



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Chimie-Biologie-Santé*

---

Présentée et soutenue par *Denis DESOUBZDANNE-DUMONT*  
Le 25 Juin 2010

**Titre :** *Radiorésistance de lignées cellulaires humaines de glioblastomes :  
recherche de biomarqueurs par métabolomique, lipidomique et  
transcriptomique*

---

### JURY

*Dr. Daniel MORVAN*  
*Dr. Alain PARIS*  
*Pr. François SEGUIN*  
*Dr. Jean SABATIER*  
*Dr. François TERCE*  
*Pr. Myriam MALET-MARTINO*

*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Examineur et président*  
*Examineur*  
*Examineur*  
*Directrice de thèse*

---

**Ecole doctorale :** *Ecole Doctorale Sciences de la Matière*  
**Unité de recherche :** *Laboratoire SPCMIB, UMR 5068 CNRS-UPS*  
**Directrice de thèse :** *Pr. Myriam MALET-MARTINO*

*« La recherche n'avancerait-elle pas plus vite,  
si au lieu de recruter des chercheurs,  
on engageait des trouveurs ? »*

*- Le chat -*

## *Remerciements*

Je tiens à remercier en tout premier lieu ma directrice de thèse, le professeur Myriam MALET-MARTINO. Elle m'a accueilli au sein de son groupe de recherche, le groupe de RMN Biomédicale du laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB, UMR 5068 CNRS-Université Paul Sabatier). Elle m'a donné l'opportunité de me former à différentes méthodes en chimie et en biologie, dont principalement la métabolomique par RMN  $^1\text{H}$ . Je lui en suis grandement reconnaissant. Je suis désormais armé pour travailler dans le monde de la recherche, à l'interface de la chimie et de la biologie.

Je souhaite ensuite remercier tous les membres de mon jury de thèse, dont particulièrement les docteurs Daniel MORVAN et Alain PARIS pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie aussi le professeur François SEGUIN, examinateur et président de mon jury, ainsi que le docteur Jean SABATIER en tant qu'examineur et ancien membre du groupe de RMN Biomédicale.

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration avec différents laboratoires. Je souhaite remercier les directeurs respectifs de ces laboratoires pour m'avoir accueilli dans leurs locaux : le docteur Michel BALTAS du laboratoire SPCMIB, le professeur Bertrand PERRET du Département de Lipoprotéines et Médiateurs Lipidiques (Centre de Physiologie de Toulouse Purpan, INSERM U563) et le professeur Gilles FAVRE du Département d'Oncogénèse, Signalisation et Innovation Thérapeutique (Institut Claudius Regaud, INSERM U563).

Je souhaite ensuite adresser de sincères remerciements au docteur François TERCE qui a accepté de m'encadrer pour la partie biologique. J'ai pu réaliser la culture cellulaire dans les locaux du CPTP, malgré les (quelques) soucis de cellules que j'ai pu rencontrer ! Mes conversations avec François ont toujours été enrichissantes et conviviales, aussi bien sur le plan scientifique que sur la vie courante. Merci beaucoup François.

J'en profite pour remercier chaleureusement toute l'équipe du thème A « Lipoprotéines, transport lipidique et dyslipidémies », dirigé par le docteur Xavier COLLET, pour m'avoir amicalement accueilli comme un biologiste. Je tiens à remercier tout particulièrement Claudia RADOJKOVIC. Toujours disponible et souriante, elle m'a formé à la biologie cellulaire et moléculaire. De véritables liens d'amitié se sont tissés entre nous.

Je remercie mes deux collaborateurs, Guillaume COMBES et Grégory TORKOMIAN, pour leur gentillesse et pour avoir contribué à l'avancée de ce travail de thèse. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans votre vie professionnelle et familiale. Je souhaite ensuite intégrer dans ces remerciements toutes les personnes du bâtiment C à Purpan, en particulier Stéphane, Gégé, Michela, Christine, Céline, Véro, Pierre, Corinne, les deux Michels, Audrey, Armelle et Jean-Philippe.

Merci infiniment à tous les membres du groupe de RMN Biomédicale : Stéphane, Véro, Robert, Brigitte, Joëlle, les deux Julie et Sacha (bon courage aux futurs docteurs : ne lâchez pas prise, ça en vaut la peine !). Je remercie tous les stagiaires qui ont participé aux activités du groupe, et tout particulièrement Edern CAHOREAU avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler. Merci pour ta contribution, je te souhaite plein de réussite pour ta thèse, tu le mérites.

J'adresse de chaleureux remerciements à Delphine BON, ancienne doctorante du laboratoire, qui m'a formé au début de ma thèse. Je te remercie pour ta gentillesse et ton amitié, félicitations pour ton poste de maître de conférences. Je termine enfin par de sincères remerciements à Franck DESMOULIN, ancien membre du groupe. J'ai pris beaucoup de plaisir en travaillant les quelques mois avec toi.

Je souhaite remercier tous les collègues du laboratoire SPCMIB, et en particulier Jean-Marc, Christiane, Sébastien, Marie, Virginie et Sandra. J'adresse de sincères remerciements à Chantal ZEDDE avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à collaborer. Je te remercie pour ton dévouement et pour m'avoir fait partager tes compétences professionnelles. Je tiens ensuite à remercier Corinne PAYRASTRE, mon ancien maître de stage, qui m'a toujours épaulé, en particulier lors des périodes difficiles. Merci pour tes conseils et ton amitié. Je remercie et je souhaite bon courage à Marie-Pierre pour sa fin de thèse, bon vent pour la suite !

Je remercie les personnes de l'Institut Claudius Regaud, en particulier Caroline DELMAS pour sa contribution au début de ma thèse, ainsi que Florence et Olivia. Je remercie les docteurs Elisabeth COHEN-JONATHAN-MOYAL et Christine TOULAS pour nous avoir fourni les cellules et sans qui ce travail de thèse n'aurait pas vu le jour.

Je tiens ensuite à remercier tous les collaborateurs qui m'ont aidé à réaliser l'étude transcriptomique : Pascal MARTIN, ingénieur de recherche INRA et spécialiste en transcriptomique, les docteurs Véronique LE BERRE et Sergueï SOKOL, ainsi que Delphine LABOURDETTE de la plateforme Biopuces de la Génopole Toulouse. Je remercie le docteur Sébastien DEJEAN de la plateforme Biostatistique de la Génopole de Toulouse, pour sa collaboration dans le traitement statistique des données métaboliques.

Un grand merci à tous les membres (et ex-membre) du Plateau de Lipidomique : Justine, Véro et Séverine, avec qui j'ai pu lier de sincères relations professionnelles et amicales. Vivement un appareil de LC-MS/MS !! Je souhaite remercier les membres du Service Commun de Spectrométrie de Masse, en particulier Cathy et Nathalie, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à collaborer. Enfin je tiens à remercier les membres du Service Commun de RMN, notamment Pierre et Marc.

Je remercie tous mes amis et notamment les Toulousains : Dom (ahh ! les soirées PES !!) & Flo, Matt & Sandrine, Elo & Matt, Céline & Damien, Hélène & Guillaume. Un grand merci à mes amis de toujours : les charentais et Maël. Je vous remercie pour votre soutien permanent.

Je souhaite terminer par remercier mes parents qui ont toujours été à mes côtés et qui m'ont permis d'en arriver là où je suis. Merci beaucoup. Je remercie ma sœur et ma cousine Aurélie : bienvenu au petit Maxime !

« At last but not at least », je remercie Lucie, ma compagne, avec qui je partage ma vie depuis plus de 5 ans et sans qui je n'aurai jamais réussi.

## *Table des matières*

LISTE DES FIGURES .....	10
LISTE DES TABLEAUX .....	15
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES .....	18
AVANT-PROPOS .....	22
CHAPITRE I : INTRODUCTION .....	25
I. GLIOBLASTOMES MULTIFORMES (GBM) : TUMEURS CEREBRALES .....	26
I.1. SYSTEME NERVEUX CENTRAL .....	26
I.2. DONNEES CLINIQUES ET LOCALISATION DES GBM .....	26
I.2.1. <i>Données cliniques</i> .....	26
I.2.2. <i>Localisation et rechute</i> .....	27
I.3. DIAGNOSTIC ET PRONOSTIC CLINIQUES DES GBM .....	28
I.3.1. <i>Classification selon l'OMS</i> .....	28
I.3.2. <i>Diagnostic des GBM</i> .....	28
I.3.3. <i>Pronostic de survie</i> .....	29
I.4. ONCOGENESE DES GBM PRIMAIRES ET SECONDAIRES .....	29
I.4.1. <i>Origine et formation des GBM</i> .....	29
I.4.2. <i>Principales altérations moléculaires</i> .....	30
I.5. VERS UNE CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES GBM .....	33
I.5.1. <i>Facteurs pronostiques moléculaires</i> .....	33
I.5.2. <i>Facteurs prédictifs moléculaires de réponse aux traitements</i> .....	35
II. RADIOTHERAPIE, RADIORESISTANCE ET RADIOSENSIBILISANTS .....	37
II.1. RADIOTHERAPIE DES GBM .....	37
II.1.1. <i>Définition et historique</i> .....	37
II.1.2. <i>Radiobiologie</i> .....	38
II.2. RADIORESISTANCE DES GBM .....	42
II.2.1. <i>Radiorésistance extrinsèque liée au microenvironnement</i> .....	42
II.2.2. <i>Radiorésistance intrinsèque</i> .....	46
II.2.3. <i>Cellules souches cancéreuses (CSC) de GBM</i> .....	54
II.3. RADIOSENSIBILISANTS ET GBM .....	56
II.3.1. <i>Témozolomide : premier radiosensibilisant des GBM</i> .....	56
II.3.2. <i>Agents anti-récepteurs de facteurs de croissance</i> .....	57
II.3.3. <i>Agents anti-angiogéniques</i> .....	57
II.3.4. <i>Inhibiteurs des voies de transduction du signal</i> .....	58
II.3.5. <i>Inhibiteurs de protéases et d'autres cibles</i> .....	59
II.3.6. <i>Résumé des radiosensibilisants présentés et perspectives</i> .....	60
III. OUTILS POUR LES ETUDES MORPHOLOGIQUES ET METABOLIQUES DES GLIOMES .....	62
III.1. PRINCIPES DE LA RMN .....	62
III.1.1. <i>Noyaux, spin et moment magnétique</i> .....	62
III.1.2. <i>Noyaux placés dans un champ magnétique</i> .....	62
III.1.3. <i>Résonance magnétique et fréquence de Larmor</i> .....	65
III.1.4. <i>Relaxations magnétiques</i> .....	66
III.2. IRM DES GLIOMES .....	67
III.2.1. <i>Principe de l'IRM</i> .....	67
III.2.2. <i>Obtention d'une image</i> .....	67
III.2.3. <i>Origine du signal et du contraste</i> .....	68
III.2.4. <i>Principales séquences d'imagerie en IRM</i> .....	68
III.2.5. <i>L'imagerie de perfusion et autres types d'imagerie</i> .....	72

<b>III.3. SRM <sup>1</sup>H DES GLIOMES</b> .....	73
<b>III.3.1. Intérêt de la SRM <sup>1</sup>H</b> .....	73
<b>III.3.2. Principe de la SRM <sup>1</sup>H</b> .....	73
<b>III.3.3. Métabolites cérébraux détectés par SRM <sup>1</sup>H</b> .....	75
<b>III.3.4. Apport de la SRM <sup>1</sup>H en clinique et en recherche</b> .....	77
<b>III.4. RMN METABOLOMIQUE ET GLIOMES</b> .....	80
<b>III.4.1. Définition de la métabolomique</b> .....	80
<b>III.4.2. MS et RMN métabolomique</b> .....	81
<b>III.4.3. Standardisation des analyses et méthodologie</b> .....	84
<b>III.4.4. Les différentes stratégies de la RMN métabolomique</b> .....	84
<b>III.4.5. RMN métabolomique pour l'étude des gliomes</b> .....	88
<b>III.4.6. Devenir de la (RMN) métabolomique</b> .....	90
<b>IV. LIPIDES ET CANCER</b> .....	<b>92</b>
<b>IV.1. LIPIDOMIQUE ET CANCER</b> .....	92
<b>IV.1.1. Lipidomique et différentes classes de lipides</b> .....	92
<b>IV.1.2. Glycéro(phospho)lipides, sphingolipides et cancer</b> .....	97
<b>IV.2. ETUDE DU METABOLISME DES PHOSPHATIDYLCHOLINES (PTDCHO)</b> .....	99
<b>IV.2.1. Composés à choline du cycle métabolique des PtdCho</b> .....	99
<b>IV.2.2. Anabolisme et catabolisme des PtdCho</b> .....	100
<b>IV.2.3. Etude in situ des flux métaboliques par marquage</b> .....	101
<b>IV.2.4. Protéines du cycle métabolique des PtdCho via CDP-Cho</b> .....	102
<b>IV.2.5. Métabolisme des PtdCho et cancer</b> .....	105
<b>V. CONTEXTE DU TRAVAIL DE THESE</b> .....	<b>111</b>
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>114</b>
<b>I. BIOLOGIE CELLULAIRE</b> .....	<b>115</b>
<b>I.1. DESCRIPTION DES LIGNEES CELLULAIRES ETUDIEES</b> .....	115
<b>I.2. CULTURE ET ENTRETIEN DES LIGNEES CELLULAIRES</b> .....	116
<b>II. PROTOCOLES STANDARDS</b> .....	<b>117</b>
<b>II.1. CONTROLE DE L'EXPRESSION DE PROTEINES PAR WESTERN-BLOT (WB)</b> .....	117
<b>II.2. DOSAGE DES PROTEINES</b> .....	118
<b>II.3. ETUDES METABOLOMIQUES</b> .....	118
<b>II.3.1. Récolte des cellules</b> .....	119
<b>II.3.2. Extraction des cellules</b> .....	119
<b>II.3.3. Récupération de la phase hydrosoluble</b> .....	119
<b>II.3.4. Préparation de l'extrait hydrosoluble deutéré</b> .....	120
<b>II.3.5. Analyses métabolomiques par RMN</b> .....	120
<b>II.3.6. Attribution spectrale et bucketing</b> .....	121
<b>II.3.7. Traitement des spectres, des données et analyses statistiques</b> .....	128
<b>II.4. ETUDES LIPIDOMIQUES</b> .....	129
<b>II.4.1. Récolte des cellules</b> .....	129
<b>II.4.2. Broyage des cellules</b> .....	129
<b>II.4.3. Extraction des cellules et préparation des échantillons</b> .....	129
<b>III. DESCRIPTION DES PROTOCOLES DES DIFFERENTS PROJETS</b> .....	<b>132</b>
<b>III.1. PROJET RR VS RS</b> .....	132
<b>III.1.1. Etude métabolomique</b> .....	132
<b>III.1.2. Etude lipidomique</b> .....	133
<b>III.1.3. Etude métabolomique de l'effet de l'hémicholinium</b> .....	133
<b>III.1.4. Etude du métabolisme des PtdCho par marquage deutéré</b> .....	134
<b>III.1.5. Etudes transcriptomique et par qRT-PCR</b> .....	140
<b>III.2. PROJET FTI-277</b> .....	145
<b>III.2.1. Etude métabolomique</b> .....	145
<b>III.2.2. Contrôle par Western-Blot de l'effet du FTI-277</b> .....	146
<b>III.3. PROJET Y</b> .....	146

<b>III.4. PROJET URB14</b> .....	147
<b>III.4.1. Etude métabolomique</b> .....	147
<b>III.4.2. Etude lipidomique</b> .....	149
<b>III.4.3. Etude de la mort cellulaire par cytométrie en flux</b> .....	149
<b>III.4.4. Vérification par WB de l'induction de RhoBN19</b> .....	150
<b>III.5. PROJET KILK2</b> .....	151
<b>III.5.1. Etude métabolomique</b> .....	151
<b>III.5.2. Vérification par WB de l'inhibition d'ILK</b> .....	152
<b>CHAPITRE III - PARTIE I : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE RADIORESISTANCE DANS QUATRE LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES DE GBM (PROJET RR VS RS).</b> .....	<b>153</b>
<b>I. PRESENTATION DU PROJET RR VS RS</b> .....	<b>154</b>
<b>II. RESULTATS</b> .....	<b>155</b>
<b>II.1. ETUDE METABOLOMIQUE</b> .....	155
<b>II.1.1. ATTRIBUTIONS SPECTRALES ET <i>BUCKETING</i></b> .....	155
<b>II.1.2. ANALYSES UNIVARIEE ET MULTIVARIEE NON SUPERVISEES</b> .....	156
<b>II.1.3. ANALYSE UNIVARIEE SUPERVISEE</b> .....	158
<b>II.1.4. ANALYSES SUPERVISEES RR VS RS</b> .....	160
<b>II.1.5. QUANTIFICATION ABSOLUE DES COMPOSES A CHOLINE</b> .....	162
<b>II.1.6. INTERPRETATION</b> .....	163
<b>II.2. ETUDE LIPIDOMIQUE</b> .....	165
<b>II.3. ETUDE METABOLOMIQUE DE L'EFFET DE L'HC-3</b> .....	167
<b>II.4.1. Analyse multivariée non supervisée</b> .....	167
<b>II.4.2. Analyse ciblée des composés à choline</b> .....	168
<b>II.4.3. Interprétation</b> .....	169
<b>II.4. ETUDE DU METABOLISME DES PTDCHO PAR MARQUAGE DEUTERE</b> .....	170
<b>II.3.1. Cinétiques des composés <math>d_9</math>-Cho</b> .....	170
<b>II.3.2. Turnover des composés à choline</b> .....	172
<b>II.3.3. Interprétation</b> .....	175
<b>II.5. ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE</b> .....	179
<b>II.5.1. Expression des gènes du métabolisme des PtdCho</b> .....	179
<b>II.5.2. Recherche de (groupe de) gènes différentiellement exprimés</b> .....	180
<b>II.5.3. Interprétation</b> .....	182
<b>II.6. ETUDE PAR QRT-PCR</b> .....	184
<b>II.6.1. Expression de certains gènes</b> .....	184
<b>II.6.2. Interprétation</b> .....	187
<b>III. DISCUSSION GENERALE</b> .....	<b>188</b>
<b>IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>191</b>
<b>CHAPITRE III - PARTIE II : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE MORT RADIO-INDUITE DANS UNE LIGNEE CELLULAIRE HUMAINE RADIOSENSIBILISEE (PROJETS FTI-277, Y, URB14 ET KILK2).</b> .....	<b>194</b>
<b>I. PROJET FTI-277</b> .....	<b>195</b>
<b>I.1. PRESENTATION DU PROJET</b> .....	195
<b>I.2. CONTROLE DE L'INHIBITION DE LA FARNESYLTRANSFERASE PAR WB</b> .....	195
<b>I.3. ETUDE METABOLOMIQUE</b> .....	196
<b>I.3.1. Attribution spectrale et bucketing</b> .....	196
<b>I.3.2. Comparaison 1 : témoins vs U87-FTI</b> .....	198
<b>I.3.3. Comparaison 2 : témoins vs U87-2Gy</b> .....	204
<b>I.3.4. Comparaison 3 : U87-2Gy vs U87-FTI/2Gy</b> .....	206
<b>I.3.5. Comparaison 4 : témoins vs U87-FTI/2Gy</b> .....	208
<b>I.3.6. Interprétation</b> .....	209
<b>I.3.7. Discussion et conclusion</b> .....	210



<b>II.</b>	<b>PROJET Y</b> .....	<b>213</b>
<b>II.1.</b>	<b>PRESENTATION DU PROJET</b> .....	213
<b>II.2.</b>	<b>ETUDE METABOLOMIQUE</b> .....	213
<b>II.2.1.</b>	<i>Attribution spectrale et bucketing</i> .....	214
<b>III.2.2.</b>	<i>Comparaison 1 : témoins vs U87-Y</i> .....	215
<b>III.2.3.</b>	<i>Comparaison 2 : témoins vs U87-2Gy</i> .....	215
<b>III.2.4.</b>	<i>Comparaison 3 : U87-2Gy vs U87-Y/2Gy</i> .....	217
<b>III.2.5.</b>	<i>Comparaison 4 : témoins vs U87-Y/2Gy</i> .....	217
<b>II.2.6.</b>	<i>Interprétation</i> .....	219
<b>II.2.7.</b>	<i>Discussion et conclusion</i> .....	221
<b>III.</b>	<b>PROJET URB14</b> .....	<b>222</b>
<b>III.1.</b>	<b>PRESENTATION DU PROJET</b> .....	222
<b>III.2.</b>	<b>ETUDE METABOLOMIQUE</b> .....	222
<b>III.2.1.</b>	<i>Attribution spectrale et bucketing</i> .....	223
<b>III.2.2.</b>	<i>Comparaison 1 : 14- vs 14+</i> .....	225
<b>III.2.3.</b>	<i>Vérification de la Dex sur les cellules U87</i> .....	226
<b>III.2.4.</b>	<i>Comparaison 2 : 14-/2 vs 14+/2</i> .....	227
<b>III.2.5.</b>	<i>Comparaison 3 : 14-/2bis vs 14+/2bis</i> .....	229
<b>III.2.6.</b>	<i>Interprétation et discussion</i> .....	231
<b>III.2.6.1.</b>	<i>Effet de l'association irradiation + induction de RhoBN19</i> .....	231
<b>III.2.6.2.</b>	<i>Effet d'une induction prolongée de RhoBN19 (protocole B)</i> .....	236
<b>III.3.</b>	<b>ETUDE LIPIDIOMIQUE</b> .....	238
<b>III.3.1.</b>	<i>Présentation de l'étude et résultats</i> .....	238
<b>III.3.2.</b>	<i>Interprétation</i> .....	239
<b>III.4.</b>	<b>ETUDE DE LA MORT CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX</b> .....	240
<b>III.3.1.</b>	<i>Présentation de l'étude</i> .....	240
<b>III.3.2.</b>	<i>Résultats</i> .....	241
<b>III.3.3.</b>	<i>Interprétation et discussion</i> .....	242
<b>III.5.</b>	<b>CONCLUSION DU PROJET URB14</b> .....	243
<b>IV.</b>	<b>PROJET KILK2</b> .....	<b>246</b>
<b>IV.1.</b>	<b>PRESENTATION DU PROJET</b> .....	246
<b>IV.2.</b>	<b>CONTROLE DE L'INHIBITION DE LA TRANSCRIPTION D'ILK PAR WB</b> .....	246
<b>IV.3.</b>	<b>ETUDE METABOLOMIQUE</b> .....	247
<b>IV.3.1.</b>	<i>Attribution spectrale et bucketing</i> .....	248
<b>IV.3.2.</b>	<i>Comparaison 1 : K- vs K+</i> .....	249
<b>IV.3.3.</b>	<i>Comparaison 2 : T- vs T+</i> .....	251
<b>IV.3.4.</b>	<i>Comparaison 3 : K-/2 vs K+/2</i> .....	252
<b>IV.3.5.</b>	<i>Comparaison 4 : T-/2 vs T+/2</i> .....	254
<b>IV.3.6.</b>	<i>Comparaisons 5 et 6 : K- vs K+/2 et T- vs T+/2</i> .....	256
<b>IV.3.7.</b>	<i>Interprétation et discussion</i> .....	258
	<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>260</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>265</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>285</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>290</b>

## *Liste des figures*

FIGURE 1. IMAGE IRM (IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE) D'UN GBM. ....	27
FIGURE 2. HYPOTHESES SUR LES VOIES ALTERNATIVES DE PROGRESSION TUMORALE DANS LES GLIOMES (HOANG-XUAN ET AL., 2005). ABBREVIATIONS : AII/III, ASTROCYTOMES DE GRADE II/III ; OII/III, OLIGODENDROGLIOMES DE GRADE II/III ; GBMO, GLIOBLASTOME A COMPOSANTE OLIGODENDROGLIALE. ....	30
FIGURE 3. FREQUENCE DES ALTERATIONS GENETIQUES OBSERVEES DANS LES TROIS VOIES CRITIQUES DE SIGNALISATION DES GBM : (A) VOIE RTK/RAS/PI(3)K, (B) VOIE P53 ET (C) VOIE Rb (2008). LES COULEURS ROUGE ET BLEU REPRESENTENT RESPECTIVEMENT LES AMPLIFICATIONS ET LES DELETIONS GENETIQUES. ....	34
FIGURE 4. LESIONS DE L'ADN PAR EFFETS DIRECT ET INDIRECT DES RI. ABBREVIATION : M, MOLECULE. ....	39
FIGURE 5. CYCLE DE DIVISION CELLULAIRE. ....	40
FIGURE 6. AUGMENTATION DE L'HYPOXIE DANS DES CELLULES TUMORALES ENTOURANT UN CAPILLAIRE SANGUIN (WWW.ACCESSPHARMA.COM/IMAGES/HYPOXIA.JPG). ....	43
FIGURE 7. ETAPES DE L'ANGIOGENESE DES GBM (WONG ET AL., 2009). ABBREVIATIONS : CE, CELLULES ENDOTHELIALES ; MEC, MATRICE EXTRA-CELLULAIRE. ....	45
FIGURE 8. PRINCIPALE VOIE DE L'AUTOPHAGIE (LEFRANC ET AL., 2007). ABBREVIATIONS : PDK-1, PHOSPHOINOSITIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASE-1 ; LC3-I/II, LIGHT CHAIN I/II. ....	50
FIGURE 9. REGULATION DE L'ACTIVITE DE HIF-1 ET GENES ACTIVES PAR HIF-1 (TREDAN ET AL., 2008). ABBREVIATIONS : HRE, HYPOXIA RESPONSIVE ELEMENT ; P300/CBP, FACTEURS DE TRANSCRIPTION AUXILIAIRES P300 ET CBP (CREB BINDING PROTEIN) ; VHL, VON HIPPEL-LINDAU. ....	53
FIGURE 10. ILLUSTRATION DES VOIES DE SIGNALISATION ET DES AGENTS RADIOSENSIBILISANTS DANS LES GBM. ABBREVIATIONS : PIP3, PHOSPHATIDYL-INOSITOL TRIPHOSPHATE. ....	60
FIGURE 11. SCHEMA DE NOYAUX DE SPIN $\frac{1}{2}$ PLACES DANS UN CHAMP MAGNETIQUE $B_0$ (A DROITE) OU NON (A GAUCHE). LES MOMENTS MAGNETIQUES DES NOYAUX $\uparrow$ SONT DANS LE SENS PARALLELE AU CHAMP ET CEUX DES NOYAUX $\downarrow$ SONT DANS LE SENS ANTI-PARALLELE AU CHAMP (WWW.CHEM.UCALGARY.CA). ....	63
FIGURE 12. LES CONES DE PRECESSION (A GAUCHE) ET LE MOMENT MAGNETIQUE RESULTANT (A DROITE). ....	64
FIGURE 13. BASCULEMENT DE $M_0$ SUR L'AXE Y' APRES L'APPLICATION DE L'ONDE RF DE FREQUENCE $\gamma_1$ . ....	65
FIGURE 14. RELAXATIONS LONGITUDINALE ( $T_1$ ) ET TRANSVERSALE ( $T_2$ ) D'UN SYSTEME DE SPIN $\frac{1}{2}$ . ....	66
FIGURE 15. STRUCTURE DE BASE D'UNE SEQUENCE D'IMAGERIE. ABBREVIATIONS : CAD, CONVERTISSEUR ANALOGIQUE DIGITAL ; TE, TEMPS D'ECHO ; TR, TEMPS DE REPETITION. ....	69
FIGURE 16. IMAGES D'UN ASTROCYTOME ANAPLASIQUE : IMAGE PONDEREE EN $T_1$ (A) ; IMAGE FLAIR (B) ; IMAGE PONDEREE EN DIFFUSION (C) (CHA, 2009). ....	71
FIGURE 17. IMAGES CSI 3D D'UN GLIOME. (1) REPRESENTE QUATRE COUPES DE SEQUENCES IRM FLAIR SUR LESQUELLES EST REPRESENTE LE QUADRILLAGE DES VOXELS DE CSI ; (2) REPRESENTE UNE COUPE DE CSI AVEC LES VOXELS CORRESPONDANTS ; (3) REPRESENTE 3 VOXELS SELECTIONNES DANS UNE COUPE DE CSI (LAPRIE, 2009). ....	74
FIGURE 18. SPECTRE SRM $^1H$ D'UN VOXEL DE CERVEAU HUMAIN SAIN (SIBTAIN ET AL., 2007). ....	75
FIGURE 19. ORGANISATION BIOLOGIQUE DES «-OMES » (GRIFFIN & SHOCKCOR, 2004). ....	81

FIGURE 20. SPECTRE RMN <sup>1</sup> H (REGION ALIPHATIQUE) D'UN EXTRAIT HYDROSOLUBLE D'OLIGODENDROGLIOME REALISE DANS L'ACIDE PERCHLORIQUE. 1, VALINE, LEUCINE, ISOLEUCINE ; 2, LACTATE ; 3, GLUTAMATE ; 4, GLUTAMINE ; 5, ACETATE ; 6, NAA ; 7, METHIONINE ; 8, SUCCINATE ; 9, CREATINE ; 10, TAURINE ; 11, CHOLINE ; 12, PHOSPHORYLCHOLINE ; 13, GLYCEROPHOSPHORYLCHOLINE ; 14, MYO-INOSITOL ; 15, BETAINE ; 16, SCYLLO-INOSITOL.....	83
FIGURE 21. ILLUSTRATION DU <i>BUCKETING</i> D'UN ENSEMBLE DE SPECTRES DANS LA ZONE SPECTRALE DES COMPOSES A CHOLINE ET DE LA TAURINE (3,25-3,05 PPM).....	86
FIGURE 22. CYCLE METABOLIQUE DES PTDCHO. ABREVIATIONS : ADP, ADENOSINE DIPHOSPHATE ; ATP, ADENOSINE TRIPHOSPHATE ; CMP, CYTIDINE MONOPHOSPHATE ; CTP, CYTIDINE TRIPHOSPHATE ; DG, DIGLYCERIDE ; GP, GLYCEROPHOSPHATE ; PPI, PYROPHOSPHATE. ENZYMES CITEES : LES TRANSPORTEURS DE CHOLINE REPRESENTES PAR LES DEUX FAMILLES OCT (ORGANIC CATION TRANSPORTER) ET CTL (CHOLINE TRANSPORTER-LIKE) ; LA CHOLINE KINASE (CHO <sub>K</sub> ) ; LA CTP : PHOSPHOCHOLINE CYTIDYLTRANSFERASE (CT) ; LA DIACYLGLYCEROL CHOLINEPHOSPHOTRANSFERASE (CPT) ; LA PHOSPHOLIPASE C (PLC) ; LA PHOSPHOLIPASE D (PLD) ; LA PHOSPHOLIPASE A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ) ; LA LYSO-PHOSPHOLIPASE (L-PL) ; LA GLYCEROPHOSPHOCHOLINE PHOSPHODIESTERASE (GPCHO-PDE).....	100
FIGURE 23. SPECTRES DE MASSE DES PTDCHO ET DES D <sub>9</sub> -PTDCHO DE LYMPHOCYTES HUMAINS : (A) SPECTRE GLOBAL, (B) SPECTRE DES PTDCHO EN SELECTIONNANT TOUS LES PRECURSEURS DE L'ION 184,0 (D) ET SPECTRE DES D <sub>9</sub> -PTDCHO EN SELECTIONNANT TOUS LES PRECURSEURS DE L'ION 193,0 (POSTLE ET AL., 2007).....	101
FIGURE 24. PHOTOS DES LIGNEES CELLULAIRES U87 (A), U251 (B), SF763 (C) ET SF767 (D).....	115
FIGURE 25. ATTRIBUTION DU SPECTRE RMN <sup>1</sup> H D'UN EXTRAIT HYDROSOLUBLE D'UN ECHANTILLON DE LA LIGNEE KILK2 : (A) SPECTRE TOTAL ; (B) ZOOM DE LA REGION AROMATIQUE (8,5-5,8 PPM).....	125
FIGURE 26. (A) CHROMATOGRAMMES DES COMPOSES HYDROSOLUBLES MARQUES ET DU SI CORRESPONDANT ; (B) CHROMATOGRAMMES DE CERTAINS COMPOSES LIPOSOLUBLES MARQUES ET DU SI CORRESPONDANT. ABREVIATIONS : CPS, COUPS PAR SECONDE ; SI, STANDARD INTERNE.....	136
FIGURE 27. COURBES DE CALIBRATION DE : (A) LA D <sub>9</sub> -CHO DANS UN EXTRAIT HYDROSOLUBLE DE CELLULES SF767 (■) ET DANS L'EAU MILLI-Q (●) ; (B) LA SME D18:1/6:0 DANS UN EXTRAIT LIPOSOLUBLE DE CELLULES SF767 (■) ET DANS UN MELANGE MeOH/CHCl <sub>3</sub> (2:1) (●). ABREVIATION : FRR, FACTEUR DE REPONSE RELATIF.....	138
FIGURE 28. COURBES DE CALIBRATION DE : (A) GPCHO (■) ET CDP-CHO (●) ; (B) PCHO ; (C) PTDCHO 16:0/16:0 ; (D) L-PTDCHO 18:1.....	139
FIGURE 29. REPONSE DES QUATRE LIGNEES CELLULAIRES DE GBM AUX RI (DELMAS ET AL., 2002). ABREVIATIONS : RR, RADIORESISTANT(ES) ; RS, RADIOSENSIBLE(S) ; SF2, FRACTION DE SURVIE D'UNE LIGNEE CELLULAIRE APRES UNE IRRADIATION DE 2 GY.....	154
FIGURE 30. ATTRIBUTIONS SPECTRALES ET DEFINITION DES VARIABLES D'INTERET SUR UN SPECTRE RMN <sup>1</sup> H DE L'EXTRAIT HYDROSOLUBLE D'UN ECHANTILLON DE LA LIGNEE U251 : (A) SPECTRE TOTAL ; (B) ETALEMENT DE LA REGION AROMATIQUE. ABREVIATION : VAR, VARIABLE.....	155
FIGURE 31. RESULTATS EN ANALYSE UNIVARIEE NON SUPERVISEE : (A) VARIANCE DE CHACUNE DES VARIABLES ; (B) NOMBRE DE FOIS QU'UN ECHANTILLON EST CONSIDERE COMME <i>OUTLIER</i> ; (C) NOMBRE DE FOIS QU'UNE VARIABLE EST CONSIDEREE COMME <i>OUTLIER</i> ; (D) <i>BOX PLOT</i> DES VARIABLES 1 A 10.....	157

## Liste des figures

FIGURE 32. RESULTATS EN ACP (SANS UV) DES 40 ECHANTILLONS DU PROJET RR vs RS : (A) <i>SCORE PLOT</i> ; (B) <i>LOADING PLOT</i> .	158
FIGURE 33. <i>BOX PLOTS</i> ET <i>VIOLIN PLOTS</i> DES VARIABLES LES PLUS DISCRIMINANTES ENTRE LES QUATRE LIGNEES.	159
FIGURE 34. <i>BOX PLOT</i> ET <i>VIOLIN PLOT</i> DE LA VARIABLE GPCHO+PCHO (VAR. 25+26) DANS LES GROUPES RR ET RS.	160
FIGURE 35. RESULTAT DU MODELE RR vs RS OBTENU PAR PLS-DA AVEC UV : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> .	161
FIGURE 36. CONCENTRATIONS ABSOLUES (EN NMOL/MILLION DE CELLULES) DES COMPOSES A CHOLINE HYDROSOLUBLES DANS LES QUATRE LIGNEES CELLULAIRES.	162
FIGURE 37. CONCENTRATIONS (EN NMOL/MG DE PROTEINES) DE DIFFERENTES FAMILLES DE LIPIDES. ABREVIATIONS : <i>CHOL</i> , CHOLESTEROL ; <i>CHOL-EST</i> , CHOLESTEROL ESTERIFIE ; <i>CER</i> , CERAMIDES ; <i>DG</i> , <i>DIGLYCERIDES</i> ; <i>TD</i> , TRIGLYCERIDES ; <i>PTDCHO</i> , PHOSPHATIDYLCHOLINES ; <i>PTDE</i> , PHOSPHATIDYLETHANOLAMINES ; <i>PTDI</i> , PHOSPHATIDYLINOSITOLS ; <i>PTDS</i> , PHOSPHATIDYLSERINES ; <i>SME</i> , <i>SPHINGOMYELINES</i> .	165
FIGURE 38. RESULTATS EN ACP (SANS UV) DE L'EFFET DE L'HC-3 SUR LES LIGNEES RR ET RS : (A) <i>SCORE PLOT</i> ; (B) <i>LOADING PLOT</i> .	167
FIGURE 39. AIRES RELATIVES DES COMPOSES A CHOLINE HYDROSOLUBLES.	168
FIGURE 40. CINETIQUES D'INCORPORATION OU DE FORMATION DES COMPOSES DEUTERES (NMOL/MG DE PROTEINES) : (A) D <sub>9</sub> -CHO ; (B) D <sub>9</sub> -PCHO ; (C) D <sub>9</sub> -CDP-CHO, (D) D <sub>9</sub> -GPCHO, (E) D <sub>9</sub> -PTDCHO (SOMME), (F) D <sub>9</sub> -L-PTDCHO 18:1 ET (G) D <sub>9</sub> -SME D18:1/16:0.	170
FIGURE 41. <i>TURNOVER</i> DES COMPOSES A CHOLINE HYDROSOLUBLES : (A) CHO ; (B) PCHO ; (C) CDP-CHO ; (D) GPCHO, (E) PTDCHO (SOMME) ; (F) L-PTDCHO 18:1 ET (G) SME D18:1/16:0.	173
FIGURE 42. <i>SCATTER PLOT</i> DE L'EXPRESSION DES 26 GENES SELECTIONNES (ECHELLE LOGARITHMIQUE) IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES PTDCHO.	179
FIGURE 43. EXPRESSIONS GENIQUES, PAR RAPPORT AU GENE DE REFERENCE B-ACTINE, DE CERTAINS GENES DANS LES QUATRE LIGNEES CELLULAIRES (U87 : LIGNEE CONTROLE). ABREVIATION : <i>REF.</i> , GENE DE REFERENCE.	184
FIGURE 44. EXPRESSIONS GENIQUES, PAR RAPPORT AU GENE DE REFERENCE B2M, DE CERTAINS GENES DANS LES QUATRE LIGNEES CELLULAIRES (U87 : LIGNEE CONTROLE).	185
FIGURE 45. VERIFICATION PAR <i>WESTERN-BLOT</i> DE L'INHIBITION DE LA FARNESYLTRANSFERASE SUR LA PROTEINE HDJ-2 (POIDS MOLECULAIRE ~ 50 KDA).	195
FIGURE 46. RESULTATS EN ANALYSE UNIVARIEE NON SUPERVISEE : (A) <i>BOX PLOTS</i> DES 60 VARIABLES, (B) NOMBRE DE FOIS OU LES VARIABLES SONT <i>OUTLIERS</i> DANS LES QUINZE INDIVIDUS CONSIDERES, (C) VARIANCE ET (D) ETENDUE DE CHAQUE VARIABLE.	198
FIGURE 47. RESULTAT EN ANALYSE UNIVARIEE NON SUPERVISEE : NOMBRE DE VARIABLES <i>OUTLIERS</i> POUR CHAQUE INDIVIDU.	199
FIGURE 48. <i>SCORE PLOTS</i> DES ACP-CLASS : GROUPE TEMOINS SANS (A) ET AVEC (C) UV ; GROUPE U87-FIT SANS (B) ET AVEC (D) UV.	199

FIGURE 49. RESULTATS EN ACP-X : <i>SCORE PLOT</i> SANS (A) ET AVEC (C) UV ; <i>LOADING PLOT</i> SANS (B) ET AVEC (D) UV.....	200
FIGURE 50. RESULTATS EN ANALYSE UNIVARIEE SUPERVISEE : (A) TEST DE WELCH ; TESTS DE NORMALITE DU GROUPE TEMOINS (B) ET DU GROUPE U87-FTI (C).....	201
FIGURE 51. <i>BOX PLOTS</i> ET <i>VIOLIN PLOTS</i> PAR NIVEAU DES VARIABLES SIGNIFICATIVEMENT DISCRIMINANTES ( $P < 0,05$ ) ENTRE LES GROUPES TEMOINS ET U87-FTI .....	201
FIGURE 52. RESULTATS DE L'ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA SANS UV) DE LA COMPARAISON « TEMOINS vs U87-FTI » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> (TEMOINS – U87-FTI).....	202
FIGURE 53. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA SANS UV) DE LA COMPARAISON « TEMOINS vs U87-2GY » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> (TEMOINS – U87-2GY).....	205
FIGURE 54. <i>BOX PLOTS</i> ET <i>VIOLIN PLOTS</i> PAR NIVEAU DES VARIABLES SIGNIFICATIVEMENT DISCRIMINANTES ( $P < 0,05$ ) ENTRE LES GROUPES U87-2GY ET U87-FTI/2GY.....	206
FIGURE 55. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA SANS UV) DE LA COMPARAISON « U87-2GY vs U87-FTI/2GY » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> (U87-2GY – U87-FTI/2GY). .....	207
FIGURE 56. <i>BOX PLOTS</i> ET <i>VIOLIN PLOTS</i> DES VARIABLES SIGNIFICATIVEMENT DISCRIMINANTES GLN (46) ET ALA (51) ENTRE LES GROUPES TEMOINS ET U87-FTI/2GY.....	208
FIGURE 57. VALEURS DES VARIABLES SELECTIONNEES (EN AIRE NORMALISEE/MG DE PROTEINES) DANS LES INDIVIDUS TEMOINS, U87-FTI, U87-2GY ET U87-FTI/2GY.....	210
FIGURE 58. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (OPLS-DA AVEC UV) DE LA COMPARAISON « TEMOINS vs U87-2GY » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOTS</i> (TEMOINS – U87-2GY).....	216
FIGURE 59. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (OPLS-DA AVEC UV) DE LA COMPARAISON « TEMOINS vs U87-Y/2GY » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOTS</i> (TEMOINS – U87-FTI/2GY).....	218
FIGURE 60. VALEURS DES VARIABLES SELECTIONNEES DANS LES QUATRE GROUPES. ....	220
FIGURE 61. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA AVEC UV) DE LA COMPARAISON « 14- vs 14+ » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> [(14-) - (14+)]. ...	225
FIGURE 62. <i>BOX PLOTS</i> ET <i>VIOLIN PLOTS</i> DE LA VARIABLE TAU (VAR. 32) DANS LES GROUPES 14-/2 ET 14+/2.....	227
FIGURE 63. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA AVEC UV) DU MODELE « 14-/2 vs 14+/2 » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> (14-/2 – 14+/2)....	228
FIGURE 64. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA AVEC UV) DE LA COMPARAISON « 14-/2BIS vs 14+/2BIS » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> (14-/2BIS – 14+/2BIS).....	230
FIGURE 65. VALEURS (EN $A_{\text{NORMALISEE}}$ /MG DE PROTEINES) DES VARIABLES SELECTIONNEES DANS LES QUATRE GROUPES OBTENUES SELON LE PROTOCOLE A : 14-, 14+, 14-/2 ET 14+/2.....	232
FIGURE 66. POURCENTAGES DE VARIATION DES METABOLITES ENTRE LES PROTOCOLES A ET B.....	236

---

FIGURE 67. CONCENTRATION DES GPL ( $\mu\text{G}/\text{MG}$ DE PROTEINES) ET DES SL (EN $\text{NMOL}/\text{MG}$ DE PROTEINES) DANS LES INDIVIDUS 14-, 14+, 14-/2 ET 14+/2 .....	238
FIGURE 68. EXEMPLES DE <i>DOT PLOTS</i> OBTENUS PAR CYTOMETRIE EN FLUX POUR LES INDIVIDUS 14-, 14+, 14-/2 ET 14+/2.....	240
FIGURE 69. POPULATION CELLULAIRE (EN %) DANS LES HUIT CONDITIONS OBTENUES SELON LES PROTOCOLES A ET B. ....	241
FIGURE 70. VERIFICATION DE L'INHIBITION DE LA TRANSCRIPTION DE LA PROTEINE ILK (~ 59 kDA) DANS LES CELLULES KILK2 ET T2K APRES INDUCTION A LA DOXYCYCLINE (DOX), AVEC ET SANS IRRADIATION (2 GY). ....	246
FIGURE 71. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA AVEC UV) DE LA COMPARAISON « K- vs K+ » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> [(K-) – (K+)]. ....	250
FIGURE 72. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA AVEC UV) DU MODELE « K-/2 vs K+/2 » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> [(K-/2) – (K+/2)]. .	253
FIGURE 73. RESULTATS EN ANALYSE MULTIVARIEE SUPERVISEE (PLS-DA AVEC UV) DE LA COMPARAISON « T-/2 vs T+/2 » : (A) <i>SCORE PLOT</i> , (B) <i>LOADING PLOT</i> , (C) <i>VIP PLOT</i> ET (D) <i>COEFFICIENT PLOT</i> [(T-/2) – (T+/2)]. .....	255
FIGURE 74. VALEURS DES VARIABLES SELECTIONNEES (EN $A_{\text{NORMALISEE}}/\text{MG}$ DE PROTEINES) DANS LES QUATRE GROUPES RESPECTIFS DES LIGNEES KILK2 ET T2K : K-, K+, K-/2, K+/2, T-, T+, T-/2 ET T+/2.....	257

## *Liste des tableaux*

TABLEAU 1. PRINCIPALES ALTERATIONS GENETIQUES DES GBM PRIMAIRES ET SECONDAIRES. ....	32
TABLEAU 2. ESSAIS CLINIQUES D'AGENTS RADIOSENSIBILISANTS POUR LE TRAITEMENT DES GBM. ....	61
TABLEAU 3. METABOLITES OBSERVES EN SRM <sup>1</sup> H CEREBRALE. ....	76
TABLEAU 4. LES SIX CLASSES DE LIPIDES CHEZ LES MAMMIFERES, ACCOMPAGNEES D'EXEMPLES. ....	94
TABLEAU 5. STRUCTURE DES METABOLITES ET LIPIDES A CHOLINE IMPLIQUES DANS LE CYCLE METABOLIQUE DES PHOSPHATIDYLCHOLINES (PTDCHO). ....	99
TABLEAU 6. DONNEES SPECTRALES (RMN <sup>1</sup> H) DES METABOLITES PRESENTS DANS LES CELLULES DE GBM A pH = 10 ET POUR Δ <sub>TAU</sub> = 3,080 ± 0,003 PPM. ....	122
TABLEAU 7. TRANSITIONS IONIQUES ET TEMPS DE RETENTION DES COMPOSES A CHOLINE ....	137
TABLEAU 8. COUPLES DE PRIMERS ET CONDITIONS D'UTILISATION ....	144
TABLEAU 9. METABOLITES SIGNIFICATIVEMENT DISCRIMINANTS INTER-LIGNEES (P-VALUES OBTENUES PAR LE TEST DE WELCH) ET POURCENTAGES DE VARIATION (± SD). ....	159
TABLEAU 10. CONCENTRATIONS ABSOLUES (EN NMOL/MILLION DE CELLULES) DES COMPOSES A CHOLINE HYDROSOLUBLES. ....	162
TABLEAU 11. COMPOSES A CHOLINE SIGNIFICATIVEMENT DISCRIMINANTS INTER-LIGNEES (P-VALUES OBTENUES PAR LE TEST DE STUDENT). ....	163
TABLEAU 12. CONCENTRATIONS (EN NMOL/MG PROT) DE DIFFERENTES FAMILLES DE LIPIDES. ....	165
TABLEAU 13. FAMILLES DE LIPIDES SIGNIFICATIVEMENT DISCRIMINANTES INTER-LIGNEES (P-VALUES OBTENUES PAR LE TEST DE STUDENT). ....	166
TABLEAU 14. AIRES RELATIVES DES COMPOSES A CHOLINE HYDROSOLUBLES (% DE LA SOMME DES AIRES). ....	168
TABLEAU 15. CONCENTRATION DES COMPOSES A CHOLINE DEUTERES (EN NMOL/MG DE PROTEINES) AU BOUT DE 8 H. ....	171
TABLEAU 16. COMPOSES A D <sub>9</sub> -CHO SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTS INTER-LIGNEES AU BOUT DE 8 H (P-VALUES SUR LES VALEURS EN NMOL/MG DE PROTEINES). ....	172
TABLEAU 17. TURNOVER DES COMPOSES A CHOLINE (FRACTION DU COMPOSE DEUTERE CONSIDERE PAR RAPPORT AU POOL DU COMPOSE CONSIDERE) AU BOUT DE 8 H. ....	174
TABLEAU 18. FRACTION DES COMPOSES A D <sub>9</sub> -CHO (PAR RAPPORT A LEUR POOL RESPECTIF) SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTS INTER-LIGNEES AU BOUT DE 8 H (P-VALUES SUR LES FRACTIONS). ....	175
TABLEAU 19. EXPRESSION DES GENES (VALEURS ORIGINALES) PLCB1 ET SLC5A7 DANS LES QUATRE LIGNEES. .....	180
TABLEAU 20. GENES OU GROUPES DE GENES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMES DANS LES LIGNEES RR (SUR- EXPRIMES : ↑ RR OU SOUS-EXPRIMES : ↓ RR) PAR RAPPORT AUX LIGNEES RS. ....	181
TABLEAU 21. EXPRESSIONS GENIQUES (± SD) PAR RAPPORT A CHACUN DES GENES DE REFERENCE (B-ACTINE ET B2M) ET EN CONSIDERANT LA LIGNEE U87 COMME LIGNEE CONTROLE. ....	185
TABLEAU 22. EXPRESSIONS GENIQUES SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES INTER-LIGNEES (P-VALUES OBTENUES PAR LE TEST DE STUDENT). ....	186

## Liste des tableaux

---

TABLEAU 23. LISTE DES <i>BUCKETS</i> (NUMEROS DE VARIABLES, DEPLACEMENTS CHIMIQUES ET ATTRIBUTIONS) POUR L'ETUDE METABOLOMIQUE DU PROJET FTI-277. ....	197
TABLEAU 24. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DANS LA COMPARAISON « TEMOINS VS U87-FTI » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	203
TABLEAU 25. LISTE (ORDRE DECROISSANT) DES VARIABLES POSSEDANT UNE <i>P-VALUE</i> SIGNIFICATIVE ( $P < 0,05$ ) ENTRE LES GROUPES TEMOINS ET U87-2GY. ....	204
TABLEAU 26. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DANS LA COMPARAISON « U87-2GY VS U87-FTI/2GY » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	207
TABLEAU 27. VALEURS DES VARIABLES DISCRIMINANTES DES COMPARAISONS 1 ET 3 DANS LES QUATRE CONDITIONS ET <i>P-VALUES</i> DE CES VARIABLES ENTRE LES GROUPES U87-FTI/2GY ET TEMOINS. ....	209
TABLEAU 28. LISTE DES <i>BUCKETS</i> (NUMEROS DE VARIABLES, DEPLACEMENTS CHIMIQUES ET ATTRIBUTIONS) POUR L'ETUDE METABOLOMIQUE DU PROJET Y. ....	214
TABLEAU 29. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DANS LA COMPARAISON « TEMOINS VS U87-2GY » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	216
TABLEAU 30. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DISCRIMINANT DANS LA COMPARAISON « TEMOINS VS U87-Y/2GY » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	218
TABLEAU 31. VALEURS DES VARIABLES DISCRIMINANTES (EN ROUGE) OU COMPLEMENTAIRES (EN NOIR) DES COMPARAISONS 2 ET 4 DANS LES QUATRE CONDITIONS ET <i>P-VALUES</i> DE CES VARIABLES ENTRE LES GROUPES TEMOINS ET U87-Y/2GY. ....	220
TABLEAU 32. LISTE DES <i>BUCKETS</i> (NUMEROS DE VARIABLES, DEPLACEMENTS CHIMIQUES ET ATTRIBUTIONS) POUR L'ETUDE METABOLOMIQUE DU PROJET URB14. ....	224
TABLEAU 33. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DE LA COMPARAISON « 14- vs 14+ » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	226
TABLEAU 34. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS ENTRE LES GROUPES 87- ET 87+, AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	226
TABLEAU 35. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DANS LA COMPARAISON « 14-/2 vs 14+/2 » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	228
TABLEAU 36. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DE LA COMPARAISON « 14-/2BIS vs 14+/2BIS » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	230
TABLEAU 37. VALEURS DES VARIABLES DISCRIMINANTES ENTRE LES INDIVIDUS 14-, 14+, 14-/2 ET 14+/2 (PROTOCOLE A), AINSI QUE LA VALEUR DES <i>P-VALUES</i> DES VARIABLES ENTRE LES GROUPES 14- ET 14+/2. ....	232
TABLEAU 38. VALEURS DE QUELQUES METABOLITES DANS LES INDIVIDUS 14-/2 ET 14+/2 (PROTOCOLE A) ET 14-/2BIS ET 14+/2BIS (PROTOCOLE B), AINSI QUE LEURS <i>P-VALUES</i> ET LEURS POURCENTAGES DE VARIATION. ....	236
TABLEAU 39. CONCENTRATION DES GPL (EN $\mu$ G/MG DE PROTEINES) ET DES SL (EN NMOL/MG DE PROTEINES) DANS LES INDIVIDUS 14-, 14+, 14-/2 ET 14+/2. ....	238
TABLEAU 40. POURCENTAGES RELATIFS ( $\pm$ SD) OBTENUS PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES QUATRE ETATS CELLULAIRES CONSIDERES DANS LES HUIT CONDITIONS DES CELLULES URB14. ....	241
TABLEAU 41. LISTE DES <i>BUCKETS</i> (NUMEROS DE VARIABLES, DEPLACEMENTS CHIMIQUES ET ATTRIBUTIONS) POUR L'ETUDE METABOLOMIQUE DU PROJET KILK2. ....	248



TABLEAU 42. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DU MODELE « K- vs K+ » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD).....	250
TABLEAU 43. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DE LA COMPARAISON « T- vs T+ » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	251
TABLEAU 44. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DE LA COMPARAISON « K-/2 vs K+/2 » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD).....	253
TABLEAU 45. VALEURS DES <i>P-VALUES</i> DES METABOLITES DISCRIMINANTS DE LA COMPARAISON « T-/2 vs T+/2 » AINSI QUE LEUR POURCENTAGE DE VARIATION ( $\pm$ SD). ....	255
TABLEAU 46. VALEUR DES VARIABLES DISCRIMINANTES ENTRE LES INDIVIDUS K-, K+, K-/2 ET K+/2, ET <i>P-VALUES</i> DES VARIABLES ENTRE LES GROUPES K- ET K+/2.....	256
TABLEAU 47. VALEUR DES VARIABLES DISCRIMINANTES ENTRE LES INDIVIDUS T-, T+, T-/2 ET T+/2, ET <i>P-VALUES</i> DES VARIABLES ENTRE LES GROUPES T- ET T+/2.....	257

### *Liste des abréviations et acronymes*

AA	: Acide Arachidonique
Ace	: Acétate
ACP	: Analyse en Composantes Principales
ADN(c)	: Acide DésoxyriboNucléique (complémentaire)
Ala	: Alanine
ALP	: Alkylphospholipides
ANOVA	: <i>ANalysis Of VAriance</i>
Asp	: Aspartate
AXP	: Adénosine Mono/Di/Tri-Phosphate
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumine de Sérum Bovin)
CDB	: Cassures Doubles Brins
CDP-Cho	: Cytidyl-Diphosphate Choline
Cer	: Céramides
Cho	: Choline
Chol(-est)	: Cholestérol (estérifié)
ChoK	: Choline kinase
CHT1	: <i>High affinity CHoline Transporters 1</i>
CPT	: Diacylglycérol CholinePhosphoTransférase
Cr	: Créatine
CSC	: Cellules Souches Cancéreuses
CT	: CTP:phosphocholine CytidylTransférase
CTL	: <i>Choline Transporters-Like</i>
CTP	: Cytidine-TriPhosphate
d <sub>9</sub> -Cho	: [triméthyl-d <sub>9</sub> ]-Choline
Dex	: Dexaméthasone
Dox	: Doxycycline
DG/TG	: Di-/Tri-Glycérides
EGF(R)	: <i>Epidermal Growth Factor (Receptor)</i>
ESI	: <i>Electrospray Source Ionisation</i>
FACS	: <i>Fluorated-Activated Cell Sorting</i> (Cytométrie en flux)
FDR	: <i>False Discovery Rate</i>

For	: Formate
FRR	: Facteur de Réponse Relatif
FTI	: <i>FarnesylTransferase Inhibitor</i> (Inhibiteur de FarnésylTransférase)
Fum	: Fumarate
GBM 1 et 2	: GlioBlastomes Multiformes primaires et secondaires
GC	: <i>Gas Chromatography</i> (Chromatographie gazeuse)
GDP/GTP	: Guanosine Di/Tri-Phosphate
G(P)L	: Glycéro(Phospho)Lipides
Gln	: Glutamine
Glu	: Glutamate
Gly	: Glycine
GO	: <i>Gene Ontology</i>
GPCho	: GlycéroPhospho(ryl)Choline
GPCho-DE	: GlycéroPhosphoCholine DiEstérase
GSH ox/red	: Glutathion oxydé/réduit
HC-3	: Hémicholinium
HIF	: <i>Hypoxia Inductible Factor</i>
HPLC/UPLC	: <i>High/Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Chromatographie Liquide Haute/Ultra Performance)
HR-MAS	: <i>High Resolution-Magic Angle Spinning</i>
ICR	: Institut Claudius Regaud (Toulouse)
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
Ile	: <i>Iso-leucine</i>
ILK	: <i>Integrin-Linked Kinase</i>
IRM	: Imagerie par Résonance Magnétique
Lac	: Lactate
LC	: <i>Liquid Chromatography</i> (Chromatographie liquide)
Leu	: Leucine
Lip	: Lipides
LN	: Lipides Neutres
L-PL	: <i>Lyso-PhosphoLipase</i>
L-PtdCho	: <i>Lyso-PhosphatidylCholines</i>
LS	: Lipides Stérois
MAP kinases	: <i>Mitogen-Activated Protein kinases</i>

MDR	: <i>MultiDrug Resistance</i> (Résistance multi-médicaments)
Met	: Méthionine
MGMT	: O <sup>6</sup> -MéthylGuanine-ADN-MéthylTransférase
mI	: <i>myo</i> -Inositol
MMP	: <i>Matrix MetalloProteinases</i>
MRM	: <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	: <i>Mass Spectrometry</i> (Spectrométrie de Masse)
NAA	: N-AcétylAspartate
OCT	: <i>Organic Cation Transporters</i>
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
OSC	: <i>Orthogonal Signal Correction</i>
PDGF(R)	: <i>Plateled-Derived Growth Factor (Receptor)</i>
PCho	: Phospho(ryl)Choline
PCr	: PhosphoCréatine
PGSEA	: <i>Parametric Gene Set Enrichment Analysis</i>
Phe	: Phénylalanine
PI3K/Akt-PKB/mTOR	: voie de signalisation <i>Phosphatidyl-Inositol triphosphate Kinase/Akt-Protein Kinase B/mammalian Target Of Rapamycin</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PL	: PhosphoLipides
PLA <sub>2</sub>	: PhosphoLipase A <sub>2</sub>
PLC	: PhosphoLipase C
PLC-γ/PKC	: voie de signalisation <i>Phospholipase C gamma/Protein Kinase C</i>
PLD	: PhosphoLipase D
PLS-DA	: <i>Partial Least Square-Discriminant Analysis</i>
PtdCho	: PhosphatidylCholine
PtdE	: PhosphatidylEthanolamine
PtdI	: PhosphatidylInositol
PtdS	: PhosphatidylSérine
PTEN	: <i>Phospholipase and TENsin homolog on chromosome 10</i>
qRT-PCR	: RT-PCR quantitative en temps réel
RAS/Raf/MEK/ERK	: voie de signalisation <i>Rat Sarcoma viral oncogene homolog/Raf/Mitogen-activated protein kinase Kinase/Extra-cellular signal Regulated Kinase</i>

RI	: Rayonnements Ionisants
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i> (Espèces réactives oxygénées)
RR	: RadioRésistant(es)
RS	: RadioSensible(s)
RT	: RadioThérapie
RT/TMZ	: Association RadioThérapie plus TéMoZolomide
RT-PCR	: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RTK	: <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SD	: <i>Standard Deviation</i> (Ecart-type)
SF	: <i>Survival Fraction</i> (Fraction de Survie)
SI	: Standard interne
SL	: SphingoLipides
SMe	: SphingoMyélines
SNC	: Système Nerveux Central
SRM	: Spectroscopie par Résonance Magnétique
STOCSY	: <i>Statistical TOtal Correction SpectroscopY</i>
Succ	: Succinate
SVF	: Sérum de Veau Foetal
Tau	: Taurine
tCho	: Cho + PCho + GPCho
tCr	: Cr + PCr
Thr	: Thréonine
TMZ	: TéMoZolomide
TGF(R)	: <i>Transforming Growth Factor (Receptor)</i>
TSP	: 3-TriméthylSilylPropionate-2,3,3,3-d <sub>4</sub> de sodium
Tyr	: Tyrosine
UV	: <i>Unit Variance</i>
UXP	: Uracile Mono/Di/Tri-Phosphate
Val	: Valine
Var	: Variable
VEGF(R)	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)</i>
VIP	: <i>Variable Importance Projection</i>
WB	: <i>Western-Blot</i>

## *Avant-propos*

Les glioblastomes (GBM) sont une des formes les plus agressives des tumeurs cérébrales humaines (ou gliomes). Malgré l'arsenal thérapeutique mis à disposition des cliniciens pour les traiter, ils sont à l'heure actuelle incurables. Le recours à la radiothérapie (RT) est systématique mais se heurte à un phénomène de radiorésistance des GBM.

Face à ce constat d'échec, beaucoup d'efforts ont été consentis dans la recherche sur l'oncogenèse des GBM, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de mieux comprendre les différents processus biologiques impliqués dans la croissance des tumeurs. Une distinction entre les GBM primaires (GBM 1) et secondaires (GBM 2) a ainsi été établie (Hoang-Xuan et al., 2005).

Par ailleurs, les cliniciens s'orientent de plus en plus vers une classification moléculaire des GBM (Hoang-Xuan *et al.*, 2005; Frenel *et al.*, 2009) afin de définir des sous-groupes de GBM plus fiables en terme de pronostic de survie des malades et de prédiction de la réponse de la maladie face à un traitement thérapeutique (RT, médicaments, RT+médicaments...). L'objectif médical final est de pouvoir proposer dans un avenir proche une stratégie thérapeutique adaptée à chaque malade (Jensen, 2009).

Récemment, la corrélation entre le statut méthylé du promoteur du gène O<sup>6</sup>-MéthylGuanine-ADN-MéthylTransférase (MGMT) et la survie accrue des patients traités à la RT concomitamment au témozolomide (TMZ) a été établie (Stupp *et al.*, 2005). Cette découverte très encourageante a modifié la prise en charge de ces tumeurs. Cependant, le traitement reste insuffisant et beaucoup de chemin reste à parcourir vers l'éradication de cette maladie.

Enfin, l'avancée scientifique et technique des outils analytiques permet d'étudier précisément et globalement à la fois le génome, le transcriptome, le lipidome et/ou le métabolome de divers systèmes biologiques. Ces diverses approches holistiques sont parfaitement complémentaires et susceptibles d'apporter des informations moléculaires intéressantes sur la nature des GBM, et notamment sur leur radiorésistance.

Dans le cadre de cette problématique scientifique et médicale, nous avons cherché à vérifier l'hypothèse selon laquelle il existerait des biomarqueurs prédictifs de radiorésistance. Pour cela, nous avons travaillé sur plusieurs modèles cellulaires humains de GBM dont le degré de radiorésistance a été établi en 2002 (Delmas et al., 2002).

Dans une seconde partie, nous avons cherché à identifier de potentiels biomarqueurs de mort radio-induite dans un modèle cellulaire humain de GBM : la lignée radiorésistante U87. Pour ce travail, quatre différents projets ont été réalisés, avec à chaque fois une radiosensibilisation différente de la lignée.

Ce projet thèse a été réalisé au sein de deux unités de recherche (UMR 5068 et U563) et en collaboration avec plusieurs équipes. Les différentes études métabolomiques ont été réalisées au Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB, UMR 5068 CNRS-Université Paul Sabatier) dirigé par le Pr. Michel Baltas et au sein du groupe de RMN Biomédicale dirigé par ma directrice de thèse le Pr. Myriam Malet-Martino.

La culture cellulaire et la biologie moléculaire ont été effectuées au Centre de Physiologie de Toulouse-Purpan (INSERM U563) dans le Département de Lipoprotéines et Médiateurs Lipidiques dirigé par le Pr. Bertrand Perret, au sein de l'équipe « Lipoprotéines, transport lipidique et dyslipidémies » dirigée par le Dr. Xavier Collet. L'encadrement scientifique a été assuré par le Dr. François Tercé.

Les études lipidomiques ont été effectuées par le Plateau de Lipidomique (IFR 150) dirigé par le Dr. Justine Bertrand-Michel, tandis que l'étude transcriptomique a été réalisée par la Plateforme Biopuces de la Génopole Toulouse Midi-Pyrénées dirigée par le Dr. Véronique le Berre.

L'analyse statistique des données métaboliques a été réalisée en collaboration avec le Dr. Sébastien Dejean de l'Institut Mathématiques de Toulouse.

L'analyse des flux métaboliques a été réalisée en collaboration avec le Service Commun de Spectrométrie de Masse (Structure Fédérative Toulousaine en Chimie Moléculaire, FR 2599) dirigé par le Dr. Catherine Claparols.

Enfin, une collaboration a été établie avec l'équipe « Signalisation, GTPases Rho et cancer » du Département d'Oncogénèse, Signalisation et Innovation Thérapeutique (U563) dirigé par le Pr. Gilles Favre, spécialisée dans la radiorésistance des GBM.

Le premier chapitre de ce manuscrit rassemble une étude bibliographique consacrée à la caractérisation des GBM dans un premier temps, puis à la radiothérapie, la radiorésistance et les radiosensibilisants dans un deuxième temps. Dans une troisième partie, les outils pour les études morphologiques et métaboliques des gliomes sont présentés ; enfin, une quatrième partie est consacrée à la description générale des lipides et leur implication dans les processus de cancérisation.

Le deuxième chapitre présente les différents matériels et méthodes utilisés.

Le troisième chapitre est divisé en deux parties. La première partie est consacrée au projet principal de ce manuscrit : « Recherche de biomarqueurs de radiorésistance dans quatre lignées cellulaires humaines de GBM (projet RR vs RS) ». Les résultats y sont présentés, discutés et une conclusion générale du projet est exposée. La deuxième partie, intitulée « Recherche de biomarqueurs de mort radio-induite dans une lignée cellulaire humaine de GBM (projets FTI-277, Y, URB14 et KILK2) » regroupe quatre projets principalement consacrés à l'étude des perturbations métaboliques occasionnée dans la lignée radiorésistante U87 radiosensibilisée de quatre manières différentes, puis irradiée.

Une conclusion générale clôt le manuscrit.



***Chapitre I :***  
***Introduction***

## **I. Glioblastomes multiformes (GBM) : tumeurs cérébrales**

### **I.1. Système nerveux central**

Le système nerveux est un ensemble coordonnant les mouvements musculaires, contrôlant le fonctionnement des organes et véhiculant les informations sensorielles et motrices vers les organes effecteurs. Il est formé du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique, les nerfs.

Le SNC est constitué de l'encéphale et de la moelle épinière située dans le canal rachidien. L'encéphale, situé dans la boîte crânienne, comprend le cerveau, formé des hémisphères droit et gauche, le cervelet et le tronc cérébral.

Le cerveau est constitué de neurones comportant des corps cellulaires formant la substance grise et de prolongements cytoplasmiques formant la substance blanche. Ce sont les cellules spécialisées dans la réception, l'intégration et la transmission d'informations.

Le soutien et la nutrition des neurones sont assurés par les cellules gliales constituées en majorité d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de cellules microgliales. Contrairement aux cellules neuronales, elles peuvent se multiplier. Ce sont ces cellules qui, par leur prolifération incontrôlée, sont impliquées dans la formation des tumeurs gliales.

Les astrocytes constituent, avec les cellules endothéliales micro-vasculaires cérébrales, la barrière hémato-encéphalique. En forme d'étoile, les astrocytes assurent la nutrition des neurones, gèrent les connections inter-neuronales et régulent les neurotransmetteurs (Baudrimont, 1991).

### **I.2. Données cliniques et localisation des GBM**

#### **I.2.1. Données cliniques**

Les gliomes malins, ou tumeurs gliales, sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes. Ils représentent 78% des tumeurs du SNC détectées chez l'adulte (Noda et al., 2009).

Parmi les gliomes, les glioblastomes multiformes (GBM) sont les tumeurs les plus fréquentes et les plus agressives. Ce sont des tumeurs hétérogènes dérivées de cellules astrocytaires.

Ils sont considérés comme une maladie orpheline puisqu'ils touchent 10 personnes sur 100000 tous les ans, soit environ 6000 nouveaux cas par an en France. Ils constituent la troisième cause de mortalité due au cancer chez l'adulte ([www.gfme.free.fr](http://www.gfme.free.fr)).

Ils apparaissent dans 70% des cas entre 45 et 70 ans et touchent en particulier les hommes. Ils sont à l'heure actuelle incurables. La médiane de survie des patients est située entre 9 et 12 mois (Noda et al., 2009).

Les traitements palliatifs administrés impliquent systématiquement la radiothérapie (RT) précédée d'une chirurgie totale ou partielle dans certains cas. La RT est depuis quelques années associée à de la chimiothérapie à visée radiosensibilisante (Stupp et al., 2005).

## I.2.2. Localisation et rechute

Les GBM sont le plus souvent localisés au niveau des hémisphères cérébraux, dans la matière blanche. Ils sont volumineux, profonds et souvent inopérables (Fig. 1). Ces tumeurs comprennent une partie centrale souvent nécrosée et une partie externe imprécise et irrégulière. Cette zone externe est le siège d'œdèmes péritumoraux et de cellules malignes isolées (Mazeron et al., 2005). Environ 95% des récidives ont lieu dans le lit tumoral ou à son voisinage immédiat (Dhermain et al., 2005).



**Figure 1. Image IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) d'un GBM.**

## **I.3. Diagnostic et pronostic cliniques des GBM**

### **I.3.1. Classification selon l’OMS**

A défaut de critères biologiques consensuels, les gliomes sont actuellement classés histologiquement en fonction de leur origine cellulaire présumée et de leur grade de malignité.

Ce classement est établi par l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et régulièrement actualisé en fonction des avancées scientifiques (Louis et al., 2007).

La classification de l’OMS fait l’objet de controverses puisqu’elle se base principalement sur les données histologiques. D’autres classifications existent comme celle de l’hôpital Sainte-Anne à Paris, qui prend en compte l’analyse des images IRM en plus des données histologiques (Daumas-Duport et al., 2000; Varlet et al., 2005). Pour décrire les GBM dans ce manuscrit, nous utiliserons la classification la plus courante, celle de l’OMS.

Cette classification distingue les gliomes bénins et malins de bas grade (I et II, respectivement) regroupant les tumeurs à croissance lente, des gliomes de haut grade (III et IV) regroupant celles à croissance rapide (Frenel et al., 2009). Les gliomes de grade I regroupent les astrocytomes pilocytiques. Les gliomes de grade II sont constitués des astrocytomes fibrillaires, des oligodendrogliomes et des oligoastrocytomes. Les gliomes de plus forte malignité (grade III) regroupent les astrocytomes anaplasiques, les oligodendrogliomes anaplasiques et les oligoastrocytomes anaplasiques. Enfin, les gliomes de très forte malignité correspondent aux GBM, également nommés astrocytomes de grade IV.

### **I.3.2. Diagnostic des GBM**

Dans la plupart des cas, un prélèvement de la tumeur, appelé biopsie, est réalisé sur le malade afin de classer la tumeur cérébrale et d’établir un diagnostic. En ce qui concerne les GBM, les critères histologiques sont les suivants : forte densité cellulaire, pléomorphisme cellulaire, nombreuses cellules en mitose, prolifération cellulaire endothéliale et nécrose.

### **I.3.3. Pronostic de survie**

En plus des données histologiques, d'autres critères cliniques sont considérés afin d'évaluer plus précisément le pronostic de survie des patients atteints de GBM.

Les critères comme l'âge du patient, l'indice de Karnofsky (gradation de l'état du patient), le type de chirurgie (nulle, partielle ou totale), les données d'imagerie (IRM par exemple), l'évaluation de la réponse aux traitements ou la localisation de la tumeur entrent en ligne de compte (Chinot, 2005; Maire *et al.*, 2008; Jensen, 2009).

Malgré tous les critères de diagnostic et l'arsenal thérapeutique mis à disposition des cliniciens, le constat d'échec est récurrent. Le pronostic de survie des malades est très limité puisqu'il dépasse rarement un an.

## **I.4. Oncogenèse des GBM primaires et secondaires**

### **I.4.1. Origine et formation des GBM**

Comme dans la plupart des processus de cancérisation, la formation des GBM est issue de mutations génétiques affectant principalement deux catégories de gènes impliqués dans la tumorigenèse : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur (Robert, 2006).

Les premiers sont généralement surexprimés alors que les seconds, qui sont en partie responsables de la réparation de l'ADN et du contrôle du cycle cellulaire, sont éteints. Ce déséquilibre entre ces deux types d'effecteurs est principalement à l'origine de la dérégulation de la croissance cellulaire et donc de la croissance tumorale (Hanahan & Weinberg, 2000; Robert, 2006).

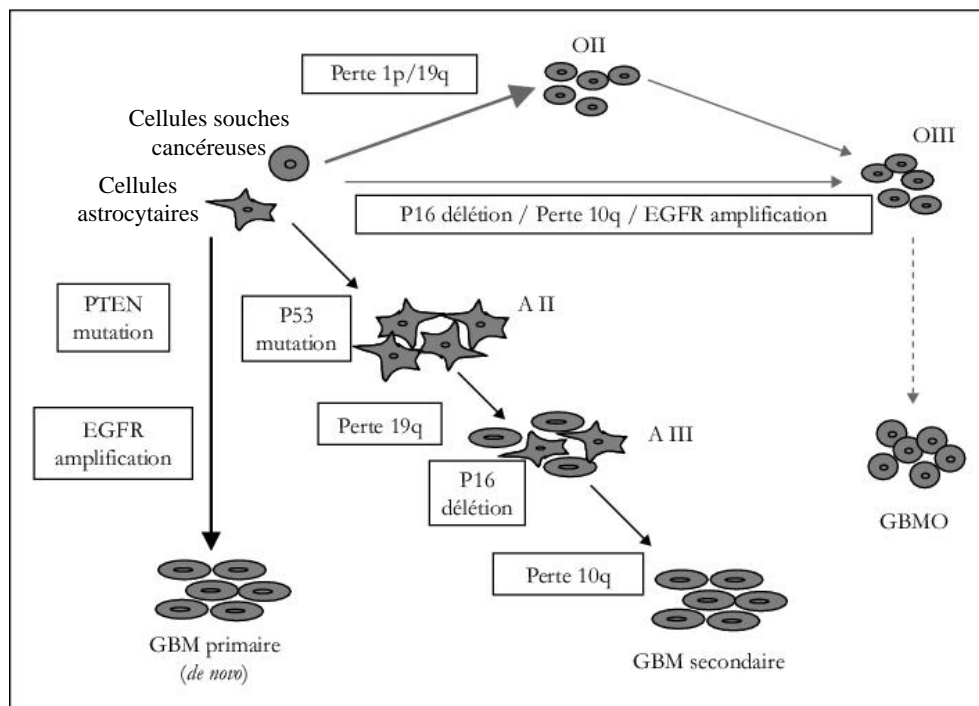
Dans le cas plus précis des GBM, plusieurs altérations génétiques diffèrent selon l'origine cellulaire. Les GBM sont majoritairement issus de cellules astrocytaires dégénérées, mais une hypothèse récente suggère que les GBM pourraient dériver de cellules souches cancéreuses, présentes en faible proportion dans les tumeurs (Altaner, 2008; Kanu *et al.*, 2009). Cette hypothèse, de plus en plus confortée, sera plus explicitement décrite dans la partie II.2.3.

Il existe au moins deux voies de tumorigenèse des GBM (Fig. 2) : celle des glioblastomes *de novo* ou primaires (GBM 1) et celle des glioblastomes secondaires (GBM 2) (Hoang-Xuan *et al.*, 2005; Soni *et al.*, 2005; Noda *et al.*, 2009). Une troisième voie, encore

controversée, concerne celle des glioblastomes à composante oligodendrogliale, selon l'OMS (Louis et al., 2007). Nous ne développerons pas ce type de GBM.

Les GBM 1, représentant 90% des GBM, sont décelés généralement vers l'âge de 55 ans et plus fréquemment chez les hommes. Ils se développent rapidement et directement à partir de cellules astrocytaires ou de cellules souches cancéreuses.

Les GBM 2 apparaissent à un âge plus précoce (39-41 ans) plus souvent chez la femme. Ils se développent lentement à partir d'astrocytomes de bas grade (Kleihues & Ohgaki, 1999).



**Figure 2. Hypothèses sur les voies alternatives de progression tumorale dans les gliomes (Hoang-Xuan et al., 2005).** Abréviations : AII/III, astrocytomes de grade II/III ; OII/III, oligodendrogliomes de grade II/III ; GBMO, glioblastome à composante oligodendrogliale.

#### I.4.2. Principales altérations moléculaires

Les délétions chromosomiques sont fréquemment observées dans les GBM. La délétion sur le chromosome 10 est souvent totale dans les GBM 1 et partielle dans les GBM 2 (Kanu et al., 2009).

D'une manière générale, les récepteurs des facteurs de croissance tyrosine kinase (RTK, *Receptor Tyrosine Kinase*), tels que l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), le

VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), le PDGFR (*Plateted-Derived Growth Factor Receptor*) et/ou le TGF $\alpha$  (*Transforming Growth Factor Receptor*) sont impliqués dans l'oncogénèse des GBM. Ils activent différentes voies de signalisation à l'intérieur des cellules tumorales, ce qui déclenche différents évènements et/ou réponses cellulaires (Kanu et al., 2009).

Ainsi, l'oncogène EGFR, et plus fréquemment son variant EGFRvIII mutant, est souvent amplifié dans les GBM 1 (Kleihues & Ohgaki, 1999; Kanu *et al.*, 2009). L'activation de ce récepteur déclenche la propagation de signaux intracellulaires vers trois principales voies de transduction du signal (**Annexe 1**) :

- la voie PLC- $\gamma$ /PKC (*Phospholipase C gamma/Protein Kinase C*) impliquée dans la migration cellulaire et la mitose ;
- la voie RAS/Raf/MEK/ERK (*RA*t *Sarcoma* *viral* *oncogene* *homolog/Raf/Mitogen-activated protein kinase Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinases*) ou voie des MAP (*Mitogen-Activated Protein*) kinases, impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaires ;
- la voie PI3K/Akt-PKB/mTOR (*Phosphatidyl-Inositol triphosphate Kinase/Akt-Protein Kinase B/mammalian Target Of Rapamycin*) impliquée dans la survie cellulaire.

*A contrario*, l'oncogène PDGFR- $\alpha$  et sa protéine associée, sont respectivement amplifié ou surexprimée dans les GBM 2 (Kleihues & Ohgaki, 1999). Les voies activées par cet oncogène sont celles de PI3K/Akt/mTOR et de PLC- $\gamma$ /PKC (**Annexe 1**) (Kanu et al., 2009).

L'inactivation du gène suppresseur de tumeur TP53, codant pour la protéine p53, est une caractéristique propre des astrocytomes de bas grade, et par conséquent des GBM 2. Cette anomalie est plus rare dans les GBM 1. L'amplification de l'EGFR et la mutation de TP53 semblent en effet incompatibles (Kleihues & Ohgaki, 1999). La protéine p53 a pour rôle, entre autres, de bloquer le cycle cellulaire en cas de dommages à l'ADN et de déclencher l'apoptose lorsque celui-ci est irréparable (Nozaki *et al.*, 1999; Favaudon, 2000; Malkin, 2001).

Le gène codant pour la protéine PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog on chromosome 10*), considéré également comme un gène suppresseur de tumeur, est plus souvent délété dans les GBM 1. PTEN a notamment pour effet d'inhiber la voie PI3K/Akt/mTOR. La mutation de TP53 et la perte de PTEN semblent mutuellement exclusifs (Kleihues & Ohgaki, 1999).

Il a récemment été démontré que la perte de PTEN est fortement corrélée à l'activation de la protéine mTOR *via* Akt. L'amplification de l'oncogène MTOR est fréquemment observée dans le cas des GBM 2. Quant à la protéine mTOR, elle est un important effecteur dans la signalisation d'Akt. La protéine Akt contrôle la traduction d'ARN messagers spécifiques nécessaires à la prolifération et à l'oncogénèse (Soni et al., 2005).

Il existe d'autres altérations moléculaires dans les GBM 1 et 2. Le tableau 1 regroupe les principales altérations mentionnées précédemment, ainsi que certaines non mentionnées. Ces données restent indicatives et non exhaustives. Elles sont susceptibles d'être modifiées par les résultats de futures études.

**Tableau 1. Principales altérations génétiques des GBM primaires et secondaires.**

Catégorie de gène	Gène ou chromosome	Fonction(s)	Principales altérations	Fréquences des altérations observées en clinique		Références
				GBM 1	GBM 2	
Oncogène	EGFR	Transduction du signal	Amplification	39% 36-50% 40-60%	0% 8% 10%	(Kleihues & Ohgaki, 1999) (Zhou et al., 2007) (Kanu et al., 2009)
Oncogène	PDGFR- $\alpha$	Transduction du signal	Amplification	-	Fréquente	(Kleihues & Ohgaki, 1999; Noda et al., 2009)
Gène suppresseur de tumeur	TP53	Contrôle du cycle cellulaire, apoptose, réparation	Mutation	11% 30%	67% 65%	(Kleihues & Ohgaki, 1999) (Kanu et al., 2009)
Gène suppresseur de tumeur	PTEN	Transduction du signal, invasion	Perte	32% 25%	4% 5%	(Kleihues & Ohgaki, 1999) (Kanu et al., 2009)
Gène suppresseur de tumeur	INK4a	Contrôle du cycle cellulaire	Perte	30%	20%	(Kanu et al., 2009)
Gène suppresseur de tumeur	ARF ( <i>ADP Ribosylation Factor</i> )	Contrôle du cycle cellulaire	Perte ou méthylation du promoteur	30%	20%	(Kanu et al., 2009)
Oncogène	MDM2 ( <i>Murine Double Minute 2</i> )	Contrôle du cycle cellulaire	Amplification Surexpression de la protéine	7-8% >50%	0% <10%	(Kleihues & Ohgaki, 1999)
Gène suppresseur de tumeur	RB1 ( <i>Retinoblastoma protein 1</i> )	Contrôle du cycle cellulaire	Méthylation du promoteur	15%	40%	(Kanu et al., 2009)
-	Chromosome 10	-	Perte	70% (perte totale du gène)	60% (perte du bras 10q)	(Kanu et al., 2009)
-	IDH 1/2 ( <i>Isocitrate Dehydrogenase 1/2</i> )	-	Mutation	5%	85%	(Yan et al., 2009)



## **I.5. Vers une classification moléculaire des GBM**

Une classification moléculaire des GBM spécifique et objective est en train de voir le jour afin de définir des sous-groupes homogènes en terme de diagnostic mais aussi de pronostic (Zhou et al., 2007). Cette classification permettra, dans un avenir proche, d'adapter la thérapie en fonction des caractéristiques moléculaires propres à chaque sous-groupe (Mischel et al., 2003). Par ailleurs, les cliniciens prennent de plus en plus en compte des marqueurs biologiques pour prédire la réponse des malades au traitement et adapter la thérapie (Hoang-Xuan *et al.*, 2005; Frenel *et al.*, 2009).

### **I.5.1. Facteurs pronostiques moléculaires**

Les cliniciens reconnaissent qu'il manque des facteurs pronostiques objectifs fiables pour grader les gliomes. L'avancée récente des travaux scientifiques dans le domaine de l'oncogénèse de ces tumeurs a permis de recenser la plupart des altérations moléculaires et génétiques et de les corrélérer avec les données histologiques et cliniques.

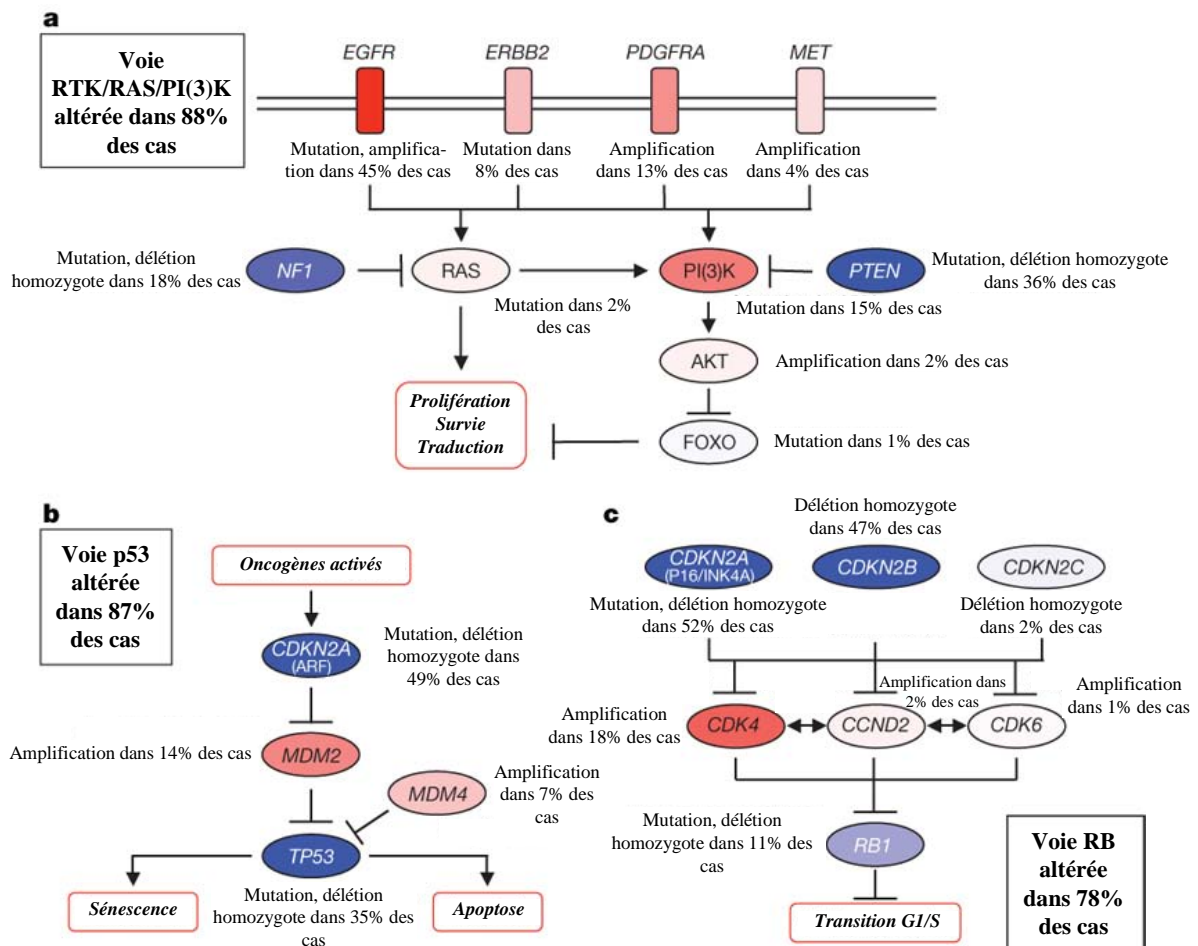
Les nouvelles techniques d'analyses multivariées portant sur le génome (génomique) ou sur l'expression des gènes (transcriptomique) ont vu le jour. Elles deviennent incontournables dans les études entreprises pour la recherche de nouvelles cibles moléculaires, de marqueurs pronostiques et/ou prédictifs de pathologies comme les GBM.

L'élaboration de profils génétiques et/ou transcriptomiques de chaque tumeur est en cours afin de proposer une prise en charge de la maladie mieux adaptée et propre à chaque patient (Mischel *et al.*, 2003; Frenel *et al.*, 2009).

Des institutions telles que *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) ont vu le jour et ont entrepris le criblage de 206 biopsies de GBM afin d'en déterminer les profils génétiques et transcriptomiques (2008). Les aberrations géniques couramment décrites dans la littérature ont été confirmées. Cette étude a par ailleurs mis en évidence, entre autres, le rôle potentiel des gènes NF1 (*NeuroFibromatosis 1*) et PIK3CA (*Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase, Catalytic Alpha*) dans l'oncogénèse des GBM. Enfin une corrélation entre la méthylation du promoteur MGMT (*O<sup>6</sup>-MéthylGuanine-ADN-MéthylTransférase*) et un phénotype hyper-mutateur présent dans des biopsies de patients traités a été confirmée.

Cette approche globale des aberrations observées pour un groupe de gènes codant pour des protéines impliquées dans les mêmes voies de signalisation est très intéressante. En effet, il ne s'agit plus d'observer les modifications d'un ou deux gènes isolés mais d'un ensemble de gènes, considérant que ces modifications sont fortement corrélées entre elles.

Ainsi, plus de 78% des GBM étudiés possèdent au moins une altération dans une des trois voies de signalisation fréquemment affectées dans les GBM, à savoir les voies activées par les RTK (PLC- $\gamma$ /PKC, RAS/Raf/MEK/ERK et PI3K/Akt-PKB/mTOR regroupées sous la voie RTK/RAS/PI(3)K dans la figure 3) [a], la voie p53 [b] et la voie Rb (*Retinoblastoma*) [c] (Fig. 3).



**Figure 3. Fréquence des altérations génétiques observées dans les trois voies critiques de signalisation des GBM : (a) voie RTK/RAS/PI(3)K, (b) voie p53 et (c) voie Rb (2008). Les couleurs rouge et bleu représentent respectivement les amplifications et les délétions génétiques.**

L'étude transcriptomique entreprise par Reddy et ses collaborateurs en 2008 met en évidence deux nouveaux gènes surexprimés spécifiquement dans les GBM : GADD45A (*Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 45 Alpha*) et FSTL1 (*FolliStatin-Like 1*). La surexpression du premier confère un pronostic plus favorable, alors que celle du second est une marque de pronostic défavorable.

Par ailleurs, deux gènes spécifiquement sur-exprimés dans les GBM 1, SOD2 (*SuperOxide Dismutase 2*) et AEBP1 (*Adipocyte Enhancer Binding Protein 1*), ont été identifiés (Reddy et al., 2008).

Czernicki et ses collaborateurs ont classé des gliomes de haut grade en deux groupes en fonction de la survie médiane des patients. Ces deux groupes ont été corrélés avec la sur- ou sous-expression d'une dizaine de gènes, permettant ainsi un pronostic fiable et statistiquement significatif des groupes d'individus (Czernicki et al., 2007; Zhou et al., 2007).

## **I.5.2. Facteurs prédictifs moléculaires de réponse aux traitements**

Face à la résistance des GBM aux agents chimiothérapeutiques (phénomène de chimiorésistance) ou aux rayonnements ionisants (phénomène de radiorésistance), la détermination de facteurs prédictifs moléculaires fiables de réponses aux traitements devient indispensable.

### **I.5.1.1. Facteurs prédictifs de chimiorésistance**

A ce jour, seul le statut du gène MGMT est un important facteur prédictif de la résistance des GBM aux agents alkylants, tels que le témozolomide (TMZ). Ce dernier est associé de manière systématique à la radiothérapie depuis 2005 (Stupp et al., 2005). La protéine MGMT est une enzyme de réparation de l'ADN qui inhibe spécifiquement la destruction des cellules cancéreuses par les agents alkylants. Il a été montré que la méthylation du promoteur du gène codant pour cette protéine supprime l'expression du gène et donc la traduction de sa protéine. Ainsi, les patients dont la tumeur présente cette caractéristique bénéficient de l'effet synergique du TMZ avec la radiothérapie. Leur médiane de survie est significativement accrue (Hegi *et al.*, 2005; Felsberg *et al.*, 2009).

Par ailleurs, nous pouvons citer le rôle des protéines membranaires telles que la Pgp (*P-glycoprotein*) et les MRP (*Multidrug Resistance Protein*) qui sont responsables de la résistance multi-médicaments (*MultiDrug Resistance*, MDR) des cellules de GBM (Decleves et al., 2002). L'isoenzyme MRP1 est fréquemment sur-exprimée dans les GBM (Benyahia et al., 2004) et son expression est anti-corrélée à une durée de vie moyenne accrue des malades (Nakagawa et al., 2009).

### **I.5.1.2. Facteurs prédictifs de radiorésistance**

A l'heure actuelle, aucun marqueur biologique prédictif de la radiorésistance des GBM n'est utilisé par les cliniciens lors du traitement par RT. De tels marqueurs permettraient de prédire la réponse tumorale à la RT et donc de prévoir un traitement plus adapté pour les patients ayant un profil radiorésistant.

Récemment, Liu et ses collaborateurs ont établi, dans quatre lignées cellulaires de GBM humains, une corrélation entre la radiorésistance intrinsèque de ces lignées et le statut du gène ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementing Protein 1*) (Liu et al., 2009). La méthylation du promoteur du gène ERCC1 engendre une augmentation de la radiosensibilité des cellules. Ce résultat doit être confirmé cliniquement sur des biopsies de GBM.

Par ailleurs, Welsh et ses collaborateurs (Welsh et al., 2009) ont montré que, dans des biopsies de différents GBM, une expression accrue de la protéine Rad51 est corrélée à une survie prolongée des patients après traitement par RT. Cette protéine est impliquée dans les mécanismes de réparation des lésions radio-induites.

## II. Radiothérapie, radiorésistance et radiosensibilisants

A travers ce chapitre, nous allons dans un premier temps détailler la place de la radiothérapie dans l'arsenal thérapeutique des GBM. Puis, nous présenterons les principaux phénomènes de radiorésistance. Enfin, nous décrirons les agents radiosensibilisants mis à disposition des cliniciens et ceux qui pourraient être mis sur le marché dans les années à venir.

### II.1. Radiothérapie des GBM

#### II.1.1. Définition et historique

La radiothérapie (RT) est un traitement local des cancers utilisant des rayonnements ionisants (RI) pour détruire les cellules. Son rôle peut être curatif, palliatif ou symptomatique. Son objectif est d'assurer le contrôle et/ou la guérison locale de la tumeur tout en préservant l'organe malade. Elle est très souvent associée à la chirurgie et/ou à la chimiothérapie. Plus de 2/3 des traitements des cancers actuels font appel à la RT. Dans le cas des GBM, elle est systématique.

La première utilisation de rayonnements ionisants à des fins cliniques date des années 50. Très vite, la RT a été reconnue bénéfique dans le contrôle des tumeurs malignes primitives (Peirce & Bouchard, 1950).

En 1979, le *Brain Tumor Cooperative Group* (BTCCG) montre qu'associer la RT de la totalité de l'encéphale à la chirurgie permet d'augmenter significativement la médiane de survie. La dose de 60 Gy ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$ ) en 30 fractions de 2 Gy devient la dose standard pour les gliomes de haut grade (Walker *et al.*, 1979).

Dix ans plus tard, avec le développement de nouveaux appareils d'imagerie tels que le scanner aux rayons X, Shapiro et ses collaborateurs montrent dans un essai randomisé qu'une irradiation focalisée au niveau de la tumeur est tout aussi efficace et moins toxique pour le patient (Shapiro *et al.*, 1989). A partir de cette date, la radiothérapie devient localisée.

En 1993, Curran et son équipe publient une analyse multivariée rétrospective portant sur plusieurs lots de tumeurs de haut grade. Ils les classent en fonction de plusieurs données cliniques (âge, durée des symptômes, dose de RT, chirurgie) et de facteurs pronostiques (indice de Karnofsky, *mini mental status*, histologie). L'élaboration de groupes de patients de pronostics différents permet, d'une part, une prise en charge plus spécifique de chaque

patient et, d'autre part, la réalisation d'essais de phase II non randomisés sur une population bien définie. A partir de ces travaux, les astrocytomes anaplasiques (gliomes de grade III) et les glioblastomes (grade IV) ont été considérés séparément dans les études cliniques (Curran et al., 1993).

En 2005, l'*European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) associée au *National Cancer Institute of Canada* (NCI-C) publient les résultats du premier essai clinique en phase III d'une chimiothérapie concomitante et adjuvante à la RT dans les GBM (Stupp et al., 2005). L'association RT et TMZ (RT/TMZ) augmente l'impact des RI sur les cellules de GBM radiorésistantes. Depuis, l'association RT/TMZ est le traitement standard des GBM.

Avec le progrès des techniques d'imagerie médicale, telles que l'IRM, la RT conventionnelle s'est améliorée. Ainsi, les RT conformationnelles tridimensionnelle et avec modulation d'intensité sont apparues dans les années 2000. Cette dernière technique, de plus en plus utilisée en clinique, permet d'optimiser la distribution de dose dans le volume irradié, en ciblant plus précisément la zone tumorale et en préservant les tissus sains environnants (Mazeron et al., 2005).

## **II.1.2. Radiobiologie**

### **II.1.2.1. Sources de rayonnements ionisants (RI)**

Les RI sont des rayonnements constitués de flux de particules à forte énergie capables de créer des réactions dans la matière biologique traversée. Dans le cas de la radiothérapie, le but est de détruire le plus spécifiquement possible les cellules cancéreuses. Les RI utilisées en RT sont produits par deux types de procédés :

- la désintégration d'éléments radioactifs donnant des positrons, des électrons ou des rayons  $\gamma$  (photons de haute énergie) ;
- l'accélération artificielle de particules chargées (protons, électrons ou ions lourds) ou non (neutrons ou rayons X).

Les installations de RT sont donc équipées soit de générateurs de rayons X, soit d'appareils de télécobalthérapie (utilisant comme source le  $^{60}\text{Co}$ ), ou encore d'accélérateurs de particules. L'utilisation de rayonnements engendrant un nombre élevé d'ionisations tels que les neutrons ou les ions lourds est néanmoins privilégiée pour traiter les GBM (Mazeron et al., 2005).

### II.1.2.2. Mécanismes d'action des RI

Les effets biologiques d'une irradiation sur les cellules sont l'aboutissement d'une chaîne de phénomènes déclenchés par le passage du rayonnement. L'interaction des radiations incidentes (rayonnement primaire) avec les atomes des molécules cellulaires provoque soit des ionisations (arrachement d'électrons dits secondaires), soit des excitations (transfert d'électrons sur une couche supérieure). Les excitations ont peu d'impact sur la cellule, alors que les ionisations entraînent des réactions physico-chimiques aboutissant à un effet biologique.

#### II.1.2.2.1. Les actions physico-chimiques

Ce sont les collisions entre les électrons secondaires et les molécules des cellules qui sont responsables des effets physico-chimiques. Le rayonnement peut provoquer sur les molécules de la cellule (Fig. 4) :

- des lésions directes qui se caractérisent par l'interaction d'une particule (rayonnement) avec un atome. L'énergie absorbée entraîne la libération d'un électron secondaire qui interagit directement avec les molécules, dont l'ADN ;
- des lésions indirectes, induites par les produits de la radiolyse cellulaire. Ces produits sont des radicaux libres hautement réactifs qui réagissent principalement avec l'ADN. Certains de ses radicaux libres ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ) font parti des espèces réactives oxygénées (ROS, *Reactive Oxygen Species*) responsables du stress oxydant dans les cellules.

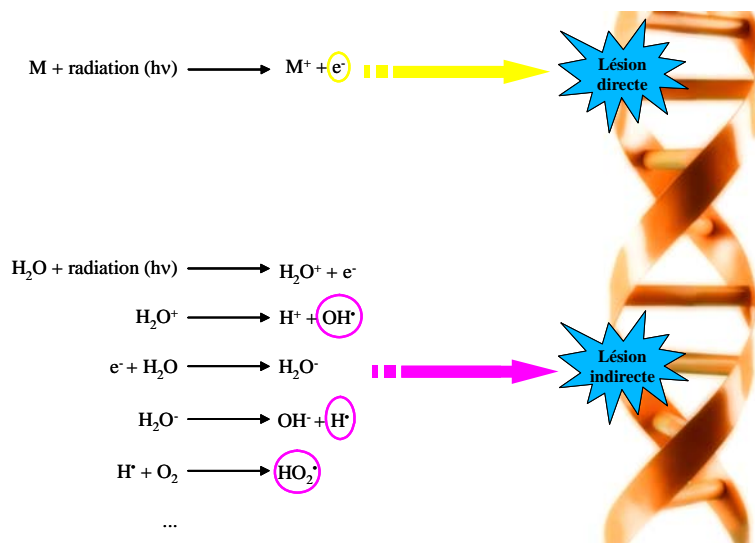


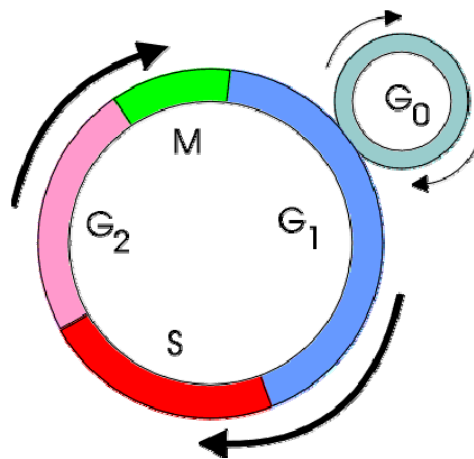
Figure 4. Lésions de l'ADN par effets direct et indirect des RI. Abréviation : *M*, molécule.

L'ADN est la cible privilégiée des RI. Les lésions les plus fréquentes concernent la rupture des liaisons entre les acides désoxyribonucléiques créant des lésions simples ou doubles. Les lésions simples brins sont souvent plus facilement réparées par la lecture de la séquence de bases correspondante sur le brin opposé. Les lésions sur les deux brins de l'ADN donnent plus fréquemment lieu à des cassures doubles brins (CDB) de l'ADN. Les CDB sont la forme la plus létale des dommages à l'ADN générés par les RI.

#### II.1.2.2.2. Les actions sur la cellule : réparation et mort cellulaire radio-induite

Le cycle cellulaire eucaryote est composé de deux étapes principales : l'interphase, subdivisée en trois phases (G1, S, G2), au cours de laquelle l'ADN et les composants du cytosol sont dupliqués et la mitose (M) qui assure une répartition homogène du matériel génétique et du cytoplasme entre les deux cellules filles (Fig. 5).

Au repos, la cellule est en phase G<sub>0</sub> (quiescence). Le passage de l'état G<sub>0</sub> à la phase G<sub>1</sub> (contrôle de l'entrée en prolifération) marque l'entrée de la cellule en division. L'engagement de la cellule dans le cycle est alors irréversible. Pendant la phase S, la cellule synthétise et duplique son ADN. La phase G<sub>2</sub> correspond à une phase de transition vers la phase M.



**Figure 5. Cycle de division cellulaire.**

La radiosensibilité d'une cellule varie selon les phases du cycle. Les phases les plus radiosensibles sont les phases G<sub>2</sub> et M. Par ailleurs, la phase la plus résistante est la phase S (Favaudon, 2000).

Les cellules exposées à une irradiation sont bloquées en phase G<sub>1</sub> ou G<sub>2</sub>. En réponse aux CDB, la cellule met en place des mécanismes spécifiques de réparation pendant les points de contrôle G<sub>1</sub>/S ou G<sub>2</sub>/M du cycle de division cellulaire.



Certaines lésions irréparables, en particulier les CDB, peuvent entraîner une large gamme d'effets réversibles ou irréversibles, à échéance immédiate comme à très long terme, tels que la lyse cellulaire et/ou la perte de capacité proliférative (mort clonogénique ou reproductive). Ces deux effets définissent la mort cellulaire ; c'est l'objectif recherché pour l'éradication des tumeurs par RT (Favaudon, 2000).

Cinq types de mort cellulaire radio-induite sont répertoriés dans le cas de cellules tumorales exposées aux RI (Favaudon, 2000) :

- l'apoptose (mort cellulaire programmée de type I) : c'est la mort cellulaire la plus connue et la plus étudiée ;
- la mort cellulaire immédiate ou autophagie (mort cellulaire programmée de type II) : elle survient rapidement après des doses d'irradiation élevées. Elle nécessite l'activation de lysosomes pour une lyse rapide des membranes et des organites intracellulaires. C'est un processus peu connu (Zhuang *et al.*, 2009) ;
- la mort mitotique (mort cellulaire rapide) : la cellule meurt pendant la phase M en tentant de se diviser alors que des lésions chromosomiques majeures ne sont pas réparées ;
- la mort cellulaire différée (ou mort post-mitotique) : les cellules ayant subi des lésions non fatales continuent à se diviser en conférant à leur descendance une instabilité génomique, évoluant au fil des générations. Ces remaniements s'accompagnent de la mort d'une proportion variable de cellules ;
- l'oncose : cette mort cellulaire est caractérisée par un gonflement du cytoplasme et des organelles, un accroissement de la perméabilité membranaire, la lyse du noyau et des protéines de la cellule.

L'oncose est un processus mal connu et est généralement appelée « nécrose » dans la littérature. Par ailleurs, le terme de mort cellulaire par nécrose est abusivement utilisé pour qualifier tout ce qui n'est pas de l'apoptose (Favaudon, 2000). Par exemple, la mort cellulaire différée se caractérise notamment par un gonflement et une lyse cellulaires, comme pour la mort nécrotique. Il est alors question de mort cellulaire différée nécrotique (Delmas *et al.*, 2002).

### **II.1.2.2.3. Les actions sur les tissus**

La sensibilité d'un tissu aux RI est proportionnelle au temps de renouvellement des cellules qui le composent et inversement proportionnelle au degré de différenciation de ces cellules.

Les cellules tumorales sont par définition en prolifération continue. Leur temps de doublement est très rapide comparé à celui des cellules saines. Dans le cas des gliomes, l'irradiation a un effet immédiat sur les cellules tumorales plutôt que sur les cellules saines du SNC. Des effets tardifs peu réversibles apparaissent sur les tissus sains à renouvellement lent. Ces effets tardifs constituent le facteur limitant de la RT.

L'objectif du radiothérapeute est de minimiser l'impact des RI sur les cellules saines, tout en délivrant la dose maximale pour traiter la tumeur. Le fractionnement de la dose totale, le nombre de fractions, l'intervalle entre deux fractions, l'étalement du traitement et la dose totale sont tous les éléments qui constituent le programme radiothérapeutique. La dose totale d'irradiation d'un GBM est généralement de 60 Gy de manière fractionnée : 2 Gy/j, cinq fois par semaine, pendant six semaines (Dhermain et al., 2005).

## **II.2. Radiorésistance des GBM**

Malgré les bénéfices réels de la RT, les récives sont systématiques dans le cas des GBM, quelques mois après la fin du traitement. C'est pourquoi nous allons nous intéresser aux facteurs biologiques responsables de la radiorésistance des GBM.

D'un point de vue clinique, une tumeur est considérée comme radiorésistante si :

- une récive rapide (quelques semaines) est observée malgré la régression de cette tumeur après la RT ;
- aucune régression n'est observée après la RT.

Les GBM sont considérés comme des tumeurs particulièrement radiorésistantes. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène récurrent.

### **II.2.1. Radiorésistance extrinsèque liée au microenvironnement**

Il est clairement établi que le microenvironnement entourant la tumeur est impliqué dans de nombreux phénomènes tels que l'hypoxie, l'angiogenèse ou l'invasion des cellules cancéreuses. Ces phénomènes ont un impact direct sur la radiorésistance des cellules de GBM (Jensen, 2009).

## II.2.1.1. Hypoxie

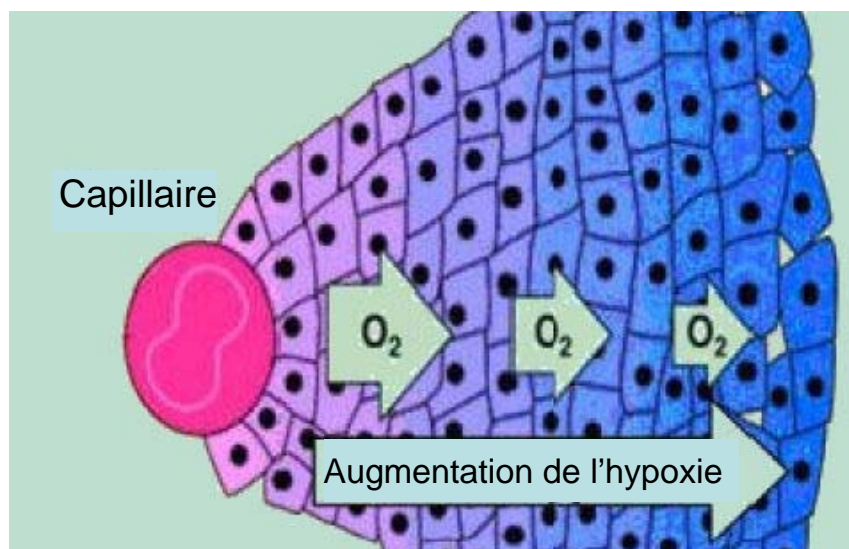
### II.2.1.1.1. Oxygénation des GBM

L'oxygène, lorsqu'il est présent dans les cellules, réagit avec les radicaux libres pour former des ROS ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ...) responsables du stress oxydant. Lors d'une radiothérapie, ces ROS augmentent l'effet des RI.

Dans le cas des tumeurs solides, comme les GBM, l'absence d'oxygène est récurrente. Ce manque d'oxygène, ou hypoxie, est une marque caractéristique des GBM (Fischer et al., 2008; Jensen, 2009). L'hypoxie est incontestablement le premier facteur de radiorésistance des GBM.

Deux types d'hypoxie existent. L'hypoxie chronique est liée à la progression tumorale qui éloigne les cellules des capillaires sanguins. C'est pourquoi, il est fréquent d'observer, à partir des vaisseaux et/ou capillaires, des cellules oxygénées, puis hypoxiques et enfin nécrotiques (Fig. 6). L'hypoxie aiguë est liée à des anomalies lors de la néo-vascularisation tumorale (Tredan *et al.*, 2008).

La vascularisation des GBM, autrement dit l'angiogenèse, est donc impliquée dans l'hypoxie (Cohen-Jonathan Moyal, 2009; Mazon *et al.*, 2009).



**Figure 6. Augmentation de l'hypoxie dans des cellules tumorales entourant un capillaire sanguin ([www.accesspharma.com/images/hypoxia.jpg](http://www.accesspharma.com/images/hypoxia.jpg)).**

### **II.2.1.1.2. Oxygénation et RT**

Contourner le phénomène d'hypoxie permettrait de radiosensibiliser les GBM. L'utilisation de doses fractionnées et étalées dans le temps favorise la réoxygénation des cellules hypoxiques (Hennequin *et al.*, 2009). Le mécanisme est la migration des cellules hypoxiques vers des zones mieux oxygénées, après la mort des cellules plus proches des capillaires.

Par ailleurs, des essais cliniques d'oxygénothérapie hyperbare ont été réalisés afin d'élargir la zone oxygénée autour des capillaires. Cependant, cette technique, lourde à mettre en place, a été abandonnée car peu de bénéfices ont été obtenus (Mazeron *et al.*, 2005).

### **II.2.1.2. Angiogenèse et invasion cellulaire**

#### **II.2.1.2.1. Angiogenèse et GBM**

L'angiogenèse tumorale correspond à la croissance de néo-vaisseaux sanguins à partir des parois ou des extrémités des vaisseaux existants. L'angiogenèse est un élément clé de la progression des gliomes et, en particulier, des GBM. Ce sont les tumeurs cérébrales les plus angiogéniques et avec le plus fort degré de prolifération vasculaire et d'hyperplasie (développement exagéré) de cellules endothéliales.

Ainsi, la prolifération microvasculaire constitue une signature histopathologique caractéristique des GBM et est étroitement liée au pronostic de survie des malades (de Bouard & Guillo, 2005; Wong *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'intense vascularisation des GBM est responsable de divers symptômes pathologiques comme les œdèmes péritumoraux et les hémorragies intratumorales visibles en neuro-imagerie (Wong *et al.*, 2009).

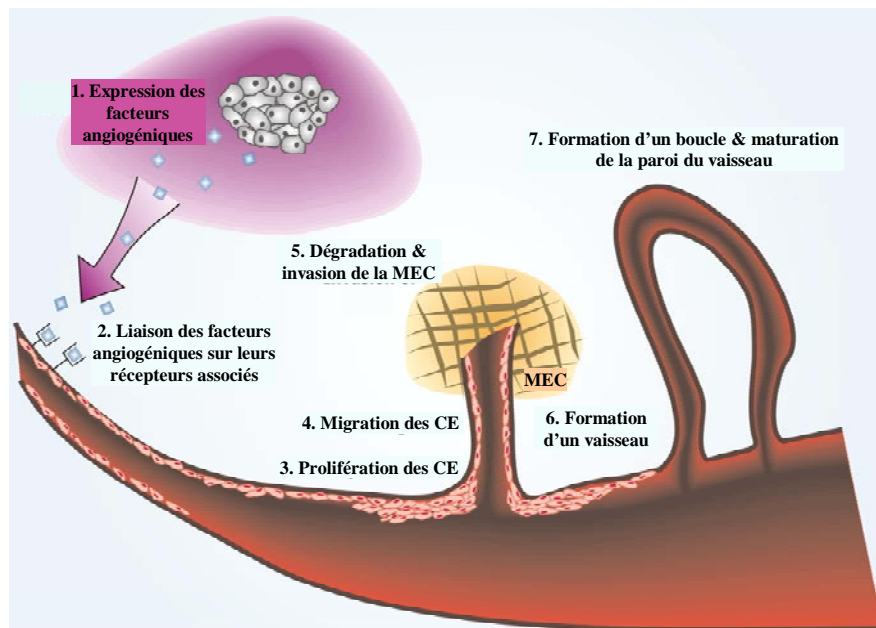
#### **II.2.1.2.2. Initiation de l'angiogenèse**

Le processus angiogénique dans les tumeurs est relativement complexe. Il requiert des activités mitotiques, protéolytiques et chimiotactiques des cellules endothéliales. Il est la résultante d'un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques à la suite d'altérations environnementales, telles que l'hypoxie (Fischer *et al.*, 2008; Jensen, 2009) et/ou d'altérations génétiques.

Cependant, ce déséquilibre peut être initié par les cellules tumorales elles-mêmes par la synthèse de leurs propres facteurs angiogéniques, l'activation des macrophages infiltrés dans la tumeur qui libèrent à leur tour ces facteurs et/ou la synthèse de protéases spécifiques capables de libérer ces facteurs stockés dans la matrice cellulaire (de Bouard & Guillamo, 2005).

### II.2.1.2.3. Mécanisme d'angiogenèse des GBM

L'angiogenèse des GBM (Fig. 7) commence par l'expression de facteurs angiogéniques tels que le VEGF (**étape 1**), qui se lie à leurs récepteurs associés, ici le VEGFR, sur les cellules endothéliales (CE) (**étape 2**). Le VEGFR déclenche la prolifération (**étape 3**) et la migration des CE (**étape 4**). Des enzymes protéolytiques dont les MMP (*Matrix MetalloProteinases*) provoquent ensuite la dégradation de la matrice extra-cellulaire (MEC). L'invasion des CE dans la MEC est notamment possible grâce à l'implication de molécules d'adhésion cellulaire comme les intégrines (**étape 5**). Les CE sont ensuite assemblées en une structure tubulaire, pour former un nouveau vaisseau (**étape 6**). Le processus se termine par la formation d'une boucle et la maturation de la paroi du vaisseau (**étape 7**) (Wong et al., 2009).



**Figure 7. Etapes de l'angiogenèse des GBM (Wong et al., 2009).** Abréviations : CE, Cellules endothéliales ; MEC, Matrice extra-cellulaire.

Le lien entre l'hypoxie et l'angiogenèse des GBM est clairement établi (Jensen, 2009). Les deux phénomènes sont interdépendants : l'angiogenèse est à l'origine de l'hypoxie et l'hypoxie stimule l'angiogenèse (Mazeron et al., 2009).

## **II.2.2. Radiorésistance intrinsèque**

La radiorésistance intrinsèque correspond à la mise en place par la cellule de mécanismes moléculaires qui lui permettent de résister aux RI. Le concept de radiorésistance/radiosensibilité intrinsèque peut être vérifié *in vitro* par l'établissement de courbes de survie en fonction d'une dose d'irradiation unique (Skuli, 2007). Ceci constitue la base même des tests de clonogénie réalisés sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires afin d'évaluer leur fraction de survie.

Par ailleurs, les mécanismes mis en place dans la cellule sont fortement conditionnés par l'environnement extérieur (hypoxie, angiogénèse, stress oxydant). Ces processus activent des voies de signalisation à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire d'oncogènes, de gènes suppresseurs de tumeur, mais surtout de récepteurs membranaires tels que les intégrines, VEGFR et FGFR. Ces récepteurs sont des passerelles entre le milieu extra-cellulaire et la cellule.

Nous allons donc présenter différents mécanismes moléculaires connus dans les GBM pour être activés/initiés par les rayonnements ionisants, l'hypoxie ou l'angiogénèse, conduisant à la radiorésistance intrinsèque de ces tumeurs : signalisation membranaire, activation de seconds messagers, régulation du cycle cellulaire, réparation de l'ADN, inactivation de mécanismes de morts cellulaires radio-induites. La mort cellulaire par oncose radio-induite est peu décrite dans le cas des GBM. La résistance des tumeurs face à cette mort cellulaire ne sera donc pas explicitée dans ce manuscrit.

### **II.2.2.1. Capacité de réparation de l'ADN**

La capacité des cellules à réparer les CDB de l'ADN est essentielle pour la survie de la cellule et corrèle avec sa radiorésistance intrinsèque. Une meilleure compréhension de l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN est à l'heure actuelle indispensable.

C'est ainsi qu'Otomo et ses collaborateurs ont étudié l'expression génique de deux lignées cellulaires de GBM humains avant et juste après irradiation. L'une de ces lignées est considérée radiorésistante (U87), l'autre radiosensible (A172). Un plus grand nombre de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN sont sur-exprimés après irradiation dans la lignée U87 par rapport à la lignée A172 (Otomo et al., 2004). La lignée U87 semble posséder une plus grande capacité à réparer l'ADN, ce qui pourrait expliquer son profil radiorésistant.

L'EGFR, véritable passerelle entre la matrice extra-cellulaire et la cellule, est activé sous irradiation et pourrait jouer un rôle dans la radiorésistance des GBM. Récemment, Mukherjee et ses collaborateurs (Mukherjee et al., 2009) ont montré que, dans la lignée de GBM U87, la protéine DNA-PKCS (*DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit*) est activée sous irradiation par l'intermédiaire de la forme mutante EGFR $\nu$ III. La protéine DNA-PKCS est une enzyme clé dans la réparation des CDB radio-induits. La voie présumée serait EGFR $\nu$ III/PI3K/Akt-1/DNA-PKCS. Ces résultats fournissent une base mécanistique importante pour la compréhension de la radiorésistance des GBM.

Enfin l'étude réalisée par Zheng et son équipe souligne l'implication de la protéine membranaire TRAF2 (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2*) dans la radiorésistance. Lorsqu'elle est sur-exprimée, elle protège les cellules U251 de GBM humain de la mort cellulaire radio-induite. Outre son rôle anti-apoptotique, cette protéine activerait la protéine NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*) impliquée dans la transcription de l'ADN. TRAF2 contrôlerait par ailleurs plusieurs protéines impliquées dans le point de contrôle G2/M (Zheng et al., 2008).

#### **II.2.2.2. Rôle protecteur des anti-oxydants**

Certaines petites molécules (glutathion, vitamines C/E...) et/ou enzymes (glutathion peroxydase et reductase, superoxyde dismutase...) jouent un rôle protecteur par des réactions de détoxification des ROS dans les cellules (Tuzgen et al., 2007).

Gao et ses collaborateurs ont montré que les cellules de gliomes humains U118-9 sur-exprimant l'enzyme anti-oxydante SOD1 (*CuZn SuperOxide Dismutase 1*) sont davantage radiorésistantes. De plus, la sur-expression de SOD1 empêche l'accumulation de ROS longtemps après l'irradiation (Gao et al., 2008).

Par ailleurs, un métabolite tel que la taurine (Tau) est reconnu comme osmorégulateur et cytoprotecteur en inhibant les ROS dans les cellules (Sokol *et al.*, 2004). Selon Patterson et ses collaborateurs, la concentration en Tau dans la cellule est corrélée à sa radiorésistance (Patterson et al., 2008). Cette affirmation mérite d'être confirmée par des études *in vivo*.

### II.2.2.3. Résistance des GBM à l'apoptose

Les voies induisant l'apoptose dans les GBM sont tout particulièrement étudiées afin de mieux comprendre les mécanismes de radio-résistance des GBM.

Quelques études soulignent l'influence du gène suppresseur de tumeur TP53 sur la radio-résistance des cellules tumorales, bien que son rôle soit controversé (Tsai et al., 2007). Les cellules U87 de GBM possédant le gène TP53 muté semblent moins sensibles aux RI lors de RT multi-fractionnées (Haas-Kogan et al., 1999). La perte de fonction de p53 dans les cellules engendre une incapacité à entrer en apoptose (Nozaki et al., 1999).

La voie PI3K/Akt-PKB/mTOR est connue pour être activée par les RI dans les GBM. Elle semble directement impliquée dans la radio-résistance de ces derniers. *In vitro*, l'inhibition de cette voie radiosensibilise la lignée U87 (Li et al., 2009). Sur des biopsies, le degré d'activation de cette voie est corrélé au pronostic de survie des patients traités par RT, suggérant un lien direct avec la radio-résistance (Chakravarti et al., 2004; Nakamura et al., 2005).

Knizetova et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence une régulation autocrine de la progression, de la viabilité et de la radio-résistance de plusieurs lignées cellulaires de GBM, à travers l'association VEGF/VEGFR2. L'oncogène VEGFR, outre sa fonction pro-angiogénique, est connu pour activer trois voies de signalisation impliquées dans la croissance, la prolifération, la migration et la survie cellulaires. Ces trois voies ont été décrites précédemment (**Annexe 1**). Les auteurs présentent le VEGF comme un radioprotecteur des GBM et l'inhibition du récepteur VEGFR2 augmente considérablement le taux de cellules apoptotiques radio-induites. Cette découverte ouvre des perspectives très prometteuses de chimiothérapie à visée radiosensibilisante (Knizetova et al., 2008).

Selon Zhou et son équipe, SOCS1 et SOCS3 (*Suppressors Of Cytokine Signaling 1 & 3*) sont des marqueurs de radio-résistance des GBM. Le premier est éteint, alors que le deuxième est constamment exprimé dans les biopsies étudiées. Les deux ont un rôle antagoniste de régulateur de la voie RAS/Raf/MAPK : SOCS1 l'inhibe et SOCS3 l'active. Cette voie est aussi impliquée dans la radio-résistance des GBM en contrôlant l'oncogénèse, la survie et la prolifération cellulaires. L'activation de SOCS1 ou l'inhibition de SOCS3 dans les cellules U87 les radiosensibilisent (Zhou et al., 2007). Cette étude suggère que SOCS1 et SOCS3 peuvent être des cibles thérapeutiques pour radiosensibiliser les GBM.



Les travaux présentés par Chen et ses collaborateurs mettent en avant la protéine pro-apoptotique BAX (*Bcl2-Associated X protein*) comme une protéine radiosensibilisante dans des cellules sous hypoxie. Les GBM expriment très faiblement cette protéine, contrairement à d'autres types cellulaires plus radiosensibles. Lorsque cette protéine mitochondriale est activée préalablement sous hypoxie dans des cellules U87, elle les radiosensibilise de manière significative (Chen et al., 2005).

Enfin, des travaux récents ont montré qu'il est possible de radiosensibiliser des modèles cellulaires de GBM en inhibant XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*). XIAP fait partie des IAP, protéines anti-apoptotiques souvent exprimées dans différents cancers. Les inhibiteurs de XIAP agissent de manière synergique avec les rayons ionisants  $\gamma$  en perméabilisant les membranes et en activant les caspases et l'apoptose. Ils ne semblent pas cytotoxiques sur des cellules saines du SNC de rat. Des essais pré-cliniques peuvent donc être envisagés combinant l'utilisation de ces inhibiteurs et la RT (Vellanki et al., 2009).

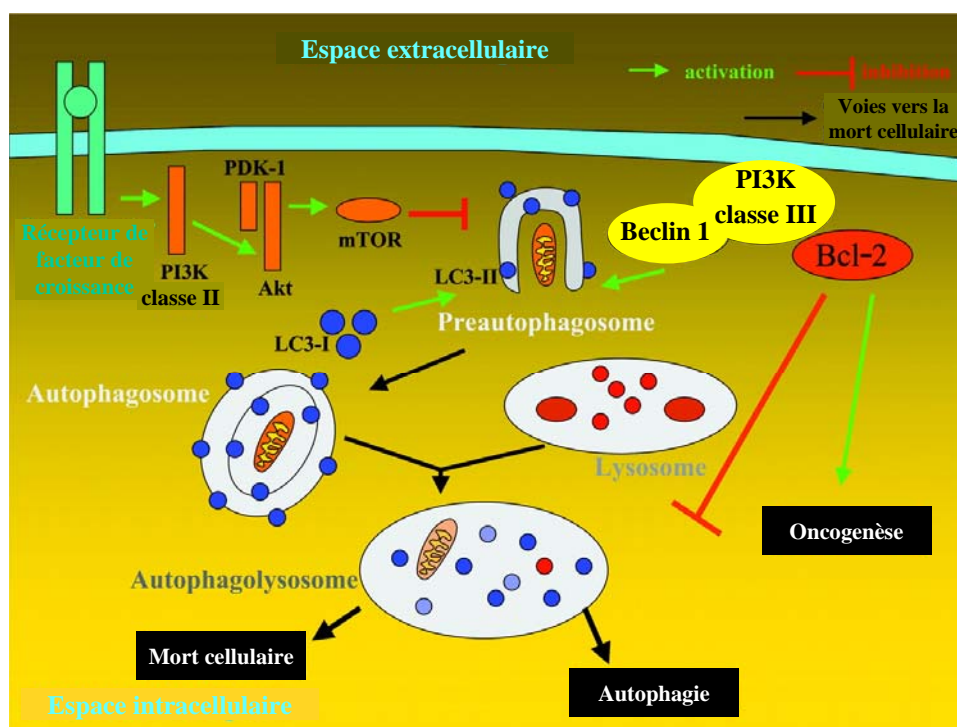
#### **II.2.2.4. Résistance des GBM à l'autophagie**

L'autophagie (du grec : « se manger soi-même ») est un processus cellulaire important dans l'oncogénèse des GBM et dans leurs radio- et chimiorésistances. Le rôle de l'autophagie est controversé : elle agirait à la fois sur la survie et la mort cellulaires. L'autophagie dégrade les protéines superflues et les organelles cytoplasmiques dégradées (par les RI par exemple) par l'intermédiaire des lysosomes. Dans un premier temps, son rôle est donc de maintenir l'homéostasie cellulaire.

En revanche, lorsque les cellules sont trop endommagées, l'autophagie constitue un véritable type de mort cellulaire qui se substitue ou s'associe à l'apoptose (Lefranc *et al.*, 2007). Dans le cas des gliomes, la mort autophagique radio-induite prédomine sur la mort apoptotique radio-induite (Zhuang et al., 2009).

D'un point de vue mécanistique, les voies de signalisation pro-autophagiques, bien que caspases-indépendantes, sont pour la plupart communes avec celles de l'apoptose. En effet, la voie PI3K/Akt-PKB/mTOR est la voie principale de l'autophagie dans les cellules de mammifères (Fig. 8). Cette voie est connue pour être activée sous RI (Zhuang et al., 2009).

Des gènes suppresseurs de tumeur tels que p53 et Beclin 1 sont inducteurs d'autophagie (Lefranc et al., 2007; Zhuang et al., 2009). La protéine Beclin 1 associée à la protéine PI3K classe III favorise l'autophagie et inhibe l'oncogénèse. En revanche, lorsque le complexe interagit avec Bcl-2, le processus serait inversé (Fig. 8).



**Figure 8. Principale voie de l'autophagie (Lefranc et al., 2007). Abréviations : PDK-1, Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1 ; LC3-I/II, Light Chain I/II.**

Selon Lefranc et ses collaborateurs, l'autophagie est supprimée aux stades précoces de formation de la tumeur. En revanche, elle est surexprimée dans les stades avancés de celle-ci. Elle agirait ainsi contre les stress extra-cellulaires. Une équipe montre que l'expression de Beclin 1 est inversement proportionnelle au grade des gliomes primaires humains (Miracco *et al.*, 2007). Ainsi, l'introduction de Beclin 1 dans les cellules cancéreuses du sein MCF-7 xénogreffées induit l'autophagie et inhibe la tumorigénèse. L'initiation de l'autophagie aux stades précoces de formation des tumeurs pourrait constituer un axe thérapeutique intéressant, étant donné que les voies pro-apoptotiques sont désactivées dans la plupart des cancers (Lefranc et al., 2007).

Les agents pro-autophagiques, ciblant principalement mTOR, seront présentés dans la partie II.3. Le cas du TMZ, essentiel dans la stratégie actuelle de traitement des GBM, est controversé. Lefranc et ses collaborateurs (Lefranc & Kiss, 2006) le présentent comme un agent pro-autophagique, alors que d'autres le présentent comme un agent pro-apoptotique induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Laigle-Donadey et al., 2009) ou en augmentant les CDB (Chakravarti et al., 2006).

### **II.2.2.5. Résistance des GBM aux morts mitotique et post-mitotique : rôle de RhoB**

Des chercheurs de l'Institut Claudius Regaud (ICR) de Toulouse proposent une toute autre voie de radiorésistance des GBM. La résistance des cellules à la mort radio-induite non-apoptotique serait contrôlée par une petite protéine G active sous forme farnésylée, RhoB (Milia et al., 2005). Elle appartient à la sous-famille des Rho, cette dernière faisant partie de la famille des Rho GTPases, qui elle-même appartient à la grande famille des Ras.

Les Rho GTPases agissent comme des interrupteurs moléculaires, passant d'une forme active lorsqu'elles sont liées à un GTP à une forme inactive lorsqu'elles sont liées à une GDP (Vega & Ridley, 2008). Plusieurs études montrent que l'expression de RhoB est induite en réponse à des stress comme les UV, l'hypoxie, les RI ou des dommages à l'ADN dans différents modèles cellulaires (Skuli, 2007; Vega & Ridley, 2008).

Dans un premier temps, il a été montré dans des cellules HeLa que le mécanisme de radiorésistance est induit par une des isoformes du facteur angiogénique FGF-2. Cette signalisation radio-induite est régulée par la protéine RhoB qui empêche la mort cellulaire post-mitotique (Ader et al., 2002).

Dans les modèles NIH-3T3 (lignée cellulaire de fibroblaste embryonnaire murin), U87 (lignée cellulaire humaine de GBM) et HeLa (lignée cellulaire humaine de cancer du col de l'utérus), les chercheurs de l'ICR mettent en évidence que RhoB protège les cellules irradiées de la mort cellulaire différée (ou post-mitotique) ou mitotique *via* FGF-2 dans le cas des cellules HeLa (Ader *et al.*, 2002; Delmas *et al.*, 2002; Ader *et al.*, 2003; Milia *et al.*, 2005).

Ader et ses collaborateurs montrent que RhoB régule la protéine pro-angiogénique MMP2, qui elle-même active des récepteurs membranaires tels que les intégrines ou l'EGFR (Ader et al., 2003).

Les auteurs montrent ensuite que pour des lignées cellulaires de GBM humains, U87, SF763, U251 et SF767, la radiorésistance intrinsèque des cellules les plus radiorésistantes peut être diminuée en inhibant RhoB par un inhibiteur de farnésyltransférase (FTI), R115777 (Zarnestra<sup>®</sup>) (Delmas et al., 2002). La véritable cible du FTI reste cependant controversée (Wang et al., 2006).

Les mêmes auteurs ont par ailleurs récemment mis en évidence un mécanisme de signalisation radio-induit RhoB-dépendant. En effet, de manière basale, dans les modèles U87

et SF763 de GBM, RhoB est régulée dans la cellule par les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et/ou  $\alpha_v\beta_5$  via ILK (*Integrin-Linked Kinase*) (Monferran *et al.*, 2008). Les intégrines sont des récepteurs de la matrice extra-cellulaire impliquées dans l'invasion et l'angiogenèse des tumeurs notamment. Elles participent également à l'adhésion des cellules à la matrice extra-cellulaire et sont connues pour être activées lors de stress génotoxique. Ainsi, elles confèrent à la cellule de plus grandes radio- et chimio-résistances (Hehlhans *et al.*, 2007).

Les Rho GTPases interviennent dans les étapes clés de la tumorigenèse. Cependant, au sein de la sous-famille des Rho, la protéine RhoB fait exception. En effet, RhoB est généralement sous-réglée dans les tumeurs humaines. Son expression est inversement corrélée à l'agressivité de la tumeur (Vega & Ridley, 2008). Son rôle dans la cellule est encore controversé. Certains résultats présentent RhoB comme un gène suppresseur de tumeur dans certains modèles cellulaires, et notamment dans des modèles de GBM.

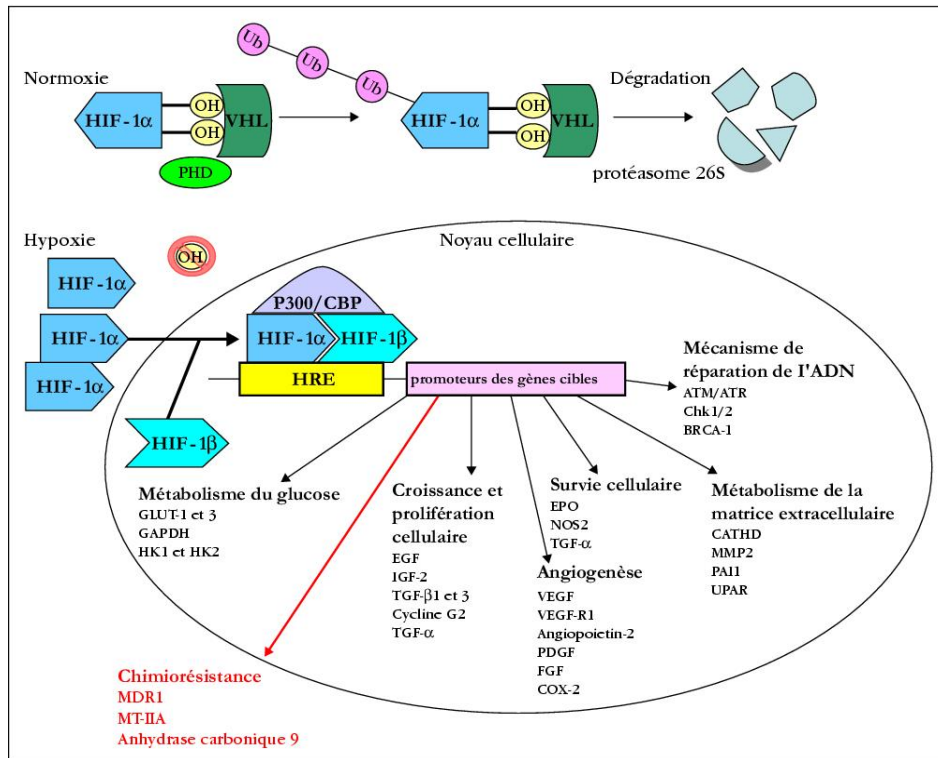
En effet, il a été montré *in vitro* que les protéines RhoB et PKC $\iota$  (*Protein Kinase C iota*) sont antagonistes et que RhoB est inhibée par PKC $\iota$  de manière basale dans les cellules de GBM U87. En revanche, lorsque RhoB est activée, elle inhibe la mobilité et l'invasion des cellules en inactivant à son tour PKC $\iota$  (Baldwin *et al.*, 2008). Elle aurait aussi des fonctions pro-apoptotiques (Vega & Ridley, 2008).

#### **II.2.2.6. Adaptation des GBM à l'hypoxie : rôle de HIF-1**

La réponse et l'adaptation des cellules à l'hypoxie sont contrôlées par différents facteurs de transcription inductibles, notamment HIF-1 (*Hypoxia Inductible Factor-1*). Cette protéine est le régulateur le plus important dans le contrôle de l'homéostasie de l'oxygène. Elle permet la réponse et l'adaptation des cellules dans un environnement pauvre en oxygène.

HIF-1 induit plus d'une centaine de gènes impliqués dans les phénomènes d'angiogenèse, tels que VEGF et PDGF, de glycolyse, de prolifération et de survie, de régulation du pH, d'invasion et de migration cellulaires tels que MMP2 (*Matrix MetalloProteinase 2*) et ILK (Skuli, 2007).

HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités : HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . Alors que la sous-unité HIF-1 $\beta$  est exprimée de manière constante dans la cellule, HIF-1 $\alpha$  est rapidement dégradée par le protéasome sous normoxie (condition normale d'oxygénation). En revanche, sous hypoxie, HIF-1 $\alpha$  n'est plus réprimée : le dimère HIF-1 peut se former et se lier à l'ADN facilitant l'expression des gènes cibles (Fig. 9) (Tredan *et al.*, 2008).



**Figure 9. Régulation de l'activité de HIF-1 et gènes activés par HIF-1 (Tredan et al., 2008).** Abréviations : HRE, Hypoxia Responsive Element ; P300/CBP, facteurs de transcription auxiliaires p300 et CBP (Creb Binding Protein) ; VHL, von Hippel-Lindau.

Cependant, la sous-unité HIF-1 $\alpha$ , sur-exprimée dans de nombreux cancers, peut être régulée positivement sous normoxie *via* une stabilisation de la protéine et/ou une augmentation de la transcription et de la traduction. Cette induction est la résultante de l'activation d'oncogènes tels qu'EGF ou IGF (*Insulin-like Growth Factor*), ou de la délétion de gènes suppresseurs de tumeur comme PTEN, VHL (von Hippel-Lindau) ou TP53. Ainsi, différentes voies de signalisation telles que la voie PI3K/Akt-PKB/mTOR, celle des MAP kinases et/ou celle de p53 sont susceptibles de stabiliser HIF-1 $\alpha$  et donc d'activer HIF-1 (Kaur et al., 2005; Skuli, 2007).

Les chercheurs de l'ICR montrent que pour des lignées cellulaires de GBM sous hypoxie (U87 et SF763), la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est régulée par la voie de signalisation des intégrines  $\alpha_v\beta_3$ - $\alpha_v\beta_5$ /FAK/RhoB/GSK-3 $\beta$  (Skuli et al., 2009). Cette voie constitue donc une cible thérapeutique prometteuse afin d'augmenter l'efficacité de la RT des GBM.

### II.2.3. Cellules souches cancéreuses (CSC) de GBM

La dernière cause de radiorésistance des GBM présentée dans ce manuscrit concerne les cellules souches cancéreuses (CSC). Cette piste, encore hypothétique il y a quelques années, est de plus en plus prise en compte (Kanu et al., 2009; Noda et al., 2009). Les GBM sont présentés comme des tumeurs hétérogènes constituées en grande majorité de cellules cancéreuses différenciées mais aussi de CSC. Ces dernières sont parfois suspectées d'être à l'origine même de la tumeur (Singh et al., 2004).

#### II.2.3.1. Caractéristiques des CSC

Les cellules souches cancéreuses possèdent un grand nombre de caractères des cellules souches (Altaner, 2008) comme une expression à leur surface de transporteurs ABC impliqués dans la chimiorésistance, une capacité de réparation de l'ADN très importante, une résistance à l'apoptose et une absence d'étape de quiescence dans le cycle cellulaire. Dans la tumeur, les cellules souches cancéreuses se caractérisent par leur capacité à :

- s'auto-renouveler ;
- se différencier de manière aberrante ;
- être à l'initiative de la tumorigenèse ;
- migrer ;
- régénérer une copie conforme de la tumeur d'origine lorsqu'elles sont injectées *in vivo* (Altaner, 2008).

L'isolement de cellules souches dans une biopsie de GBM n'a été réalisé que très récemment. Les auteurs ont mis en évidence le caractère fortement oncogénique de la sous-population des cellules souches exprimant l'antigène CD133<sup>+</sup> à leur surface. Implantée *in vivo*, une centaine de cellules CD133<sup>+</sup> est capable de régénérer à l'identique la tumeur dont elles sont issues (Singh et al., 2004).

### **II.2.3.2. Radiorésistance des CSC**

Blazek et ses collaborateurs ont montré que, pour des cellules de médulloblastome, la sous-population CD133<sup>+</sup> est plus radiorésistante que la sous-population CD133<sup>-</sup> (Blazek *et al.*, 2007). Ceci corrèle avec les résultats présentés par Altaner (Altaner, 2008), qui montrent que la sous-population de cellules souches cancéreuses de GBM exprimant les marqueurs CD133, CD117, CD71 et CD45 est radiorésistante.

Implantées *in vivo*, les CSC CD133<sup>+</sup> prolifèrent rapidement après irradiation. Cela s'expliquerait par le fait qu'elles évitent la mort cellulaire apoptotique en activant les mécanismes de réparation de l'ADN. La capacité de réparation des CDB des CSC CD133<sup>+</sup> et donc leur survie cellulaire sont accrues, ce qui leur confère une très grande radiorésistance (Bao et al., 2006a).

### **II.2.3.3. Différentiation et angiogenèse des CSC**

La sous-population CD133<sup>+</sup> possède des caractères de prolifération, d'auto-renouvellement et de pluripotence très prononcés. Ces cellules sont capables *in vivo* dans la souris d'initier la tumorigenèse et de se différencier en cellules endothéliales. Cela expliquerait pourquoi les GBM possèdent à la fois des cellules tissulaires et vasculaires (Altaner, 2008).

Bao et ses collaborateurs (Bao et al., 2006b) montrent que les cellules souches cancéreuses de gliomes induisent l'angiogenèse tumorale en sur-exprimant le facteur angiogénique VEGF.

### **II.2.3.4. Caractère invasif des CSC**

Malgré la résection quasi-totale de la tumeur par les neurochirurgiens, la récurrence tumorale est fatale. La capacité des CSC de GBM à migrer et à proliférer malgré un nombre très restreint de cellules pourrait être l'explication des rechutes cliniques systématiques des GBM (Kanu et al., 2009).

## **II.3. Radiosensibilisants et GBM**

Nous allons dans cette partie détailler les agents chimiothérapeutiques radiosensibilisants dans le cadre du traitement des GBM.

Un agent est radiosensibilisant s'il n'a aucun effet cytotoxique sur les cellules lorsqu'il est administré seul. En revanche, la combinaison RT et radiosensibilisant doit avoir un effet synergique (supra-additif) pour apporter un bénéfice net comparé à la RT seule ou la RT combinée au TMZ (RT/TMZ) (Hennequin et al., 2009).

Même si, depuis 2005, le traitement standard des GBM associe RT/TMZ, le bénéfice est réel mais insuffisant et la découverte de nouveaux radiosensibilisants s'impose. Les nouveaux agents thérapeutiques décrits ci-dessous, encore en essais cliniques, sont administrés en traitement initial avec ou sans TMZ, mais toujours en association avec la RT.

Les agents thérapeutiques présentés sont répartis en quatre groupes : les agents anti-récepteurs de facteurs de croissance ; les agents anti-angiogéniques ; les inhibiteurs des voies de transduction du signal ; les inhibiteurs de protéases et d'autres protéines.

### **II.3.1. Témzolomide : premier radiosensibilisant des GBM**

Depuis les travaux publiés par Stupp et ses collaborateurs (Stupp et al., 2005), le TMZ (Témodal<sup>®</sup>) administré concomitamment à la RT est le traitement standard des GBM (Maire et al., 2008). L'association RT/TMZ augmente significativement la médiane de survie (14,6 mois au lieu de 12,1 mois avec la RT seule) et la survie sans progression au bout de 2 ans (26% de patients contre 10% avec la RT seule).

Comme l'ont montré Hegi et ses collaborateurs (Hegi et al., 2005), le statut du gène MGMT conditionne ces résultats : seules les personnes possédant un promoteur du MGMT méthylé bénéficient de l'effet synergique du TMZ couplé à la RT.

Le TMZ est un agent alkylant de l'ADN. Il s'administre par voie buccale du fait de sa biodisponibilité et de sa bonne pénétration dans le SNC. Le TMZ est administré quotidiennement (75 mg/m<sup>2</sup>/j) pendant toute la durée de la RT. Puis il est administré de façon adjuvante toutes les quatre semaines (six cycles de cinq jours) à la dose initiale de 150 mg/m<sup>2</sup>/j (Maire et al., 2008).



### II.3.2. Agents anti-récepteurs de facteurs de croissance

Actuellement, l'une des principales cibles des agents thérapeutiques des GBM concerne les récepteurs de facteurs de croissance, et principalement le PDGFR, l'EGFR et sa forme mutée l'EGFR $\nu$ III. Ces récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase intracellulaire : c'est ce site catalytique qui est préférentiellement ciblé.

Le mésylate d'imatinib (Glivec<sup>®</sup>) est une petite molécule qui inhibe le PDGFR. Administrée seule sur des GBM en récurrence, cette molécule ne montre aucune efficacité en phase II. Cette inefficacité peut être due à une faible pénétration à travers la barrière hémato-encéphalique (Reardon & Wen, 2006). Cependant, des essais *in vitro* ont montré le potentiel radiosensibilisant de la molécule sur une lignée cellulaire de GBM humain, RuSi RS1 (Holdhoff et al., 2005). Une étude clinique de phase I/II du mésylate d'imatinib administré concomitamment à la RT est actuellement en cours (Noda et al., 2009).

Le géfitinib (Iressa<sup>®</sup>) et l'erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>) sont deux inhibiteurs oraux de l'EGFR. Ces deux produits n'ont pas donné de résultats convaincants en monothérapie sur des GBM en récurrence. Par ailleurs, l'essai de phase I/II du géfitinib administré en même temps que la RT n'a pas été concluant. Seuls les patients pour lesquels l'EGFR est activé répondraient au traitement (Le Guilloux & Carpentier, 2008). Des essais de phase I de l'erlotinib avec la RT seule ou avec RT/TMZ sont en cours (Noda et al., 2009).

D'autres agents, comme le cétuximab (Erbix<sup>®</sup>) ou le peptide CDX-110 (Noda et al., 2009), ciblant l'EGFR ou sa forme mutante EGFR $\nu$ III sont actuellement évalués dans des essais cliniques couplés à la RT/TMZ.

### II.3.3. Agents anti-angiogéniques

Du fait du caractère angiogénique prononcé des GBM, cibler les protéines membranaires impliquées dans l'angiogenèse des GBM est un autre axe de recherche thérapeutique important.

L'étude de phase I/II associant l'inhibiteur des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$ , le cilengitide (EM121974), à la RT/TMZ a montré une bonne tolérance et aucune majoration de la toxicité radio-induite (Cohen-Jonathan Moyal, 2009). Le groupe de patients possédant un promoteur du MGMT méthylé semble mieux répondre au traitement (Noda et al., 2009).

Plusieurs agents anti-VEGFR sont à l'essai : le vatalanib (PTK787/ZK222584), le sunitinib (Sutent<sup>®</sup>), le cediranib (Recentin<sup>®</sup>) ou encore le sorafenib (Nevaxar<sup>®</sup>). En plus de leur activité anti-angiogénique, ces agents inhibent d'autres voies d'activation intracellulaire comme celles du PDGFR ou de l'EGFR (Le Guilloux & Carpentier, 2008).

Par exemple, le vatalanib et le sunitinib inhibent le VEGFR et le PDGFR. Le vatalanib est à l'essai en phase I/II comme adjuvant à la RT/TMZ et/ou après traitement standard (sur des GBM en récurrence). Les essais pré-cliniques montrent une augmentation de la radiosensibilité des cellules U87. Quant au sunitinib, il est actuellement étudié en phase I avec RT/TMZ (Noda et al., 2009).

### **II.3.4. Inhibiteurs des voies de transduction du signal**

Comme la voie de transduction du signal PI3K/Akt/mTOR est fortement impliquée dans la radiorésistance des GBM, ses protéines associées constituent des cibles privilégiées.

Plusieurs inhibiteurs de la protéine mTOR sont en essai clinique. Par exemple, deux dérivés du sirolimus (rapamycine, Rapamune<sup>®</sup>), le temsirolimus (CCI-779<sup>®</sup>) et l'évérolimus (RAD-001<sup>®</sup>) combinés à la RT/TMZ sont en essais cliniques de phases I et I/II respectivement (Noda et al., 2009). Des essais de phase II de ces composés seuls ont cependant montré des résultats décevants sur des GBM en récurrence (Le Guilloux & Carpentier, 2008).

Les inhibiteurs de farnésyltransférase tels que le tipifarnib (Zarnestra<sup>®</sup>) et l'ionafarnib (Sarasar<sup>®</sup>) ont une fenêtre thérapeutique assez large. Ils inhibent la farnésylation post-traductionnelle de protéines comme RAS et RhoB. La protéine RAS est impliquée dans la voie des MAP kinases qui contrôle la croissance et l'invasion cellulaires. La protéine RhoB est, quant à elle, impliquée dans la radiorésistance et l'hypoxie sur des modèles de GBM humains. Des essais pré-cliniques ont montré le caractère radiosensibilisant du tipifarnib sur des modèles de GBM (Wang et al., 2006). Mais des essais de phase II sur des GBM en récurrence ont conduit à des résultats décevants (Le Guilloux & Carpentier, 2008). Le tipifarnib a été testé en phase I avec la RT seule (Moyal et al., 2007) et en phase pré-clinique avec le TMZ sur des GBM en récurrence (Noda et al., 2009).

La protéine PKC est impliquée dans la voie des MAP kinases et possède probablement un rôle pro-angiogénique (Le Guilloux & Carpentier, 2008). Dans des essais *in vitro*, l'inhibiteur de la PKC $\beta$ , l'enzastaurine, a montré des propriétés anti-angiogéniques et radiosensibilisantes. Des essais de phase I/II avec RT/TMZ sont en cours (Noda et al., 2009).

### II.3.5. Inhibiteurs de protéases et d'autres cibles

Parmi les inhibiteurs de protéases, le prinomastat (AG3340) inhibe spécifiquement les métalloprotéases MMP-2, -9, -13 et -14. Ces protéines dégradent la matrice extra-cellulaire et contribuent à l'invasion, à la tumorigenèse et aux processus métastatiques des tumeurs (Le Guilloux & Carpentier, 2008). Même si les résultats *in vivo* sont encourageants, les résultats de l'essai clinique de phase II avec la RT/TMZ ne sont pas concluants (Wong et al., 2009).

Cibler l'histone deacétylase (HDAC) semble intéressant afin d'inhiber la réparation des CDB dans les GBM. Des inhibiteurs de HDAC tels que l'acide valproïque sont à l'étude. Actuellement, une étude de phase II entreprise par le NCI (*National Cancer Institute*) évalue l'action concomitante de la RT et de l'acide valproïque par rapport à la RT seule sur des tumeurs gliales (Noda et al., 2009).

Par ailleurs, le 2-méthoxyestradiol (2ME2), inhibiteur *in vitro* de la prolifération cellulaire, induit l'apoptose et augmente les lésions cellulaires provoquées par les radicaux libres oxygénés. Ce composé a la particularité de sous-réguler l'expression de HIF-1 et d'inhiber l'expression de VEGF induite par ce dernier. Son efficacité a été évaluée dans un essai clinique de phase II sur des GBM en récurrence. Les résultats semblent encourageants (Wong et al., 2009).

Le bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF. Plusieurs études cliniques ont montré le bénéfice réel de son association avec l'irinotecan (Campto<sup>®</sup>), inhibiteur de la topoisomérase I, sur des GBM en récurrence. Des essais cliniques de cette association pour le traitement des GBM en phase initiale sont prévus (Laigle-Donadey et al., 2009).

Ainsi, une phase pré-clinique est envisagée avec la RT et l'association bevacizumab-irinotecan, précédée d'un pré-traitement avec ces deux produits. Par ailleurs, un essai pilote en phase II est en cours avec le bevacizumab et RT/TMZ. Les résultats préliminaires semblent encourageants (Laigle-Donadey et al., 2009).

Un essai pré-clinique est en cours pour évaluer le lénalidomide (Revlimid<sup>®</sup>), un analogue de la thalidomide supposé inhiber l'expression de VEGF et IL-6, en association avec la RT sur des patients atteints de GBM (Mazeron et al., 2009).

Pour terminer, nous évoquerons l'étude de phase II du topotécan (Hycamtin<sup>®</sup>), autre inhibiteur de la topoisomérase I, associé à la RT, les résultats de l'essai de phase I ayant été prometteurs (Laigle-Donadey et al., 2009).

### II.3.6. Résumé des radiosensibilisants présentés et perspectives

La recherche de nouveaux radiosensibilisants devrait aboutir prochainement à un traitement des GBM associant la RT à plusieurs agents thérapeutiques. Ces agents seront choisis en fonction des marqueurs prédictifs permettant d'identifier des sous-groupes de patients répondant à une association donnée.

La figure 10 illustre les cibles moléculaires et les radiosensibilisants actuellement en essais cliniques qui deviendront peut-être des agents thérapeutiques des GBM.

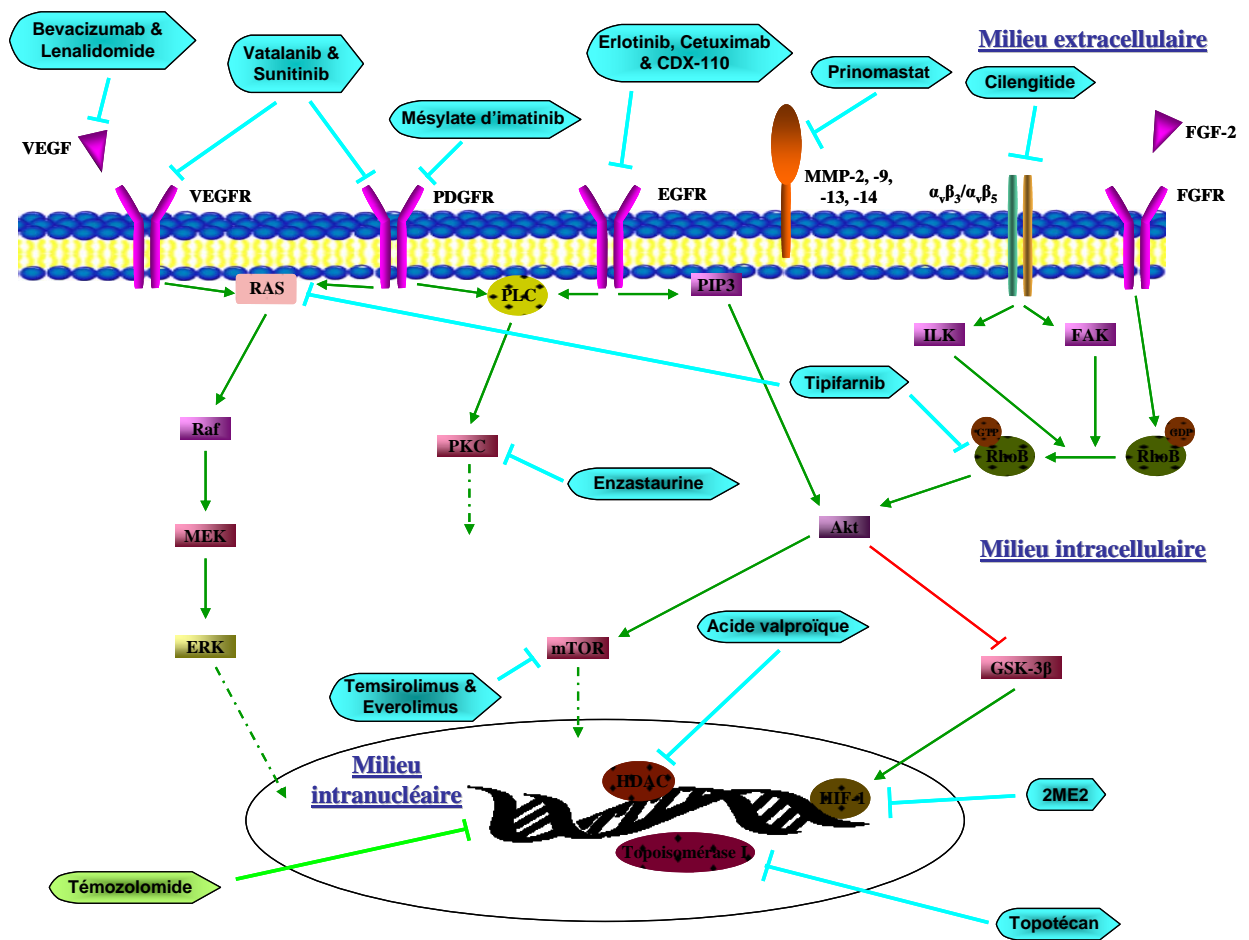


Figure 10. Illustration des voies de signalisation et des agents radiosensibilisants dans les GBM. Abréviations : PIP3, Phosphatidyl-Inositol Triphosphate.

Le tableau 2 liste les agents radiosensibilisants actuellement en essais cliniques, leurs cibles, le type de thérapie et les effets observés. La plupart de ces agents ne sont pas exclusivement utilisés pour le traitement des GBM.

**Tableau 2. Essais cliniques d'agents radiosensibilisants pour le traitement des GBM.**

Cible	Agent	Traitement concomitant	Essai(s) clinique(s)	Résultats/Observations	Référence
PDGFR	Mésylate d'imatinib	RT	I/II	En cours Pas de bénéfices sur des GBM en récurrence (phase II)	(Noda et al., 2009)
EGFR	Erlotinib	RT ou RT/TMZ	I	En cours	(Krishnan et al., 2006)
	Cetuximab	RT/TMZ	I/II	En cours	(Combs et al., 2006)
EGFRvIII	CDX-110	RT/TMZ	II/III	Résultats des essais en phase II prometteurs	(Sampson <i>et al.</i> , 2008)
$\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$	Cilengitide	RT/TMZ	I/II	Seuls les patients avec le promoteur MGMT méthylé semblent bénéficier de cette association	(Stupp et al., 2007)
VEGFR/PDGFR	Vatalanib	RT/TMZ	I/II	Résultats positifs <i>in vitro</i> sur U87	(Stupp et al., 2005)
	Sunitinib	RT/TMZ	I	En cours	(Louis et al., 2007)
mTOR	Temsirolimus	RT/TMZ	I	Résultats décevants en phase II sur des GBM en récurrence	(Noda et al., 2009)
	Évérolimus	RT/TMZ	I/II		
RAS/RhoB	Tipifarnib	RT	I	Résultats <i>in vitro/in vivo</i> encourageants	(Moyal et al., 2007)
PKC $\beta$	Enzastaurine	RT/TMZ	I/II	Résultats <i>in vitro/in vivo</i> encourageants	(Sijben et al., 2008)
MMP-2, -9, -13, -14	Prinomastat	RT/TMZ	II	Décevant malgré des résultats pré-cliniques encourageants	(Levin et al., 2002)
HDAC	Acide valproïque	RT	II	Réalisé par le NCI	(Noda et al., 2009)
HIF-1 (entre autres)	2ME2	-	II	GBM en récurrence Résultats encourageants	(Kirkpatrick et al., 2007)
VEGF	Bevacizumab	Irinotecane + RT/TMZ	Pré-clinique	Bénéfice réel de l'association bevacizumab-irinotecane sur des GBM en récurrence	(Laigle-Donadey et al., 2009)
	Bevacizumab	RT/TMZ	II pilote		(Lai et al., 2008)
VEGF, IL-6	Lénalidomide	RT	Pré-clinique	-	(Drappatz et al., 2009)
Topoisomérase I	Topotécan	RT	II	Résultats préliminaires encourageants	(Varveris et al., 2008)

### III. Outils pour les études morphologiques et métaboliques des gliomes

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser au principe et à l'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de la spectrométrie de résonance magnétique (SRM) en tant qu'outils radiologiques médicaux. Ces deux techniques utilisées *in vivo*, basées sur les principes de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), apportent des informations morphologiques et métaboliques sur les gliomes des malades. Ces données permettent de visualiser et de mieux cibler les zones à irradier.

Nous présenterons ensuite la RMN métabolique et son apport dans l'étude des profils métaboliques des gliomes. Il s'agit d'une approche analytique relativement nouvelle complémentaire de l'IRM et de la SRM.

#### III.1. Principes de la RMN

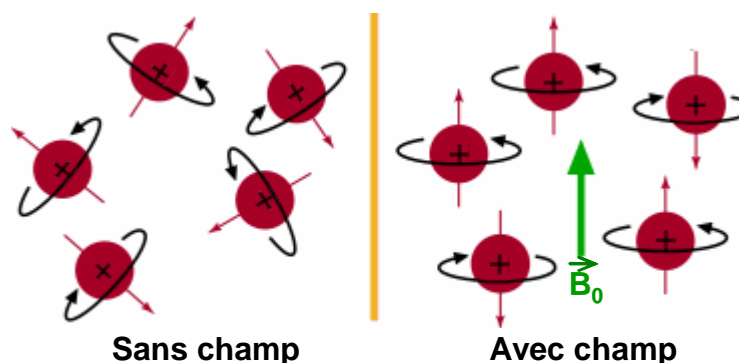
##### III.1.1. Noyaux, spin et moment magnétique

La résonance magnétique est basée sur l'existence d'un paramagnétisme des noyaux des atomes. Les noyaux contiennent des particules chargées, les protons, en rotation sur elles-mêmes (spin).

Cette rotation génère pour chaque noyau un moment magnétique  $\vec{\mu}_i$ , qui est lié à la valeur du nombre quantique de spin  $I$ . Ce dernier peut être nul ou prendre des valeurs multiples de  $\frac{1}{2}$  ( $\frac{1}{2}$ ,  $1...$ ). Seuls les noyaux possédant un nombre quantique de spin non nul, tels que  $^1\text{H}$ , peuvent être étudiés en RMN.

##### III.1.2. Noyaux placés dans un champ magnétique

Placés dans un champ magnétique statique  $\vec{B}_0$ , les moments magnétiques des noyaux de spin  $\frac{1}{2}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) s'orientent selon deux directions : parallèle ( $\uparrow$ ) et antiparallèle ( $\downarrow$ ) au champ  $\vec{B}_0$  (Fig. 11). Les noyaux se comportent alors comme de petits barreaux aimantés.



**Figure 11. Schéma de noyaux de spin  $\frac{1}{2}$  placés dans un champ magnétique  $\vec{B}_0$  (à droite) ou non (à gauche). Les moments magnétiques des noyaux  $\uparrow$  sont dans le sens parallèle au champ et ceux des noyaux  $\downarrow$  sont dans le sens anti-parallèle au champ ([www.chem.ucalgary.ca](http://www.chem.ucalgary.ca)).**

Ces deux directions correspondent, en mécanique quantique, à deux valeurs possibles de niveaux d'énergie :  $E_\alpha$  et  $E_\beta$  (avec  $E_\beta > E_\alpha$ ). Cette différence d'énergie ( $\Delta E$ ), appelée effet Zeeman, est proportionnelle au champ magnétique appliqué et au rapport gyromagnétique, caractéristique propre de chaque noyau, selon l'équation (1) :

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \gamma(h/2\pi)B_0 \quad (1)$$

Avec :  $\gamma$  = rapport gyromagnétique du noyau considéré ( $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$ ) ;  $h$  = constante de Planck ( $6,626\cdot 10^{-34}$  J.s)

Pour un ensemble de noyaux donnés, tels que les protons ( $^1\text{H}$ ), le nombre de noyaux orientés dans le sens parallèle au champ ( $N_\alpha$ ) et situés sur le niveau d'énergie le plus bas ( $E_\alpha$ ) est légèrement plus élevé que le nombre de noyaux ( $N_\beta$ ) situés sur le niveau d'énergie le plus haut ( $E_\beta$ ) et orientés dans le sens antiparallèle. Cette distribution suit la loi de Boltzmann, selon l'équation (2) suivante :

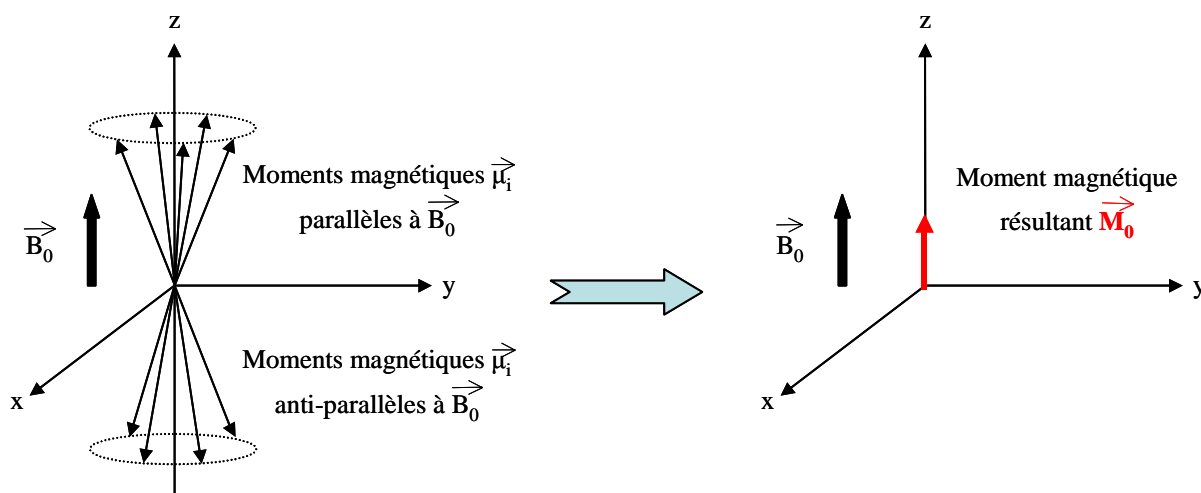
$$N_\beta/N_\alpha = \exp(-\Delta E/k_B T) \quad (2)$$

Avec :  $k_B$  = constante de Boltzmann ( $1,38\cdot 10^{-23}$  J.K $^{-1}$ ) ;  $T$  = température (K)

Pour les noyaux de spin  $\frac{1}{2}$ , les moments magnétiques tournent autour de  $\vec{B}_0$  sur deux cônes parallèle et anti-parallèle à celui-ci. Il est alors possible de considérer un vecteur aimantation résultant  $\vec{M}_0$ , parallèle à  $\vec{B}_0$  et somme de tous les moments magnétiques du système de spins en précession (Fig. 12). Cela donne l'équation (3) suivante :

$$\vec{M}_0 = \chi_m \vec{B}_0 \quad (3)$$

Avec :  $\chi_m$  = susceptibilité magnétique propre au noyau étudié (sans unité)



**Figure 12. Les cônes de précession (à gauche) et le moment magnétique résultant (à droite).**

L'équation fondamentale de la RMN (4) relie la vitesse angulaire de précession  $\omega_0$ , propre à chaque noyau, au champ magnétique  $B_0$  et au rapport gyromagnétique  $\gamma$  :

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (4)$$

Avec :  $\omega_0$  = vitesse angulaire de précession ( $\text{rad.s}^{-1}$ )

Cette vitesse angulaire est proportionnelle à la fréquence de précession (équation 5), appelée fréquence de Larmor :

$$\nu_0 = \omega_0/2\pi = (\gamma B_0)/2\pi \quad (5)$$

Avec :  $\nu_0$  = fréquence de Larmor du noyau donné (Hz)



Par exemple, placés dans un champ de 9 T, la fréquence de Larmor du proton est de 400 MHz. Abusivement, la valeur du champ des appareils RMN est donnée par la fréquence de Larmor du proton.

Enfin, la valeur  $\Delta E$  (équation 1) est, pour les noyaux de spin  $\frac{1}{2}$ , proportionnelle à la fréquence de Larmor (équation 6), selon l'équation (7) :

$$\Delta E = h \cdot \nu_0 \quad (7)$$

### III.1.3. Résonance magnétique et fréquence de Larmor

Le phénomène de résonance d'un noyau donné est observé lorsqu'une onde radiofréquence (RF) est appliquée au noyau placé dans le champ magnétique à condition que sa fréquence  $\nu_1$  soit égale à la fréquence de Larmor du noyau considéré (équation 8).

$$\nu_1 = \nu_0 \quad (8)$$

Avec :  $\nu_1$  = fréquence de l'onde RF excitatrice (Hz)

L'application de la RF de fréquence  $\nu_1$ , appelée impulsion, induit la transition d'un certain nombre de noyaux du niveau d'énergie le plus bas vers le niveau d'énergie le plus haut. Lorsque l'impulsion est de  $90^\circ$ , il y a égalisation des populations de telle sorte que  $N_\alpha = N_\beta$  et basculement du vecteur aimantation résultant  $\vec{M}_0$  sur l'axe  $y'$  du référentiel tournant (Fig. 13).

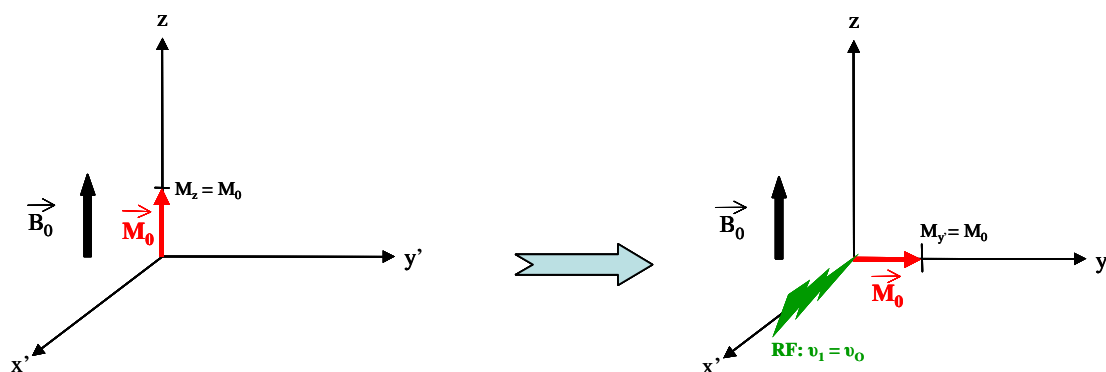


Figure 13. Basculement de  $\vec{M}_0$  sur l'axe  $y'$  après l'application de l'onde RF de fréquence  $\nu_1$ .

### III.1.4. Relaxations magnétiques

Le retour à l'état initial des noyaux s'effectue dès la fin de l'impulsion RF. Le retour à cet équilibre fait intervenir deux phénomènes distincts de relaxation magnétique :

- une relaxation longitudinale (ou relaxation  $T_1$ ). Il s'agit du retour de l'aimantation nucléaire vers sa position d'équilibre, selon l'axe  $z$  ;
- une relaxation transversale (ou relaxation  $T_2$ ). Cette dernière est associée à la destruction de l'aimantation transversale (dans le plan perpendiculaire à  $z$ ) (Fig. 14).

L'aimantation nucléaire revient à sa valeur d'équilibre selon des équations cinétiques du premier ordre, avec comme constantes de temps  $T_1$  et  $T_2$  pour chacune des relaxations.  $T_2$  est toujours inférieur ou égal à  $T_1$  et le système est considéré comme revenu à l'équilibre lorsque  $t = 5T_1$ .

D'un point de vue macroscopique, après l'application de la RF de fréquence  $\nu_1$  (Fig. 13), le vecteur  $\vec{M}_0$  a pour unique composante  $M_{y'}$ . Progressivement,  $M_{y'}$  tend vers 0 (relaxation transversale) et la composante  $M_z$  croît pour tendre vers  $M_0$  initial (relaxation longitudinale).

Pour plus de clarté, nous avons représenté sur la figure 14 la relaxation selon l'axe  $y'$ , puis celle selon l'axe  $z$ . Dans la réalité, ces deux relaxations se font conjointement.

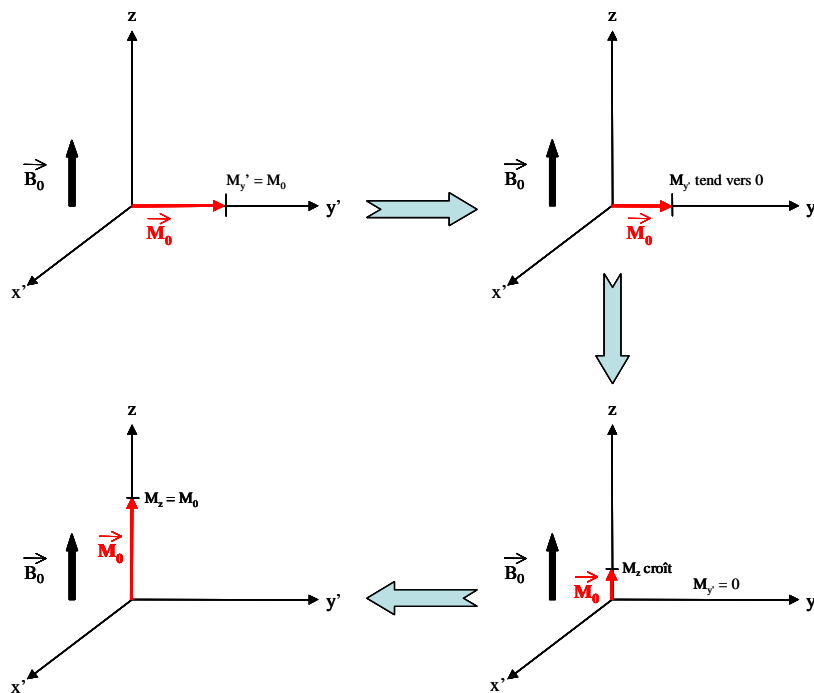


Figure 14. Relaxations longitudinale ( $T_1$ ) et transversale ( $T_2$ ) d'un système de spin  $1/2$ .

Les temps de relaxation dépendent principalement de l'environnement des noyaux considérés. Lors du retour à l'équilibre, le signal RF émis par les noyaux excités est détecté sous la forme d'un courant électrique oscillant et dépendant du temps, qui décroît régulièrement du fait de la relaxation. C'est le FID (*Free Induction Decay*). Après digitalisation, le FID est converti en fréquences par une opération mathématique, dont la plus courante est la transformée de Fourier (TF), pour conduire au spectre RMN conventionnel.

## **III.2. IRM des gliomes**

### **III.2.1. Principe de l'IRM**

L'IRM est une technique d'analyse d'imagerie médicale basée sur les principes physiques de la RMN décrits précédemment. L'utilisation de l'IRM en milieu médical a été rendue possible grâce au progrès des outils informatiques et électroniques de ces dernières décennies, mais aussi par les travaux de P.C. Lauterbur et P. Mansfield (prix Nobel de Médecine en 2003).

Elle permet de visualiser l'intérieur d'un organisme, placé dans un champ magnétique et sur lequel est appliqué une RF, de façon non invasive et sans effet secondaire connu. L'image obtenue provient des protons des molécules d'eau qui composent l'organe étudié. L'eau est en effet présente dans tous les tissus du corps humain à une proportion massique moyenne de l'ordre de 65% chez l'adulte, permettant l'obtention d'une image de haute définition (Vion-Dury, 2002).

### **III.2.2. Obtention d'une image**

La différence par rapport à la RMN conventionnelle est l'application de gradients de champ magnétique permettant un encodage spatial de l'organe étudié dans les trois directions de l'espace. Cet encodage spatial permet la construction d'une image IRM, qui est en fait une carte numérisée en 2D ou 3D d'intensité du signal de l'eau (plan de Fourier).

L'intensité est convertie en échelle de couleurs ou bien en échelle de gris, afin de former une image facilement lisible. L'image obtenue n'est pas celle de toutes les molécules d'eau de l'organe, mais d'un ensemble de points (pixels) de volume fixe (généralement  $1 \text{ mm}^3$ ) et contenant des molécules d'eau.

Ainsi, les caractéristiques de l'image obtenue à partir de l'objet sont la taille de l'image (champ de vue), la résolution (taille du pixel élémentaire) et le contraste (différence détectable de signal entre deux pixels).

La qualité de l'image dépend du nombre de pixels et des caractéristiques de contraste permettant visuellement de bien différencier plusieurs zones (zones tumorales et saines par exemple) (Vion-Dury, 2002).

### III.2.3. Origine du signal et du contraste

La mobilité de l'eau constitue un point critique dans la génération du contraste. Il y a une image (signal) en IRM parce qu'il y a mouvement des molécules d'eau, et donc de spins. Cependant, les atomes d'hydrogène de l'eau des tissus présentent des temps de relaxation d'autant plus longs que les molécules sont mobiles.

Ainsi, les molécules d'eau intracellulaire, à proximité de macromolécules, ont des temps de relaxation courts. En revanche, les molécules d'eau extracellulaire, interstitielle ou cavitaire ont des temps de relaxation plus élevés.

La quantité absolue de protons par point constitue un autre facteur important de contraste. Par exemple, la substance grise contient 84% d'eau (en pourcentage massique), alors que la substance blanche n'en contient que 72%.

### III.2.4. Principales séquences d'imagerie en IRM

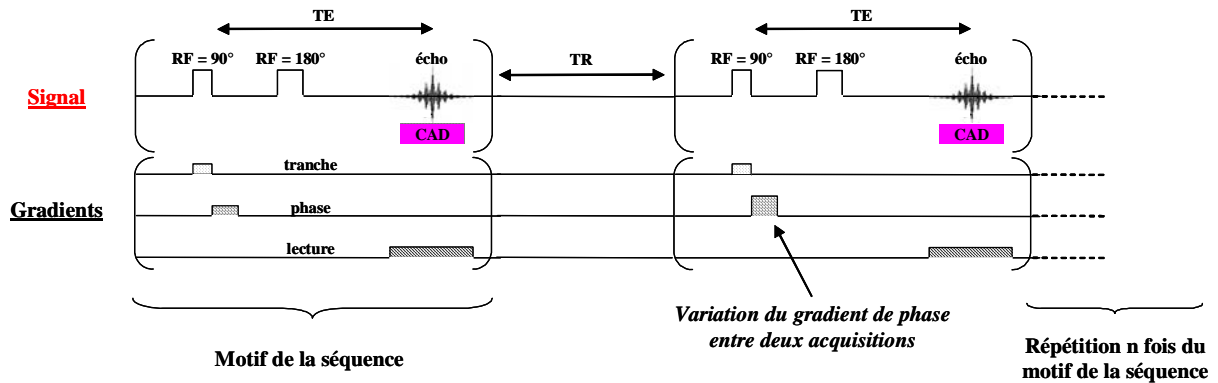
#### III.2.4.1. Structure de base d'une séquence d'imagerie

La succession des événements électroniques et informatiques permettant l'acquisition du signal est appelée séquence d'imagerie. L'image finale obtenue, selon la séquence choisie, est le résultat de la somme de plusieurs motifs (expériences), donnant chacun un signal.

La séquence classique en IRM est dite séquence d'écho (de spin, de gradient) à partir de laquelle plusieurs séquences ont été créées (Fig. 15). Cette séquence comprend :

- une partie (en rouge), commune aux séquences RMN multidimensionnelles, intégrant les impulsions RF  $90^\circ$  (excitation des spins) et  $180^\circ$  (refocalisation des spins) et l'enregistrement d'un signal *via* les amplificateurs et le convertisseur analogique digital (CAD) ;

- une partie comprenant le schéma des variations des gradients dans les trois directions de l'espace et assurant le codage spatial du signal. Ce codage est réalisé sur les deux premiers axes (tranche et phase) et la lecture des coordonnées est réalisée sur le troisième axe (lecture).



**Figure 15. Structure de base d'une séquence d'imagerie.** Abréviations : CAD, convertisseur analogique digital ; TE, temps d'écho ; TR, temps de répétition.

D'une manière générale, les séquences d'IRM utilisent un signal de type écho de spin ou de gradient pour la refocalisation des spins. L'avantage de ces échos est de minimiser l'impact des inhomogénéités de champ magnétique pour une meilleure qualité de l'image.

Le choix de la séquence est fonction des paramètre(s) physico-chimique(s) choisi(s) ( $T_1$ ,  $T_2$ ...), dont on veut voir leur prépondérance dans l'expression mathématique du signal (notion de pondération) (Vion-Dury, 2002).

Il est alors possible d'obtenir des images dont la nature et les caractéristiques dépendent des types de séquences utilisées. Les parties ci-dessous présentent quelques séquences fréquemment utilisées par les cliniciens.

### III.2.4.2. Séquences pondérées en $T_1$

Les séquences d'imagerie pondérées en  $T_1$  sont très utilisées en IRM pour la détection des tumeurs cérébrales. En utilisant un temps d'écho (TE) court (10 à 20 ms) et un temps de répétition (TR) court (400 à 600 ms), un contraste d'image pondérée en  $T_1$  est obtenu. La détection de protons peu mobiles avec un  $T_1$  court est ainsi favorisée.

Des agents chélatants des molécules d'eau, tels que les ions paramagnétiques du gadolinium, sont utilisés en clinique afin d'augmenter le contraste de l'image. Ces agents, dits

positifs, accélèrent la relaxation  $T_1$  des protons, ce qui a pour conséquence une augmentation artificielle du signal de l'eau. Concrètement, l'eau interstitielle, comprise entre les cellules et les vaisseaux sanguins après rupture de ces derniers (œdème), produit un signal plus intense que l'eau intracellulaire.

Ainsi, les agents de contraste paramagnétiques permettent de délimiter des régions invisibles par ailleurs. Ces dernières sont soit des lésions trop petites et indétectables, soit des lésions dans lesquelles les propriétés physico-chimiques de l'eau sont trop similaires à celles des tissus avoisinants.

### **III.2.4.3. Séquences pondérées en $T_2$**

Lors des séquences en pondération  $T_2$ , le TE est long ( $> 80$  ms) ainsi que le TR ( $> 2000$  ms). Cela favorise la détection de protons mobiles avec un  $T_2$  long. Lors de ce type de séquence, l'eau et les œdèmes apparaissent en hyper signal.

Des chélatants ferromagnétiques ou super-paramagnétiques tels que les oxydes de fer, peuvent être utilisés pour ce type de séquences afin de diminuer le  $T_2$  des protons. Ces agents de contraste, dits négatifs, assombrissent le signal des zones dans lesquels ils se concentrent, comme le liquide céphalo-rachidien (LCR). Ces agents ont un effet maximal dans les séquences d'écho de gradients.

### **III.2.4.4. Séquences de type FLAIR**

Les séquences de type FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*), dites séquences d'inversion-récupération (IR), sont très utilisées en clinique. Ce type de séquence est surtout appliqué pour éliminer le signal de certains tissus masquant des lésions. Ces séquences requièrent un long TR (9000 à 12000 ms) et nécessitent donc des temps d'acquisition élevés.

La séquence FLAIR pondérée en  $T_2$ , abusivement appelée séquence FLAIR, permet de différencier le signal du LCR, apparaissant en sombre sur l'image, des lésions parenchymateuses cérébrales. Ce type de séquences est de plus en plus utilisé et s'avère plus précis que la séquence pondérée en  $T_1$  pour la délimitation des tumeurs.

### III.2.4.5. Séquences pondérées en diffusion

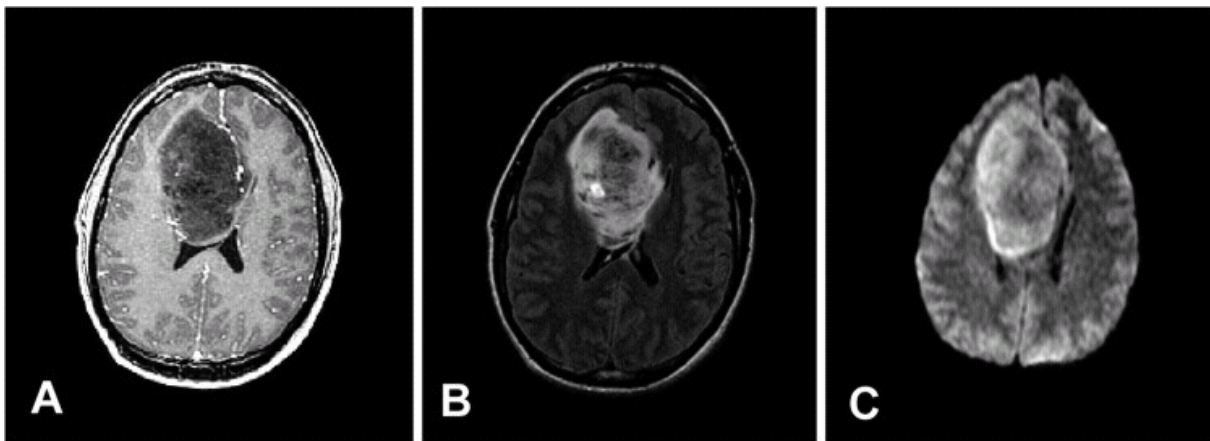
Dans le cerveau, l'œdème est très souvent présent lors des processus pathologiques. La détection de l'œdème cérébral peut être améliorée avec des séquences pondérées en diffusion qui mettent en évidence la possibilité d'un parcours libre des molécules d'eau dans l'espace tissulaire. Avec ces séquences, il est notamment possible de faire la différence entre un œdème cytotoxique et un œdème vasogénique.

Ces séquences reposent sur le fait que les déplacements aléatoires des molécules sont contraints par l'organisation des tissus. Dans les images pondérées en diffusion, les zones de fort signal correspondent aux zones dans lesquelles la diffusion est restreinte.

L'intérêt de la diffusion comme marqueur précoce de réponse des tumeurs cérébrales au traitement a été présenté par Moffat et ses collaborateurs (Moffat et al., 2005).

Cha (Cha, 2009) explique l'utilité de l'imagerie pondérée en diffusion pour déterminer les zones de récurrence de la tumeur après résection de cette dernière.

La figure 16 représente les images IRM pondérée en  $T_1$  (A), FLAIR (B) et pondérée en diffusion (C) d'un astrocytome anaplasique (Cha, 2009). Sur la première image (A), la masse tumorale semble homogène, alors que les images (B) et (C) révèlent l'hétérogénéité de la tumeur.



**Figure 16. Images d'un astrocytome anaplasique : image pondérée en  $T_1$  (A) ; image FLAIR (B) ; image pondérée en diffusion (C) (Cha, 2009).**

### III.2.5. L'imagerie de perfusion et autres types d'imagerie

L'imagerie de perfusion fournit des informations importantes sur le volume sanguin cérébral et la vascularisation cérébrale. L'hémodynamique cérébrale est accessible en utilisant soit un marqueur exogène (agent de contraste paramagnétique), soit un marqueur endogène, tel que l'hémoglobine du sang. Ce type d'imagerie peut être utilisé, en complément des analyses histologiques classiques, pour le diagnostic et la gradation des gliomes (Laprie, 2009).

De plus, elle présente un grand intérêt pour le suivi des traitements anti-angiogéniques des gliomes et dans la détermination des réponses des tumeurs à ces agents (Cha, 2009). Enfin, elle permet de distinguer les régions nécrotiques radio-induites des zones tumorales de récurrence après traitement des gliomes, ces dernières étant caractérisées par une prolifération vasculaire.

La tomographie par émission de positrons (TEP) utilise des molécules radiomarquées pour apporter des informations morphologiques ou métaboliques des gliomes, et des GBM en particulier. Ainsi, le [<sup>18</sup>F]-misonidazole permet d'observer *in vivo* les zones hypoxiques du cerveau. Une étude récente a montré que le volume et l'intensité hypoxiques dans les GBM mesurés avant la RT sont fortement corrélés à des temps de progression tumorale et de survie plus courts (Spence et al., 2008). Cette technique d'imagerie pourrait être utilisée pour des traitements thérapeutiques plus ciblés sur l'hypoxie des GBM et pour contrôler les réponses de la tumeur au traitement.

La scanographie, et plus récemment la tomodensitométrie (TDM), sont d'autres techniques d'imagerie apportant elles aussi de précieuses informations pour mieux cibler et traiter les tumeurs.

Nous allons, dans la partie suivante, discuter de la spectroscopie de résonance magnétique (SRM) comme outil clinique.



### III.3. SRM $^1\text{H}$ des gliomes

#### III.3.1. Intérêt de la SRM $^1\text{H}$

La SRM, tout comme l'IRM, est une méthode d'analyse *in vivo* non invasive. Son but est d'obtenir l'analyse qualitative et parfois quantitative de différents métabolites présents dans un organe tel que le cerveau.

Les métabolites sont des molécules hydrosolubles organiques de bas poids moléculaire (< 1000 uma), présents dans les cellules en tant que précurseurs ou produits des voies de biosynthèse par exemple.

La SRM peut être associée à l'examen IRM classique et apporter des informations complémentaires pour diagnostiquer une tumeur ou localiser les zones nécrotiques ou de récurrence après traitement.

#### III.3.2. Principe de la SRM $^1\text{H}$

Nous nous limiterons dans ce paragraphe à l'étude de la SRM  $^1\text{H}$ . Le  $^1\text{H}$  est le seul noyau actuellement étudié en clinique. Son abondance naturelle, sa grande sensibilité magnétique et sa présence ubiquitaire dans les métabolites font que ces molécules sont détectables avec des temps d'expérience relativement courts.

Le développement récent des appareils à haut champ (> 1 T) a permis l'émergence de la SRM en tant qu'outil intéressant en clinique (Soares & Law, 2009).

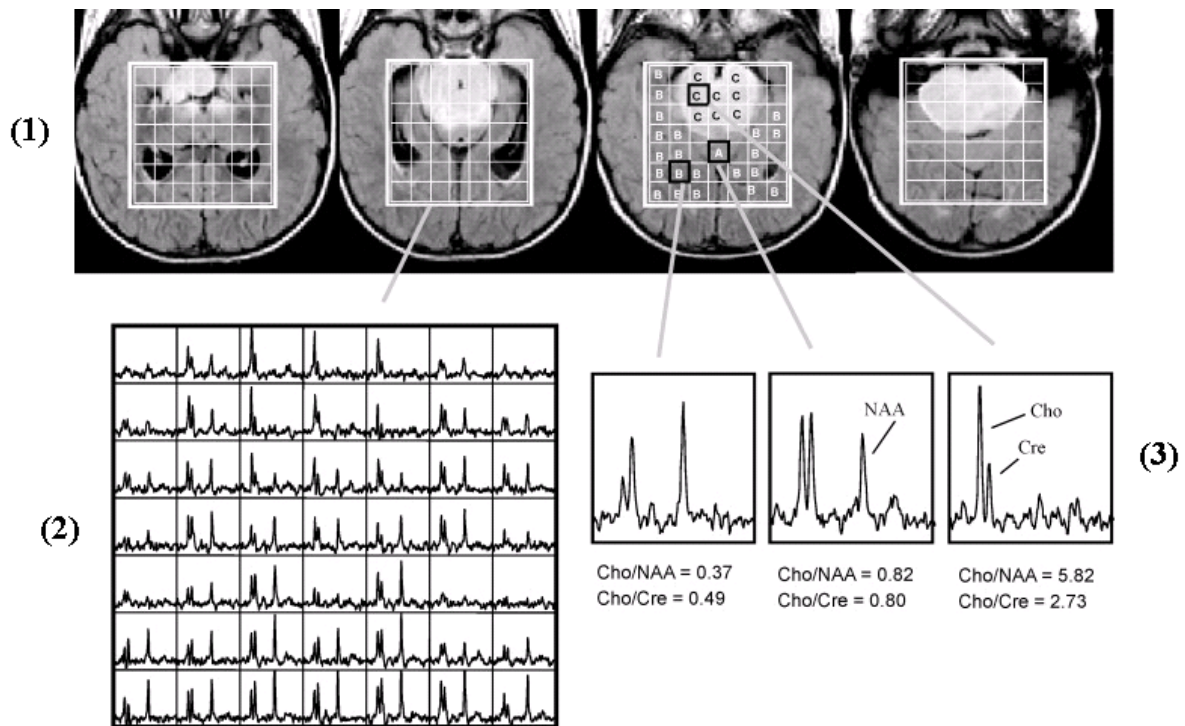
Les séquences adaptées pour la SRM sont utilisables sur les appareils IRM actuels. Le recours à des appareils avec des champs magnétiques de plus en plus élevés fait que les temps d'analyse diminuent (moins de 10 min), ce qui constitue un confort non négligeable pour le patient.

Les métabolites cellulaires les plus abondants étant en solution dans l'eau à une concentration de l'ordre du millimolaire, il est nécessaire de réaliser une saturation du signal de l'eau pendant l'acquisition du signal.

La taille des *voxels* (contraction de *volumetric pixel* : unité de volume en imagerie) utilisés en SRM est de l'ordre du millimètre cube. L'acquisition du signal de SRM se fait selon deux types de techniques :

- la SVS (*Single Voxel Spectroscopy*) qui permet l'enregistrement d'un seul voxel (monovoxel) ;
- la technique multivoxel ou CSI (*Chemical Shift Imaging*) qui permet l'acquisition de plusieurs voxels couvrant un large volume d'intérêt (VOI). Dans ce cas, on parle d'imagerie spectroscopique par résonance magnétique (ISRM).

L'ISRM est la méthode la plus couramment utilisée. On parle de CSI bidimensionnelle (2D) si elle utilise une trentaine de voxels mais sur une seule coupe. Il s'agit de CSI tridimensionnelle (3D) si elle couvre une centaine de voxels sur plusieurs coupes transversales (Fig. 17).



**Figure 17. Images CSI 3D d'un gliome. (1) représente quatre coupes de séquences IRM FLAIR sur lesquelles est représenté le quadrillage des voxels de CSI ; (2) représente une coupe de CSI avec les voxels correspondants ; (3) représente 3 voxels sélectionnés dans une coupe de CSI (Laprie, 2009).**

### III.3.3. Métabolites cérébraux détectés par SRM $^1\text{H}$

Le nombre de molécules (métabolites) détectables en SRM dans le cerveau est limité. Il dépend, entre autres, du TE appliqué pendant la séquence.

En théorie, il serait tout à fait possible de réaliser une quantification absolue des métabolites, en utilisant un standard externe de concentration connue. Cela paraît très séduisant, mais difficilement applicable.

En pratique, les cliniciens ont plutôt recours à des ratios d'aires de pics, aires mesurées par intégration des signaux. Une résolution des pics et un rapport signal/bruit (S/B) optimaux sont indispensables pour pouvoir exploiter convenablement un spectre SRM.

Les principaux signaux observés sur un spectre SRM  $^1\text{H}$  du cerveau sont ceux du N-acétylaspartate (NAA), des composés à choline [tCho : choline (Cho) + phosphorylcholine (PCho) + glycérophosphorylcholine (GPCho)], des composés à créatine [tCr : créatine (Cr) + phosphocréatine (PCr)], du *myo*-inositol (mI), de l'ensemble Glx [glutamate (Glu) + glutamine (Gln) + gamma-aminobutyrate (GABA)] et, dans certaines conditions pathologiques, du lactate (Lac) et des lipides libres (Lip). Les lipides ne sont pas à proprement parler des métabolites.

Les signaux sont généralement des singulets, sauf pour le lactate qui donne un doublet. Les lipides forment des signaux larges entre 0,80 et 1,50 ppm.

La figure 18 représente le spectre SRM  $^1\text{H}$  de cerveau d'un volontaire sain (Sibtain *et al.*, 2007).

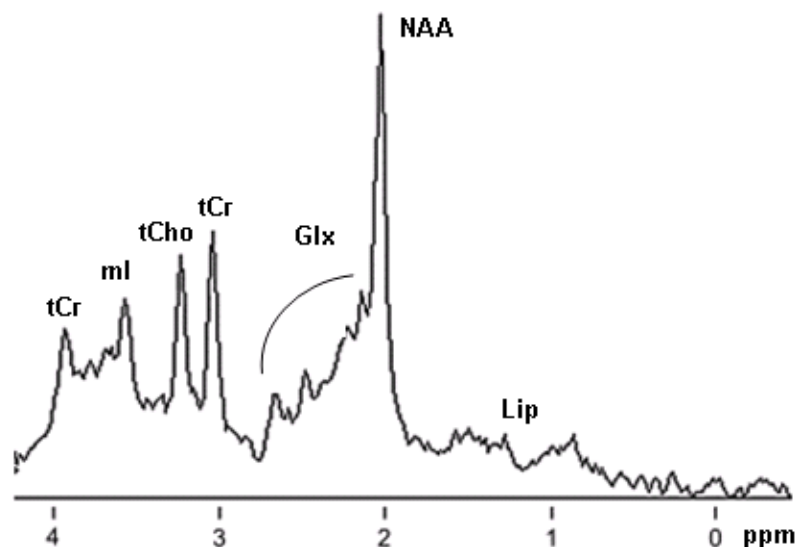


Figure 18. Spectre SRM  $^1\text{H}$  d'un voxel de cerveau humain sain (Sibtain *et al.*, 2007).

Le tableau 3 indique les métabolites et les lipides observés en SRM  $^1\text{H}$ , leur déplacement chimique respectif et la signification de la présence de ces composés d'après les cliniciens (Galanaud et al., 2007; Soares & Law, 2009).

**Tableau 3. Métabolites observés en SRM  $^1\text{H}$  cérébrale.**

Métabolite(s)	Déplacement(s) chimique(s) (ppm)	Interprétation clinique
Lipides libres (Lip)	0,80 - 1,50 (multiplets)	Traduisent une nécrose cellulaire (tumeur de haut grade, ischémie)
Lactate (Lac)	1,33 (doublet)	Augmente en cas d'activation du métabolisme anaérobie (hypoxie, ischémie...)
N-acétylaspartate (NAA)	2,02 (singulet)	Uniquement présent dans les neurones ; marqueur de la densité et de la viabilité neuronales ; diminue en cas de souffrance et de mort neuronales
Glu/Gln/GABA (Glx)	2,05 - 2,50 (multiplet)	Marqueurs du <i>pool</i> des neurotransmetteurs intracellulaires ; intérêt limité car difficile à interpréter
Composés à choline (tCho)	3,22 (singulet)	Marqueurs de la prolifération cellulaire ; augmentent dans les cellules tumorales
Composés à créatine (tCr)	3,02 et 3,94 (singulets)	Marqueurs du métabolisme énergétique et donc de l'état physiologique global du tissu ; souvent utilisés comme pics de référence
<i>myo</i> -inositol (mI)	3,56 (singulet)	Composé uniquement présent dans la glie ; augmente en cas de prolifération et d'activation gliales (gliomes de bas grades) ; diminue en cas d'atteinte toxique de la glie

### **III.3.4. Apport de la SRM <sup>1</sup>H en clinique et en recherche**

Les rapports métaboliques sont fonction des séquences utilisées (TE courts ou longs), de la région cérébrale étudiée, de l'homogénéité des tissus étudiés, de l'âge des patients et de leur pathologie. Il faut toujours garder à l'esprit que les voxels étudiés en SRM sont la moyenne des signaux des métabolites présents dans un volume fixe, aussi hétérogène soit-il.

#### **III.3.4.1. Définition du volume tumoral**

Le premier intérêt de la SRM consiste à apporter des informations métaboliques afin de délimiter plus précisément le volume tumoral à enlever et à irradier. D'une manière générale, le profil métabolique des tumeurs cérébrales s'accompagne d'une augmentation de tCho, du Lac et des Lip et d'une diminution du NAA et de tCr (Soares & Law, 2009). McKnight et ses collaborateurs (McKnight et al., 2002) ont montré qu'il est possible d'utiliser de manière fiable l'indice tCho/NAA (CNI) afin de différencier le tissu sain du tissu tumoral.

#### **III.3.4.2. Prévision des sites de récurrence**

La SRM peut permettre de différencier la radio-nécrose de la rechute dans le suivi des traitements de tumeurs cérébrales, ce qui est très difficile par les méthodes classiques d'imagerie (Laprie, 2009). Une radio-nécrose se traduit par une augmentation des lipides libres alors que les régions de rechute présentent une élévation du taux de tCho (Galanaud et al., 2007).

Park et ses collaborateurs (Park et al., 2007) ont montré que les sites de rechute tumorale se situent, dans 89% des cas, dans des zones qui présentent des anomalies métaboliques avant l'irradiation (tCho élevé). Ce résultat a été confirmé par Laprie (Laprie, 2009) dans des GBM.

La SRM peut donc cibler précisément les zones à fort potentiel de récurrence. Les radiothérapeutes peuvent ainsi proposer une escalade de doses d'irradiation (jusqu'à 90 Gy) focalisée sur des volumes cibles très limités.

Un essai clinique combinant la SRM, pour évaluer les zones de forte activité métabolique, et la RT, à des doses supérieures à la dose standard de 60 Gy, va commencer en France sur des malades atteints de GBM (Laprie, 2009).

### III.3.4.3. Gradation des tumeurs cérébrales

En complément des analyses histologiques, la SRM est de plus en plus utilisée pour grader précisément les tumeurs cérébrales, notamment les astrocytomes. Par ailleurs, l'étude SRM préalable au prélèvement de la biopsie peut être utile pour cibler la zone tumorale la plus proliférative et donc améliorer la gradation de la tumeur (Cha, 2009).

L'aire du pic de tCho augmente graduellement de l'astrocytome de bas grade vers l'astrocytome de grade III, mais diminue dans les GBM. Cela peut s'expliquer par la diminution du signal liée à l'augmentation de la nécrose. Les rapports tCho/NAA et tCho/Cr sont proposés afin de grader les tumeurs. Il est ainsi possible de différencier de manière significative les tumeurs de bas grade de celles de haut grade (Soares & Law, 2009). L'augmentation des Lip et du Lac ainsi que la diminution du mI sont corrélées au grade tumoral (Soares & Law, 2009).

Malgré toutes ces données métaboliques, des recouvrements entre les grades sont fréquents et il n'est pas possible à l'heure actuelle de grader avec certitude une tumeur cérébrale uniquement par SRM  $^1\text{H}$  (Galanaud et al., 2007).

Nous pouvons toutefois citer la constitution récente d'une base de données européenne qui a pour but d'établir les profils métaboliques de tumeurs cérébrales : INTERPRET (*International Network for Pattern Recognition of Tumours*). Une banque de spectres SRM  $^1\text{H}$  de tumeurs cérébrales est ainsi disponible en ligne (<http://azizu.uab.es/INTERPRET/index.html>), avec toutes les informations cliniques en rapport avec chaque tumeur. Les cliniciens peuvent faire appel à cette banque afin de diagnostiquer le plus précisément possible les tumeurs observées par SRM (Sibtain et al., 2007).

#### **III.3.4.4. SRM et recherche**

La SRM reste un outil analytique de recherche très intéressant pour l'analyse métabolique de tissus du fait de son caractère non-invasif et de sa relative facilité d'utilisation. Des chercheurs ont récemment montré qu'il est possible d'établir des profils métaboliques de xénogreffes de GBM à différents stades d'évolution. Deux xénogreffes ont été étudiées. La première présente des caractéristiques de cellules souches cancéreuses de glioblastomes (stade précoce de formation des GBM). L'autre a les caractéristiques d'un GBM plus avancé (fortes angiogenèse et nécrose). Le premier phénotype présente des signaux plus importants de tCho, taurine (Tau) et Lac (Thorsen et al., 2008).

L'augmentation de tCho pourrait être une marque de niches de cellules souches cancéreuses dans les GBM. Les zones de récurrence tumorale correspondraient alors à la présence de ces cellules connues pour être fortement chimio- et radio-résistantes.

#### **III.3.4.5. Perspectives de la SRM des tumeurs cérébrales**

Les avancées technologiques devraient permettre dans un avenir proche l'utilisation d'appareils à très haut champ. Actuellement, les services de radiothérapie sont principalement équipés d'appareil IRM de 1,5 T. Un appareil IRM de 11,5 T sera livré en 2011 au CEA de Saclay à des fins expérimentales.

De nombreux réglages et problèmes techniques sont à surmonter avant l'utilisation courante de tels appareils par les cliniciens. La résolution et la qualité des images seront accrues, tandis que les temps d'analyses seront diminués, ce qui devrait élargir les possibilités de l'IRM et de la SRM en particulier. D'autres noyaux pourront alors être étudiés en SRM clinique, tels que le  $^{31}\text{P}$  ou le  $^{13}\text{C}$ .

La SRM doit s'inscrire dans le cadre d'analyses multivariées visant à caractériser les tumeurs et, en particulier les GBM, au niveau génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique/lipidomique. La constitution de bases de données spectrales, telles qu'INTERPRET, s'inscrit dans cette démarche et semble prometteuse.

La SRM  $^1\text{H}$  des gliomes peut être complétée pour des études cliniques ou fondamentales par l'analyse métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  de biopsies ou de lignées cellulaires de glioblastomes. Nous allons dans la partie suivante montrer les avantages et les limites de cette nouvelle approche analytique.

## III.4. RMN métabolomique et gliomes

### III.4.1. Définition de la métabolomique

Depuis le séquençage du génome humain réalisé en 2001 (Venter et al., 2001), les chercheurs s'intéressent aux fonctions des produits des gènes. Ainsi, de nouvelles stratégies analytiques ont vu le jour. La transcriptomique s'intéresse aux produits de transcription des gènes, les ARN, alors que la protéomique se consacre à l'étude de l'expression et de la régulation des protéines. Parmi les sciences « -omiques », la métabolomique est la plus récente (Oresic, 2009).

Le suffixe « -omique » peut se traduire comme l'analyse et le criblage d'un grand nombre d'échantillons de manière automatisée.

La métabolomique consiste en l'analyse qualitative, quantitative et globale des métabolites (métabolome) d'un système biologique (cellules, tissus, biofluides, organes ou organismes) dans un état physiologique donné.

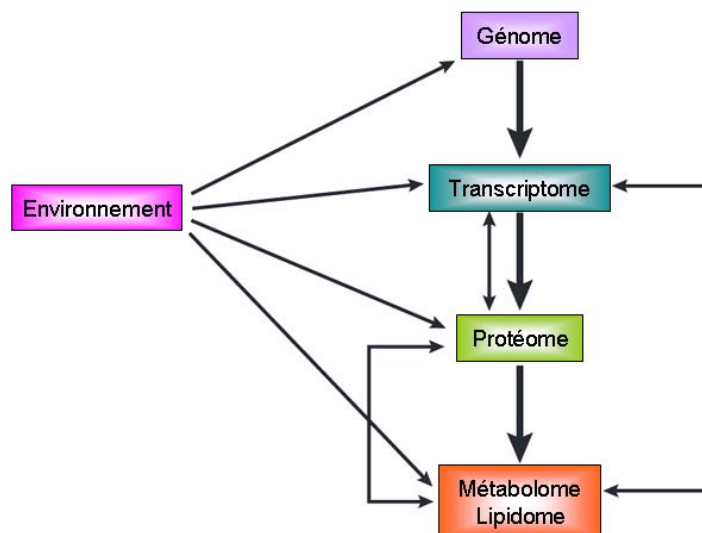
Rappelons que les métabolites sont des petites molécules impliquées dans les voies anaboliques et cataboliques des cellules notamment. Leur poids moléculaire est inférieur à 1 000 uma. Les métabolites, composés hydrosolubles, sont représentés par les acides aminés, les acides organiques, les glucides et de petits peptides.

La métabolomique est un outil analytique qui reflète le phénotype d'un système donné à un instant t et est parfaitement complémentaire des autres approches « -omiques » citées préalablement. Le système biologique peut être naïvement considéré comme une arborescence dans laquelle tous les « -omes » (génomome, transcriptome, protéome et métabolome/lipidome) sont interconnectés et sont dépendants les uns des autres (Fig. 19).

La métabolomique est notamment sensible à toute modification du système biologique, qu'elle soit le résultat d'un changement interne (mutations, cancérisation), ou de stimuli extérieurs (xénobiotiques par exemple). Nicholson a introduit le terme de « métabonomique » qui consiste en l'étude des variations quantitatives de métabolites induites par tout type de modifications (internes) et/ou de perturbations (externes) (Nicholson *et al.*, 1999). Nous utiliserons uniquement le terme de métabolomique dans ce manuscrit.



La métabolomique est parfaitement adaptée aux études pré-cliniques et cliniques de diverses pathologies (cancers, diabète, maladies dyslipidiques...) puisqu'elle est reproductible et peu coûteuse par échantillon, à condition d'avoir à disposition des appareils de RMN ou de spectrométrie de masse (Griffin & Shockcor, 2004).



**Figure 19. Organisation biologique des «-omes » (Griffin & Shockcor, 2004).**

### III.4.2. MS et RMN métabolomique

Les progrès technologiques réalisés ces dernières décennies en RMN et en spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*, MS) ont rendu ces deux techniques parfaitement adaptées pour la métabolomique, et complémentaires. D'autres outils analytiques tels que la FT-IR ou la spectroscopie Raman peuvent être utilisés mais dans une moindre mesure (Ellis et al., 2007). Nous parlerons brièvement de la MS métabolomique dans un premier temps.

#### III.4.4.1. MS métabolomique

Cette technique est généralement utilisée en tandem ( $MS^n$ ), couplée à des techniques chromatographiques liquides ou gazeuses (LC ou GC), afin de faciliter la détection des métabolites dans des extraits tissulaires et/ou cellulaires ou dans des biofluides. La LC/MS est la méthode la plus sensible puisqu'elle permet de détecter et de quantifier des métabolites de l'ordre du picogramme (Spratlin *et al.*, 2009). Bien que le nombre de métabolites chez

l'homme ne soit pas connu avec certitude, il y a actuellement 6500 métabolites référencés et détectés par MS (Carraro et al., 2009). Elle reste la technique la plus prisée pour la métabolomique ainsi que pour la lipidomique, comme nous le verrons plus loin (Griffin & Kauppinen, 2007). Les progrès technologiques de la MS et de la chromatographie sont permanents et promettent un bel avenir pour le développement de la métabolomique (Madalinski et al., 2008; Werner et al., 2008).

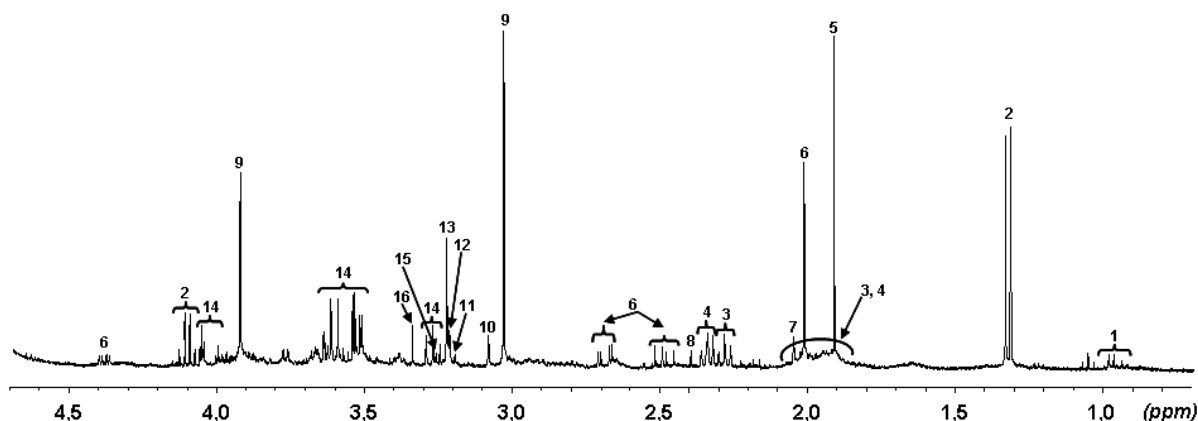
#### **III.4.4.2. RMN métabolomique liquide et HR-MAS**

La RMN métabolomique, ou plutôt la métabolomique par RMN, est principalement celle du  $^1\text{H}$ , puisque ce noyau est présent dans toutes les molécules organiques, que son abondance naturelle est très élevée (99,99%) et qu'il est le plus sensible des noyaux naturels détectables par RMN (Ellis et al., 2007). Nous verrons par la suite que des noyaux tels que le  $^{31}\text{P}$  ou le  $^{13}\text{C}$  peuvent être utilisés dans une moindre mesure en RMN métabolomique.

La RMN métabolomique est apparue grâce aux avancées techniques des trois dernières décennies, telles que les spectromètres à haut champ et les sondes cryogéniques notamment. Ces avancées ont considérablement amélioré la sensibilité, la résolution et les temps d'analyses de mélanges bruts riches en métabolites. Il est ainsi possible actuellement d'identifier et de quantifier des métabolites de l'ordre du micromolaire (Fan & Lane, 2008).

La RMN métabolomique présente l'avantage d'être non destructive, reproductible, facilement quantifiable et ne nécessite pas de séparation chromatographique en amont. Les différentes séquences RMN 1D et 2D (COSY, J-res, HMBC, HSQC...) permettent par ailleurs la détermination de la structure des métabolites observés et d'attribuer un grand nombre de signaux des spectres (Wishart, 2008).

La RMN métabolomique est bien adaptée pour l'étude quasi-directe de biofluides tels que l'urine, le plasma ou le liquide céphalo-rachidien, ou d'extraits cellulaires et/ou tissulaires (Griffin & Kauppinen, 2007). L'analyse d'extraits nécessite cependant d'avantage d'étapes et est un peu plus complexe que l'analyse de biofluides. La figure 20 représente le spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un extrait hydrosoluble d'oligodendrogliome réalisé dans de l'acide perchlorique au laboratoire.



**Figure 20. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (région aliphatique) d'un extrait hydrosoluble d'oligodendroglome réalisé dans l'acide perchlorique.** 1, valine, leucine, isoleucine ; 2, lactate ; 3, glutamate ; 4, glutamine ; 5, acétate ; 6, NAA ; 7, méthionine ; 8, succinate ; 9, créatine ; 10, taurine ; 11, choline ; 12, phosphorylcholine ; 13, glycérophosphorylcholine ; 14, myo-inositol ; 15, bétaine ; 16, scyllo-inositol.

La RMN métabolomique est le plus souvent de la RMN liquide. Mais, depuis une dizaine d'années, la technique RMN HR-MAS (*High Resolution-Magic Angle Spinning*), dérivée de la RMN du solide, permet d'étudier des tissus bruts directement placés dans l'aimant à l'angle « magique » de  $54,7^\circ$  (Lindon et al., 2009). Cette technique est particulièrement prisée pour étudier directement des biopsies de tumeurs. Il est alors question de RMN  $^1\text{H}$  *ex vivo*, parfaitement complémentaire de la SRM  $^1\text{H}$  *in vivo* décrite dans le paragraphe précédent.

Contrairement à la RMN liquide, la RMN HR-MAS conserve théoriquement intact le tissu analysé. Ce dernier peut être réutilisé après analyse RMN pour des analyses histopathologiques (Griffin & Kauppinen, 2007). Cependant, une étude comparative entre la RMN liquide et la RMN HR-MAS réalisée au laboratoire montre que cela n'est pas toujours vrai, et que le choix entre la RMN liquide ou HR-MAS n'est pas aussi tranché (Desmoulin et al., 2008).

### III.4.3. Standardisation des analyses et méthodologie

La standardisation de l'analyse des échantillons en RMN métabolomique est le fondement de cette stratégie analytique. La récolte (extraction ou non) des échantillons, la conservation de ces derniers, leur analyse RMN (choix de la séquence, température, pH...) et enfin l'analyse des données des spectres doivent être rigoureusement identiques d'un échantillon à l'autre. Une méthodologie robuste et rigoureuse doit être adoptée en préalable de toute analyse métabolomique par RMN (Aranibar et al., 2006; Ebbels & Cavill, 2009; Issaq et al., 2009).

Les étapes clés de la RMN métabolomique ont été largement décrites dans différentes revues des chercheurs de l'*Imperial College* à Londres (Nicholson & Wilson, 2003; Lindon & Nicholson, 2008).

### III.4.4. Les différentes stratégies de la RMN métabolomique

Différentes stratégies peuvent être adoptées en RMN métabolomique. Il est possible de considérer : l'analyse ciblée d'un nombre restreint de métabolites (*metabolic target analysis* ou *metabolic targeting*) ; l'analyse de métabolites d'une même classe ou d'une même voie biologique (*metabolic profiling*) et l'analyse globale de tous les métabolites, qu'ils soient identifiés ou non (*metabolite fingerprinting*) (Ellis et al., 2007).

#### III.4.4.1. *Metabolic targeting*

Le *metabolic targeting* est l'analyse qualitative et quantitative de métabolites connus (Ellis et al., 2007). Cette métabolomique « classique » est réalisée depuis près de vingt ans (Wishart, 2008). Elle consiste à intégrer l'aire des pics de métabolites ciblés et de les quantifier à l'aide d'un standard interne. Généralement, le 3-triméthylsilylpropionate-2,3,3,3-d<sub>4</sub> de sodium (TSP) est utilisé comme référence pour calibrer le spectre en déplacement chimique ( $\delta_{\text{TSP}} = 0$  ppm) et pour quantifier les métabolites des extraits hydrosolubles.

Elle a largement été utilisée dans l'étude RMN <sup>1</sup>H *in vitro* de biopsies de tumeurs cérébrales préalablement diagnostiquées et observées par SRM <sup>1</sup>H *in vivo* (Usenius et al., 1994; Podo, 1999). La RMN étant beaucoup plus sensible et plus résolutive que la SRM, il

devient alors attractif de chercher à quantifier les métabolites contenus dans les biopsies et de pouvoir distinguer les différents composés à choline notamment (Sabatier et al., 1999).

Cette approche est toujours utilisée et est la seule à être vraiment quantitative (Wishart, 2008).

#### **III.4.4.2. *Metabolic profiling***

Le *metabolic profiling* consiste à identifier et quantifier un nombre restreint de métabolites appartenant à une même voie métabolique.

Les chercheurs ont généralement recours à des produits marqués avec des isotopes tels que le  $^{13}\text{C}$ , le  $^{15}\text{N}$  ou le  $^2\text{H}$ . Ces noyaux étant très faiblement abondants à l'état naturel, la détection et la quantification par RMN des métabolites marqués sont hautement spécifiques et sélectifs.

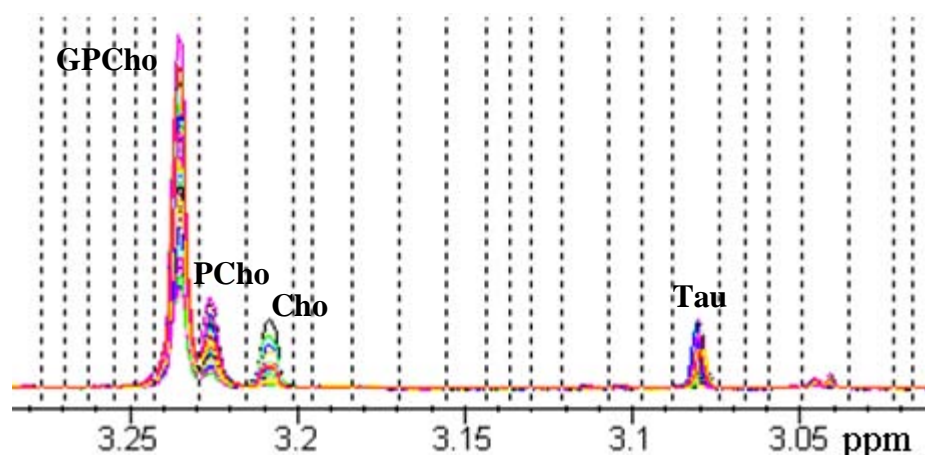
Cette approche est utilisée pour l'étude de voies ou de réseaux biologiques tels que la glycolyse (Troufflard et al., 2007) ou les voies métaboliques énergétiques et des phospholipides notamment (Glunde *et al.*, 2006c; Spratlin *et al.*, 2009).

Lorsque ces flux métaboliques sont étudiés *in silico*, il est alors question de fluxomique (Fan & Lane, 2008). La fluxomique est elle-même une stratégie analytique à part entière en pleine expansion.

#### **III.4.4.3. *Metabolic fingerprinting***

Le *metabolic fingerprinting* est à proprement parler LA métabolomique moderne (Ellis et al., 2007). Elle étudie de manière non ciblée, contrairement au *metabolic targeting*, un ensemble de spectres qui sont convertis en matrice de données, après découpage des spectres en « tranches » (*buckets*) de largeurs variables, à l'aide de logiciels dédiés au traitement de spectres (Fig. 21).

La largeur et le nombre des *buckets* dépendent de l'utilisateur. Ce dernier cherche à découper les spectres de telle sorte qu'un *bucket* corresponde à un signal, donc à un métabolite si son signal est bien résolu. Par ailleurs, il peut éliminer les *buckets* inutiles du spectre (bruit de fond, signal de l'eau, contamination...). Il est alors question d'*intelligent bucketing*.



**Figure 21. Illustration du *bucketing* d'un ensemble de spectres dans la zone spectrale des composés à choline et de la taurine (3,25-3,05 ppm).**

La taille des *buckets* est *stricto sensu* la même sur l'ensemble des spectres étudiés. Les spectres RMN sont alors considérés comme une source de données générant une matrice de variables de différentes intensités (généralement normalisées) en fonction de chaque individu (spectre). L'alignement précis des spectres est une condition indispensable pour l'obtention d'une bonne matrice de données.

Le but d'une telle démarche est de classer des groupes d'individus (différents types cellulaires, systèmes biologiques pathologiques *versus* sains...) suivant leur profil métabolique global. Il n'est pas nécessaire en métabolomique *metabolic fingerprinting* d'avoir identifié tous les signaux au préalable.

Une fois cette matrice de données obtenue, il n'est plus question de RMN. La métabolomique fait appel à des logiciels de chimiométrie qui analysent la matrice de données. Par différentes analyses statistiques multivariées, ces logiciels permettent à la fois d'obtenir une représentation visuelle des différents groupes séparés (*clusters*) et de faire ressortir la ou les variable(s) responsables de cette/ces séparation(s), ou celles qui sont à l'origine des différents groupes.

La significativité de ces variables peut être validée par des outils de statistiques univariées tels que le test de Student ou l'ANOVA (*ANalysis Of Variance*) (Spratlin et al., 2009).

Les outils de statistiques multivariées peuvent être de deux natures : non supervisés ou supervisés (Carraro et al., 2009). Nous allons détailler chacune de ces approches.

### III.4.4.3.1. Analyses multivariées non supervisées

L'analyse en composantes principales (ACP) est la plus utilisée des analyses multivariées non supervisées (Lindon & Nicholson, 2008). Elle repose sur l'analyse sans *a priori* des variables à forte variance, permettant de séparer des groupes d'individus dans un espace réduit à deux ou trois composantes. L'ACP est donc une méthode statistique descriptive permettant de représenter un grand nombre de données de façon synthétique, en mettant en avant celles qui sont les plus représentatives de la matrice initiale. Les variables qui contribuent à la séparation des groupes ne sont pas systématiquement discriminantes en ACP : leur grande variance peut être due à une grande variabilité du métabolite au sein même d'un groupe.

D'autres analyses multivariées non supervisées sont utilisées mais dans une moindre mesure, telles que la *clusterisation* hiérarchique ou la *non-linear mapping* (Lindon & Nicholson, 2008).

### III.4.4.3.2. Analyses multivariées supervisées

La méthode statistique multivariée supervisée la plus courante demeure la PLS (*Partial Least Squares*) (Lindon & Nicholson, 2008). Cette méthode prend en compte l'appartenance des individus Y à un groupe prédéfini (malade *versus* sain, par exemple). Une analyse discriminante est souvent réalisée après la PLS ; il s'agit de la PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*). Le but de la PLS-DA est de décrire de manière optimale l'appartenance des groupes prédéfinis d'individus Y à partir de variables prédictives X (matrice de données initiale). Cette méthode permet donc de mettre en évidence les variables discriminantes entre les groupes, contrairement à l'ACP. Une méthode de filtrage des données par OSC (*Orthogonal Signal Correction*) peut être réalisée afin d'éliminer les variables X qui ne sont pas corrélées aux variables Y, facilitant ainsi l'interprétation et la visualisation des résultats. Il est alors question d'O-PLS-DA. La PLS-DA, tout comme l'O-PLS-DA, crée à partir des variables X un modèle prédictif d'appartenance (ou non) des individus Y au groupe prédéfini. Ces méthodes sont validées par deux critères :  $R^2Y$  et  $Q^2$ . Pour que le modèle soit considéré comme prédictif et les résultats de séparation(s) comme significatifs, ces deux valeurs doivent être le plus proche possible de la valeur 1.

Une liste plus exhaustive d'outils statistiques dédiés, entre autres, à la métabolomique a été décrite dans plusieurs revues récentes (Ebbels & Cavill, 2009; Niemela et al., 2009).

### III.4.4.3.3. Constitution de bases de données

L'analyse métabolomique par RMN nécessite de constituer des bases de données disponibles pour tous les chercheurs. Le but est de faciliter l'identification de tous les signaux, en ayant à disposition la structure et le spectre des métabolites référencés. Chaque laboratoire constitue en parallèle sa propre base de données en fonction de la méthodologie de travail utilisée.

Quelques exemples de bases de données RMN disponibles en ligne sont cités ci-dessous :

- *Human Metabolome Database* ([www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca))
- *The Magnetic Resonance Metabolomics Database* ([www.liu.se/hu/mdl/main](http://www.liu.se/hu/mdl/main))
- *Human Metabolome Project* ([www.metabolomics.ca](http://www.metabolomics.ca))
- *Biological Magnetic Resonance Data Bank* ([www.bmrwisc.edu](http://www.bmrwisc.edu))

Une liste plus exhaustive est présentée par Issaq et ses collaborateurs (Issaq et al., 2009). En ce qui concerne les voies métaboliques, celles-ci sont très bien décrites sur des sites internet tels que KEGG ([www.genome.jp](http://www.genome.jp)) ou Reactome ([www.reactome.org](http://www.reactome.org)) par exemple (Issaq et al., 2009).

### III.4.5. RMN métabolomique pour l'étude des gliomes

La RMN métabolomique classique (*metabolic targeting*) pour l'étude des gliomes a commencé au début des années 90 avec l'apparition des appareils RMN à moyen ou haut champ (300-500 MHz). L'idée de départ était d'observer et de quantifier les métabolites qui n'étaient pas observables ou mal résolus en SRM  $^1\text{H}$ .

Cette approche reste toujours d'actualité et la RMN métabolomique est un outil de choix pour l'étude des profils métaboliques des gliomes. La RMN métabolomique globale (*metabolic fingerprinting*) tend cependant à se substituer à la RMN métabolomique classique.

Plusieurs équipes montrent dans les années 90 qu'il est possible, sur des extraits de biopsies, de distinguer les tissus sains des tumeurs cérébrales en mesurant la concentration de certains métabolites tels que la créatine (Cr), la glutamine (Gln), l'alanine (Ala) ou le *myo*-Inositol (mI) (Gill *et al.*, 1990; Peeling & Sutherland, 1992; Maxwell *et al.*, 1998).



Usenius et ses collègues montrent en 1994, sur des extraits de gliomes, que le signal de la phosphorylcholine (PCho) peut être utilisé pour la gradation des astrocytomes. Plusieurs études ont par la suite confirmé l'intérêt d'étudier les profils métaboliques des tumeurs et notamment les composés à choline, afin de grader ces dernières (Sabatier *et al.*, 1999; Roda *et al.*, 2000; Lehnhardt *et al.*, 2005; Likavcanova *et al.*, 2005; Sabatier *et al.*, 2005). L'analyse du profil métabolique peut ainsi être un outil complémentaire de l'analyse histopathologique.

Le groupe de RMN Biomédicale travaille depuis plusieurs années sur l'étude du métabolisme par RMN des gliomes. Ainsi, Sabatier et ses collègues montrent en 1999 que les composés à choline sont des métabolites discriminant les gliomes de bas grade de ceux de haut grade. Même si la concentration des composés à choline est légèrement plus élevée dans les gliomes de haut grade, c'est en fait leur proportion qui permet la gradation. Dans les gliomes de bas grade, la GPCho est majoritaire, alors que c'est la PCho qui prédomine dans les gliomes de haut grade (Sabatier *et al.*, 1999; Sabatier *et al.*, 2005).

Lehnhardt et ses collègues (Lehnhardt *et al.*, 2005) confirment par la suite l'intérêt d'étudier le profil métabolique des tumeurs cérébrales, en particulier les signaux des composés à choline, pour évaluer la progression tumorale, parfois mal visible en imagerie conventionnelle (IRM et SRM).

Cheng et ses collègues (Cheng *et al.*, 2000) ont montré, par RMN  $^1\text{H}$  HR-MAS, que sur des biopsies d'un même GBM prélevées à différents endroits de la tumeur, le ratio PCho/Cho était un bon indice de malignité tumorale. Par ailleurs, ils observent que le Lac et les Lip sont corrélés au degré de nécrose tumorale, déterminé histopathologiquement après l'analyse RMN.

Des études métabolomiques classiques sur les gliomes continuent à être réalisées afin de mieux caractériser le profil métabolique de ces tumeurs (Tan *et al.*, 2008).

Depuis une dizaine d'années, des analyses métabolomiques globales (*metabolic fingerprinting*) ont été entreprises par différents laboratoires. En 1998, Maxwell et ses collaborateurs montrent qu'il est possible par ACP de distinguer significativement les méningiomes des autres tumeurs à partir d'extraits de biopsies (Maxwell *et al.*, 1998). Le modèle est en revanche moins fiable pour grader les gliomes.

En 2008, Erb et ses collègues proposent une étude fiable et robuste afin de grader les oligodendrogliomes (Erb *et al.*, 2008). Ils montrent qu'il est possible par RMN  $^1\text{H}$  HR-MAS de différencier avec précision les oligodendrogliomes des GBM par PLS-DA. Une gradation a ainsi été établie entre les oligodendrogliomes de bas grade, de grade intermédiaire, de haut

grade et les GBM. Cette gradation est corrélée à l'augmentation de l'hypoxie tumorale. Métaboliquement, les concentrations des composés comme le Lac, les composés à choline, ou les acides aminés (valine, leucine, *iso*-leucine) augmentent alors que celles de Cr, Tau ou ml diminuent en fonction du grade tumoral.

Une étude couplant la métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  HR-MAS et la transcriptomique sur des biopsies d'astrocytomes de bas ou haut grade a été réalisée en 2009 par Righi et ses collaborateurs (Righi et al., 2009). Les résultats sont cohérents avec ceux obtenus par leurs prédécesseurs.

### **III.4.6. Devenir de la (RMN) métabolomique**

La métabolomique classique et la métabolomique globale sont deux méthodes parfaitement compatibles. Même si la deuxième approche tend à remplacer la première en terme de publications, la métabolomique classique reste intéressante. En effet, elle est beaucoup moins sophistiquée et ne nécessite aucun logiciel spécifique pour étudier les métabolites d'intérêt. La métabolomique globale permet plutôt de découvrir des métabolites discriminants, non considérés par une approche classique.

La métabolomique en général (RMN, MS) semble fortement liée à l'oncologie pour quelques décennies. L'étude des profils métaboliques des cancers, et notamment des GBM, est indispensable. Cette technique nouvelle est parfaitement complémentaire des autres approches «-omiques » et parfaitement adaptée aux études pré-cliniques et cliniques.

La métabolomique souffre encore du manque de reconnaissance des chercheurs et surtout des cliniciens. En tant que métabolomistes, nous espérons que la métabolomique puisse apporter des informations sur des marqueurs de précocité ou d'agressivité tumorale, de réponse à un traitement et/ou de pronostic. L'objectif est de pouvoir mieux diagnostiquer et traiter les tumeurs de chaque malade. La métabolomique a son rôle à jouer dans la lutte contre le cancer (Erb et al., 2008; Spratlin et al., 2009).

Comparée à la métabolomique par MS, la métabolomique par RMN est handicapée par sa faible sensibilité. Par ailleurs, les appareils RMN restent très chers et demandent une maintenance régulière et coûteuse. Néanmoins, les avancées technologiques réalisées ces dernières décennies ont été considérables.

La mise en place de spectromètres à très haut champ, tel que le premier appareil RMN 1 GHz au Centre européen de Résonance Magnétique Nucléaire (CRMN) à Lyon laisse augurer de développements importants en RMN métabolomique. Par ailleurs, l'utilisation de microcapillaires (60  $\mu$ L) devrait permettre de détecter des quantités plus faibles de métabolites.

Actuellement, il est possible de détecter et de quantifier une trentaine de métabolites dans du sérum ou du plasma, une vingtaine dans un extrait tissulaire et entre 30 et 100 dans l'urine (Griffin, 2006). Toutefois, Wishart (Wishart, 2008) considère qu'il sera difficile d'identifier et de quantifier plus de 150 métabolites sur un spectre RMN. La solution pourrait résider dans la simplification du mélange métabolique en couplant la RMN à des techniques chromatographiques (LC ou GC) et à la MS. De telles installations sont cependant encore très coûteuses et ne sont pas prêtes d'être utilisées en routine dans des laboratoires de recherche.

Le développement récent de nouveaux outils statistiques tels que la STOCOSY (*Statistical Total Correlation Spectroscopy*) peut permettre une meilleure interprétation spectrale. En effet, cette méthode, qui requiert un logiciel dédié, révèle les corrélations et les anti-corrélations des signaux du spectre. Ainsi, il est possible d'identifier les signaux d'un même métabolite sur tout le spectre, mais aussi d'identifier la variation des métabolites qui corrélerent (ou non) entre eux (Cloarec et al., 2005).

Pour conclure, la RMN métabolomique devrait continuer à progresser, mais son utilisation sera moins large que celle de la métabolomique par MS. Cette dernière s'est considérablement généralisée ces dernières années car elle offre une gamme de métabolites détectables et quantifiables beaucoup plus vaste. Par ailleurs, elle est parfaitement adaptée pour l'étude des lipides, autrement dit la lipidomique. Un appareil LC-MS conventionnel tel qu'un triple quadripôle permet ainsi d'explorer à la fois le métabolome et le lipidome de n'importe quel système biologique.

## IV. Lipides et cancer

### IV.1. Lipidomique et cancer

#### IV.1.1. Lipidomique et différentes classes de lipides

##### IV.1.1.1. Définition de la lipidomique et instrumentation

Parmi les études «-omiques », la lipidomique est, avec la métabolomique, la plus récente des études globales (Wenk, 2005). Elle est définie comme l'analyse qualitative, quantitative et globale de toutes les espèces lipidiques d'un système biologique donné (Griffiths & Wang, 2009). Cette approche est complémentaire de la métabolomique dans l'étude globale des systèmes biologiques.

Les lipides sont définis chimiquement comme des composés organiques hydrophobes et ayant, dans la plupart des cas, une grande affinité pour les solvants organiques tels que le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) (Fahy et al., 2005). Il est fréquent d'étudier des extraits lipidiques de cellules, tissus ou biofluides après une extraction biphasique (voir partie Matériel & Méthodes).

L'avènement de la lipidomique est directement lié au développement et à la généralisation de la MS, associée en amont à la chromatographie liquide haute ou ultra performance (HPLC ou UPLC) ou à la chromatographie gazeuse (*Gas Chromatography*, GC) (Griffiths & Wang, 2009).

La RMN <sup>1</sup>H et/ou <sup>31</sup>P a parfois été utilisée pour des études lipidiques (Lehnhardt *et al.*, 2001; Bon *et al.*, 2006). La faible spécificité et la mauvaise résolution des spectres font de la RMN un outil analytique marginal pour la lipidomique, comparé à la MS (Wenk, 2005).

En MS, ce sont les rapports masse/charge (m/z) d'ions en phase gazeuse qui sont analysées. Les sources d'ionisation sont multiples : APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*), MALDI (*Matrix-Assisted Laser/Desorption Ionisation*), EI (*electron-ionisation*), ESI (*Electrospray Source Ionisation*)...

Parmi les sources d'ionisation citées, l'ESI est la plus utilisée en lipidomique car elle permet de détecter une large gamme de composés en mode d'ions positifs avec ou sans adduits cationiques (H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>...), ou anioniques (Griffiths & Wang, 2009).

Les appareils conçus pour la lipidomique opèrent généralement en tandem (MS/MS), ce qui offre notamment la possibilité de travailler en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). La MRM permet d'étudier spécifiquement les transitions entre des ions précurseurs (ions parents) et des ions fils issus de la fragmentation des ions parents (Griffiths & Wang, 2009). Il est ainsi possible de détecter et de quantifier un très grand nombre de lipides de la même classe avec une grande sensibilité et spécificité.

Les appareils sont multiples : triple quadripôle, quadripôle-TOF (Q-TOF : *Quadrupole-Time Of Flight*), TOF-TOF, FT-ICR (*Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance*) ou orbitrap (Griffiths & Wang, 2009). Chaque appareil a ses avantages et ses inconvénients en termes de prix et de lipides détectables notamment.

D'une manière générale l'appareillage type en lipidomique est le couplage LC-ESI-MS/MS (Postle *et al.*, 2007; Griffiths & Wang, 2009).

#### IV.1.1.2. Classement des lipides et nomenclature

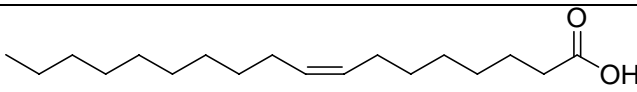
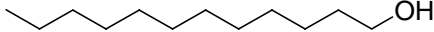
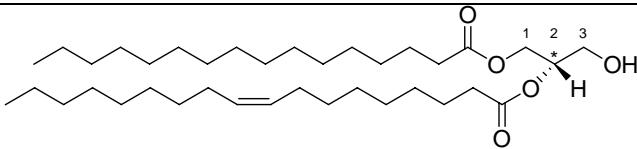
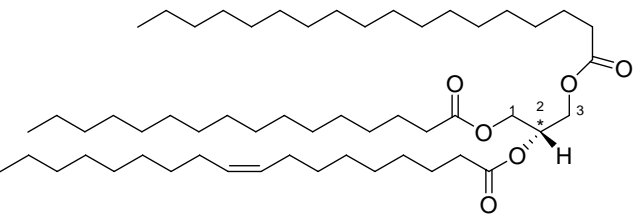
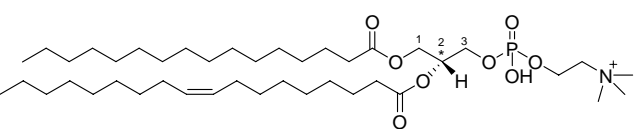
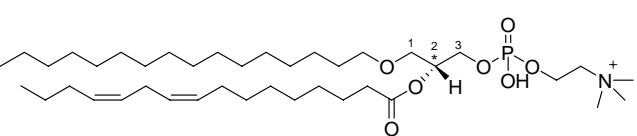
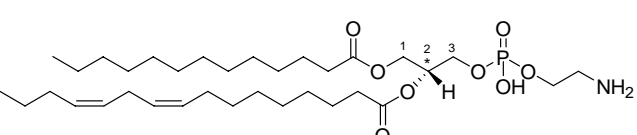
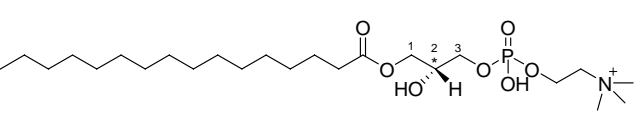
Le nombre de lipides n'est pas connu avec certitude mais il pourrait dépasser les centaines de milliers dans les cellules de mammifères (Griffiths & Wang, 2009).

Etudier le lipidome complet d'un système biologique s'avère présomptueux. C'est pourquoi les lipidomistes ont classé les lipides des mammifères en six classes structurellement et fonctionnellement différentes (Fahy *et al.*, 2005; Griffiths & Wang, 2009):

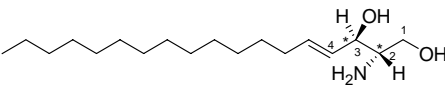
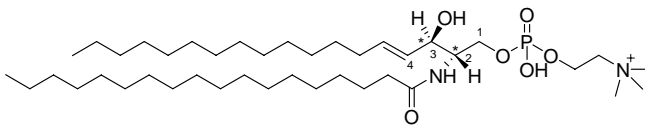
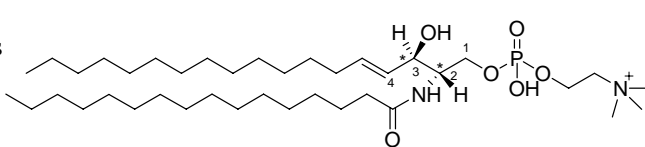
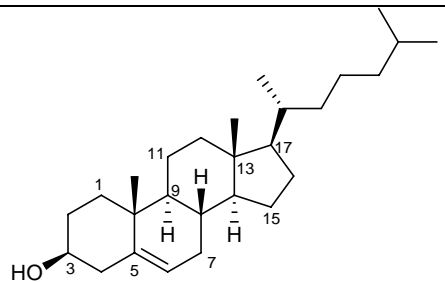
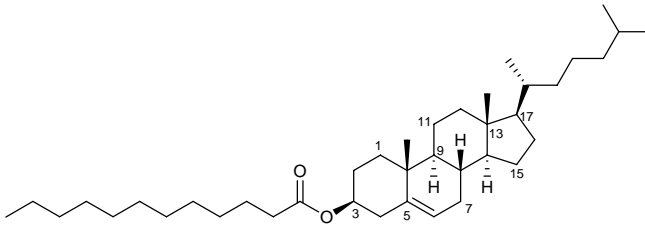
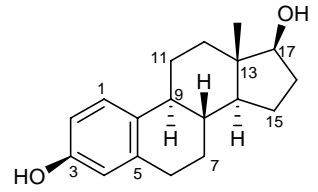
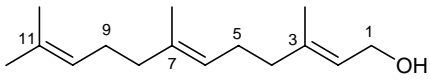
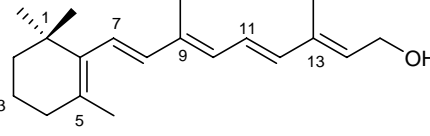
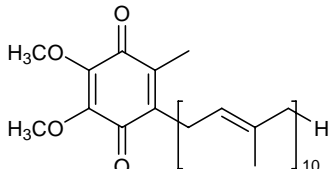
- les acyles gras : acides, esters, amides, alcools, éthers et nitriles gras, hydrocarbures...;
- les glycérolipides : mono-, di-, tri-acylglycérols...;
- les glycérophospholipides : glycérophosphocholines ou phosphatidylcholines (PtdCho), glycérophosphoéthanolamines ou phosphatidyléthanolamines (PtdE)...;
- les sphingolipides : céramides, sphingomyélines...;
- les lipides stérols : stérols, cholestérol et dérivés, stéroïdes...;
- les lipides prénoles : isoprénoïdes, quinones et hydroxyquinones, polyprénoles...

Le tableau 4 illustre les structures des différentes classes de lipides avec des exemples pour chacune des catégories, le nom IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) des molécules et le nom communément utilisé (Fahy *et al.*, 2005).

**Tableau 4. Les six classes de lipides chez les mammifères, accompagnées d'exemples.**

Catégorie de lipides	Familles	Structure chimique (exemple)	Nom IUPAC	Nom commun
<b>Acyles gras</b>	Acides gras		acide 9Z-octadécanoïque	Acide 18:1
	Alcools gras		dodécanol	Alcool 12:0
<b>Glycérolipides</b>	Diacylglycérols (Diglycérides)		1-hexadécanyol-2-(9Z-octadécénoyl)-sn-glycérol	DG 16:0/18:1
	Triacylglycérols (Triglycérides)		1-hexadécanyol-2-(9Z-octadécanyol)-3-octadécanyol-sn-glycérol	TG 18:0/16:0/18:1
<b>Glycérophospholipides</b>	Diacylglycérophosphocholines (Phosphatidylcholines)		1-hexadécanyol-2-(9Z-octadécanyol)-sn-glycéro-3-phosphocholine	PtdCho 16:0/18:1
	1-alkyl, 2-acylglycérophosphocholines (Phosphatidylcholines)		1-O-hexadécyl-2-(9Z-12Z-hexadécanyol)-sn-glycéro-3-phosphocholine	PtdCho 16:0alk/16:1
	Diacylglycérophosphoéthanolamines (Phosphatidyléthanolamines)		1-hexadécanyol-2-(9Z-hexadécanyol)-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine	PtdE 16:0/16:1
	Monoacylglycérophosphocholines (Lyso-Phosphatidylcholines)		1-hexadécanyol-2-hydroxy-sn-glycéro-3-phosphocholine	L-PtdCho 16:0

**Tableau 4. Suite.**

Catégorie de lipides	Sous-catégorie	Structure chimique (exemple)	Nom IUPAC	Nom commun
<b>Sphingo-lipides</b>	Sphingosines		Sphing-4-énine	-
	N-acyl-sphingosines (Céramides)		N-(octa-décanoyl)-sphing-4-énine	Cer 16:1/18:0
	Céramides phosphocholines (Sphingomyélines)		N-(hexadécanoyl)-sphing-4-énine-1-phospho-choline	SMe d18:1/16:0
<b>Lipides stérols</b>	Cholestérol et dérivés		Cholest-5-en-3β-ol	Cholestérol (Chol)
	Esters de cholestérol		Dodécanoate de cholest-5-en-3β-yl	Chol-est (C <sub>12</sub> )
	C <sub>18</sub> stéroïdes (estrogènes) et dérivés		1,3,5[10]-estratriène-3,17β-diol	β-estradiol
<b>Lipides pré-nols</b>	C <sub>15</sub> isoprénoïdes		2E,6E-farnésol	-
	C <sub>20</sub> isoprénoïdes		Rétinol	Vitamine A
	Ubiquinones		2-méthyl-3-décaprényl-5,6-diméthoxy-1,4-benzoquinone	Ubiquinone-10 (Co-Q10)

Tous les lipides possédant un corps glycérol, mis à part certains triglycérides, sont chiraux en position *sn-2*.

Les glycérophospholipides sont classés en fonction de la tête polaire fixée en position *sn-3* sur le corps glycérol. Ces têtes polaires peuvent être la choline ou l'éthanolamine par exemple, reliées par une liaison phosphodiester, formant ainsi les PtdCho et les PtdE.

Les sous-groupes sont ensuite nommés par la longueur et le nombre d'insaturations des chaînes grasses acylées (dans la majorité des cas) ou alkylées en position *sn-1* et/ou *sn-2*. Cette nomenclature par les chaînes grasses, délaissant la nomenclature IUPAC, est aussi utilisée pour les glycérolipides et les sphingolipides.

Lorsque les glycéro(phospho)lipides ne possèdent qu'une chaîne grasse, le préfixe *lyso* est utilisé.

Deux autres catégories de lipides sont à considérer dans la nature : les saccharolipides et les polycétides. Ces composés sont spécifiques des bactéries et des plantes notamment (Fahy et al., 2005) ; ils ne seront donc pas décrits dans ce manuscrit.

Par ailleurs, des associations lipides-protéines existent, formant des lipoprotéines, éléments indispensables dans la formation de micelles tels que les HDL (*High Density Lipoproteins*). Nous prenons le parti de classer ces composés dans les protéines et ils ne seront donc pas détaillés dans ce manuscrit.

#### **IV.1.1.3. *Consortium* et bases de données lipidiques**

Un *consortium* entre différents laboratoires majoritairement américains a été créé dans le but de caractériser le lipidome complet des cellules de mammifères et d'identifier les voies de biosynthèse des différentes classes de lipides (Griffiths & Wang, 2009). Chaque laboratoire s'est spécialisé dans un groupe de lipides donnés.

Par ailleurs, des bases de données lipidiques ont été créées et sont disponibles en ligne (Fahy et al., 2005):

- *Lipid Maps* ([www.lipidmaps.org/](http://www.lipidmaps.org/)) ;
- *Lipid Library* ([www.lipidlibrary.co.uk](http://www.lipidlibrary.co.uk)) ;
- *Lipid Bank* ([www.lipidbank.jp](http://www.lipidbank.jp)).



### IV.1.2. Glycéro(phospho)lipides, sphingolipides et cancer

D'une manière générale, par leur tête polaire et leurs queues apolaires, les glycérophospholipides et les sphingomyélines peuvent former des structures macromoléculaires en mono- ou bicouches. Ce sont les constituants majoritaires des membranes cellulaires. Ces lipides membranaires sont considérés avec attention par la communauté scientifique (Wenk, 2005).

Dans le cas des phosphatidylcholines, les plus abondants des glycérophospholipides chez les mammifères, des précurseurs ou des produits de dégradation tels que des diacylglycérols (DG), des lysophosphatidylcholines (LPtdCho) ou l'acide arachidonique (AA) jouent le rôle de seconds messagers lipidiques à l'intérieur des cellules (Vance & Vance, 2004). L'AA est notamment un précurseur des eicosanoïdes qui sont des médiateurs lipidiques de l'inflammation (Niknami et al., 2009).

Les acides (lyso)phosphatidiques sont des agents mitogènes. Les inhibiteurs des acides lysophosphatidiques acyltransférases sont utilisés pour induire la mort cellulaire *via* l'activation des caspases (Wenk, 2005).

Une étude récente sur quatre lignées cellulaires de gliomes a révélé des profils différents de sphingolipides (Sulluards et al., 2003). Les sphingolipides sont connus pour être impliqués dans différents processus biologiques. Ainsi, les céramides sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et stimulent l'apoptose (Bieberich et al., 1999; Wenk, 2005). Par ailleurs, une anti-corrélation a été décrite entre le grade tumoral des gliomes et la quantité de céramides (Smith & Schuchman, 2008).

La protéine ASM (*Acid SphingoMyelinase*), hydrolysant les sphingomyélines pour former les céramides, est nécessaire à la mort cellulaire radio-induite et serait impliquée dans la réponse des tumeurs à différents traitements anti-oncogéniques (Smith & Schuchman, 2008).

La majorité des sphingosines est elle aussi associée à l'arrêt de la croissance cellulaire (Smith & Schuchman, 2008). La sphingosine-1-phosphate est en revanche impliquée dans la croissance cellulaire, la migration et l'angiogenèse, en interagissant spécifiquement avec le VEGF. L'acide arachidonique est lui aussi impliqué dans l'angiogenèse (Wenk, 2005).

Les lysophospholipides sont impliqués dans différentes activités biologiques telles que la prolifération ou l'invasion tumorale et l'inflammation (Maeda et al., 2009).

Les phosphoinositides, dérivés phosphorés des phosphatidylinositols, sont des lipides impliqués dans les voies de signalisation. Ainsi, les 3-phosphoinositides (PI3P), synthétisés par la PI3 kinase et régulés par des enzymes telles que PTEN, ont été récemment découverts comme étant produits lors de stimulations cellulaires. Cibler la cascade signalétique dépendante des PI3P est une piste explorée en oncologie (Wenk, 2005).

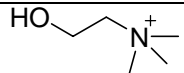
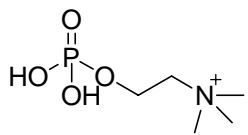
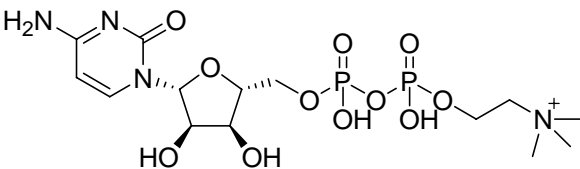
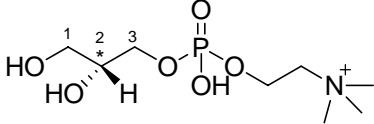
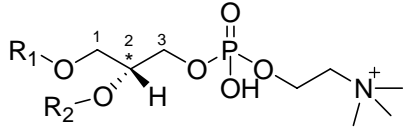
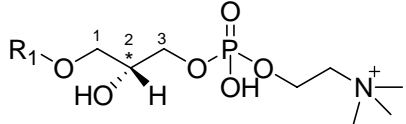
## IV.2. Etude du métabolisme des phosphatidylcholines (PtdCho)

Nous avons vu précédemment que les composés à choline sont des marqueurs de malignité et de prolifération tumorale (Podo, 1999), alors que des produits de dégradation ou issus des PtdCho sont des messagers secondaires impliqués dans divers processus biologiques (Vance & Vance, 2004). Il apparaît pertinent de s'intéresser de plus près au métabolisme des PtdCho, altéré dans les cellules cancéreuses.

### IV.2.1. Composés à choline du cycle métabolique des PtdCho

Pour plus de clarté, nous présentons la structure chimique des composés à choline hydrosolubles et liposolubles (tableau 5).

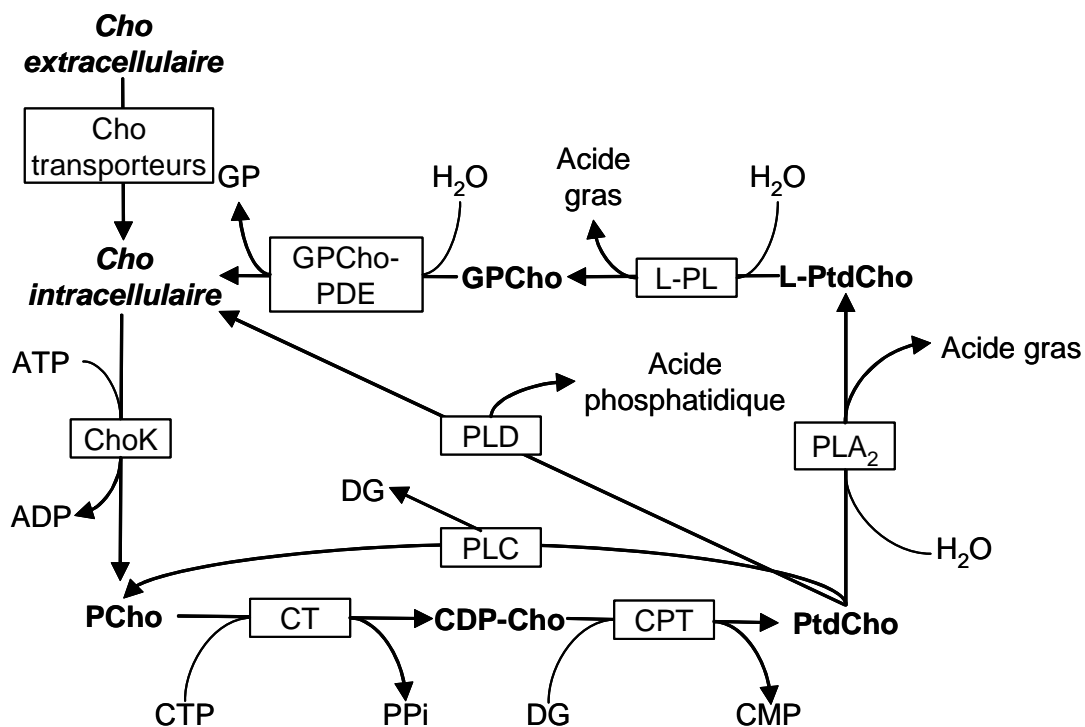
**Tableau 5. Structure des métabolites et lipides à choline impliqués dans le cycle métabolique des phosphatidylcholines (PtdCho).**

	Choline (Cho)	
	Phosphorylcholine (PCho)	
Métabolites (hydrosolubles)	CDP-choline (CDP-Cho) (CDP : cytidyl-diphosphate)	
	Glycérophosphorylcholine (GPCho)	
	Phosphatidylcholines (PtdCho)	
Lipides (liposolubles)		R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> : chaînes grasses acylées ou alkylées avec ou sans insaturation(s)
	Lyso-phosphatidylcholines (L-PtdCho)	
		R <sub>1</sub> : chaîne grasse acylée ou alkylée avec ou sans insaturation(s)

## IV.2.2. Anabolisme et catabolisme des PtdCho

Les phosphatidylcholines sont les lipides membranaires majoritaires des cellules de mammifères (Vance & Vance, 2004). La voie de biosynthèse principale *via* la CDP-Cho a été décrite par Eugène Kennedy en 1956 (Kennedy & Weiss, 1956) et porte le nom de voie de Kennedy. Cette voie anabolique a été depuis réactualisée par de nombreux chercheurs (Kent, 1990; Vance & Vance, 2004).

Une autre voie de biosynthèse des PtdCho connue chez les mammifères est la méthylation des PtdE par l'enzyme PEMT (*PhosphatidylEthanolamine N-MethylTransferase*). Cette voie est surtout active dans le foie et est négligeable dans les autres types cellulaires (Vance & Vance, 2004). Elle ne sera pas détaillée dans ce manuscrit. L'hydrolyse des PtdCho par différentes phospholipases a été proposée par Pelech et Vance (Pelech & Vance, 1989) puis confirmée par la suite (Podo, 1999; Glunde *et al.*, 2006b). Les voies anabolique et catabolique forment ainsi le cycle métabolique des PtdCho (Fig. 22).



**Figure 22. Cycle métabolique des PtdCho.** Abréviations : ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine triphosphate ; CMP, cytidine monophosphate ; CTP, cytidine triphosphate ; DG, diglycérile ; GP, glycérophosphate ; PPI, pyrophosphate. Enzymes citées : les transporteurs de choline représentés par les deux familles OCT (*organic cation transporter*) et CTL (*choline transporter-like*) ; la choline kinase (ChoK) ; la CTP : phosphocholine cytidyltransférase (CT) ; la diacylglycéril cholinephosphotransférase (CPT) ; la phospholipase C (PLC) ; la phospholipase D (PLD) ; la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ; la lyso-phospholipase (L-PL) ; la glycérophosphocholine phosphodiesterase (GPCCho-PDE).

### IV.2.3. Etude *in situ* des flux métaboliques par marquage

La synthèse des PtdCho est étudiée *in situ* par marquage radioactif de composés tels que la Cho, la PCho ou le phosphate notamment (Elsbach, 1967). Cette approche permet de mettre en évidence les variations métaboliques, les cinétiques de formation et le *turnover* des composés à choline, ainsi que les activités enzymatiques des protéines associées dans la cellule. Le schéma expérimental fréquemment rencontré est l'étude de lignées cellulaires traitées *versus* non traitées (Miquel *et al.*, 1998; Glunde *et al.*, 2006c) ou l'étude des voies de biosynthèse (Postle *et al.*, 2007). En ce qui concerne les études utilisant la choline, les marquages radioactifs ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) ont été et restent très largement utilisés (Miquel *et al.*, 1998; Rau *et al.*, 2003). Néanmoins, ce type de marquage nécessite un traitement spécial des déchets et des précautions particulières pour le manipulateur. Le marquage de la choline au  $^{13}\text{C}$  permet d'étudier par RMN la plupart des composés à choline, à l'exception de la CDP-Cho et des L-PtdCho (Glunde *et al.*, 2006c). Toutefois, aucune spécificité au sein de la classe des PtdCho ou des L-PtdCho n'est distinguable.

Les technologies analytiques récentes telles que la LC-ESI-MS/MS permettent d'étudier avec des grandes spécificité, sélectivité et sensibilité les différents lipides à l'intérieur de chaque famille (PtdCho, L-PtdCho...) (Bleijerveld *et al.*, 2006; Postle *et al.*, 2007). Le marquage de la choline au deutérium sur les méthyles ( $\text{d}_9$ -Cho) permet d'étudier la cinétique des composés à  $\text{d}_9$ -Cho dans la cellule. Virtuellement, les spectres des composés natifs et *de novo* (marqués) sont séparables et identifiables, comme l'illustre la figure 23.

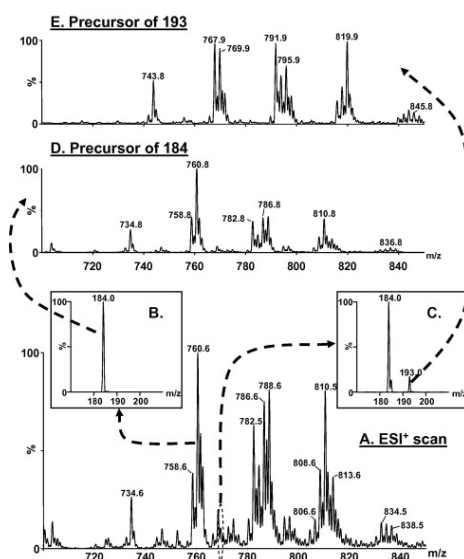


Figure 23. Spectres de masse des PtdCho et des  $\text{d}_9$ -PtdCho de lymphocytes humains : (A) spectre global, (B) spectre des PtdCho en sélectionnant tous les précurseurs de l'ion 184,0 (D) et spectre des  $\text{d}_9$ -PtdCho en sélectionnant tous les précurseurs de l'ion 193,0 (Postle *et al.*, 2007)

## IV.2.4. Protéines du cycle métabolique des PtdCho *via* CDP-Cho

### IV.2.4.1. Protéines de l'anabolisme

La choline n'est pas synthétisée par la cellule elle-même. Elle est apportée par le milieu extérieur et transportée dans la cellule par des transporteurs membranaires (Vance & Vance, 2004). Trois différentes familles ont été à ce jour répertoriées en fonction de leur affinité pour la choline : les CHT1 (*high affinity CHoline Transporters*), les OCT (*Organic Cation Transporters*) et les CTL (*Choline Transporters-Like*). Contrairement aux OCT, les CHT1 et les CTL sont spécifiques de la choline. Les CHT1 sont abondants dans les neurones qui synthétisent comme neurotransmetteur l'acétylcholine. En revanche, les CTL, possédant cinq isoformes répertoriées à ce jour, sont ubiquitaires et assurent avec les OCT le transport de la choline pour la synthèse des PtdCho (Michel et al., 2006).

La choline est rapidement phosphorylée en PCho dans le cytosol par la choline kinase (ChoK), en présence d'ATP. Il existe trois isoformes dans les cellules de mammifères : ChoK- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2 et - $\beta$ , codées par deux gènes distincts ChoK- $\alpha$  et ChoK- $\beta$ . Ces isoformes sont actives sous formes homo- ou hétérodimériques. L'homodimère  $\alpha/\alpha$  est celui qui possède l'activité kinase la plus importante alors que l'homodimère  $\beta/\beta$  a l'activité la plus faible (Janardhan *et al.*, 2006; Gallego-Ortega *et al.*, 2009).

L'étape limitante de la synthèse des PtdCho est conditionnée par la rapide activation/désactivation (déphosphorylation/phosphorylation) de l'enzyme régulatrice CTP:phosphocholine cytidyltransférase (CT). Elle peut être activée par des lipides tels que les DG, les PE ou des acides gras, alors qu'elle peut être inhibée par des PtdCho ou des C<sub>2</sub>-céramides (Awasthi et al., 2001; Vance & Vance, 2004). Elle catalyse la formation de la CDP-Cho à partir de la PCho, en présence de cytidine-triphosphate (CTP). Il existe deux isoformes de cette enzyme, actives sous forme homodimérique : CT $\alpha$  et CT $\beta$ . Dans les cellules de mammifères, la forme prédominante est la forme CT $\alpha$ , située dans le noyau et dont l'expression est régulée par différents facteurs de transcription (Sugimoto *et al.*, 2008). Dans le cerveau, les deux formes sont exprimées de manière équivalente (Jackowski & Fagone, 2005). La diacylglycérol cholinephosphotransférase (CPT) convertit la CDP-Cho en PtdCho, en présence de diacylglycérol (DG). Cette réaction a lieu dans le réticulum endoplasmique. L'activité spécifique de cette enzyme est accrue dans certains organes, notamment dans le cerveau. Même si ce n'est pas la réaction limitante, cette étape peut le devenir si l'apport en DG n'est pas suffisant (Vance & Vance, 2004).

#### IV.2.4.2. Protéines du catabolisme

Les PtdCho peuvent être hydrolysées par différentes phospholipases afin d'assurer l'homéostasie des phospholipides dans la cellule (Rodriguez-Gonzalez et al., 2003). Ces produits d'hydrolyse sont soit des messagers secondaires tels que les DG, l'acide arachidonique (AA), l'acide phosphatidique ou les L-PtdCho, soit des composés à choline réutilisables par la cellule pour la synthèse des PtdCho.

La phospholipase C (PLC) hydrolyse la PtdCho en PCho et en DG. Il existe six familles de PLC : PLC- $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\zeta$ , - $\epsilon$  et - $\eta$  (Harden & Sondek, 2006). Quelques articles décrivent une phospholipase C spécifique des PtdCho (Podo, 1999; Glunde *et al.*, 2006c), bien que cette isoforme n'ait pas été clairement identifiée et que son implication dans l'oncogenèse n'ait pas été vraiment établie. La majorité des articles présentent les PLC comme des phospholipases phosphatidylinositols (PtdI)-spécifiques (Harden & Sondek, 2006), mais pouvant avoir cependant une activité sur les PtdCho.

La phospholipase D (PLD) hydrolyse les PtdCho en Cho et en acide phosphatidique. Il existe deux isoenzymes connues chez les mammifères, PLD1 et PLD2. L'isoforme PLD1 est localisée autour du noyau cellulaire et est régulée par différents facteurs de croissance, par la protéine PKC et par des protéines-G comme les RAF, les Ras ou les Rho. En revanche, l'isoforme PLD2 est située dans la membrane plasmique et n'a pas de protéine régulatrice connue (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003; Klein, 2005).

Une autre voie d'hydrolyse en trois étapes des PtdCho est connue. La première étape consiste en l'hydrolyse des PtdCho par la PLA<sub>2</sub> en position *sn*-2 pour former des LPtdCho et des acides gras tels que l'AA. Il existe trois grandes familles de PLA<sub>2</sub> : les PLA<sub>2</sub> sécrétées (sPLA<sub>2</sub>), les PLA<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> indépendantes (iPLA<sub>2</sub>) et les PLA<sub>2</sub> cytosoliques (cPLA<sub>2</sub>). D'autres familles existent mais elles sont moins étudiées (Rosa & Rapoport, 2009). Les isoformes cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , cPLA<sub>2</sub> $\beta$ , cPLA<sub>2</sub> $\gamma$ , iPLA<sub>2</sub> $\beta$  et iPLA<sub>2</sub> $\gamma$  sont exprimées dans le cerveau. Les iPLA<sub>2</sub> sembleraient compter pour 70% de l'activité des PLA<sub>2</sub> dans le cerveau (Rosa & Rapoport, 2009). L'isoforme cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  est fréquemment sur-exprimée dans différents cancers et lignées cellulaires tumorales (Nakanishi & Rosenberg, 2006).

Les LPtdCho sont ensuite hydrolysées par une lysophospholipase (L-PL) pour former de la GPCCho et un acide gras. Le nombre et les fonctions des différentes L-PL ne sont pas bien connus (Quistad & Casida, 2004). En ce qui concerne les L-PL dédiées au métabolisme

des phospholipides, elles se divisent en deux groupes suivant la position de la chaîne grasse à hydrolyser : les LysoPLA<sub>1</sub> et les LysoPLA<sub>2</sub> (Wang & Dennis, 1999).

La GPCho est finalement hydrolysée par une glycérophosphocholine diestérase (GPCho-PDE) en Cho et en glycérol-3-phosphate. Une fois de plus, le nombre et les fonctions des différentes isoenzymes ne sont pas clairement définis. Cependant, la forme GDPD5, récemment caractérisée, serait un régulateur osmotique de la GPCho dans des cellules rénales. Sa forte expression a également été observée dans le cerveau. D'autres isoenzymes sont en cours de caractérisation (Gallazzini *et al.*, 2008).

#### **IV.2.4.3. Protéines « alternatives » du catabolisme des PtdCho**

Il semblerait que les voies d'hydrolyse des PtdCho décrites précédemment ne soient pas uniques. Les PtdCho pourraient être hydrolysées dans les cellules de mammifères directement en GPCho par l'intermédiaire d'une phospholipase B, libérant deux acides gras. Cette enzyme fait partie de la famille des NTE (*Neuropathy Target Esterase*) (Zaccheo *et al.*, 2004; Gallazzini *et al.*, 2008).

Une autre enzyme, NPP6 (*Nucleotide Phosphate Phosphatase 6*), décrite dans les cellules HeLa, semble être impliquée dans l'hydrolyse spécifique des L-PtdCho en PCho et en mono-acylglycérol (Sakagami *et al.*, 2005).

L'autotaxine, quant à elle, hydrolyse les L-PtdCho en acide lysophosphatidique. Une étude montre que cette protéine est sur-exprimée dans les tissus et dans des lignées cellulaires de GBM et qu'elle contribue à la mobilité cellulaire (Kishi *et al.*, 2006).

Enfin, il semblerait qu'au moins deux formes de glycéro-phosphodiesterases existent dans le cerveau : une forme produisant de la Cho, et une autre de la PCho (Ross *et al.*, 1995).

Ces protéines « alternatives » ne sont pas régulièrement citées dans la littérature. Néanmoins il serait intéressant de considérer leur rôle dans le métabolisme des PtdCho dans le cas des GBM.



## **IV.2.5. Métabolisme des PtdCho et cancer**

A travers ce paragraphe, il nous a semblé intéressant d'établir les liens entre les protéines impliquées dans le métabolisme des PtdCho et les GBM. Peu de données bibliographiques existent, nous avons donc étendu notre investigation à d'autres types de cancer.

### **IV.2.5.1. Transporteurs de choline**

Dans les cellules de mammifères, le transport de la choline dédiée à la synthèse des PtdCho est réalisé par les transporteurs OCT, possédant une faible affinité pour la Cho, et par les CTL, possédant une affinité intermédiaire mais une forte spécificité pour la Cho (Michel et al., 2006). Plusieurs études montrent le rôle prépondérant de l'isoforme CTL1 dans le transport de la Cho pour la croissance cellulaire.

Machova et ses collaborateurs (Machova et al., 2009) montrent que l'inhibition de l'ARNm CTL1 entraîne une diminution de la croissance dans les lignées cellulaires NG108-15 et C6, lignées hybride neuroblastome/gliome et gliome de rat respectivement.

Dans la lignée humaine HT-29 de carcinome du colon, Kouji et ses collaborateurs (Kouji et al., 2009) montrent que l'isoforme CTL1 est présente et responsable de l'incorporation de la Cho pour la croissance tumorale. Le transport de la Cho se fait en coopération avec une protéine membranaire échangeuse de cations, NHE1 (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1*). Par ailleurs, l'inhibition de CTL1 par l'hémicholinium (HC-3) ou par le chlorure de tétrahexylammonium (THA) entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire (Kouji et al., 2009).

Enfin, selon Michel et ses collaborateurs (Michel et al., 2006), les protéines transporteurs de cations organiques de la famille des OCT, qui ont une faible affinité pour la Cho, sont responsables de la majorité de l'incorporation de la Cho dans le cerveau pour la synthèse des PtdCho. Ces protéines sont par ailleurs faiblement inhibées par l'HC-3.

### **IV.2.5.2. Choline kinase (ChoK)**

Actuellement, la choline kinase (ChoK) est une cible majeure dans la lutte contre le cancer. En effet, plusieurs études montrent que cette protéine est sur-exprimée et activée dans la plupart des cancers (Ramirez de Molina et al., 2002).

La ChoK joue un rôle important dans les voies de signalisation, dans la régulation de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire (Janardhan et al., 2006; Ramirez de Molina et al., 2008). Par ailleurs, la ChoK est un oncogène activé par des protéines RAS, telles que Raf-1, Ral-GDS ou PI3K, ou par des facteurs de croissance tels que l'EGF, le VEGF, l'IGF ou le PDGF, lors de la tumorigenèse, ce qui entraîne une augmentation de la PCho dans les cellules (Janardhan et al., 2006). De plus, la ChoK active RhoA, une protéine GTPase impliquée dans de nombreuses voies de signalisation (Ramirez de Molina et al., 2005).

L'équipe de Lacal étudie le rôle des isoformes ChoK $\alpha$  et ChoK $\beta$  dans la tumorigenèse. Elle a montré que l'isoforme ChoK $\alpha$ 1 est oncogénique lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules HEK293T ou MDCK, ce qui n'est pas le cas pour ChoK $\beta$ . L'ARNm ChoK $\alpha$ 1 est fréquemment sur-exprimé dans les lignées cellulaires cancéreuses de sein ou de poumon. Enfin, Gallego-Ortega et ses collaborateurs (Gallego-Ortega et al., 2009) ont mis au point un inhibiteur de ChoK, MN58b, qui possède une bonne activité anti-tumorale *in vivo* et qui a une forte affinité pour l'isoforme ChoK $\alpha$ 1. Plusieurs produits de synthèse, dérivés de l'HC-3 notamment, sont à l'essai afin d'inhiber ChoK (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003; Janardhan *et al.*, 2006).

ChoK joue un rôle important lors de la réponse de la cellule suite à un stress externe (radicaux libres, chimiothérapie, hypoxie...) (Janardhan et al., 2006). Ainsi, Glunde et ses collaborateurs (Glunde et al., 2008) montrent que dans les cellules PC-3 (cellules humaines cancéreuses de la prostate) sous hypoxie, l'isoforme ChoK $\alpha$ 1 est sur-exprimée par HIF-1, ce qui conduit à une augmentation de PCho. Kiss et ses collaborateurs soulignent le potentiel rôle de PCho en tant que régulateur de la croissance cellulaire dans les cellules cancéreuses (Kiss, 1999). Enfin, Vanpouille et ses collaborateurs (Vanpouille et al., 2009) mettent en évidence une sur-expression de ChoK et CHT1 dans des cellules U87 de GBM rendues chimio-résistantes, comparée à la lignée contrôle U87.

#### **IV.2.5.3. CTP:phosphocholine cytidyltransférase (CT)**

La CT est l'enzyme régulatrice de la synthèse des PtdCho. Comme elle peut être régulée par différents lipides, plusieurs composés lipidiques cytotoxiques et anti-tumoraux sont proposés comme inhibiteurs de la CT. Ainsi, l'ET-18-OMe et l'hexadécylphosphocholine (HDPC), qui appartiennent à la famille des analogues des PtdCho (APC) et des L-PtdCho (ALP) respectivement, inhibent l'activité des protéines associées aux

membranes telles que CT et entraînent l'apoptose des cellules (Dymond *et al.*, 2008). Mallampalli et ses collaborateurs (Mallampalli *et al.*, 2000) montrent que le TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor Alpha*), une cytokine clé impliquée dans les maladies inflammatoires du poumon, agit comme régulateur de la CT dans la lignée cellulaire MLE-12, cellules alvéolaires murines.

#### **IV.2.5.4. Diacyl-glycérol cholinephosphotransférase (CPT)**

La CPT intervient dans l'étape finale de la synthèse des PtdCho. L'équipe de Das a montré que l'expression de la CPT est plus importante dans la lignée humaine du cancer du sein 11-9-14, comparée à la lignée humaine saine MCF-12A. Par ailleurs, des substitutions nucléotidiques sont observables sur la protéine CPT tumorale (Ghosh *et al.*, 2002).

En traitant différentes lignées cellulaires humaines cancéreuses du sein (11-9-14 et BT-549) avec une benzodiazépine, Ro5-4864, la même équipe a montré que les expressions de la CPT et de la protéine *c-fos* augmentent conjointement avec la prolifération cellulaire. Ces expressions ne sont pas observées sur la lignée contrôle MDF-12A. L'activité enzymatique de la CPT est aussi augmentée dans les lignées cancéreuses traitées (Ghosh *et al.*, 2002). Le facteur de transcription inductible *c-fos* avait déjà été décrit comme un régulateur cytoplasmique de la biosynthèse des PtdCho (Akech *et al.*, 2005).

Enfin, l'équipe de Sinha Roy (Sinha Roy *et al.*, 2008) montre qu'*in vivo* chez le rat, pour les tumeurs du sein induites par le diméthylbenz(a)anthracène, l'expression et l'activité des protéines CPT et *c-fos* sont accrues, comparées aux cellules saines de sein.

Miquel et ses collaborateurs (Miquel *et al.*, 1998) ont montré le rôle du géranylgeraniol et du farnésol dans la régulation du CPT, ces composés étant impliqués dans la voie du mévalonate pour synthétiser notamment les protéines prénylées. Le lien biochimique est ainsi établi entre le contrôle de la prolifération cellulaire par la régulation de la synthèse des PtdCho et l'induction de l'apoptose par ces isoprénoïdes qui bloquent les cellules A549 (adénocarcinome humain du poumon) en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

Gueguen et ses collaborateurs (Gueguen *et al.*, 2002) présentent l'activité pro-apoptotique du (S)PNPA (*N*-palmitoyl-norleucinol-1-phosphate), un analogue de l'acide lysophosphatidique, comme inhibiteur spécifique de la CPT sur la lignée IMR-90, fibroblaste humain du poumon. Le composé est ainsi proposé comme agent anti-tumoral potentiel.

#### **IV.2.5.5. Phospholipase C (PLC)**

Plusieurs études montrent que la PLC est régulée par des GTPases de la famille des Ras, ainsi que par RhoA et RhoB (Harden & Sondek, 2006; Bunney *et al.*, 2009).

L'isoforme PLC $\gamma$ 1, spécifique de la PtdI, semble être impliquée dans le métabolisme des PtdCho. En effet, Belouèche-Babari et ses collègues (Belouèche-Babari *et al.*, 2009) montrent que, sur un modèle cellulaire humain de cancer de la prostate, l'inhibition de PLC- $\gamma$ 1 diminue la quantité de PCho, arrondit les cellules et altère leur migration.

Cette isoforme PLC $\gamma$ 1 est sur-exprimée dans de nombreux cancers et semble jouer un rôle important dans le développement métastatique et la régulation de l'apoptose des carcinomes humains colorectaux (Tan *et al.*, 2007).

PLC $\gamma$  peut être activée par de nombreux récepteurs de facteurs de croissance (EGFR, VEGFR, PDGFR) et par certaines intégrines. Par ailleurs, elle est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, en activant notamment PKC (Belouèche-Babari *et al.*, 2009). Ainsi, Dietzmann et ses collègues (Dietzmann *et al.*, 2002) montrent que, sur des lignées cellulaires de gliomes et sur des cellules primaires de GBM, l'inhibition de PLC $\gamma$  diminue la densité cellulaire et l'expression de la protéine PLK-1 (*Polo-Like Kinase 1*), une enzyme impliquée dans la régulation et la ségrégation du centrosome.

En clinique, l'expression de PKC et de PLC $\gamma$  sur des biopsies de GBM est associée à une durée de vie plus courte des patients (Mawrin *et al.*, 2003).

*In vitro*, l'effet anti-invasif du composé U73122 ciblant PLC $\gamma$  a été vérifié sur la lignée cellulaire U87 (Khoshyomn *et al.*, 1999). Des études complémentaires sont nécessaires pour valider l'intérêt de ce composé comme agent anti-tumoral.

#### **IV.2.5.6. Phospholipase D (PLD)**

Le rôle de la PLD dans l'oncogénèse et le caractère métastatique des cellules cancéreuses a été décrit. Son activité est significativement accrue dans de nombreux cancers (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003).

L'isoforme PLD2 semble être continuellement active dans la cellule, alors que PLD1 est régulée par différents facteurs de croissance, par des GTPases Ras et Rho et par des oncogènes tels que Src ou Rac-1 (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans la lignée U87 de GBM, la sérine/thréonine kinase CKII (*Casein Kinase II*) active et phosphoryle PLD1 et 2, contribuant à la prolifération cellulaire (Ahn *et al.*, 2006).

Toujours dans la lignée U87, la présence du composé polyphénolique épigallocatechine-3-gallate (EGCG) entraîne une activation de la PLD. L'EGCG est connu pour produire des espèces réactives oxygénées (*ROS*) dans la cellule. Par un changement de l'état redox, la présence de l'EGCG active la PLD *via* les voies PLC $\gamma$ 1 [Ins(1,4,5) $P_3$ -Ca $^{2+}$ ]/Ca $^{2+}$ -CaM kinase II et PLC $\gamma$ 1 (diacylglycérol)/PKC (Kim et al., 2004).

La PLD augmente l'invasion cellulaire dans les GBM. En effet, Park et ses collaborateurs (Park et al., 2009) montrent que, dans les lignées cellulaires humaines de GBM, U87, U373, A172 et T98G, la sur-expression de PLD et son activité enzymatique activent la métalloprotéase matricielle MMP2, *via* la voie de signalisation PKA/PKA/NF $\kappa$ B/Sp1 et par l'intermédiaire de l'acide phosphatidique produit par la PLD. Dans les cellules U87 en conditions hypoxiques dues à la présence de chlorure de cobalt, la PLD active la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Ahn et al., 2007).

Plusieurs inhibiteurs de la PLD sont proposés, en particulier ceux de la famille des alkylphosphocholines. Nous pouvons ainsi citer l'hexadécylphosphocholine et l'érucylphosphocholine. Ce dernier composé a été testé sur des lignées de gliomes humains et murins, et a montré des activités pro-apoptotique et anti-proliférative intéressantes (Rodriguez-Gonzalez et al., 2003).

#### **IV.2.5.7. Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)**

Parmi les PLA<sub>2</sub>, la cPLA<sub>2</sub>- $\alpha$  coupe préférentiellement les chaînes lipidiques en position *sn*-2 des glycérophospholipides contenant l'AA. Cette isoenzyme est considérée avec attention pour le contrôle de l'inflammation et de la cancérisation. La sur-expression et l'augmentation de l'activité enzymatique de cPLA<sub>2</sub>- $\alpha$  ont été mis en évidence dans de nombreux cancers (Niknami et al., 2009).

Une étude sur différentes lignées cellulaires et biopsies de gliomes et/ou de GBM a notamment révélé une sur-expression de cPLA<sub>2</sub>, comparée à des modèles non-tumoraux (Culicchia et al., 2008).

Hernandez et ses collègues (Hernandez et al., 1999) ont montré dans le modèle d'astrocytome 1321N1, que la cytokine TNF $\alpha$  active cPLA<sub>2</sub> par phosphorylation. Dans une autre étude, l'équipe de Kinsey révèle que l'isoforme iPLA<sub>2</sub> du réticulum endoplasmique (RE-iPLA<sub>2</sub>) est sur-exprimée dans le modèle de GBM humain A172 (Kinsey et al., 2005).

Martin et ses collègues (Martin et al., 2009) montrent, sur le modèle humain d'astrocytome 1321N1, que l'isoforme sPLA<sub>2</sub>-IIA, sécrétée à l'extérieur de la cellule et sur-

exprimée dans de nombreux cancers, contribue à l'accumulation d'espèces réactives oxygénées dans la cellule. Par ailleurs, cette isoenzyme active les voies oncogéniques Ras/Raf-1/MEK/ERK et PI3K/Akt/mTOR.

Plusieurs inhibiteurs ayant une activité anti-inflammatoire *in vitro*, tels que les indoles, les pipérazines ou les diazépines, ciblent les sPLA<sub>2</sub> (Narendra Sharath Chandra et al., 2007). Dans les cellules 1321N1, le bromure de p-bromophénacyl et le dithiothréitol inhibent sPLA<sub>2</sub>, alors qu'ils n'ont aucun effet sur cPLA<sub>2</sub> (Hernandez et al., 1998). Le méthylarachidonylfluorophosphate (MAFP) est présenté comme inhibiteur des cPLA<sub>2</sub> et iPLA<sub>2</sub> mais pas des sPLA<sub>2</sub>. En revanche, le LY311327, l'indoxame ou le DTT semblent inhiber spécifiquement les sPLA<sub>2</sub> (Lucas & Dennis, 2005).

#### **IV.2.5.8. Lysophospholipase (L-PL) et GPCho-phosphodiesterase (GPCho-PDE)**

Peu d'études concernent la L-PL et encore moins la GPCho-PDE. Aucune implication de la GPCho-PDE dans les processus de cancérisation n'a été décrite.

L'enzyme humaine L-PL (hLysoPLA I), spécifique des lysophospholipides, a été isolée et caractérisée ; elle est localisée entre le réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire dans des cellules humaines amniotiques WISH. Dans ce type cellulaire, l'enzyme est régulée par la protéine PKC (Wang et al., 2000).

Une enzyme ne faisant pas partie des L-PL de par sa structure mais possédant l'activité hydrolase des L-PtdCho, a été caractérisée chez l'homme dans le cerveau, les érythrocytes et les lymphocytes. Cette enzyme, d'abord isolée dans le cerveau de souris, est la NTE-LysoPLA (*Neuropathy Target Esterase-LysoPhosphoLipase*). Cette enzyme n'a pas pour substrat spécifique la L-PtdCho et est impliquée dans d'autres processus biologiques, dont l'inflammation (Vose et al., 2007).

Une étude des tissus cérébraux humains et murins (au niveau du cortex frontal) a montré que la GPCho et la GPE régulent l'hydrolyse des phospholipides en inhibant l'activité de la L-PL (Fallbrook et al., 1999). Plusieurs composés organophosphorés ont montré une activité inhibitrice sur des L-PL, et notamment la NTE-LysoPLA, extraites de cerveaux de souris. Ces composés sont par exemple l'isopropyl-dodécylphosphonofluoridate, l'éthyl-octylphosphonofluoridate et deux 2-oxides alkyl-benzodioxaphosphorines (Quistad & Casida, 2004).

## V. Contexte du travail de thèse

Cette cinquième partie clôt le chapitre introductif qui dresse un état de l'art le plus complet possible des glioblastomes multiformes (GBM), de la radiothérapie et de la radiorésistance des GBM, de la métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  et des liens entre les lipides et le cancer.

Nous avons constaté que les caractéristiques biologiques et l'oncogénèse des GBM sont de mieux en mieux connues. La radiothérapie (RT) est systématiquement utilisée et est de plus en plus associée à des agents radiosensibilisants, tels que le témozolomide (TMZ). Toutefois, le traitement de ces tumeurs cérébrales n'est pas spécifique et se heurte au phénomène de radiorésistance.

Ainsi, il devient nécessaire de définir des sous-groupes de GBM établis à partir de données moléculaires. Pour cela, la découverte de biomarqueurs prédictifs de chimio- et de radio-résistance semble nécessaire afin de proposer un traitement spécifique et adapté pour chaque patient. En effet, certains de ces patients, par la non méthylation du promoteur du gène MGMT de leur tumeur (Stupp *et al.*, 2005), sont insensibles à l'association RT/TMZ. D'autres patients sont plus ou moins sensibles aux rayonnements ionisants. *In vitro*, une étude récente (Liu *et al.*, 2009) a ainsi mis en évidence une corrélation entre la méthylation du promoteur du gène ERCC1 et la radiosensibilité de lignées cellulaires humaines de GBM.

Afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs, l'utilisation de méthodes analytiques holistiques et robustes telles que la génomique, la transcriptomique, la métabolomique et/ou la lipidomique, est incontournable. Dans ce cadre de recherche clinique, nous nous sommes proposé d'étudier *in vitro* la radiorésistance de lignées cellulaires humaines de GBM. Nous avons plus spécifiquement cherché à identifier des marqueurs biologiques de radiorésistance ou de mort radio-induite par des approches globales telles que la métabolomique, la lipidomique et la transcriptomique. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le chapitre trois de ce manuscrit, lui-même divisé en deux sous-parties.

Dans une première partie, nous avons cherché à identifier *in vitro* de potentiels biomarqueurs prédictifs de radiorésistance à partir de quatre lignées cellulaires humaines de GBM. Deux de ces modèles ont été considérés comme ayant un phénotype « radiorésistant » (lignées SF763 et U87), deux autres ayant un phénotype « radiosensible » (lignées SF767 et U251) (Delmas *et al.*, 2002). Ce projet constitue la première et la majeure partie du chapitre trois (résultats) de ma thèse : « Partie I : Recherche de biomarqueurs de radiorésistance dans quatre lignées cellulaires de GBM (projet RR vs RS) ».

Cette recherche a combiné une étude métabolomique par RMN <sup>1</sup>H réalisée à partir d'extraits cellulaires des quatre lignées cellulaires de GBM et une étude lipidomique par HPLC et/ou GC-MS. Les résultats de l'étude métabolomique nous ont conduit à étudier de plus près le métabolisme des phosphatidylcholines (PtdCho).

Ainsi, une étude métabolomique de l'effet de l'hémicholinium (HC-3), un inhibiteur de transporteurs de choline, a été réalisée sur les quatre modèles cellulaires. Cette étude avait pour but de vérifier si une incorporation accrue de choline dans les lignées radiorésistantes pouvait être la cause de l'accumulation de composés à choline (phosphorylcholine et glycérophosphorylcholine) dans les deux lignées radiorésistantes.

Les résultats n'ayant pas été satisfaisants, nous avons mis au point une méthode d'analyse des flux métaboliques des composés à choline (hydro- et liposolubles) par marquage deutéré et quantification par HILIC-ESI-MS/MS (Desoubzdanne *et al.*, 2010).

Enfin, nous avons étudié l'expression des gènes des quatre lignées cellulaires par transcriptomique (sur biopuces) dans un premier temps, puis vérifié l'expression de certains de ces gènes par qRT-PCR dans un second temps. Une attention particulière a été accordée aux gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme des PtdCho. Le manque de temps n'a permis ni d'étendre l'investigation sur l'expression de toutes les isoformes des gènes du métabolisme des PtdCho, ni de vérifier la quantité et l'état des protéines de cette voie métabolique en particulier (étude protéomique).



La deuxième partie du chapitre trois est intitulée : « Partie II : Recherche de biomarqueurs de mort radio-induite dans une lignée cellulaire humaine de GBM radiosensibilisée (projets FTI-277, Y, URB14 et KILK2) ». Cette partie regroupe quatre projets menés en parallèle au cours de ma thèse. Nous avons cherché à identifier de potentiels biomarqueurs de mort radio-induite à partir de la lignée radiorésistante U87 radiosensibilisée : en présence d'un agent radiosensibilisant (i) connu (projet FTI-277) ou (ii) en développement dans un laboratoire pharmaceutique (projet Y), (iii) après inhibition de l'expression d'une protéine clé (RhoB) dans le contrôle de la radiorésistance des GBM (projet URB14) ou (iv) après inhibition de la transcription du gène codant pour la protéine ILK (projet KILK2).

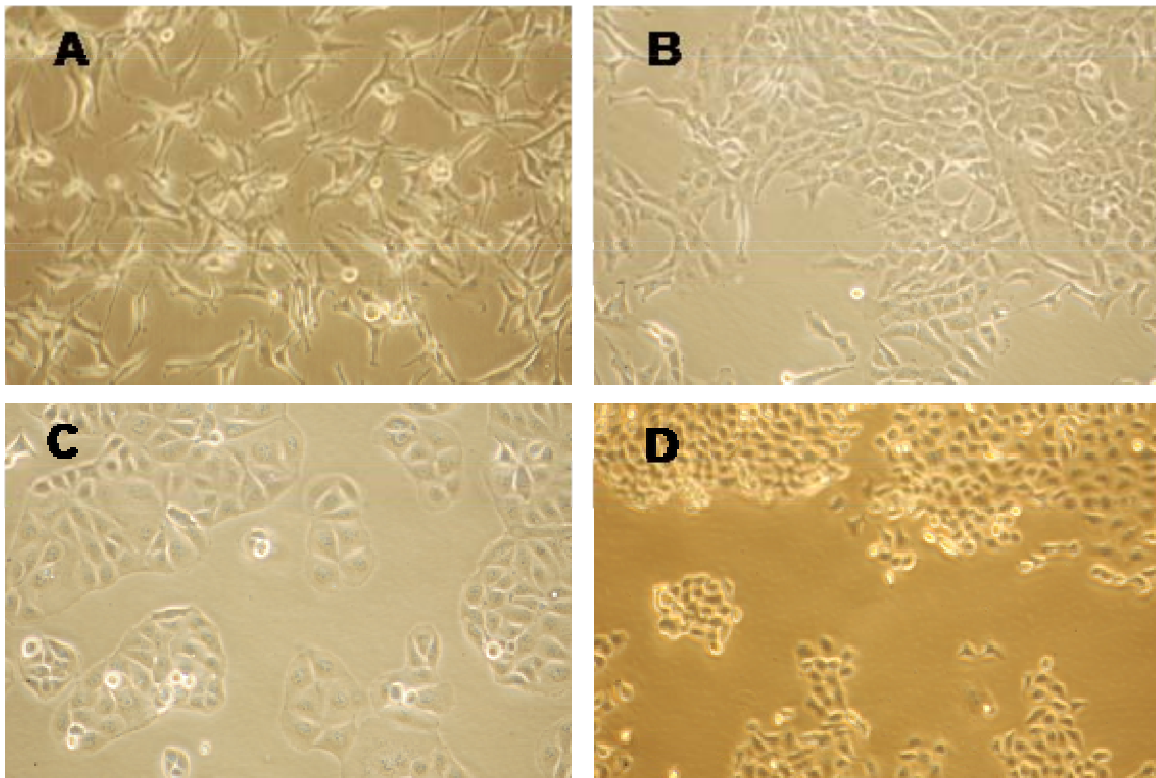
La méthode analytique privilégiée pour ces quatre projets a été la RMN  $^1\text{H}$  métabolomique. L'identification de la taurine (Tau) comme potentiel biomarqueur de mort radio-induite dans le cadre du projet URB14 nous a encouragé à réaliser une étude lipidomique, puis une étude de la mort cellulaire par cytométrie en flux. Cette dernière étude a permis de conforter l'hypothèse de la Tau comme biomarqueur de mort radio-induite sur la lignée radiorésistante U87 radiosensibilisée.

***Chapitre II :***  
***Matériel et méthodes***

## I. Biologie cellulaire

### I.1. Description des lignées cellulaires étudiées

Les lignées cellulaires U87, U251, SF763 et SF767 (Fig. 24) sont toutes les quatre décrites comme des lignées cellulaires humaines de GBM (Delmas et al., 2002; Wang et al., 2006). Les lignées URB14 (Delmas et al., 2002), KILK2 et T2K sont dérivées de la lignée U87 et présentent la même morphologie cellulaire. Toutes les cellules ont été fournies par le Dr. Christine Toulas de l'Institut Claudius Regaud (ICR) de Toulouse.



**Figure 24. Photos des lignées cellulaires U87 (A), U251 (B), SF763 (C) et SF767 (D).**

Les cellules des lignées U87 (Fig. 24A) et U251 (Fig. 24B) ont une morphologie allongée en forme d'étoile, conforme à des cellules dérivées d'astrocytes. En revanche, bien que considérées comme des cellules de GBM, les cellules SF763 (Fig. 24C) ont une morphologie arrondie et poussent en formant des îlots cellulaires ; les cellules SF767 (Fig. 24D) sont des cellules plus petites, arrondies et poussent en amas cellulaires. Toutes les cellules étudiées sont adhérentes. Le temps de doublement, estimé expérimentalement, est d'environ 24 h pour les lignées U87, U251 et SF767, et de 28 h pour la lignée SF763.

L'équipe « Signalisation, GTPases Rho et cancer » de l'ICR (Delmas et al., 2002) ont montré que les lignées U87 et SF763 présentent un phénotype de radiorésistance plus important que celui des lignées U251 et SF767. Ainsi, les lignées U87 et SF763 sont présentées comme radiorésistantes (RR) dans le manuscrit et les lignées U251 et SF767 comme radiosensibles (RS).

La lignée URB14 a été transfectée de manière permanente par un ADNc codant pour une forme dominante négative de RhoB (RhoBN19). L'expression de ce gène est inducible en présence de dexaméthasone (Qualimed<sup>®</sup>, sol. inj. 20 mg/5 mL) à une concentration finale de 25 nM dans le milieu de culture. L'inhibition de RhoB par compétition avec sa forme RhoBN19 est optimale 48 h après le début du traitement.

Afin d'inhiber la protéine ILK de manière inducible, des cellules U87 ont été transfectées par deux lentivirus vecteurs. Le premier porte un ADN codant pour une protéine de fusion KRAB-TetR qui se fixe sur des séquences régulant négativement la transcription. Le deuxième est un *short hairpin* ARN (shARN) dirigé contre ILK (lignée KILK2) ou ne reconnaissant aucune protéine (lignée contrôle T2K). Les deux lentivirus sont inducibles à la doxycycline (Sigma-Aldrich, 44577) à une concentration finale de 1 µg/mL dans le milieu de culture. L'extinction de l'expression d'ILK (environ 90%) est observée 48 à 72 h après le début du traitement.

## **I.2. Culture et entretien des lignées cellulaires**

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées et entretenues au Département Lipoprotéines et Médiateurs lipidiques (U563, INSERM) à l'hôpital Purpan de Toulouse. Les cellules ont été mises en culture monocouche à partir de cellules cryo-conservées, sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C et dans du milieu nutritif complet. Ce milieu était constitué de DMEM Glutamax<sup>®</sup> (Gibco-Invitrogen, 31966) contenant de la L-glutamine, du pyruvate de sodium et 4,5 g/L de glucose, complété avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco-Invitrogen, 10270-098) et avec 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (PAA, P11-010). Les cellules n'ont pas été conservées au-delà du passage 35.

Pour chaque étude, la densité d'ensemencement et la nature des traitements des cellules seront indiquées.

## II. Protocoles standards

### II.1. Contrôle de l'expression de protéines par *Western-Blot* (WB)

Afin de vérifier l'efficacité des agents chimiques utilisés sur les cellules, le contrôle de l'expression des protéines ciblées a été effectué par *Western-Blot* (WB). Le protocole utilisé a été transmis par l'équipe d'accueil à Purpan.

Une boîte de Pétri  $\varnothing$  100 mm par échantillon a été nécessaire. Cet échantillon, appelé échantillon WB, a été préparé dans les mêmes conditions que l'échantillon récolté pour une étude métabolomique ou lipidomique donnée.

Placé sur de la glace, le milieu de l'échantillon WB a été aspiré et le tapis cellulaire lavé deux fois avec 6 mL de PBS froid. Les cellules ont été décollées en présence de 250  $\mu$ L de tampon de lyse RipA : Tris-HCl à 20 mM et à pH = 7,6, NaCl à 150 mM et 1% (v/v) de Triton X-100. Ce tampon contenait en outre 5% (v/v) d'inhibiteurs de protéases (Roche, 11836 145 001). Les cellules ont été récoltées et placées sous agitation pendant 1 h à 4°C. Après centrifugation (9550 x g, 4°C, 10 min), le surnageant a été récupéré. Une aliquote de 10  $\mu$ L a été prélevée pour le dosage des protéines.

Un volume de 60  $\mu$ L a été prélevé et mis en présence de 6  $\mu$ L de tampon dénaturant Laemmli : 2% (v/v) de SDS (*Sodium DodecylSulfate*), 10% de glycérol, 5% de 2-mercaptoéthanol, 0,002% de bleu de bromophénol et Tris-HCl à 61,25 mM. Cette solution a été chauffée pendant 5 min à 100°C. La migration sur gel SDS-PAGE (*Sodium DodecylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) 12,5% en conditions dénaturantes a ensuite été réalisée en déposant un volume de l'échantillon WB dénaturé correspondant à 40  $\mu$ g de protéines.

Le transfert des protéines a été effectué pendant 40 min à 250 mA sur une membrane de nitrocellulose (0,4  $\mu$ m) imprégnée de tampon de transfert : Tris-HCl à 25 mM, glycine à 192 mM, 0,01% de SDS et 20% d'éthanol absolu. La membrane a ensuite été saturée sous agitation en présence de tampon TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween*) : Tris à 0,01 mM, NaCl à 0,15 mM et à pH = 8 et 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (Sigma-Aldrich, P2287). Le tampon contenait également 5% d'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma-Aldrich, A9647).

La membrane a ensuite été lavée à cinq reprises pendant 30 min dans du tampon TBS-T seul. La membrane a alors été mise en présence d'un anticorps primaire pendant une nuit à 4°C. Elle a ensuite été lavée cinq fois au TBS-T pendant 30 min et mise en présence d'un anticorps secondaire pendant 1 h à l'obscurité. La membrane a été lavée à cinq reprises dans du TBS-T seul puis mise en présence d'un réactif de luminescence (Sigma-Aldrich, CP53100-1KT) pendant 5 min à l'obscurité. La membrane a finalement été révélée sur film photographique (Kodak, 8194540 Biomax Light-1 Film) en chambre noire.

## **II.2. Dosage des protéines**

Pour déterminer la concentration en protéines de chaque échantillon, une gamme étalon a systématiquement été réalisée avec différentes solutions de BSA dans du NaCl 0,9% (0 à 300 µg/mL), préparées à partir d'une solution mère de BSA à 2 mg/mL (Sigma-Aldrich, P3717). Le dosage de Bradford a été réalisé en plaque 96 puits. Les puits ont dans un premier temps été remplis de 250 µL de réactif de Bradford (Bio-Rad, 500-0006) dilué au 1/5<sup>e</sup>. Un volume de 15 µL de solution de BSA ou d'échantillon préalablement soniqué a ensuite été déposé dans chaque puits. Les dépôts ont été réalisés en duplicat pour les solutions de BSA et en triplicat pour chaque échantillon. L'absorbance a été lue à 495 nm sur un appareil Varioskan Flash<sup>®</sup> (Thermo Scientific) et les données ont été traitées avec le logiciel SkanIt Software 2.4.1 (Thermo Scientific). Les droites d'étalonnage et la détermination de la concentration de chaque échantillon ont été effectuées sur Excel.

## **II.3. Etudes métabolomiques**

Un protocole standard a été mis au point afin de récupérer et d'extraire les cellules, de préparer et d'analyser par RMN les échantillons pour finalement analyser les données par des logiciels informatiques dédiés à la métabolomique. Ce protocole, mis au point par une ancienne doctorante du laboratoire (Bon, 2008), a été réadapté et utilisé pour la majorité des études métabolomiques réalisées au cours de cette thèse. Lorsqu'un autre protocole a été utilisé pour une étude donnée, il sera décrit explicitement.

Dans les études métabolomiques, un échantillon résultait du regroupement de plusieurs boîtes ø 100 mm. Une expérience consistait en la préparation, la récupération et l'analyse de plusieurs échantillons. Plusieurs expériences étaient donc nécessaires pour mener à bien une étude, selon le nombre d'échantillons souhaité par condition.

### **II.3.1. Récolte des cellules**

Pour un échantillon donné, le milieu de culture a été aspiré, puis le tapis cellulaire a été lavé avec 6 mL de NaCl 0,9% (m/m) par boîte. Les eaux de lavage de chaque boîte ont été conservées et regroupées. Les cellules ont ensuite été décollées avec 0,5 mL par boîte de trypsine-EDTA (Gibco-Invitrogen, 25300) pendant 30 s pour les lignées U87, U251, URB14, T2K et KILK2, ou pendant 5 min à 37°C pour les lignées SF763 et SF767. Les cellules ont ensuite été ajoutées aux eaux de lavage. Les boîtes ont été lavées avec 10 mL de NaCl afin de récolter le maximum de cellules. Les cellules, placées dans de la glace, ont été aussitôt comptées avec une cellule de Malassez puis centrifugées (311 x g, 4°C, 3 min). Le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire vortexé (10 s) avec 40 mL de NaCl froid. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot vortexé avec 10 mL de NaCl froid. Une aliquote de 100 µL a été prélevée pour le dosage des protéines. Le culot cellulaire a finalement été centrifugé, puis le surnageant éliminé.

### **II.3.2. Extraction des cellules**

Des volumes de 2 mL de MeOH (Riedel de Haën, 32211), 750 µL de CHCl<sub>3</sub> (Sigma Aldrich, 34860) et 500 µL d'eau Milli-Q (Maxima UltraPure Water, Elga) ont été successivement ajoutés au culot cellulaire (MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O, 8:3:2). Le mélange cellulaire a été vortexé et conservé à -80°C jusqu'à la séparation des phases. Ce protocole d'extraction biphasique est dérivé de la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957).

### **II.3.3. Récupération de la phase hydrosoluble**

La séparation des phases a été réalisée au laboratoire SPCMIB par centrifugation (700 x g, 4°C, 10 min). La phase hydrosoluble a de nouveau été centrifugée afin d'éliminer le maximum de résidus protéiques. Le surnageant a été récupéré et évaporé à sec pendant 6 h au SpeedVac.

### II.3.4. Préparation de l'extrait hydrosoluble deutéré

Un volume de 550  $\mu\text{L}$  de tampon borate à  $\text{pH} = 10$  (Prolabo, 32040.298) a été ajouté et l'extrait hydrosoluble a été lyophilisé pendant une nuit. Des volumes de 550  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  à 99,9% (Euriso-top, D214FS) et de 5  $\mu\text{L}$  de TSP (Alfa Aesar, A14489) à 1 mM ont été ajoutés. L'échantillon a finalement été transvasé dans un tube RMN en verre 178 mm (Norell, 508-UP-7).

### II.3.5. Analyses métaboliques par RMN

Au préalable, le spectre de l'échantillon, calibré en  $\delta$  sur le signal du TSP, a été réajusté à  $\text{pH} = 10$  de telle sorte que le signal de la taurine (Tau) ait un déplacement chimique de  $3,080 \pm 0,003$  ppm. Pour cela, quelques gouttes de solutions de NaOD (Alfa Aesar, 042346) ou de DCI (Sigma-Aldrich, 543047-10G) diluées dans du  $\text{D}_2\text{O}$  au  $1/10^{\circ}$  et au  $1/33^{\circ}$  respectivement, ont été, si nécessaire, ajoutées dans le tube.

L'enregistrement du spectre RMN  $^1\text{H}$  1D de l'échantillon a été réalisé sur un spectromètre 400 MHz (Bruker Avance), équipé d'une sonde TBO 5 mm multi-noyaux à triple résonance (Bruker) et à la température de 298 K. Une séquence de pré-saturation du signal de l'eau résiduelle (zgpr30) a été appliquée.

Les paramètres d'acquisition des données, permettant notamment la quantification des métabolites, étaient les suivants :

- taille du FID : TD = 64 K
- nombre de *scans* : NS = 1024
- fenêtre spectrale : SW = 6394 Hz
- durée de l'impulsion : P1 = 4,56  $\mu\text{s}$  (impulsion de  $30^{\circ}$ )
- temps d'acquisition : AQ = 5,12 s
- délai entre les impulsions : D1 = 2 s
- taille du spectre : SI = 256 K
- multiplication exponentielle : LB = 0,3 Hz



### II.3.6. Attribution spectrale et *bucketing*

Avant d'entreprendre toute analyse métabolomique par RMN  $^1\text{H}$ , nous avons choisi de réaliser l'attribution la plus exhaustive possible de l'ensemble des signaux observés sur le spectre de l'extrait hydrosoluble. Le choix de la taille de chaque *bucket*, ainsi que celui du nombre de *buckets* d'intérêt à conserver, sont primordiaux. Etant donné qu'un *bucket* donnera au final une variable, elle-même associée à un seul métabolite dans le meilleur des cas, il est nécessaire de connaître avec précision la nature du *bucket* considéré au départ. Ainsi, après les analyses statistiques, il est possible de directement corrélérer une variable à un métabolite donné. Par ailleurs, la réduction du nombre de données facilite les analyses statistiques qui suivent. L'obtention d'une matrice carrée, c'est-à-dire comportant un nombre d'échantillons égal au nombre de variables, est la situation optimale. Néanmoins, le nombre d'échantillons nécessaires la rend difficilement réalisable.

Des bases de données métaboliques sont constituées au laboratoire pour chaque type cellulaire ou tissulaire donné. Nous avons la particularité de travailler à  $\text{pH} = 10$ , ce qui a été illustrée par une publication soumise en 2010 (Robert *et al.*). Le travail à  $\text{pH} = 10$  a pour conséquence des variations dans le déplacement chimique des métabolites étudiés. Le métabolite illustrant le mieux ce phénomène est la taurine (Tau). En effet, O. Robert, un ancien doctorant du laboratoire, a montré que les déplacements chimiques de la Tau varient considérablement entre  $\text{pH} = 7$  et 10. Alors qu'elle conduit à deux triplets à  $\delta = 3,26$  et  $3,43$  ppm à  $\text{pH} = 7$ , un seul signal est observé à  $\delta = 3,08$  ppm à  $\text{pH} = 10$  (Robert, 2004).

Une grande partie des attributions a été effectuée par les anciens doctorants du laboratoire (Robert, 2004; Bon, 2008), principalement par ajout de standards (*spikage*) dans des échantillons et par des expériences RMN COSY  $^1\text{H}$  2D. Pour les études réalisées au cours de cette thèse, nous avons complété ces attributions par *spikage* exclusivement.

Les déplacements chimiques ( $\delta$ , en ppm), la multiplicité des signaux ( $m$ ) et les constantes de couplage ( $J$ , en Hz) de chaque métabolite présent dans les lignées cellulaires de GBM étudiées sont indiqués dans le tableau 6. La figure 25 montre le spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un extrait hydrosoluble d'un échantillon de la lignée KILK2. Cette attribution s'applique aux autres types cellulaires de GBM étudiés.

**Tableau 6. Données spectrales (RMN <sup>1</sup>H) des métabolites présents dans les cellules de GBM à pH = 10 et pour  $\delta_{\text{Tau}} = 3,080 \pm 0,003$  ppm.**

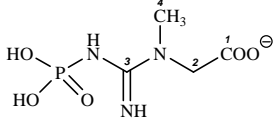
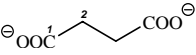
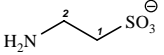
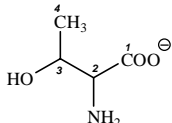
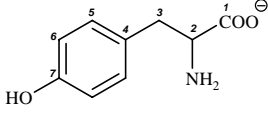
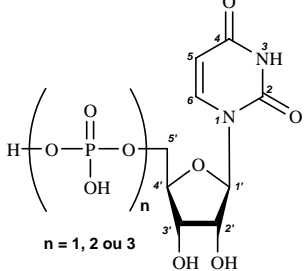
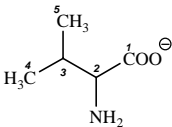
Métabolite	Structure	Groupe- -ment	$\delta$ (ppm)	<i>m</i>	J (Hz)
Acétate (Ace)		<sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	1,919	s	-
Alanine (Ala)		<sup>2</sup> CH <sup>3</sup> CH <sub>3</sub>	3,588 1,376	q d	7,2 7,2
Aspartate (Asp)		<sup>2</sup> CH <sup>3</sup> CH <sub>2</sub>	3,746 2,742 2,542	dd ABd	3,8/9,4 3,8/15,5 1,7/15,5
Adénosine mono/di/tri- phosphate (AXP)		<sup>2</sup> CH <sup>8</sup> CH <sup>1'</sup> CH <sup>2'</sup> CH <sup>3'</sup> CH <sup>4'</sup> CH <sup>5'</sup> CH <sub>2</sub>	8,276 8,455 6,16 - - 4,423 4,23	s s d - - m m	- - 4,5 - - - -
Choline (Cho)		<sup>1</sup> CH <sub>2</sub> <sup>2</sup> CH <sub>2</sub> <sup>⊕</sup> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	4,06 3,52 3,208	- - s	- - -
Créatine (Cr)		<sup>2</sup> CH <sub>2</sub> <sup>4</sup> CH <sub>3</sub>	3,933 3,041	s s	- -
Formate (For)		H-COO <sup>⊖</sup>	8,460	s	-
Fumarate (Fum)		<sup>2</sup> CH	6,521	s	-
Glutamate (Glu)		<sup>2</sup> CH <sup>3</sup> CH <sub>2</sub> <sup>4</sup> CH <sub>2</sub>	3,484 1,98 2,279	dd - t	5,2/7,2 - 8,0
Glutamine (Gln)		<sup>2</sup> CH <sup>3</sup> CH <sub>2</sub> <sup>4</sup> CH <sub>2</sub>	3,453 1,93 2,343	dd m t	12,8/6,0 - 8,4
Glutathion oxydé (GSH ox)		<sup>2</sup> CH <sup>3</sup> CH <sub>2</sub> <sup>4</sup> CH <sub>2</sub> <sup>7</sup> CH <sup>10</sup> CH <sub>2</sub> <sup>12</sup> CH <sub>2</sub>	3,422 1,98 2,43 4,80 3,749 3,809 2,965 3,319	t - - - AB ABd	6,5 - - - 17,3 9,8/14,2 4,3/14,2

AB(d), système AB (dédoublé) ; d(d), doublet (dédoublé) ; m, multiplet ; q, quadruplet ; s, singulet ; t, triplet.

**Tableau 6. (Suite) Données spectrales (RMN <sup>1</sup>H) des métabolites présents dans les cellules de GBM à pH = 10 et pour  $\delta_{\text{Tau}} = 3,080 \pm 0,003$  ppm.**

Métabolite	Structure	Groupe- -ment	$\delta$ (ppm)	<i>m</i>	J (Hz)
Glutathion réduit (GSH red)		<sup>2</sup> CH	3,48	-	-
		<sup>3</sup> CH <sub>2</sub>	1,98	-	-
		<sup>4</sup> CH <sub>2</sub>	2,45	-	-
		<sup>7</sup> CH	4,27	-	-
		<sup>10</sup> CH <sub>2</sub>	3,749	AB	17,3
		<sup>12</sup> CH <sub>2</sub>	3,800 2,805 2,923	ABd	7,9/13,3 5,0/13,3
Glycérophospho- -rylcholine (GPCho)		<sup>1</sup> CH <sub>2</sub>	3,88	-	-
		<sup>2</sup> CH	3,88	-	-
		<sup>3</sup> CH <sub>2</sub>	3,62	-	-
		<sup>1'</sup> CH <sub>2</sub>	4,334	m	-
		<sup>2'</sup> CH <sub>2</sub>	3,686	m	-
<sup>⊕</sup> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3,235	s	-		
Glycine (Gly)		<sup>2</sup> CH <sub>2</sub>	3,371	s	-
Isoleucine (Ile)		<sup>2</sup> CH	3,41	-	-
		<sup>3</sup> CH	1,84	-	-
		<sup>4</sup> CH <sub>2</sub>	1,21	-	-
			1,44	-	-
		<sup>5</sup> CH <sub>3</sub>	0,915	t	7,4
<sup>6</sup> CH <sub>3</sub>	0,965	d	9,2		
Lactate (Lac)		<sup>2</sup> CH	4,130	q	6,9
		<sup>3</sup> CH <sub>3</sub>	1,331	d	6,9
Leucine (Leu)		<sup>2</sup> CH	3,52	-	-
		<sup>3</sup> CH <sub>2</sub>	1,60	-	-
		<sup>4</sup> CH	1,60	-	-
		<sup>5</sup> CH <sub>3</sub>	0,932	d	5,7
		<sup>6</sup> CH <sub>3</sub>	0,947	d	5,7
Méthionine (Met)		<sup>2</sup> CH	3,49	-	-
		<sup>3</sup> CH <sub>2</sub>	1,91	-	-
			2,01	-	-
		<sup>4</sup> CH <sub>2</sub>	2,59	-	-
<sup>5</sup> CH <sub>3</sub>	2,127	s	-		
Phénylalanine (Phe)		<sup>2</sup> CH	3,64	-	-
		<sup>3</sup> CH <sub>2</sub>	2,93	-	-
			3,07	-	-
		<sup>5, 6, 7</sup> CH	7,330	m	-
Phosphoryl- -choline (PCho)		<sup>1</sup> CH <sub>2</sub>	3,59	-	-
		<sup>2</sup> CH <sub>2</sub>	4,166	m	-
		<sup>⊕</sup> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3,225	s	-

**Tableau 6. (Suite) Données spectrales (RMN  $^1\text{H}$ ) des métabolites présents dans les cellules de GBM à pH = 10 et pour  $\delta_{\text{Tau}} = 3,080 \pm 0,003$  ppm.**

Métabolite	Structure	Groupe- -ment	$\delta$ (ppm)	<i>m</i>	J (Hz)
Phosphocréatine (PCr)		$^2\text{CH}_2$	3,951	s	-
		$^4\text{CH}_3$	3,045	s	-
Succinate (Succ)		$^2\text{CH}_2$	2,405	s	-
Taurine (Tau)		$^{1,2}\text{CH}_2$	3,080	s	-
Thréonine (Thr)		$^2\text{CH}$	3,184	d	5,2
		$^3\text{CH}$	<i>4,01</i>	-	-
		$^4\text{CH}_3$	1,230	d	6,6
Tyrosine (Tyr)		$^2\text{CH}$	3,62	-	-
		$^3\text{CH}_2$ ( $\text{H}_a$ )	2,84	-	-
		( $\text{H}_b$ )	3,00	-	-
		$^5\text{CH}$	7,111	d	8,7
Uracile mono/di/tri- phosphate (UXP)		$^5\text{CH}$	7,715	d	7,8
		$^6\text{CH}$	5,886	d	7,7
		$^{1'}\text{CH}$	5,977	d	2,9
		$^{2'}\text{CH}$	4,49	-	-
		$^{3'}\text{CH}$	4,23	-	-
		$^{4'}\text{CH}$	4,16	-	-
		$^{5'}\text{CH}_2$ ( $\text{H}_a$ )	4,12	-	-
( $\text{H}_b$ )	4,21	-	-		
Valine (Val)		$^2\text{CH}$	3,326	d	4,9
		$^3\text{CH}$	2,10	-	-
		$^4\text{CH}_3$	0,926	d	7,0
		$^5\text{CH}_3$	0,988	d	7,0

*NB: Les valeurs en italique signifient qu'elles n'ont pas pu être déterminées avec certitude. Ces valeurs ont été attribuées à partir de la base spectrale des composés purs.*

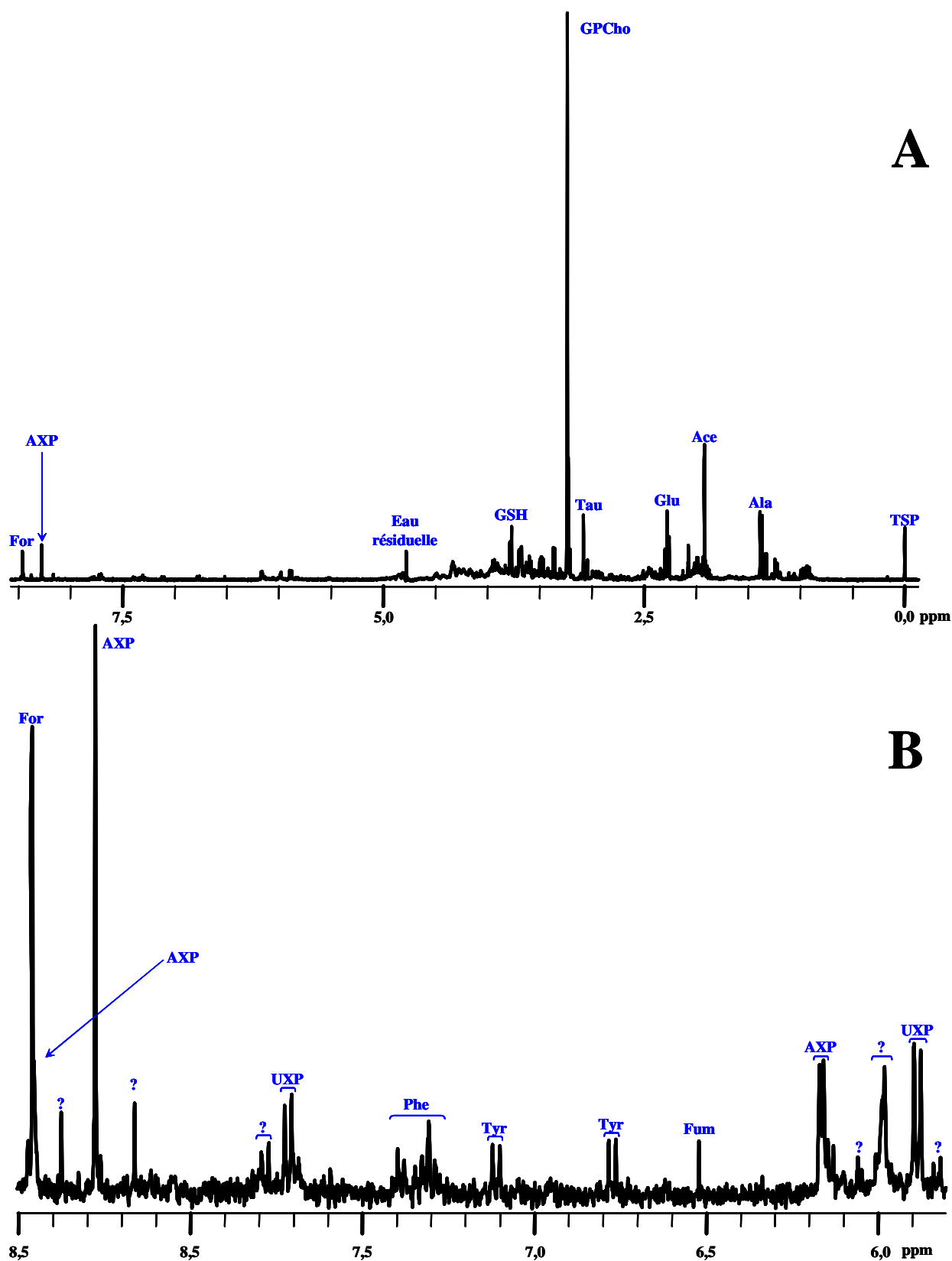


Figure 25. Attribution du spectre RMN <sup>1</sup>H d'un extrait hydrosoluble d'un échantillon de la lignée KILK2 : (A) spectre total ; (B) zoom de la région aromatique (8,5-5,8 ppm)

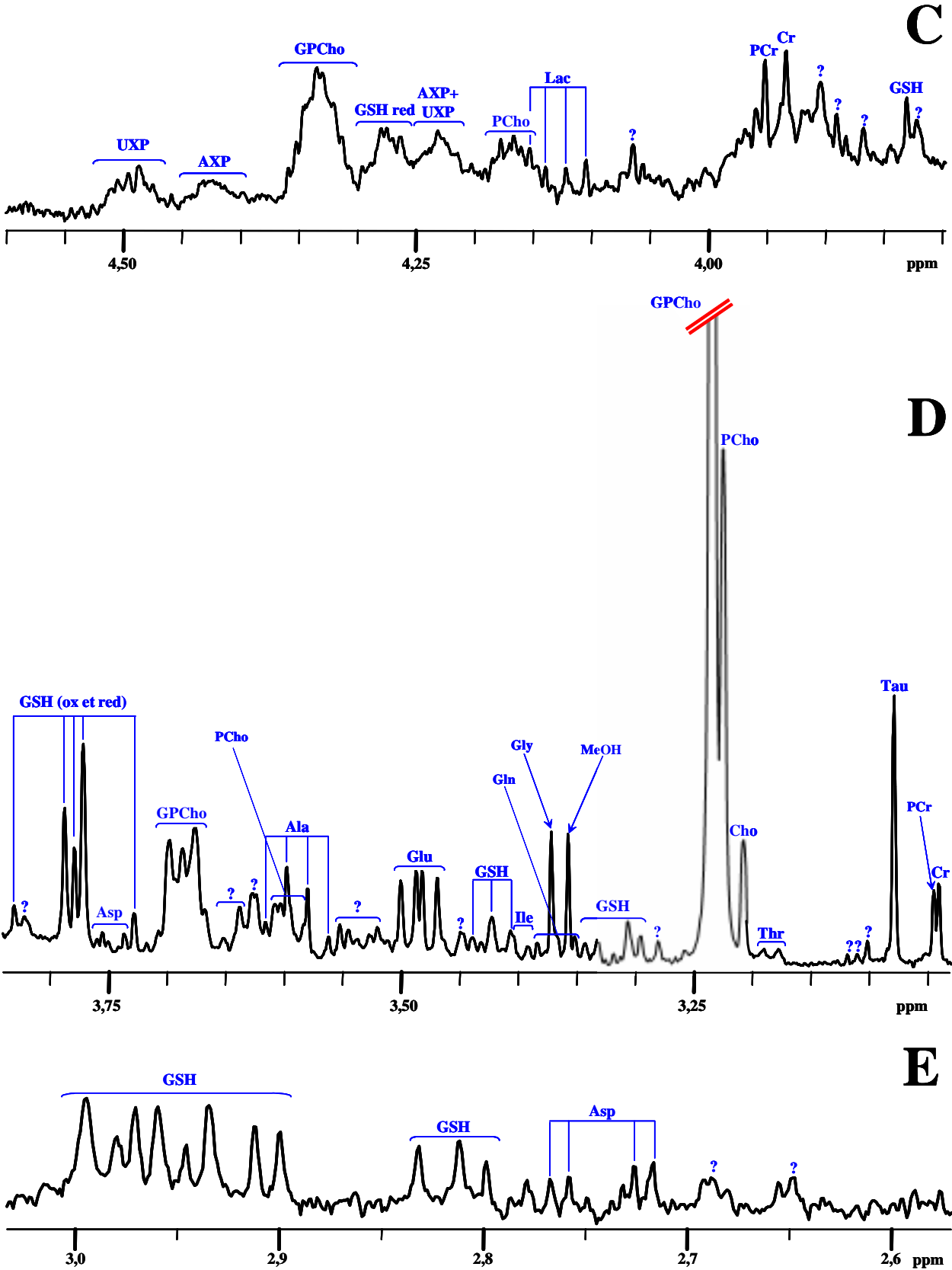


Figure 25. (Suite) (C), (D) et (E) zooms de la région aliphatique (4,6-2,6 ppm).

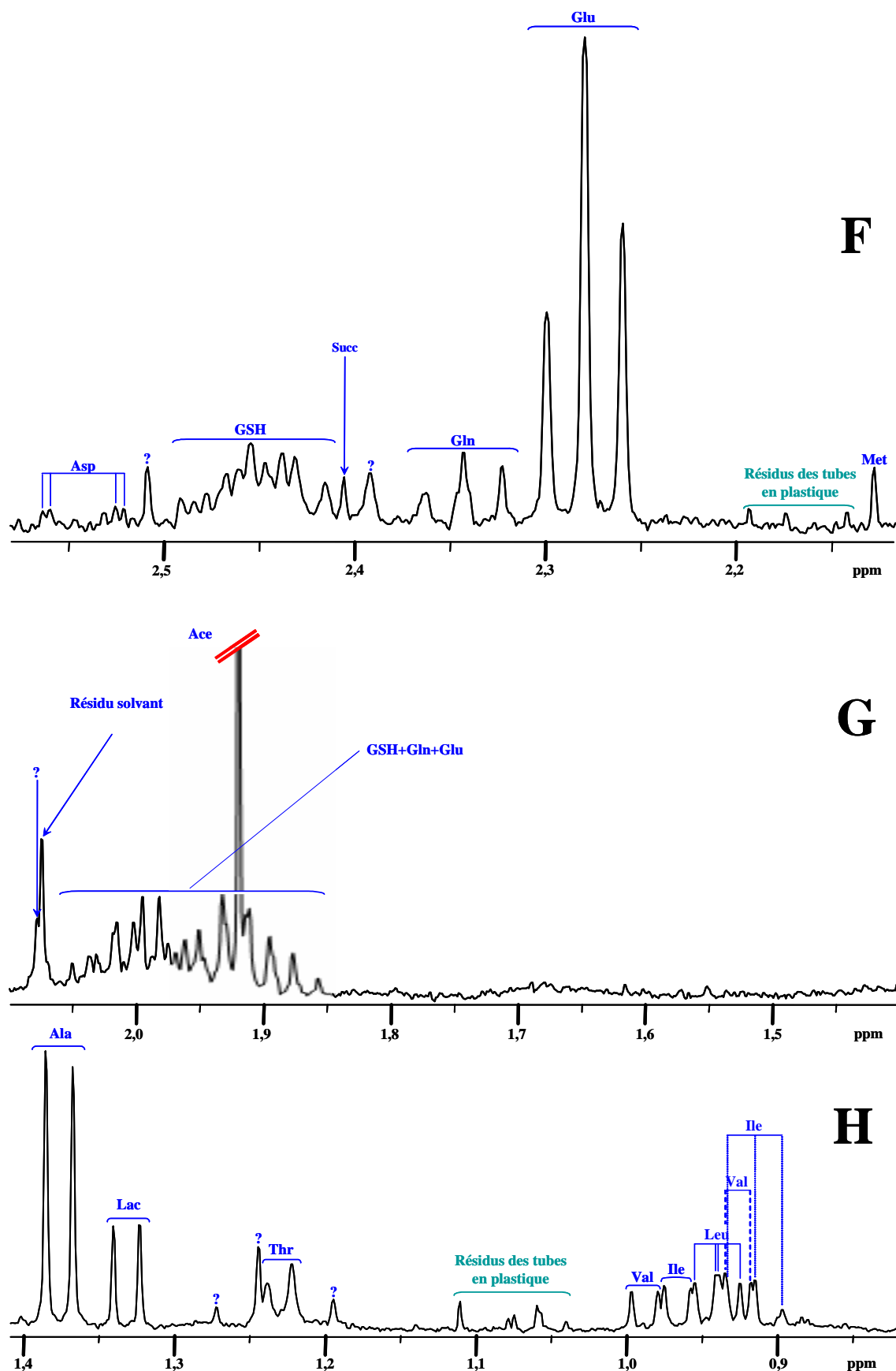


Figure 25. (Suite) (F) et (G) zooms de la région aliphatique (2,6-1,4 ppm) ; (H) zoom de la région des groupements méthyles (1,4-0,8 ppm).

### II.3.7. Traitement des spectres, des données et analyses statistiques

Le traitement des spectres RMN (calibration, phasage et correction de la ligne de base) des échantillons a été effectué avec le logiciel Topspin<sup>®</sup> 2.0 (Bruker). Des bases de spectres ont ensuite été constituées à l'aide du logiciel KnowItAll<sup>®</sup> (Bio-Rad). Le découpage des spectres par *intelligent bucketing* a été réalisé et un premier tri des *buckets* inutiles ou artéfactuels a été effectué.

La matrice obtenue rassemblait l'ensemble des variables  $X_i$ , pour chaque individu (ou échantillon)  $Y_j$  considéré. Pour un individu  $Y$  d'un groupe donné (exemples de groupes : Témoins, U87-FTI...), chaque variable  $X$  a été normalisée et exprimée en «  $A_{\text{normalisée}}/\text{mg de protéines}$  », selon l'équation 1' suivante :

$$(A_{\text{normalisée}} / \text{mg de protéines}) = A_X \cdot \overline{\sum A_{X_i}} / (A_{\text{TSP}} \cdot \sum A_{X_i} \cdot Q_Y) \quad (1')$$

Avec :  $A_X$  = aire de la variable  $X$  ;  $\overline{\sum A_{X_i}}$  = moyenne de la somme des aires des variables  $X_i$  de chaque individu  $Y_j$  appartenant à un groupe donné ;  $A_{\text{TSP}}$  = aire du signal du TSP ;  $\sum A_{X_i}$  = somme des aires des variables  $X_i$  de l'individu  $Y$  considéré et  $Q_Y$  = quantité de protéines (en mg) mesurée pour l'individu  $Y$ .

A partir de cette matrice de données, des analyses univariées non supervisées et supervisées ont été effectuées à l'aide d'un programme développé au laboratoire sur le logiciel libre R 2.8.1, ainsi que des analyses multivariées non supervisées et supervisées à l'aide du logiciel SIMCA P+ 12.0 (Umetrics). Sous le logiciel SIMCA, les variables ont été au préalable centrées sur leur moyenne et une réduction de leurs valeurs en UV (*Unit Variance*) a parfois été nécessaire. Les analyses ont été systématiquement effectuées pour comparer un groupe d'individus par rapport à un autre groupe. L'exemple d'une comparaison détaillée est présenté pour l'étude métabolomique du projet FTI-277 (partie II).



## **II.4. Etudes lipidomiques**

Le broyage et l'extraction des cellules, la récupération de la phase liposoluble, la préparation des échantillons, le dosage des protéines, les dérivations (si nécessaire), les analyses et le traitement des données ont été effectués au Plateau de Lipidomique dirigé par Justine Bertrand-Michel (IFR 150, [www.ifr150.toulouse.inserm.fr/page.asp?page=1726](http://www.ifr150.toulouse.inserm.fr/page.asp?page=1726)). La récupération, le broyage et l'extraction des cellules, la récupération de la phase liposoluble et la préparation des échantillons ont été effectués par notre équipe. Les autres étapes ont été assurées par l'équipe d'accueil. Le protocole standard pour les études lipidomiques est, à partir de l'étape de broyage et d'extraction des cellules, celui du Plateau de Lipidomique. L'analyse des chromatogrammes, l'intégration de l'aire des pics et la quantification des lipides ont été effectuées par l'équipe du Plateau de Lipidomique. Nous allons considérer le cas d'un échantillon.

### **II.4.1. Récolte des cellules**

Le regroupement de plusieurs boîtes  $\varnothing$  100 mm était souvent nécessaire pour constituer un échantillon. Pour un échantillon donné, le milieu de culture a été aspiré, puis le tapis cellulaire a été lavé deux fois avec 6 mL de PBS (PAA, H15-002) par boîte. Les cellules ont ensuite été grattées et récupérées avec 1,5 mL de PBS. Après centrifugation (50 x g, 5 min), le surnageant a été éliminé. Le culot cellulaire a aussitôt été plongé dans de l'azote liquide et un flux d'azote a ensuite été passé. Le culot cellulaire a été conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son extraction.

### **II.4.2. Broyage des cellules**

Le culot cellulaire, placé sur de la glace, a été resuspendu dans un volume de 2 mL d'un mélange de MeOH/solution aqueuse d'EGTA à 5 mM (2:1, v/v) et broyé à l'aide d'un appareil Fast-Prep (MP Biochemicals). Une aliquote de 50  $\mu\text{L}$  a été prélevée, évaporée à sec puis dissoute dans 0,2 mL de NaOH 0,1 M pendant une nuit. La quantité de protéines a été déterminée par le test de Bio-Rad.

### **II.4.3. Extraction des cellules et préparation des échantillons**

Les lipides sont classés selon leur structure mais, d'un point de vue analytique, ils sont regroupés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Le Plateau de Lipidomique propose notamment l'analyse des phospholipides (PL), celle des lipides neutres (cholestérol, dérivés du cholestérol, di- et tri-glycérides : LN) et enfin celle des céramides/sphingomyélines (Cer/SMe).

Le broyat cellulaire a été fractionné en trois échantillons destinés à chaque groupe de lipides à analyser : PL, LN et Cer/SMe. Les trois échantillons ont subi une extraction biphasique selon la méthode de Bligh & Dyer (Bligh & Dyer, 1959), avec des proportions volumiques de 2,5:2,5:2,1 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O).

#### **II.4.3.1. Extraction, préparation et analyse des PL**

A 0,9 mL d'homogénat cellulaire, un volume de 10 µL de PG16 (standard interne) à 1 mg/mL a été ajouté. Des volumes de 1,9 mL de MeOH (Sigma-Aldrich, 34860), 1,7 mL d'eau Milli-Q (Maxima UltraPure Water, Elga) et 2,5 mL de CHCl<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, 34854) ont ensuite été successivement ajoutés. La phase liposoluble a été récupérée puis évaporée à sec sous flux d'azote et reprise dans l'éluant A. Cet éluant consistait en un mélange d'hexane/isopropanol/triéthylamine/acide acétique glacial (82/18/0,014/0,5 v/v/v/v).

L'analyse a été effectuée sur une chaîne de chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Dionex Summit) couplée à un détecteur à diffraction dynamique de lumière (Polymer Laboratory ELS 2100). Le débit d'azote était de 1,8 mL/min. Les températures d'évaporation et du nébulisateur étaient respectivement de 50 et 80 °C. Une cartouche de garde DIOL (2,1 x 10 mm, Interchim) et une colonne analytique Uptisphere 6OH (2,1 x 250 mm, 5 µm, Interchim) ont été utilisées. La phase mobile B était constituée d'un mélange d'isopropanol/eau Milli-Q/triéthylamine/acide acétique glacial (85/15/0,014/0,5 v/v/v/v). Le volume d'injection était de 50 µL et le débit de 0,25 mL/min. La séparation des PL a été réalisée en effectuant un gradient de phase mobile B. La proportion de B a commencé à 5% puis a augmenté de manière linéaire jusqu'à 35% au bout de 35 min, est ensuite redescendue à 5% en 1 min et est enfin restée à 5% pendant 10 min.

#### **II.4.3.2. Extraction, préparation et analyse des LN**

A 0,5 mL de broyat cellulaire, des standards internes ont été ajoutés : 1 µg de stigmastérol, 1 µg d'heptadécanoate de cholestérol, 1 µg de triheptadécanoate de glycérol et 1 µg de 1,3-dimyristine. Des volumes de 1 mL de MeOH, 0,9 mL d'eau Milli-Q et 1,4 mL de CHCl<sub>3</sub> ont ensuite été successivement ajoutés. L'extrait cellulaire a été centrifugé (435 x g, 2 min). La phase liposoluble a été évaporée à sec sous flux d'azote.

Les LN ont été séparés des autres lipides sur colonne en verre SPE (Macherey Nagel, CHROMABOND pure silicium 200 mg). L'extrait a dans un premier temps été repris par 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  puis déposé sur la colonne conditionnée au préalable par 2 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Les LN ont été élués par 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  puis évaporés à sec. Ils ont ensuite été dissous dans 20  $\mu\text{L}$  d'AcOEt.

Les LN ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (FOCUS Thermo Electron). Un volume de 1  $\mu\text{L}$  a été injecté dans une colonne capillaire en silice fondue Zebron-1 (5 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du film, Phenomenex) (Barrans et al., 1994). La température du four a été programmée pour passer de 200 à 350°C à raison de 5°C/min. Le gaz vecteur était de l'hydrogène à 0,5 bar. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 315 et 345°C.

#### **II.4.3.3. Extraction, préparation et analyse des Cer/SMe**

A 0,5 mL de broyat cellulaire, 2  $\mu\text{g}$  du standard interne céramide NC15 a été ajouté, préparé selon Vieu et ses collaborateurs (Vieu et al., 2002). Des volumes de 1 mL de MeOH, 0,9 mL d'eau Milli-Q et 1,4 mL de  $\text{CHCl}_3$  ont ensuite été successivement ajoutés. L'extrait cellulaire a été centrifugé (435 x g, 2 min). La phase liposoluble a été récupérée puis évaporée à sec sous flux d'azote. L'extrait a ensuite subi une hydrolyse alcaline douce en présence de 1 mL d'une solution méthanolique de NaOH 0,6 M pendant 5 min à température ambiante. Après neutralisation, ré-extraction (selon la méthode de Bligh & Dyer) et évaporation à sec, l'extrait a subi une silylation en présence de 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) contenant 1% de  $\text{TMSCl}/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1), à température ambiante pendant une nuit (TMSCl : chlorure de triméthylsilyle).

L'analyse des Cer/SMe a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse (Hewlett Packard, 4890) selon Vieu et ses collaborateurs (Vieu et al., 2002) et un volume de 5  $\mu\text{L}$  a été injecté dans une colonne capillaire en silice fondue RTX-50 (30 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du film, RESTEK). La température du four a été programmée pour passer de 195 à 310°C à raison de 3,5°C/min. Le gaz vecteur était de l'hydrogène à 0,5 bar. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 310 et 340°C.

### III. Description des protocoles des différents projets

#### III.1. Projet RR vs RS

##### III.1.1. Etude métabolomique

Pour cette étude, les quatre lignées cellulaires U87, U251, SF763 et SF767 ont été cultivées à l'ICR par Caroline Delmas. Les cellules ont été mises en culture monocouche sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C, dans du milieu nutritif complet constitué de DMEM contenant de la L-glutamine, du pyruvate de sodium et 4,5 g/L de glucose (Lonza, BE12-604F) supplémenté avec 10% de SVF (PAN<sup>TM</sup>, 3301-P0261003). Pour chaque lignée cellulaire, les cellules ont étéensemencées à **J<sub>0</sub>** dans plusieurs boîtes ø 140 mm de telle sorte qu'à **J<sub>4</sub>** les cellules soient récoltées à 60% de confluence (estimée visuellement par l'expérimentatrice). Quatre à six boîtes, selon les lignées, étaient ainsi nécessaires pour constituer un échantillon final.

Le milieu de culture a été aspiré, puis le tapis cellulaire a été lavé avec du NaCl 0,9%. Les cellules ont ensuite été décollées avec 1 mL par boîte de trypsine-EDTA (Gibco-Invitrogen, 25300) pendant 30 s pour les lignées U87 et U251, et pendant 5 min à 37°C pour les lignées SF763 et SF767. Les cellules ont ensuite été récupérées avec 20 mL de NaCl froid en regroupant les boîtes nécessaires pour constituer un échantillon. Les cellules ont été comptées puis centrifugées (311 x g, 4°C, 3 min). Le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire vortexé (10 s) avec 10 mL de NaCl froid. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire conservé dans de la glace. Des volumes de 2 mL de MeOH (RPE-quality, Carlo Erba Reactifs), 0,75 mL de CHCl<sub>3</sub> (RPE-quality, Carlo Erba Reactifs) et 0,5 mL d'eau Milli-Q (Purelab Maxima, Elga) ont été successivement ajoutés au culot cellulaire (MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O, 8:3:2). Le mélange cellulaire a été vortexé, transféré au laboratoire et conservé à -80°C jusqu'à séparation des phases.

La quantité de TSP ajouté dans les tubes RMN était de 10 µL à 1 mM. Les spectres RMN <sup>1</sup>H ont été enregistrés selon les paramètres d'acquisition suivants : TD = 64 K, NS = 128, SW = 6394 Hz, P1 = 4,56 µs (30° d'impulsion), AQ = 5,12 s, SI = 256 K et D1 = 2 s. Avant toute analyse statistique et pour un individu (échantillon) donné, ses variables ont été normalisées en divisant leurs valeurs par la somme de ses variables (*divided by*). Dix échantillons (n = 10) par lignée ont été obtenus pour l'étude métabolomique du projet RR vs RS. Ces échantillons ont été obtenus en treize expériences distinctes.

### III.1.2. Etude lipidomique

Les lignées cellulaires U87, U251, SF763 et SF767 ont été ensemencées séparément à **J<sub>0</sub>** dans plusieurs boîtes ø 140 mm à une densité de  $1,5 \cdot 10^6$ ,  $2,6 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^6$  et  $3 \cdot 10^6$  cellules par boîte, respectivement. Les cellules ont été récoltées à 60% de confluence à **J<sub>2</sub>** pour les U87, U251 et SF767 et à **J<sub>3</sub>** pour les SF763. Alors qu'une seule boîte suffisait pour constituer un échantillon pour les lignées U87, U251 et SF767, deux boîtes étaient nécessaires pour la lignée SF763. Le protocole standard pour les études lipidomiques a été utilisé. Seuls les volumes de lavage des tapis cellulaires (10 mL) et de PBS pour récupérer les cellules (2 mL/boîte) ont été modifiés. Cinq échantillons ( $n = 5$ ) ont été obtenus pour la lignée SF767, six échantillons ( $n = 6$ ) pour les lignées U251 et SF763 et sept échantillons ( $n = 7$ ) pour la lignée U87. Ces échantillons ont été obtenus en deux expériences distinctes pour chaque lignée.

### III.1.3. Etude métabolomique de l'effet de l'hémicholinium

Pour cette étude, le protocole de traitement des cellules a été établi à partir des travaux de Daly et de ses collaborateurs (Daly et al., 1987). Les lignées cellulaires U87, U251, SF763 et SF767 ont été ensemencées séparément à **J<sub>0</sub>** dans plusieurs boîtes ø 140 mm à une densité de  $0,9 \cdot 10^6$ ,  $2,3 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^6$  et  $3 \cdot 10^6$  cellules par boîte, respectivement. Pour chaque lignée, quatre boîtes étaient nécessaires pour constituer un échantillon. A **J<sub>2</sub>**, le milieu des boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet seul pour la moitié d'entre elles (échantillons contrôles) et par du milieu complet avec de l'hémicholinium (HC-3) (H108, Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 100  $\mu$ M pour l'autre moitié (échantillons HC-3). Au bout de 8 h, les cellules ont été récoltées à 60% de confluence.

Le protocole standard pour les études métabolomiques a été appliqué. Seuls les volumes de lavage des tapis cellulaires (8 mL) et de trypsine par boîte (1 mL) ont été modifiés. Le dosage des protéines n'a pas été effectué. Par ailleurs, seule une analyse multivariée non supervisée (ACP) a été réalisée, suivie de *metabolic targeting*. Pour cela, l'aire des signaux des métabolites les plus abondants a été déterminée. Chaque aire a ensuite été normalisée par la somme des aires mesurées sur chaque spectre (aire relative par rapport à la somme des aires). Nous nous sommes principalement intéressés à l'aire relative des composés à choline hydrosolubles (Cho, PCho et GPCho). Trois échantillons ( $n = 3$ ), en trois expériences distinctes, ont été obtenus pour les conditions suivantes : U87, U251, U251 HC-3, SF763, SF763 HC-3, SF767 et SF767 HC-3. Quatre échantillons ( $n = 4$ ) ont été récoltés pour la condition U87 HC-3.

### **III.1.4. Etude du métabolisme des PtdCho par marquage deutéré**

Suite à de nombreux échecs pour appliquer le protocole d'étude du métabolisme des PtdCho par marquage à la choline tritiée (Miquel et al., 1998), nous avons entrepris de mettre au point un nouveau protocole. Ce protocole, utilisant la choline deutérée comme précurseur, est inspiré de plusieurs protocoles décrits dans la littérature (Hunt *et al.*, 2002; Koc *et al.*, 2002; Rau *et al.*, 2003; Bleijerveld *et al.*, 2006; Postle *et al.*, 2007). La méthode analytique pour détecter tous les composés à cholines marqués et non marqués est la HILIC-ESI-MS/MS. Ce travail a été valorisé par une publication acceptée en 2010 (Desoubzdanne *et al.*, 2010).

#### **III.1.4.1. Ensemencement et traitement des cellules**

Les lignées cellulaires U87, U251, SF763 et SF767 ont été ensemencées séparément à  $J_0$  dans plusieurs boîtes  $\varnothing$  100 mm à une densité cellulaire de  $0,3 \cdot 10^6$ ,  $0,3 \cdot 10^6$ ,  $0,25 \cdot 10^6$  et  $0,45 \cdot 10^6$  cellules par boîte, respectivement. A  $J_3$ , le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet contenant 1 mM final de chlorure de [triméthyl- $d_9$ ]-choline ( $d_9$ -Cho) (Euriso-top<sup>®</sup>, DLM-549-1), soit 97% d'enrichissement en choline dans le milieu (Hunt et al., 2002). Trois échantillons ( $n = 3$ ), sur trois expériences distinctes, ont été obtenus pour chacune des lignées et pour chaque temps. Nous allons décrire le protocole pour un échantillon donné.

#### **III.1.4.2. Récupération et extraction des cellules**

Pour chacune des lignées, trois boîtes étaient nécessaires pour constituer un échantillon. Aux temps 0,5, 1, 1,5, 3, 5 et 8 h, les deux premières étapes du protocole standard pour les études métabolomiques (récupération et extraction des cellules) ont été appliquées.

#### **III.1.4.3. Séparation des phases et préparation des échantillons**

Dans le mélange biphasique, 2 nmol de standards internes (SI) de [ $d_{13}$ ]-choline ( $d_{13}$ -Cho) (Euriso-top<sup>®</sup>, DLM-3015-0.1) et de PtdCho 17:0/17:0 (Avanti Polar Lipids, 172977) ont été ajoutés, puis le mélange a été vortexé. La séparation des phases a été réalisée par centrifugation ( $700 \times g$ ,  $4^\circ C$ , 10 min). La phase hydrosoluble a de nouveau été centrifugée et le surnageant récupéré. Les phases lipo- et hydrosolubles ont été évaporées à sec au SpeedVac pendant 1 et 6 h, respectivement. Les extraits lipo- et hydrosolubles ont été re-suspendus respectivement dans 200  $\mu L$  d'un mélange MeOH/ $CHCl_3$  (2:1) et 200  $\mu L$  d'eau Milli-Q, puis transférés dans des vials avec inserts. Les échantillons ont été conservés à  $4^\circ C$  jusqu'à leur analyse.

#### III.1.4.4. Conditions chromatographiques

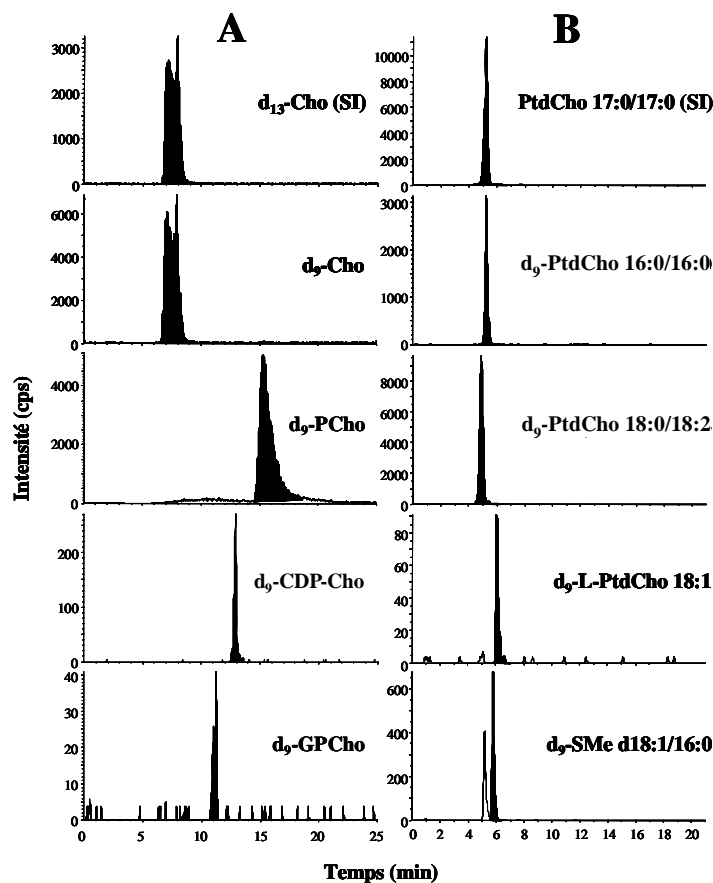
Les échantillons lipo- et hydrosolubles ont été analysés sur un chromatographe liquide Agilent 1100 (Agilent Technologies), couplé à un spectromètre de masse Q/Trap (Applied Biosystems/MDS Sciex). Le chromatographe est constitué d'une pompe binaire avec dégazeur et d'un injecteur automatique. Une cartouche de garde SecurityGuard Cartridge Silica (4 x 3,0 mm, Phenomenex®) et une colonne Atlantis™ HILIC Silica (3,0 x 100 mm, 3 µm, Waters) ont été utilisées.

Le volume d'injection était de 30 µL pour les deux types d'échantillons et le débit de 600 µL/min. La phase mobile A était une solution aqueuse d'acétate d'ammonium (AceA) à 10 mM et à pH = 3, alors que la phase mobile B était constituée d'acétonitrile (ACN) contenant 5% d'AceA à 200 mM et pH = 3.

Pour la séparation des composés liposolubles, la séquence pour la phase mobile a été la suivante : 10% de A pendant 1 min ; augmentation linéaire pendant 9 min jusqu'à 45% de A ; diminution linéaire pendant 1 min jusqu'à 10% de A ; stabilité pendant 20 min.

En ce qui concerne la séparation des composés hydrosolubles, la séquence pour la phase mobile a été la suivante : 10% de A pendant 1 min ; augmentation linéaire pendant 9 min jusqu'à 35% de A ; augmentation linéaire pendant 2 min jusqu'à 45% de A ; stabilité pendant 2 min ; diminution linéaire pendant 1 min jusqu'à 10% de A ; stabilité pendant 10 min. Ces conditions chromatographiques ont permis d'avoir une bonne résolution des pics des composés lipo- et hydrosolubles.

La figure 26 représente les chromatogrammes de composés deutérés hydro- et liposolubles d'un échantillon de la lignée SF767 à t = 8 h. Les temps de rétention des composés seront décrits dans le tableau 7.



**Figure 26. (A) Chromatogrammes des composés hydrosolubles marqués et du SI correspondant ; (B) Chromatogrammes de certains composés liposolubles marqués et du SI correspondant. Abréviations : cps, coups par seconde ; SI, standard interne.**

### III.1.4.5. Conditions de détection des composés en MS

Pour des raisons techniques et de coût, l'optimisation des conditions de détection des composés à choline deutérés en MS a été réalisée à partir des composés non deutérés correspondants. Les réponses ioniques changent en fonction des variations de masse et du nombre d'insaturations dans le cas des lipides (Koivusalo et al., 2001; Postle et al., 2007). Pour cette étude, nous avons néanmoins considéré que la réponse ionique de chaque composé deutéré était relativement proche de celle de son homologue non deutéré.

L'identification des métabolites et des phospholipides deutérés et non deutérés a été réalisée sur un spectromètre de masse triple quadripôle Q/Trap avec une source d'ionisation Turbo spray (Applied Biosystems/MDS Sciex) en mode positif. La tension du spray ionique était de 5 000 V. Le *declustering potential* était de 35 V pour d<sub>9</sub>-GPCho et GPCho, 45 V pour Cho, d<sub>9</sub>-Cho, d<sub>13</sub>-Cho, PCho, d<sub>9</sub>-PCho, CDP-Cho et d<sub>9</sub>-CDP-Cho, et 70 V pour tous les lipides marqués et non marqués. L'énergie de collision était de 21 V pour d<sub>9</sub>-GPCho et GPCho, 25 V



pour Cho, d<sub>9</sub>-Cho et d<sub>13</sub>-Cho, 30 V pour PCho, d<sub>9</sub>-PCho, CDP-Cho et d<sub>9</sub>-CDP-Cho, et 28 V pour tous les lipides marqués et non marqués. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et de collision. La température de la source était de 450°C. L'analyse des métabolites et des lipides a été effectuée en modes balayage et MRM, par le logiciel Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex).

La détermination des transitions ioniques des différents composés a été réalisée par injection directe de composés standards non marqués, dans un premier temps, puis sur des échantillons tests avec les composés deutérés. Pour chaque composé marqué et non marqué, une transition spécifique entre l'ion parent (Q1) et un ion fragment (Q3) a été sélectionnée. Le tableau 7 liste les transitions ioniques et les temps de rétention de tous les composés à choline étudiés (marqués et non marqués).

**Tableau 7. Transitions ioniques et temps de rétention des composés à choline**

Composés à choline		Q1 [M + H] <sup>+</sup> (m/z)	Q3 (m/z)	Temps de rétention (min)
<b>Métabolites</b>				
	Cho	104,0	60,0	7,7
	d <sub>9</sub> -Cho	113,2	69,1	“
	d <sub>13</sub> -Cho (SI)	117,2	69,1	“
	PCho	184,1	124,9	13,1
	d <sub>9</sub> -PCho	193,0	124,9	“
	CDP-Cho	489,2	264,1	12,2
	d <sub>9</sub> -CDP-Cho	498,2	273,1	“
	GPC	258,0	104,0	11,0
	d <sub>9</sub> -GPC	266,8	113,1	“
<b>Lipides</b>				
	PtdCho	16:0/14:0	706,8	184,0
		16:0/16:0 (courbe de calibration)	734,7	“
		16:0/16:1	732,7	“
		16:0/18:1	760,7	“
		16:0/18:2	758,8	“
		18:0/18:2	786,7	“
		16:0/20:4	782,7	“
		16:0alk/16:0	721,8	“
		16:0alk/18:0	748,8	“
		17:0/17:0 (SI)	763,0	184,0
	d <sub>9</sub> -PtdCho	16:0/14:0	716,0	193,0
		16:0/16:0	743,8	“
		16:0/16:1	741,8	“
		16:0/18:1	769,7	“
		16:0/18:2	768,0	“
		18:0/18:2	795,8	“
		16:0/20:4	791,8	“
		16:0alk/16:0	730,0	“
		16:0alk/18:0	757,8	“
	L-PtdCho <sup>a</sup>	18:1 (courbe de calibration)	522,0	184,0
	d <sub>9</sub> -L-PtdCho <sup>a</sup>	18:1	531,0	193,0
	SMe <sup>a</sup>	d18:1/16:0	704,0	184,0
	d <sub>9</sub> -SMe <sup>a</sup>	d18:1/16:0	713,0	193,0
	SMe	d18:1/6:0 (courbe de calibration)	563,8	184,0

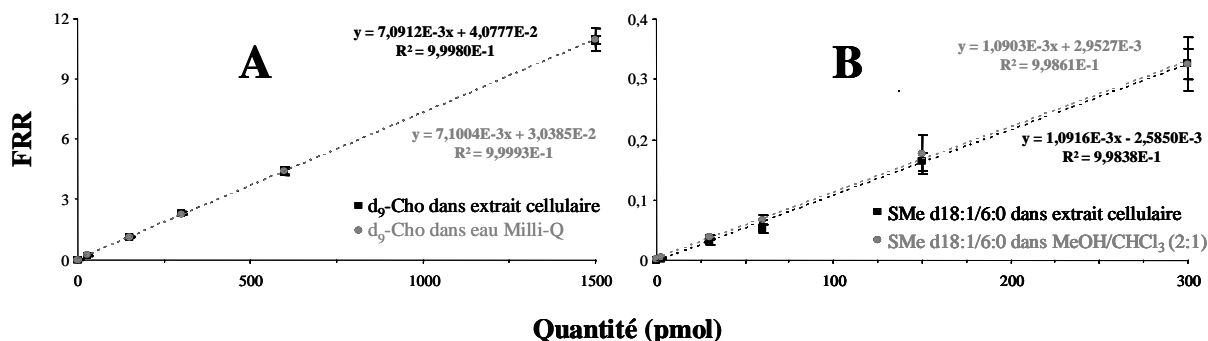
<sup>a</sup> Les espèces moléculaires sélectionnées étaient les plus abondantes pour ces composés.

### III.1.4.6. Evaluation de l'effet matrice et courbes de calibration

L'effet matrice dans les échantillons hydro- et liposolubles a été évalué avec les composés  $d_9$ -Cho et SMe d18:1/6:0 (Avanti Polar Lipids, 860 582P), respectivement. Ces deux composés ont été choisis car ils n'existent pas à l'état naturel dans les cellules.

Les volumes des échantillons dans les vials, le volume d'injection, la quantité du standard interne et les conditions analytiques étaient les mêmes que celles décrites précédemment.

Les courbes de calibration des deux composés ont été effectuées dans un premier temps dans des extraits de cellules SF767 hydro- et liposolubles. Puis, ces courbes ont été réalisées dans de l'eau Milli-Q pour la  $d_9$ -Cho et dans le mélange MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2:1) pour la SMe d18:1/6:0. Chaque courbe de calibration a été réalisée avec trois injections pour chaque quantité (en picomole) de composé (Fig. 27). Le facteur de réponse relatif (FRR) correspond, pour un composé donné, au *ratio* de l'aire du pic du composé sur l'aire du pic du SI, multiplié par la quantité du SI. Il est donc possible de directement déterminer la quantité de chaque composé, en tenant compte du volume initial (200  $\mu$ L) et du volume injecté (30  $\mu$ L).



**Figure 27.** Courbes de calibration de : (A) la  $d_9$ -Cho dans un extrait hydrosoluble de cellules SF767 (■) et dans l'eau Milli-Q (●) ; (B) la SMe d18:1/6:0 dans un extrait liposoluble de cellules SF767 (■) et dans un mélange MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2:1) (●).

*Abréviation : FRR, facteur de réponse relatif.*

Pour les deux composés, les courbes de calibration sont sensiblement identiques dans la matrice cellulaire et dans le solvant approprié. L'effet matrice a donc été considéré comme négligeable à la fois dans les extraits hydro- et liposolubles. Les courbes de calibrations externes présentées dans la figure 28 ont ainsi été réalisées dans les solvants appropriés (eau Milli-Q pour les extraits hydrosolubles et MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2:1) pour les extraits liposolubles).

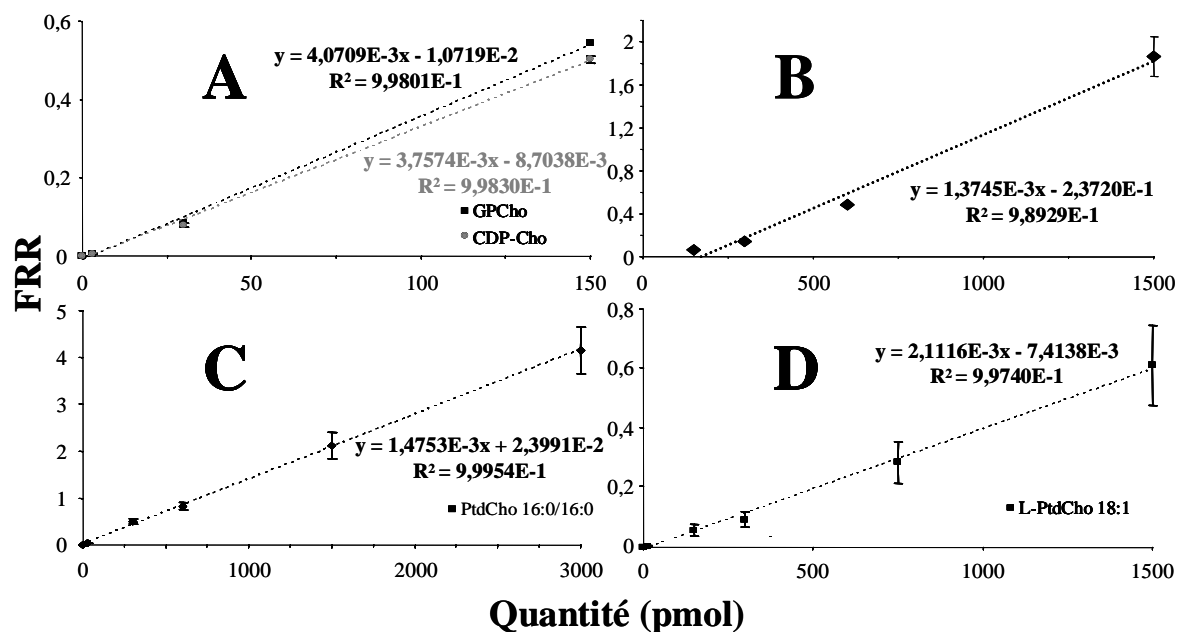


Figure 28. Courbes de calibration de : (A) GPCho (■) et CDP-Cho (●) ; (B) PCho ; (C) PtdCho 16:0/16:0 ; (D) L-PtdCho 18:1.

### III.1.4.7. Cinétiques d'incorporation, de formation et du *turnover* des composés deutérés

Hormis pour le composé  $d_9$ -Cho, toutes les courbes de calibration des composés marqués ont été effectuées avec leur homologue non deutéré respectif. Pour les PtdCho, seule la PtdCho 16:0/16:0 a été utilisée. C'est pourquoi, en ce qui concerne les données qui ont permis de tracer les cinétiques d'incorporation ou de formation des composés deutérés, les valeurs ont été considérées comme pseudo-quantitatives.

Comme les données ont été obtenues lors de trois expériences différentes pour chacune des lignées, les valeurs des cinétiques sont exprimées en nanomole par milligramme de protéines (ou en nanomole par million de cellules, voir **Annexe 2**), plus ou moins l'écart-type (*Standard Deviation* ou SD). Les valeurs du *turnover* des composés marqués ( $\pm$  SD) correspondent au pourcentage de la quantité d'un composé marqué donné par rapport à la somme des quantités du composé et de son homologue non deutéré.

Pour comparer deux groupes de données, des tests de Student ont été réalisés. Les résultats ont été considérés comme significatifs pour des valeurs inférieures à 5% ( $p < 0,05$ ).

### III.1.5. Etudes transcriptomique et par qRT-PCR

Les lignées cellulaires U87, U251, SF763 et SF767 ont étéensemencées séparément à **J<sub>0</sub>** dans plusieurs boîtes ø 100 mm à une densité de  $0,75 \cdot 10^6$ ,  $1,3 \cdot 10^6$ ,  $0,5 \cdot 10^6$  et  $1,5 \cdot 10^6$  cellules par boîte, respectivement.

Une seule boîte par échantillon a été nécessaire pour chaque lignée. Les cellules ont été récoltées à 60% de confluence à **J<sub>2</sub>** pour les quatre lignées. Les boîtes ont été placées sur de la glace. Le milieu de culture a été aspiré, puis le tapis cellulaire a été lavé deux fois avec 10 mL de PBS froid par boîte. Les boîtes ont été parafilmées et aussitôt placées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction des ARN.

Les ARN ont été extraits à l'aide d'un kit Qiagen RNeasy<sup>®</sup> (Qiagen, 74 104) suivant le protocole fourni dans le kit. Après extraction, les ARN ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

#### III.1.5.1. Etude transcriptomique

En ce qui concerne l'étude transcriptomique, quatre échantillons ( $n = 4$ ) en quatre expériences distinctes ont été obtenus pour chacune des lignées. La qualité des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) dénaturant avec la détection des deux bandes d'ARN ribosomiaux 18s et 28s (1,9 et 5 kb respectivement).

Les échantillons ont été transférés à la plateforme Biopuces de la Génopole Toulouse Midi-Pyrénées, située sur le campus de l'INSA à Ranguel et dirigée par Véronique le Berre ([www.genotoul.fr](http://www.genotoul.fr)). Ils ont été étudiés sur seize biopuces (ou lames) RNG\_Human\_25K (environ 26000 gènes) commandées auprès du Laboratoire d'exploration fonctionnelle du génome (CEA, Evry) et livrées à la plateforme.

Le plan expérimental a consisté à mélanger les seize extraits d'ARN comme référence commune sur chaque lame marquée au fluorophore vert Cy3. Les ADNc d'intérêt ont été marqués au fluorophore rouge Cy5. L'hybridation, le marquage par des fluorophores (cyanines Cy3 et Cy5), le dépôt sur les lames (un échantillon par lame avec une référence commune) et le traitement des images ont été réalisés par l'équipe de la plateforme.

Le traitement des données a ensuite été réalisé par notre groupe à l'aide des logiciels Bioplot et Bioclust, disponibles en ligne sur le site de la plateforme et mis au point par les chercheurs de la plateforme. Dans un premier temps, l'expression des gènes codant pour les protéines susceptibles d'être impliquées dans la biosynthèse des PtdCho a été vérifiée dans les quatre lignées cellulaires. La liste des gènes étudiés et présents sur les lames ( $n = 26$ ) est la suivante : CHAT, CHDH, CHKA, CHPT1, COLQ, LYPLA1, PCYT1B, PLA2G6, PLCB1, PLCB2, PLCB3, PLCB4, PLCD1, PLCD3, PLCD4, PLCE1, PLCG1, PLCG2, PLCH1, PLCL1, PLCL2, PLCXD1, PLCXD2, PLCXD3, PLCZ1 et SLC5A7. Les conditions de traitement des données étaient les suivantes : prétraitement (*mean intensity*), normalisation (*quantile*), conversion en échelle logarithmique ( $\log_{10}$ ) et résultats affichés à l'échelle normale.

Dans un deuxième temps, la recherche de gènes différentiellement exprimés dans les lignées RR par rapport aux lignées RS a été effectuée. La première étape a consisté à vérifier l'homogénéité des lames à l'aide du logiciel Bioclust. Les données ont ensuite été traitées dans les conditions suivantes : prétraitement (*mean intensity*), normalisation (*quantile*), conversion en échelle logarithmique ( $\log_{10}$ ), élimination des données négatives (*not negative*), seuil ( $p < 0,1$ ). Entre deux groupes d'échantillons donnés (cellules radiorésistantes RR *vs* cellules radiosensibles RS), un gène était considéré comme sur- ou sous-exprimé si le *ratio* de son expression était inférieur à 0,714 ou supérieur à 1,4 ( $0,714 > \text{ratio} > 1,4$ ), et si cette condition était respectée lorsqu'étaient comparées les lignées U87 *vs* U251, U87 *vs* SF767, SF763 *vs* U251 et SF763 *vs* SF767.

Ces données transcriptomiques ont ensuite été retraitées sous le logiciel libre R, complété du *package* Limma, avec l'aide de Pascal Martin, ingénieur de recherche au laboratoire de Toxicologie Intégrative et Métabolisme (INRA, UR66), et chercheur de la plateforme Biostatistique de la Génopole Toulouse Midi-Pyrénées. Les gènes se situant dans le bruit de fond ont été éliminés, ce qui a permis de sélectionner environ 15000 gènes. Les données ont ensuite été normalisées (*lowess*), puis converties en échelle logarithmique ( $\log_2$ ) et une correction du bruit de fond a été effectuée sur les lames (*background correction*). L'homogénéité des lames intra-lignées a été vérifiée, ce qui a conduit à appliquer un poids différent pour chaque lame (pondération). L'expression des gènes a ensuite été vérifiée entre le groupe des lignées RR *vs* RS.

Un gène était considéré comme sur- ou sous-exprimé si la confiance de prédiction FDR (*False Discovery Rate*) était inférieure à 5% ( $FDR < 5\%$ ) et si la différence du  $\log_2$  de son expression ( $\log_2 A - \log_2 B$ ) était différente de zéro (A est l'expression du gène dans une lignée RR et B celle dans une lignée RS). Ces conditions devaient être respectées à chaque fois pour les conditions suivantes : U87 vs U251, U87 vs SF767, SF763 vs U251 et SF763 vs SF767.

En fixant un FDR moins astringent ( $FDR < 20\%$ ), P. Martin s'est intéressé à la probabilité (seuil :  $p < 0,01$ ) de retrouver des gènes sur- ou sous-exprimés dans un groupe GO (*Gene Ontology*) donné. Cette approche avait pour but de rechercher l'enrichissement de catégorie GO dans les gènes différentiels entre RR et RS. Enfin, une dernière approche PGSEA (*Parametric Gene Set Enrichment Analysis*) (Kim & Volsky, 2005) a consisté à considérer la sur- ou sous-expression d'un ensemble de gènes appartenant à un groupe GO donné.

### III.1.5.2. Etude par qRT-PCR

L'étude de l'expression de certains transcrits par RT-PCR quantitative en temps réel (*Real Time quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* ou qRT-PCR) a été réalisée postérieurement à l'étude transcriptomique. Six échantillons ( $n = 6$ ) d'extraits d'ARN en une seule expérience ont été obtenus pour chacune des lignées. La qualité et la quantité des extraits d'ARN ont été vérifiées sur des puces Agilent RNA6000 LabChip® série II (Agilent Technologies, 5067-1511) à l'aide d'un Bioanalyseur 2100 Agilent (Agilent Technologies).

Pour un échantillon donné, la transcription inverse des ARN en ADNc a été effectuée pour 1  $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$  d'échantillon d'ARN dilué dans de l'eau *RNase free* (Gibco, 10977-035), en présence de 4  $\mu\text{L}$  de tampon 5X et de 1  $\mu\text{L}$  de RTase (Bio-Rad, iScript™ cDNA Synthesis Kit, 170-8890), sur un appareil GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Les conditions étaient les suivantes : 5 min à 72°C, puis 5 min à 4°C, puis 60 min à 42°C, puis 5 min à 90°C et enfin l'échantillon a été refroidi et conditionné à 4°C.

Les couples de *primers* ont été dessinés de telle sorte que leur température d'hybridation ( $T_m$ ) soit proche de 60°C. Leur efficacité a été vérifiée sur des ADNc de la lignée U87. Pour cela, 4 µL d'ADNc dilué au 1/5<sup>e</sup>, 1/10<sup>e</sup>, 1/20<sup>e</sup>, 1/40<sup>e</sup> et 1/80<sup>e</sup> (ou 4 µL d'eau *RNAse free*) ont été mis en présence de 6 µL de couple de *primers* à une concentration finale de 100, 300 ou 900 nM dans le puits. Un volume de 10 µL de *Mix* (Sigma-Aldrich, SyberGreen JumpStart™ TAQ Ready Mix™, S4438-500RXN) a été ajouté. Le *Mix* a été préalablement complété par le marqueur interne de référence ROX™ (Sigma-Aldrich, R4526) dilué au 1/50<sup>e</sup>. Chaque condition a été réalisée en duplicat sur la plaque PCR 96 puits.

Les amplifications ont été réalisées sur un appareil à PCR (Applied Biosystems, 7000) selon le programme suivant : 50°C pendant 10 s pour l'activation de l'*Uracil-DNA Glycosylase* (UNG), 95°C pendant 10 min pour l'activation de la Taq polymérase, suivi de quarante cycles de polymérisation à 60°C pendant 1 min précédés à chaque fois d'un palier à 95°C pendant 15 s. Les données ont été traitées avec le logiciel ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

Un couple de *primers* était validé si : (i) son efficacité était comprise entre 85 et 105%, (ii) la dissociation était correcte (un seul pic observé) et (iii) aucune amplification n'était observée dans l'eau.

Ainsi, les couples de *primers* du tableau 8 ont été validés puis testés sur les échantillons d'ADNc des quatre lignées cellulaires. Pour chaque puits, le protocole pour l'amplification du gène était le suivant : 6 µL de couple de *primers*, puis 10 µL de *Mix* et 4 µL d'ADNc dilué au 1/10<sup>e</sup> (ou 4 µL d'eau *RNAse free*). Les conditions d'amplification étaient les mêmes que celles décrites précédemment. Deux gènes de référence ont été par ailleurs utilisés lors de chaque expérience (Tab. 8).

**Tableau 8. Couples de primers et conditions d'utilisation**

Gènes à amplifier	GenBank Number	Couples de primers (humains)		Concentration finale (nM)
		Sens	Anti-sens	
SLC5A7	NM_021815	5'-CTTCTTCCTCAGCCACCTATG-3'	5'-GTCTGCCTCTTCTGTAGTCTTG-3'	100
SLC6A8	NM_005629	5'-CACTCTGGGCTGCCCTGTT-3'	5'-CAAAGTGGCTGTCGAGACCAAGCAGCAACA-3'	100
ChoK- $\alpha$	NM_212469	5'-TTCCACATCATGTGTCAT CAGAGG-3'	5'-GGTCACTTGGGCCAAAAGTCTATG-3'	900
ChoK- $\beta$	NM_152253	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'	900
FTMT	NM_177478	5'-GCCATCAACCGCCAGATC-3'	5'-GCCATGGACAAGTACACGTAGGA-3'	300
FTH1	NM_002032	5'-GAGGTGGCCGAATCTTCCTT-3'	5'-GCCCGCTCTCCCAGTCA-3'	100
CT- $\alpha$	NM_005017	5'-GCCCTTCTCCGGCAAGA-3'	5'-TTGTGCTGGAGAGATTGCT-3'	300
CT- $\beta$	NM_004845	5'-GGCGTCCAGCCGATTTT-3'	5'-AAAGGAACCTTCCCTCTTAC-3'	300
NFIC	NM_205843	5'-CCTTGGCGTCCCAGAGT-3'	5'-AAAAACCCACCCAAGCAAGA-3'	100
MAX	NM_197957	5'-GGCTCATCATAATGCACTGGAA-3'	5'-CGCAAAGTGTGAAAGCTGTCTT-3'	100
PHB	NM_002634	5'-TGCTGAGCCACCTGTTTGG-3'	5'-CCTGGATGACGTGTCTTGA-3'	900
<b>Références</b>				
$\beta$ 2M	NM_004048	5'-TGCTGTCTCCATGTTTGTACTCT-3'	5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'	300
$\beta$ -actine	NM_001101.3	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'	5'-CCTGTTGCTGTAGCCAAATTCG-3'	900

Le cycle seuil ou CTh (*Cycle Threshold*) de chaque gène a été déterminé lors de trois expériences distinctes, à partir du même échantillon d'extrait d'ARN. L'expression d'un gène (notée A) d'une lignée cellulaire X a été déterminée de la manière suivante (1'') :

$$A_X = 2^{-\Delta\Delta CTh} \quad (1'')$$

En considérant la lignée cellulaire U87 comme lignée contrôle et en utilisant un gène de référence ( $\beta$ 2M ou  $\beta$ -actine) cela donne (2'') :

$$\Delta\Delta CTh = \Delta CTh_X - \Delta CTh_{U87} \quad (2'')$$

Avec :  $\Delta CTh_X = CTh_{\text{gène}} - CTh_{\text{gène de référence}}$  (pour la lignée X) et

$\Delta CTh_{U87} = CTh_{\text{gène}} - CTh_{\text{gène de référence}}$  (pour la lignée U87)

La moyenne et l'écart type (SD) de l'expression de chaque gène par rapport à la lignée contrôle U87 ( $A_{U87}$  fixé à 1 pour chaque gène) ont ainsi été déterminés.



## III.2. Projet FTI-277

### III.2.1. Etude métabolomique

Cette étude visait à observer les perturbations métaboliques engendrées par un radiosensibilisant, le FTI-277 (Calbiochem, 344555), sur la lignée radorésistante U87. Après plusieurs tests, la concentration en FTI-277 de 10  $\mu\text{M}$  finale dans le milieu a été utilisée. Cette concentration est identique à ce qui a été décrit dans la littérature (Maity et al., 2000).

Par ailleurs, nous avons étudié les effets des rayonnements ionisants (2 Gy) sur les cellules, couplés ou non avec le FTI-277. Les cellules ont été irradiées à l'aide d'un irradiateur Biobeam 2000<sup>®</sup> (Bebig) utilisant le  $\text{Cs}^{137}$  comme source de rayonnements ionisants  $\gamma$  (EFS Pyrénées-Méditerranée, Purpan). Cela a conduit à considérer quatre conditions : U87 seules (témoins), U87 avec FTI (U87-FTI), U87 avec irradiation (U87-2Gy) et U87 avec FTI plus irradiation (U87-FTI/2Gy).

Pour cette étude, les cellules U87 ont étéensemencées à  $\mathbf{J}_0$  dans des boîtes  $\varnothing$  100 mm à une densité de 35000 cellules par boîte. Cinq boîtes étaient nécessaires pour constituer un échantillon. A  $\mathbf{J}_2$ , le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet pour les échantillons témoins et U87-2Gy, et par du milieu avec FTI-277 à 10  $\mu\text{M}$  pour les échantillons U87-FTI et U87-FTI/2Gy. A  $\mathbf{J}_3$ , les échantillons U87-2Gy et U87-FTI/2Gy ont été irradiés. A  $\mathbf{J}_4$ , le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet. Selon le protocole standard de récolte et d'extraction des cellules pour les études métabolomiques, les échantillons témoins, U87-FTI, U87-2Gy et U87-FTI/2Gy ont été récoltés et extraits à  $\mathbf{J}_7$ ,  $\mathbf{J}_8$ ,  $\mathbf{J}_8$ , et  $\mathbf{J}_9$  respectivement, afin de s'affranchir au maximum de l'effet de la confluence des cellules sur le profil métabolique des échantillons.

Huit échantillons ( $n = 8$ ), sur dix expériences distinctes, ont été obtenus pour les conditions U87-FTI, U87-2Gy et U87-FTI/2Gy, et neuf échantillons ( $n = 9$ ) ont été récoltés pour les échantillons témoins.

### III.2.2. Contrôle par *Western-Blot* de l'effet du FTI-277

Le protocole standard pour le contrôle par *Western-Blot* (WB) a été suivi. Les cellules U87 ont été néanmoinsensemencées à **J<sub>0</sub>** dans des boîtes ø 100 mm à une densité de 100000 cellules par boîte. A **J<sub>2</sub>**, le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet avec du FTI-277 à 0 (véhicule : DMSO à 0,2 % v/v), 0,1, 0,5, 1, 5, 10 et 20 µM. Une boîte a été suffisante pour chacune des concentrations. A **J<sub>3</sub>**, les cellules ont été récoltées. L'anticorps primaire était celui de la protéine HDJ-2 (*Homologue of DNAJ-2*), une protéine de la famille des HSP (*Heat Shock Protein*) potentiellement impliquée dans la radiorésistance des cellules de GBM (Wang et al., 2006). En tant qu'inhibiteur de farnésyltransférase, le FTI-277, un analogue du Zarnestra<sup>®</sup>, empêche la farnésylation de cette protéine.

Une quantité de 15 µg par échantillon a été déposée. L'anticorps primaire monoclonal de souris anti-HDJ-2 (Neomarkers, MS-225-P1) a été utilisé au 1/3000<sup>e</sup> et l'anticorps secondaire IgG anti-souris (Sigma-Aldrich, A9917) au 1/10000<sup>e</sup>. La dilution de l'anticorps secondaire a été effectuée extemporanément dans du TBS-T. Selon le fabricant, la protéine apparaît sur la membrane à un poids d'environ 45 kDa.

### III.3. Projet Y

Pour ce projet, seule l'étude métabolomique de l'effet d'un composé Y sur les cellules radiorésistantes U87 a été réalisée. Cet agent est un radiosensibilisateur potentiel développé par un laboratoire pharmaceutique.

Pour cette étude, le schéma expérimental est identique à celui décrit pour le projet FTI-277. Après plusieurs tests, une concentration finale en composé de 1 µM dans le milieu a été utilisée et la dose d'irradiation des cellules a été fixée à 2 Gy. Cela a conduit à considérer quatre conditions : U87 seules (témoins), U87 avec Y (U87-Y), U87 avec irradiation (U87-2Gy) et U87 avec Y et avec irradiation (U87-Y/2Gy). Les cellules U87 ont étéensemencées à **J<sub>0</sub>** dans des boîtes ø 100 mm à une densité de 35000 cellules par boîte. Huit boîtes ont été utilisées pour constituer un échantillon pour chacune des conditions. A **J<sub>2</sub>**, le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet pour les échantillons témoins et U87-2Gy, et par du milieu avec Y à 1 µM pour les échantillons U87-Y et U87-Y/2Gy. A **J<sub>3</sub>**, les échantillons U87-2Gy et U87-Y/2Gy ont été irradiés. A **J<sub>4</sub>**, le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet.

Le protocole standard de récolte et d'extraction des cellules pour les études métabolomiques a été appliqué, hormis le fait que tous les échantillons ont été récoltés à **J<sub>7</sub>**.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  ont été enregistrés avec les paramètres d'acquisition suivants : TD = 64 K, NS = 128, SW = 6394 Hz, P1 = 4,56  $\mu\text{s}$  (30° d'impulsion), AQ = 5,12 s, SI = 256 K et D1 = 2 s. Avant toute analyse statistique et pour un individu (échantillon) donné, les valeurs de ses variables ont été normalisées en les divisant par la somme de toutes ses variables.

Quatre échantillons (n = 4) ont été obtenus pour la condition U87-Y/2Gy, cinq échantillons (n = 5) pour les conditions U87-Y et U87-2Gy et huit échantillons (n = 8) pour les témoins. Les échantillons ont été récoltés sur six expériences distinctes.

### III.4. Projet URB14

#### III.4.1. Etude métabolomique

Cette étude visait à observer les perturbations métaboliques engendrées par l'inhibition de la protéine RhoB par l'expression d'un dominant négatif RhoBN19, sur la lignée cellulaire URB14, avec ou sans irradiation. L'expression de RhoBN19 est inductible à la dexaméthasone (Dex) à 25 nM dans le milieu. Nous nous permettrons par la suite décrire abusivement que l'induction par la Dex entraîne l'inhibition de RhoB.

Dans un premier temps, l'étude a été menée sur les deux lignées URB14 et U87, la dernière servant de lignée contrôle. Cependant, les cellules URB14 ont une croissance plus rapide que les cellules U87 et leur profil métabolique est différent. Sur les quelques échantillons de cellules U87 récoltés, nous n'avons pas observé de grande variation métabolique, et encore moins d'influence sur la croissance des cellules. C'est la raison pour laquelle l'étude de l'influence de la Dex sur la lignée U87 n'a pas été poursuivie et reste incomplète.

Deux plans expérimentaux ont été adoptés. Le **plan expérimental A sur trois jours** consistait à observer les perturbations métaboliques engendrées par l'inhibition de RhoB induite **24 h** avant l'irradiation. Le **plan expérimental B sur quatre jours** consistait à observer les perturbations métaboliques occasionnées par l'inhibition de RhoB induite **48 h** avant l'irradiation. Le plan B a été mis au point compte tenu du fait que l'inhibition de RhoB est censée être optimale 48 h après le début du traitement. Dans les deux plans, la récolte des cellules s'est effectuée 24 h après l'irradiation, à 60 % de confluence.

### III.4.1.1. Plan expérimental A sur trois jours

Six conditions ont été considérées pour le plan expérimental A : URB14 et U87 sans traitement et sans irradiation (**14-** et **87-**), URB14 et U87 avec Dex (**14+** et **87+**), URB14 avec irradiation (**14-/2**) et URB14 avec Dex et avec irradiation (**14+/2**). Les cellules URB14 et U87 ont étéensemencées à **J<sub>0</sub>** dans des boîtes  $\varnothing$  100 mm à une densité de 200000 cellules par boîte. Cinq boîtes étaient nécessaires pour constituer un échantillon.

A **J<sub>1</sub>**, le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet pour la moitié d'entre elles (boîtes pour les conditions 14- et 14-/2) et par du milieu avec de la Dex pour l'autre moitié (boîtes pour les conditions 14+ et 14+/2). A **J<sub>2</sub>**, les boîtes destinées aux conditions 14-/2 et 14+/2 ont été irradiées à une dose de 2 Gy. A **J<sub>3</sub>**, le protocole standard pour les études métabolomiques a été suivi.

Treize échantillons (n = 13), sur huit expériences distinctes, ont été obtenus pour les conditions 14-, 14+ et 14+/2, douze échantillons (n = 12) pour la condition 14-/2, quatre (n = 4) pour la condition 87- et trois (n = 3) pour la condition 87+.

### III.4.1.2. Plan expérimental B sur quatre jours

Pour le plan expérimental B, nous avons considéré deux conditions seulement : URB14 avec irradiation (**14-/2bis**) et URB14 avec Dex plus irradiation (**14+/2bis**). Les cellules URB14 ont étéensemencées à **J<sub>0</sub>** dans des boîtes  $\varnothing$  100 mm à une densité de 100000 cellules par boîte. Cinq boîtes étaient nécessaires pour constituer un échantillon.

A **J<sub>1</sub>**, le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet pour la moitié d'entre elles (boîtes pour la condition 14-/2bis) et par du milieu avec de la Dex pour l'autre moitié (boîtes pour la condition 14+/2bis). A **J<sub>3</sub>**, toutes les boîtes ont été irradiées à une dose de 2 Gy. A **J<sub>4</sub>**, le protocole standard pour les études métabolomiques a été suivi.

Six échantillons (n = 6), sur deux expériences distinctes, ont été obtenus pour chacune des conditions.

### III.4.2. Etude lipidomique

Pour cette étude, seul le plan expérimental A présenté précédemment a été adopté. Deux boîtes ø 100 mm ont été nécessaires pour constituer un échantillon. Seuls les Cer/SMe et les PL ont été analysés. Le protocole standard pour les études lipidomiques a été appliqué, avec 1,5 mL de MeOH/solution aqueuse d'EGTA à 5 mM (2:1) pour le broyage des culots cellulaires.

Trois échantillons (n = 3) ont été obtenus pour chacune des conditions en une seule expérience.

### III.4.3. Etude de la mort cellulaire par cytométrie en flux

L'étude par cytométrie en flux ou FACS (*Fluorated-Activated Cell Sorting*) consistait à évaluer la mort cellulaire radio-induite et celle induite par l'inhibition de RhoB. Deux types de morts cellulaires ont été considérées : la mort cellulaire apoptotique et la mort cellulaire par nécrose.

Les conditions d'ensemencement, de traitement à la Dex et d'irradiation décrits précédemment pour les deux plans expérimentaux A et B ont été appliquées pour cette étude. Seuls les protocoles de récolte, de marquage des cellules et d'analyse des cellules sont différents.

En ce qui concerne le plan expérimental B, les conditions suivantes ont été ajoutées : URB14 sans traitement et sans irradiation (**14-bis**), URB14 avec Dex et sans irradiation (**14+bis**). Cela a conduit à considérer huit conditions, avec une boîte de cellules par condition. Chaque condition a été réalisée en triplicat, ce qui a permis d'établir des moyennes avec SD. Pour chaque plan expérimental, l'étude a été réalisée sur une seule expérience. La reproductibilité des résultats n'a donc pas été validée. Deux échantillons contrôles ont été préparés. Ces deux échantillons ont été déprivés en SVF pendant 48 h avant la récolte et n'ont subi ni traitement, ni irradiation.

Pour un échantillon donné, le milieu de culture a été récupéré et conservé. Le tapis cellulaire a ensuite été lavé avec 8 mL de PBS puis décollé avec 500 µL (30 s) de trypsine-EDTA. Les cellules ont été récoltées avec 6 mL de milieu complet et ajoutées au milieu de culture précédemment récupéré. Les cellules ont été centrifugées (311 x g, 5 min) puis le surnageant a été éliminé.

Le culot cellulaire a été re-suspendu délicatement dans 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Un volume de 200  $\mu\text{L}$  a ensuite été déposé dans un puits sur une plaque 96 puits à fond plat. Les cellules ont été centrifugées (311 x g, 20°C, 5 min) et le surnageant a été éliminé.

Pour un ensemble d'échantillons, le marquage des cellules apoptotiques et nécrotiques a été réalisé par re-suspension des cellules de chaque échantillon dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon de fixation à 4°C, pendant 30 min et à l'abri de la lumière. Ce tampon était constitué d'Hepes à 0,01 M et à pH = 7,4, de NaCl à 0,14 M et de CaCl<sub>2</sub> à 2,5 mM. Par ailleurs, 1/100<sup>e</sup> (v/v) d'annexine-FITC (BD Pharmingen, 556419) et 1/50<sup>e</sup> d'iodure de propidium (IP) (BD Pharmingen, 556463) étaient présents dans le tampon. Le premier échantillon contrôle a été marqué à l'annexine-FITC seule et l'autre à l'IP seul. Ces deux échantillons contrôles ont permis le réglage de l'appareil.

Les cellules de chaque échantillon ont été centrifugées (311 x g, 10°C, 5 min) puis lavées à deux reprises avec 100  $\mu\text{L}$  de tampon de fixation seul. A l'issue des lavages, les cellules ont été re-suspendues dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon de fixation seul puis transférées dans des tubes de comptage.

Les cellules ont été analysées sur un cytomètre de flux (BD FACScan<sup>®</sup>). Les analyses ont été effectuées sur 10000 cellules par échantillon. Les données ont été acquises *via* le logiciel CellQuestpro (BD Biosciences<sup>®</sup>) et traitées à l'aide du logiciel libre WinMDI 2.9.

#### **III.4.4. Vérification par WB de l'induction de RhoBN19**

La vérification de l'inhibition de la protéine RhoB, ou plus exactement l'induction de la forme dominante négative RhoBN19, a été vérifiée par WB. Malheureusement, aucun résultat en WB n'a été convaincant. Le protocole standard pour le contrôle par WB a été appliqué. L'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-RhoB (Santa Cruz Biotechnology, 119 : SC-180) a été utilisé au 1/3000<sup>e</sup> et l'anticorps secondaire IgG anti-lapin (Sigma-Aldrich, A6154) au 1/10000<sup>e</sup>. La dilution de l'anticorps secondaire a été effectuée extemporanément dans du TBS-T. Selon le fabricant, la protéine apparaît sur la membrane à un poids d'environ 25 kDa.

## III.5. Projet KILK2

### III.5.1. Etude métabolomique

L'étude visait à observer les perturbations métaboliques occasionnées par l'inhibition de la transcription de la protéine ILK dans la lignée cellulaire KILK2, avec ou sans irradiation. Cette inhibition est inductible à la doxycycline (Dox) à la concentration finale de 1 µg/mL (soit 2,25 µM) dans le milieu. Pour cette étude, la lignée T2K a servi de lignée contrôle.

Un seul plan expérimental a été adopté. Nous avons considéré quatre conditions pour la lignée KILK2 : KILK2 sans traitement et sans irradiation (**K-**), KILK2 avec Dox (**K+**), KILK2 avec irradiation (**K-/2**) et KILK2 avec Dox plus irradiation (**K+/2**) ; et quatre conditions pour la lignée T2K : T2K sans traitement et sans irradiation (**T-**), T2K avec Dox (**T+**), T2K avec irradiation (**T-/2**) et T2K avec Dox plus irradiation (**T+/2**).

Les cellules KILK2 et T2K ont étéensemencées à **J<sub>0</sub>** dans des boîtes ø 100 mm à une densité de 300000 cellules par boîte. Cinq boîtes étaient nécessaires pour constituer un échantillon. A **J<sub>1</sub>**, le milieu de toutes les boîtes a été retiré et remplacé par du milieu complet pour la moitié d'entre elles (boîtes pour les conditions sans Dox) et par du milieu avec de la Dox pour l'autre moitié (boîtes pour les conditions avec Dox). A **J<sub>2</sub>**, les boîtes destinées aux conditions avec irradiation ont été irradiées à une dose de 2 Gy. A **J<sub>3</sub>**, le protocole standard pour les études métabolomiques a été suivi.

Neuf échantillons (n = 9) ont été obtenus pour la condition **K+**. Dix échantillons (n = 10) ont été obtenus pour chacune des conditions suivantes : **K-**, **T-**, **T-/2** et **T+/2**. Onze échantillons (n = 11) ont été obtenus pour les conditions **K-/2**, **K+/2** et **T+**.

### **III.5.2. Vérification par WB de l'inhibition d'ILK**

L'inhibition de la transcription de la protéine ILK a été vérifiée par WB sur plusieurs échantillons et pour chacune des conditions décrites précédemment.

Le protocole standard pour le contrôle par WB a été appliqué. L'anticorps primaire monoclonal de souris anti-ILK (Sigma-Aldrich, I0783) a été utilisé au 1/1000<sup>e</sup> et l'anticorps secondaire IgG anti-souris (Sigma-Aldrich, A4416) au 1/10000<sup>e</sup>.

La dilution de l'anticorps secondaire a été effectuée extemporanément dans du TBS-T. Selon le fabricant, la protéine apparaît sur la membrane à un poids moléculaire d'environ 59 kDa.

L'intensité de la bande a été normalisée par rapport à celle de la  $\beta$ -actine. Pour cela, après avoir révélé la bande d'ILK, l'anticorps primaire monoclonal de souris anti- $\beta$ -actine (Sigma-Aldrich, A5441) a été dilué au 1/10000<sup>e</sup> et mis en présence de la membrane pendant 1 h. La membrane a ensuite été lavée cinq fois au TBS-T pendant 30 min puis mise en présence d'un anticorps secondaire IgG anti-souris (Sigma-Aldrich, A4416) au 1/10000<sup>e</sup> pendant 30 min.

La membrane a ensuite été lavée cinq fois au TBS-T pendant 30 min, mise en présence de réactif de luminescence (5 min) et enfin révélée.



***Chapitre III - Partie I :***  
***Recherche de biomarqueurs***  
***de radiorésistance dans quatre***  
***lignées cellulaires humaines***  
***de GBM (projet RR vs RS).***

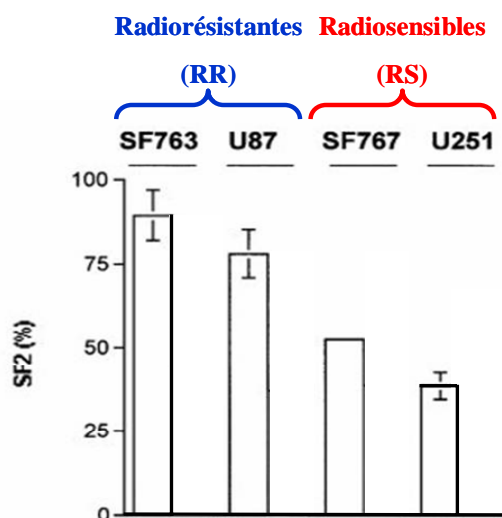
## I. Présentation du projet RR vs RS

Ce projet avait pour but d'identifier des biomarqueurs prédictifs de radiorésistance dans des modèles cellulaires humains de GBM, puis dans des biopsies de GBM humains. Seules les études sur les modèles cellulaires ont été réalisées.

Les études se sont focalisées sur le métabolome, le lipidome et le transcriptome des quatre lignées de GBM : U87, U251, SF767 et SF763.

Les premiers résultats en métabolomique nous ont par ailleurs encouragé à nous focaliser sur le métabolisme des PtdCho, en mettant au point une méthode d'analyse des flux métaboliques des composés à choline, par marquage deutéré.

D'après les chercheurs de l'ICR avec qui nous avons collaboré, les quatre lignées présentaient chacune une réponse aux RI différente (Delmas et al., 2002). Nous sommes ainsi partis du postulat que les deux lignées **SF763** et **U87** étaient **radiorésistantes (RR)**, alors que les deux lignées **SF767** et **U251**, plus sensibles aux RI, étaient **radiosensibles (RS)** (Fig. 29).



**Figure 29. Réponse des quatre lignées cellulaires de GBM aux RI (Delmas et al., 2002).**

*Abréviations : RR, radiorésistant(es) ; RS, radiosensible(s) ; SF2, fraction de survie d'une lignée cellulaire après une irradiation de 2 Gy.*

Chaque modèle cellulaire a été considéré de manière individuelle. Néanmoins, au cours des études menées pour ce projet RR vs RS, les deux lignées radiorésistantes (SF763 et U87) ont été comparées aux deux lignées radiosensibles (SF767 et U251) afin de caractériser des biomarqueurs discriminant les deux groupes.

## II. Résultats

### II.1. Etude métabolomique

#### II.1.1. Attributions spectrales et *bucketing*

Nous avons dans un premier temps attribué le maximum de signaux sur les spectres RMN  $^1\text{H}$ . Après avoir défini la taille des *buckets* d'intérêt et leur nombre, nous avons obtenu 45 variables. La figure 30 montre le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'extrait hydrosoluble d'un échantillon de la lignée U251 et l'attribution des variables (var.) considérées.

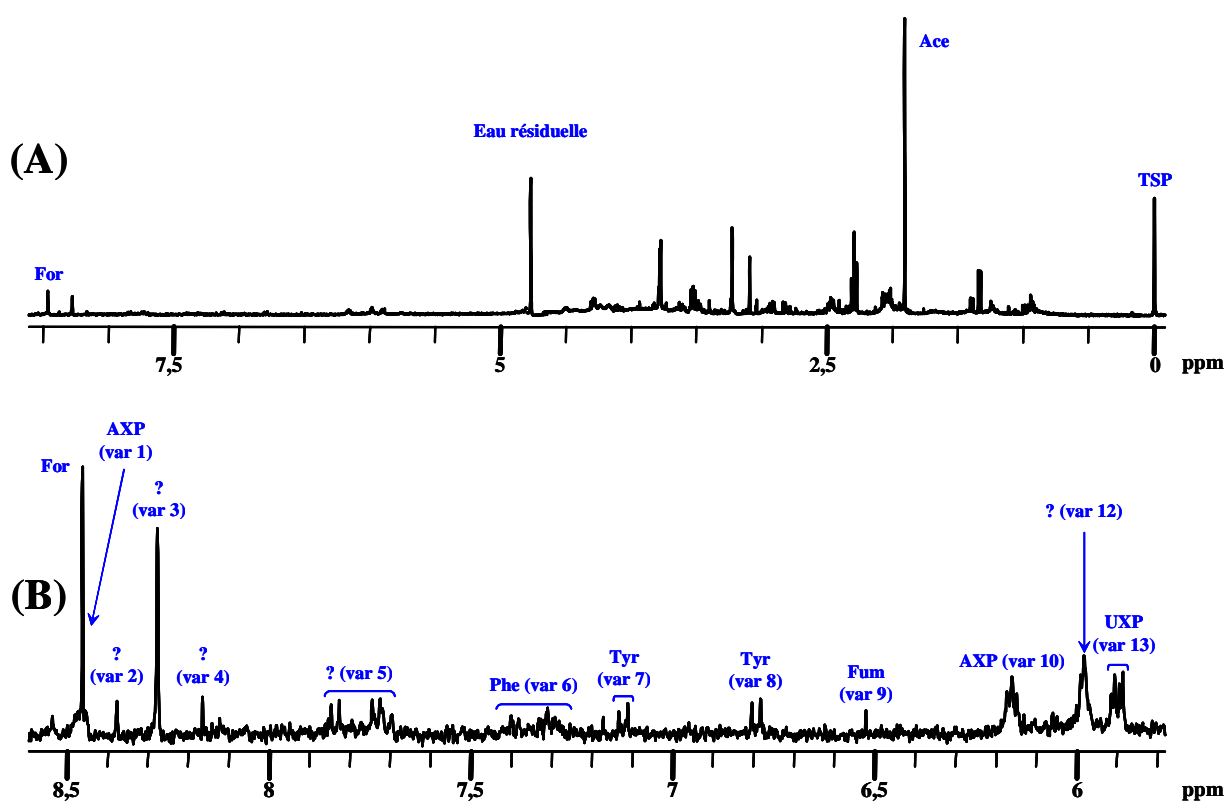
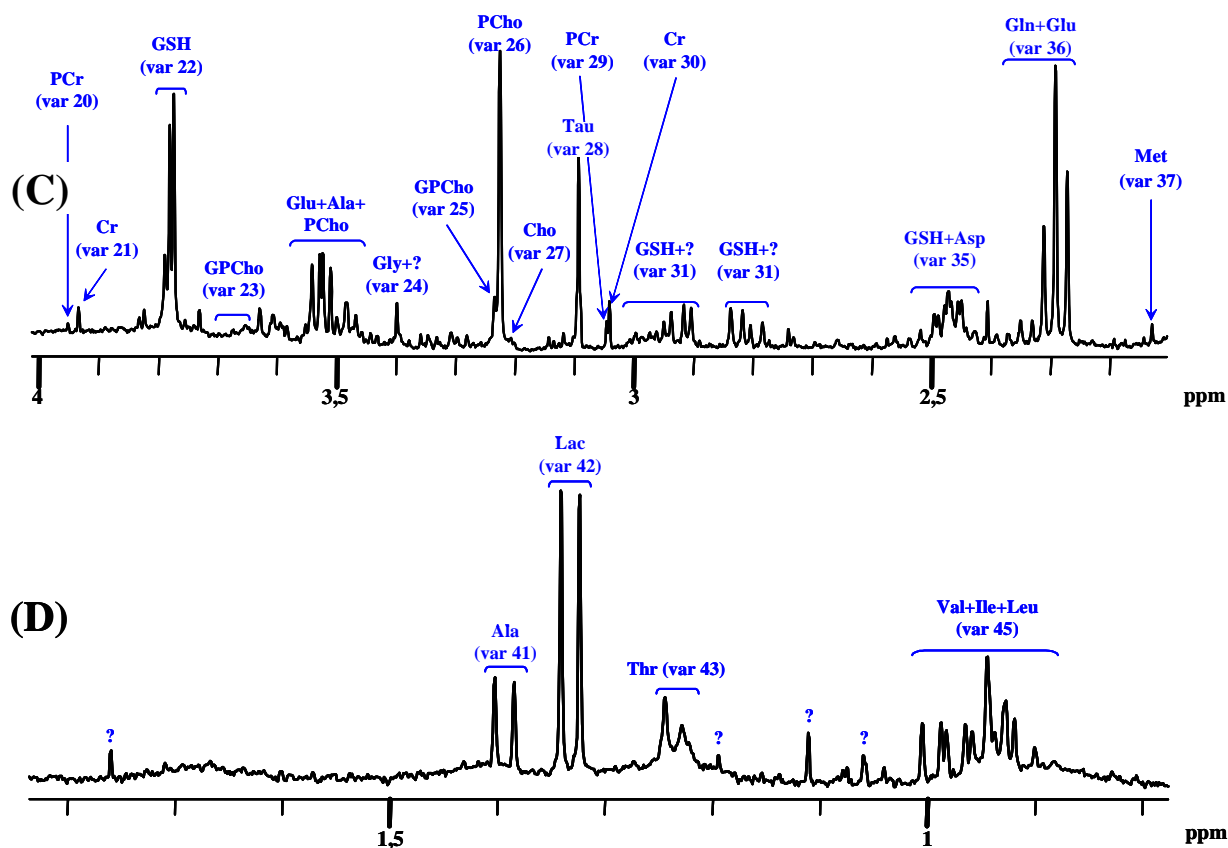


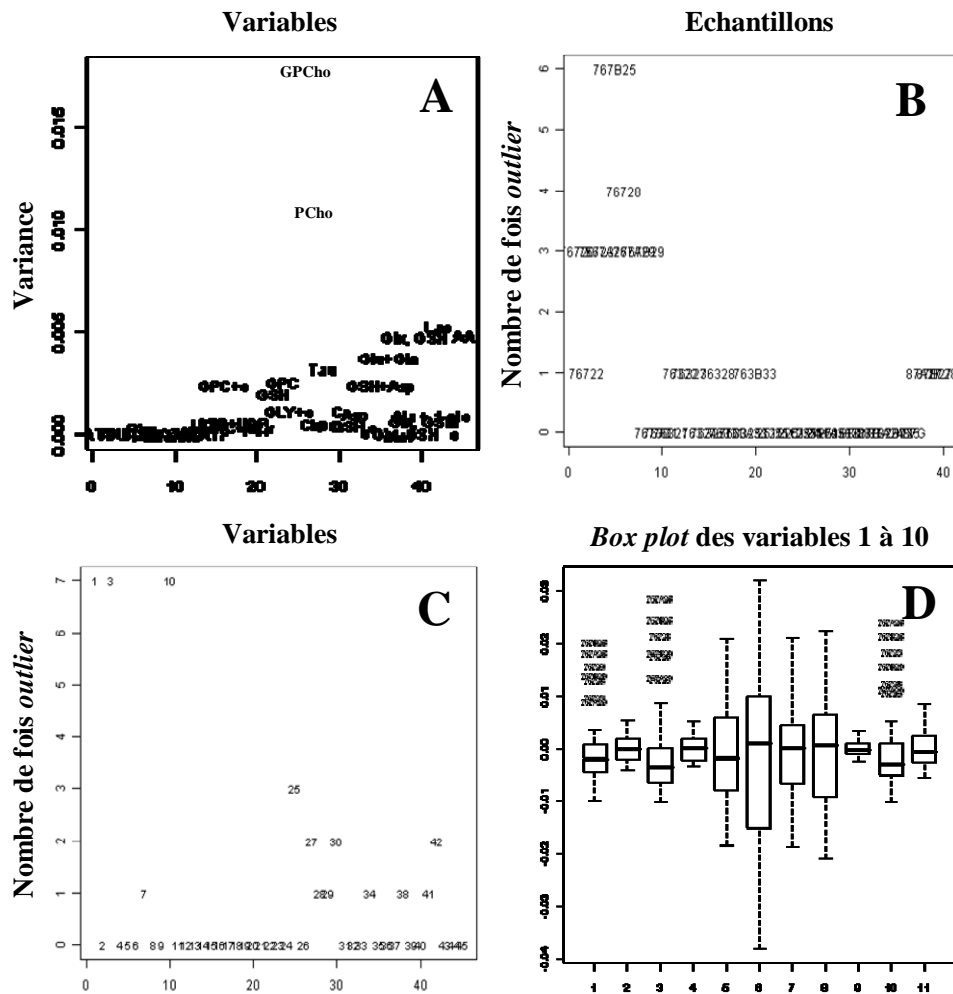
Figure 30. Attributions spectrales et définition des variables d'intérêt sur un spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'extrait hydrosoluble d'un échantillon de la lignée U251 : (A) spectre total ; (B) étalement de la région aromatique. Abréviations : var, variable.



**Figure 30. (Suite) Attributions spectrales et définition des variables d'intérêt sur un spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'extrait hydrosoluble d'un échantillon de la lignée U251 : (C) étalement de la région aliphatique ; (D) étalement de la région des groupements méthyles.**

### II.1.2. Analyses univariée et multivariée non supervisées

L'analyse univariée non supervisée des 40 individus (ou échantillons), 10 individus par lignée, a montré que les variables 25 (GPCho) et 26 (PCho) possédaient une grande variance (Fig. 31A). De plus, les individus 767B25 et 76728 ont été considérés *outliers* six et quatre fois sur quarante-cinq variables respectivement (13% et 9%, Fig. 31B), sans pour autant sortir de la sphère de confiance en ACP-Class. Les deux individus ont donc été conservés pour la suite des analyses. Les variables 1 et 10 (AXP) et 3 (?) ont été considérées avec attention (Fig. 31C). En effet, sept individus sur quarante (17%) ont été considérés comme *outliers* pour ces variables (Fig. 31D). Néanmoins, les sept individus appartiennent au groupe de la lignée SF767. Ceci suggère que les fortes valeurs de ces variables seraient une caractéristique propre à cette lignée.



**Figure 31. Résultats en analyse univariée non supervisée : (A) Variance de chacune des variables ; (B) Nombre de fois qu'un échantillon est considéré comme *outlier* ; (C) Nombre de fois qu'une variable est considérée comme *outlier* ; (D) *Box plot* des variables 1 à 10.**

L'analyse multivariée non supervisée (ACP) sans UV des 40 individus a révélé une bonne séparation des lignées RR, par rapport aux lignées RS, selon leur profil métabolique (Fig. 32A). Sur le *loading plot* représentant les deux axes principaux de l'ACP, il n'est pas possible de distinguer les deux lignées RS (Fig. 32B). En revanche, la lignée SF763 se distingue principalement des deux lignées RS par une variance de la var. 2 (PCho) plus importante selon l'axe 2, tandis que la lignée U87 possède une forte variance de la var. 25 (GPCho) selon l'axe 1. Dans une moindre mesure, d'autres variables contribuent à la bonne séparation des groupes RR et RS : Glu+Gln (var. 36), Glu+Gln+GSH (var. 39), Val+Ile+Leu (var. 45) et Tau (var. 28) notamment.



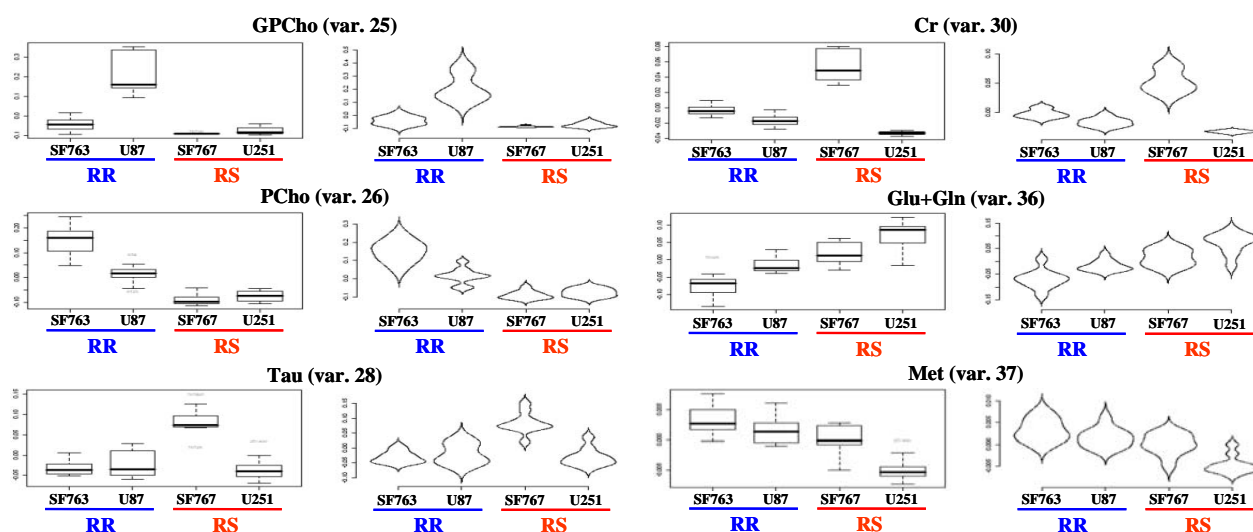


Figure 33. Box plots et violin plots des variables les plus discriminantes entre les quatre lignées.

Tableau 9. Métabolites significativement discriminants inter-lignées (*p-values* obtenues par le test de Welch) et pourcentages de variation ( $\pm$  SD).

	SF767 (RS)	SF763 (RR)	U87 (RR)
U251 (RS)		UXP ( $5,6 \cdot 10^{-6}$ ; $-44 \pm 8\%$ ) <b>PCho (<math>1,3 \cdot 10^{-7}</math>; <math>+67 \pm 18\%</math>)</b> <sup>a</sup> PCr ( $1,0 \cdot 10^{-6}$ ; $+51 \pm 17\%$ ) Cr ( $7,3 \cdot 10^{-8}$ ; $+62 \pm 12\%$ ) Glu+Gln ( $2,8 \cdot 10^{-7}$ ; $-40 \pm 6\%$ ) Met ( $8,3 \cdot 10^{-7}$ ; $+37 \pm 8\%$ ) Val+Ile+Leu ( $9,5 \cdot 10^{-9}$ ; $+44 \pm 9\%$ )	GPCho ( $5,7 \cdot 10^{-9}$ ; $+680 \pm 367\%$ ) <b>PCho (<math>4,3 \cdot 10^{-7}</math>; <math>+82 \pm 24\%</math>)</b> Cr ( $3,5 \cdot 10^{-11}$ ; $+85 \pm 22\%$ ) Met ( $5,1 \cdot 10^{-6}$ ; $+46 \pm 9\%$ )
SF767 (RS)		<b>PCho (<math>7,4 \cdot 10^{-8}</math>; <math>+71 \pm 20\%</math>)</b> Tau ( $3,4 \cdot 10^{-7}$ ; $-82 \pm 16\%$ ) Cr ( $2,3 \cdot 10^{-8}$ ; $-113 \pm 26\%$ )	GPCho ( $6,6 \cdot 10^{-4}$ ; $+1000 \pm 363\%$ ) <b>PCho (<math>9,9 \cdot 10^{-6}</math>; <math>+108 \pm 34\%</math>)</b> Tau ( $2,9 \cdot 10^{-6}$ ; $-41 \pm 11\%$ ) Cr ( $1,8 \cdot 10^{-7}$ ; $-67 \pm 19\%$ )
SF763 (RR)			UXP ( $2,6 \cdot 10^{-7}$ ; $-60 \pm 14\%$ ) GSH ( $5,6 \cdot 10^{-6}$ ; $+20 \pm 3\%$ ) GPCho ( $7,3 \cdot 10^{-8}$ ; $+330 \pm 181\%$ ) Cr ( $3,7 \cdot 10^{-4}$ ; $-21 \pm 4\%$ ) Val+Ile+Leu ( $2,6 \cdot 10^{-6}$ ; $+30 \pm 4\%$ )

NB : Les variations métaboliques sont calculées en comparant la lignée à l'entrée verticale du tableau, par rapport à la lignée à l'entrée horizontale.

<sup>a</sup> variable n°29

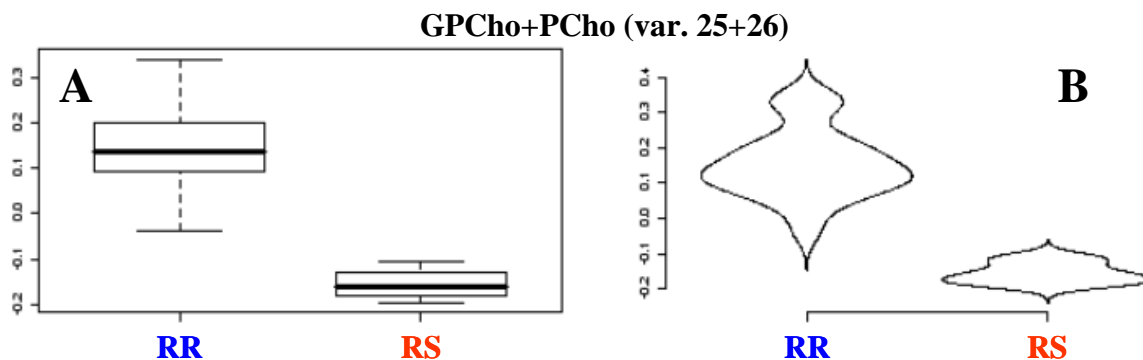
### II.1.4. Analyses supervisées RR vs RS

Pour les analyses supervisées des groupes RR vs RS, nous avons considéré les individus RR d'un côté et les RS de l'autre. Autrement dit, à l'intérieur du groupe des RR, aucune distinction n'a été faite entre les lignées SF763 et U87. Il en a été de même concernant le groupe des RS : aucune distinction entre les lignées SF767 et U251. Par ailleurs, nous avons considéré la somme des variables 25+26 (GPCho+PCho), ce qui a permis d'obtenir une meilleure discrimination des deux groupes.

Une analyse univariée supervisée a confirmé la pertinence de considérer la variable GPCho+PCho, avec une bonne distribution et séparation des valeurs des variables dans les *box plots* et *violin plots* (Fig. 34). La valeur de la *p-value* obtenue est de  $3.10^{-12}$  et le pourcentage de variations (RR par rapport aux RS) de  $69 \pm 21\%$ .

Le modèle obtenu par analyse multivariée supervisée en UV PLS-DA est prédictif : cinq axes ( $A = 5$ ),  $R^2X = 0,802$ ,  $R^2Y = 0,978$ ,  $Q^2 = 0,933$  et  $CV\text{-ANOVA} = 9,73.10^{-13}$ . Il permet une bonne discrimination des groupes RR et RS (Fig. 35A). Les *loading* et *VIP (Variable Importance Projection) plots* (Figs. 35B et 35C) confirment que la variable GPCho+PCho contribue fortement à la création du modèle, ainsi que, dans une moindre mesure, les variables 36 (Glu+Gln), 39 (Glu+Gln+GSH) et 37 (Met) notamment. Enfin, le *coefficient plot* montre les variables significativement plus importantes dans les RR ou les RS (Fig. 35D).

Ainsi, nous montrons que la variable GPCho+PCho est significativement plus importante dans les RR et constitue un bon indice prédictif de lignées de GBM radio-résistantes, par rapport à des lignées radiosensibles.



**Figure 34.** *Box plot* et *violin plot* de la variable GPCho+PCho (var. 25+26) dans les groupes RR et RS.



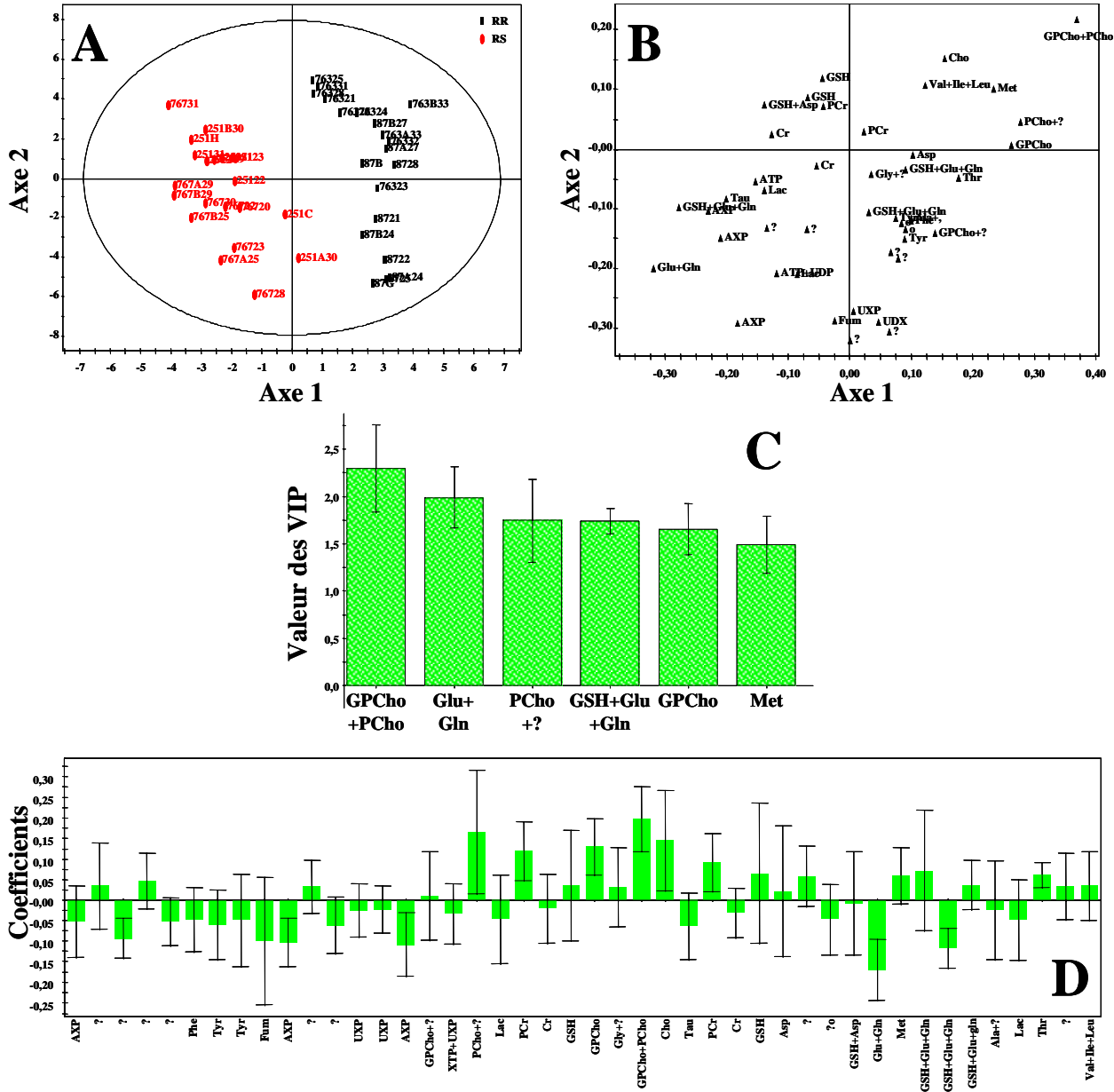


Figure 35. Résultat du modèle RR vs RS obtenu par PLS-DA avec UV : (A) Score plot, (B) Loading plot, (C) VIP plot et (D) Coefficient plot.

### II.1.5. Quantification absolue des composés à choline

La quantification absolue des composés à choline hydrosolubles a été réalisée afin d'avoir une idée précise de la quantité de ces composés dans les cellules. Il s'agit en quelque sorte de *metabolic targeting* sur trois composés : Cho, PCho et GPCho. La somme des composés PCho plus GPCho (PCho + GPCho) a également été considérée (Fig. 36 et Tab. 10). Les valeurs sont exprimées en nmol/million de cellules, le dosage des protéines n'ayant pas été réalisé pour cette étude.

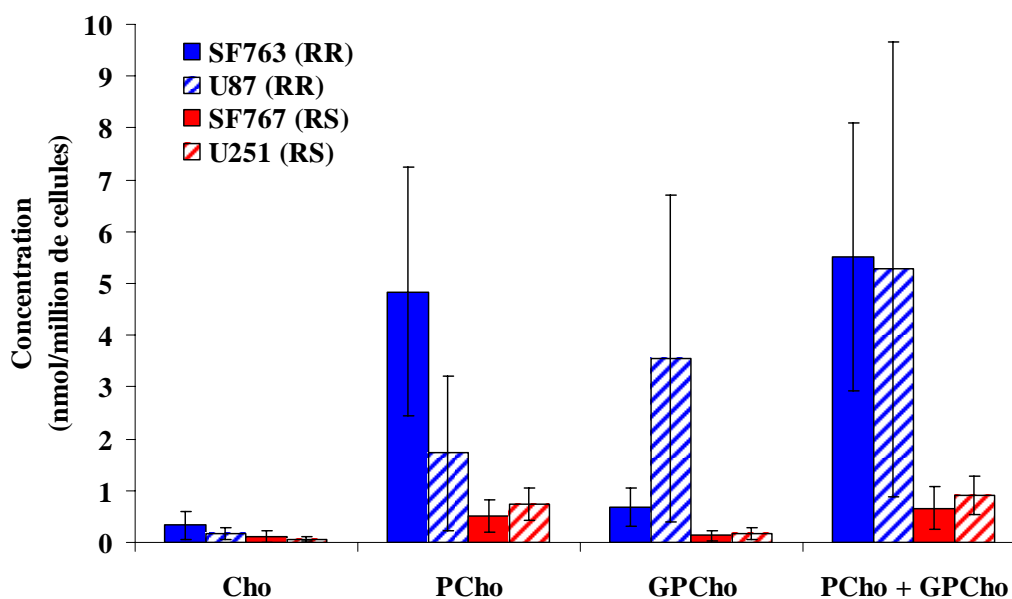


Figure 36. Concentrations absolues (en nmol/million de cellules) des composés à choline hydrosolubles dans les quatre lignées cellulaires.

Tableau 10. Concentrations absolues (en nmol/million de cellules) des composés à choline hydrosolubles.

Composés à choline	RR		RS	
	SF763	U87	SF767	U251
Cho	0,34 ± 0,27	0,16 ± 0,11	0,11 ± 0,12	0,06 ± 0,04
PCho	4,8 ± 2,4	1,7 ± 1,5	0,52 ± 0,31	0,74 ± 0,32
GPCho	0,67 ± 0,37	3,55 ± 3,15	0,13 ± 0,11	0,17 ± 0,11
PCho + GPCho	5,5 ± 2,6	5,3 ± 4,4	0,66 ± 0,41	0,91 ± 0,38

Le tableau croisé 11 montre les composés à choline significativement discriminants inter-lignées.

**Tableau 11. Composés à choline significativement discriminants inter-lignées (*p*-values obtenues par le test de Student).**

	<b>SF767 (RS)</b>	<b>SF763 (RR)</b>	<b>U87 (RR)</b>
<b>U251 (RS)</b>	<i>Non signalé</i>	Cho (0,003) <b>PCho (0,00002)</b> <b>GPCho (0,0004)</b> PCho + GPCho (0,00001)	Cho (0,011) <b>PCho (0,048)</b> <b>GPCho (0,002)</b> PCho + GPCho (0,004)
<b>SF767 (RS)</b>		Cho (0,02) <b>PCho (0,00002)</b> <b>GPCho (0,0004)</b> PCho + GPCho (0,00001)	<b>PCho (0,02)</b> <b>GPCho (0,003)</b> PCho + GPCho (0,004)
<b>SF763 (RR)</b>			PCho (0,003) GPCho (0,01)

### II.1.6. Interprétation

Suite à l'analyse univariée supervisée (Fig. 33 et Tab. 9), des profils métaboliques caractéristiques de chaque lignée sont observés. Ainsi, nous avons remarqué que la lignée SF767 possède des concentrations en Cr et Tau significativement supérieures par rapport aux trois autres lignées. Globalement, la lignée U251 a des concentrations en acides aminés, dont Met et Val+Ile+Leu, plus faibles que dans les autres lignées. En revanche, la concentration en Glu+Gln est plus élevée.

La lignée RR SF763 possède une concentration en GSH significativement inférieure à l'autre lignée RR, U87. En revanche, la lignée U87 possède la caractéristique d'avoir une très grande concentration en GPCho (variation > 149%), significativement différente des trois autres lignées ( $p < 10^{-4}$ ).

Les deux variables PCho et GPCho contribuent à elles seules à une grande partie de la bonne séparation des groupes RR et RS en ACP (Fig. 32). Même après normalisation (*UV scaling*), la somme de ces deux variables (var. 25+26) contribue fortement à la qualité du modèle prédictif obtenu en PLS-DA avec UV (Fig. 35). La différence de concentration en

GPCho + PCho dans les lignées RR est significativement supérieure à celle dans les lignées RS ( $p < 10^{-11}$  et pourcentage de variation =  $69 \pm 21\%$ ). Étant donné que la forte concentration en GPCho est une caractéristique propre à la lignée U87, nous allons plus particulièrement nous focaliser sur la variable **PCho**.

Néanmoins, les concentrations absolues (Fig. 36 et Tab. 10) des métabolites **PCho** et **GPCho** sont significativement supérieures ( $p < 0,05$  et  $p < 0,005$  respectivement) dans les lignées RR, comparées aux lignées RS (Tab. 11). Une plus forte concentration en GPCho est confirmée dans la lignée U87, avec toutefois une forte variance qui est principalement due à des approximations lors des comptages cellulaires.

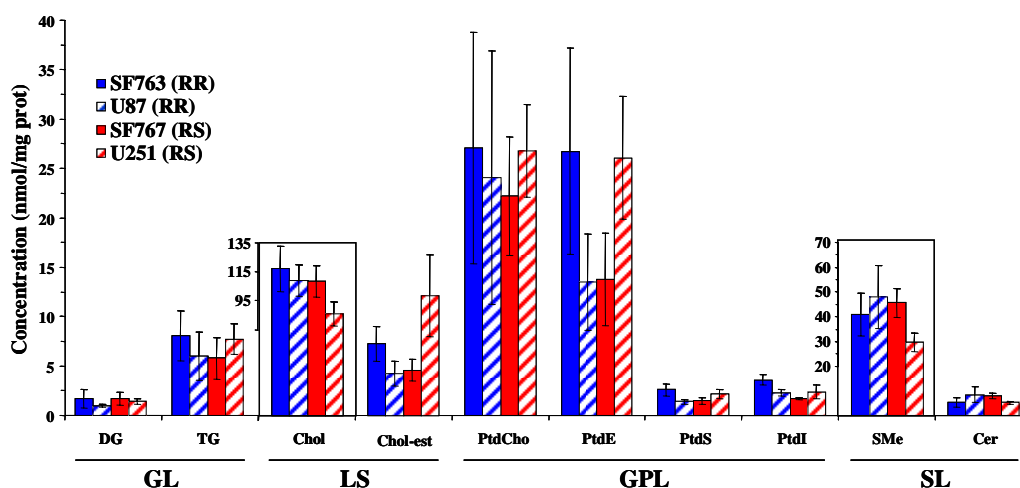
Parmi les 45 variables étudiées, seule la variable **PCho** (variable n°26) est significativement supérieure dans chacune des deux lignées RR (variation  $> 49\%$ ) par rapport à chacune des deux lignées RS (Fig. 33 et Tab. 9). Ceci confirme la valeur de son coefficient observée dans le *coefficient plot* (Fig. 35E) et son implication dans la construction du modèle en UV O-PLS-DA (Fig. 35), qui est observée dans le *VIP plot* (Fig. 35E).

Même si la variance de **PCho** est très importante (Figs. 31A et 32B), cette variable reste toujours significativement discriminante ( $p < 10^{-5}$ ) lorsque sont comparées les lignées SF763 vs U251, SF763 vs SF767, U87 vs U251 et U87 vs SF767 (Tab. 10).

Selon cette étude métabolomique, la **PCho** est un marqueur prédictif de radiorésistance pour les quatre modèles cellulaires étudiés. Ce métabolite pourrait alors être considéré comme un biomarqueur de radiorésistance.

## II.2. Etude lipidomique

L'étude a consisté à doser la concentration basale de certaines familles de lipides appartenant à la classe des glycérolipides (GL), des lipides stérols (LS), des glycérophospholipides (GPL) et des sphingolipides (SL) dans les quatre lignées cellulaires étudiées pour le **projet RR vs RS**. Les résultats obtenus sont présentés en nmol/mg de protéines ( $\pm$  SD) dans la figure 37 et le tableau 12. Le tableau croisé 13 représente les familles de lipides significativement différentes inter-lignées.



**Figure 37. Concentrations (en nmol/mg de protéines) de différentes familles de lipides.**

Abréviations : Chol, cholestérol ; Chol-est, cholestérol estérifié ; Cer, céramides ; DG, diglycérides ; TG, triglycérides ; PtdCho, phosphatidylcholines ; PtdE, phosphatidyléthanolamines ; PtdI, phosphatidylinositols ; PtdS, phosphatidylsérines ; SMe, sphingomyélines.

**Tableau 12. Concentrations (en nmol/mg prot) de différentes familles de lipides.**

Classe	Famille	RR		RS	
		SF763	U87	SF767	U251
GL	DG	1,7 ± 0,9	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,7	1,4 ± 0,3
	TG	8,1 ± 2,5	6,0 ± 2,5	5,8 ± 2,1	7,7 ± 1,6
LS	Chol	116,8 ± 15,8	108,9 ± 11,0	107,9 ± 10,9	85,7 ± 8,2
	Chol-est	6,5 ± 1,6	3,8 ± 1,1	4,1 ± 1,0	10,9 ± 3,7
GPL	PtdCho	27,0 ± 11,7	24,1 ± 12,8	22,2 ± 6,0	26,8 ± 4,7
	PtdE	26,7 ± 10,4	13,5 ± 4,9	13,8 ± 4,7	26,1 ± 6,2
	PtdS	2,6 ± 0,6	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,4	2,2 ± 0,5
	PtdI	3,6 ± 0,5	2,3 ± 0,3	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,7
SL	SMe	40,8 ± 8,6	47,9 ± 12,7	45,5 ± 5,7	29,7 ± 3,8
	Cer	1,3 ± 0,5	2,1 ± 0,8	2,0 ± 0,3	1,3 ± 0,2

**Tableau 13. Familles de lipides significativement discriminantes inter-lignées (*p-values* obtenues par le test de Student).**

	SF767 (RS)	SF763 (RR)	U87 (RR)
U251 (RS)	Chol (0,004) Chol-est (0,003) PtdE (0,006) SMe (0,0004) Cer (0,0005)	Chol (0,002) Chol-est (0,02) SMe (0,02)	Chol (0,001) Chol-est (0,0005) PtdE (0,02) PtdS (0,03) SMe (0,006) Cer (0,04)
SF767 (RS)	X	Chol-est (0,02) PtdE (0,03) PtdI (0,02) Cer (0,02)	<i>Non signalé</i>
SF763 (RR)	X	X	Chol-est (0,004) PtdE (0,01) PtdS (0,02) PtdI (0,01)

Aucune famille de lipides ne discrimine les lignées RR des lignées RS. En revanche, il existe des disparités dans les concentrations lipidiques entre chaque lignée (Fig. 27, Tab. 13).

Par exemple, la lignée U251 a des concentrations en Chol et SMe significativement ( $p < 0,005$  et  $p < 0,05$  respectivement) inférieures comparées aux trois autres lignées. Cependant, sa concentration en Chol-est est significativement supérieure ( $p < 0,05$ ).

La lignée SF763 a notamment des concentrations en Chol-est, PtdE et PtdI significativement ( $p < 0,05$ ) inférieures comparées aux lignées SF767 et U87.

En revanche, les lignées U87 et SF767 ont le même profil lipidique pour les familles de lipides étudiées.

### II.3. Etude métabolomique de l'effet de l'HC-3

Cette étude avait pour but de vérifier si la concentration élevée des composés à choline dans les lignées RR était due à une forte incorporation de choline. Pour cela, nous avons mis les quatre lignées cellulaires en présence d'hémicholinium (HC-3) pendant 8 h. Ce composé est un inhibiteur des transporteurs de choline, en particulier ceux de la famille des CTL1 (Kouji et al., 2009). En revanche, il semble que ce composé n'ait pas d'effet sur les transporteurs non spécifiques de la choline, c'est-à-dire ceux de la famille des OCT (Michel et al., 2006).

Nous avons analysé par RMN  $^1\text{H}$  les perturbations métaboliques des quatre lignées traitées avec HC-3 par rapport à ces mêmes lignées non traitées (contrôles). Une attention particulière a été accordée aux composés à choline hydrosolubles.

#### II.4.1. Analyse multivariée non supervisée

Du fait du faible nombre d'individus, nous avons simplement réalisé une analyse multivariée non supervisée (ACP sans UV) sur l'ensemble des échantillons (Fig. 38). Nous retrouvons des résultats analogues à ceux obtenus avec les lignées non traitées (Fig. 32). L'HC-3 n'induirait pas de variation métabolique importante.

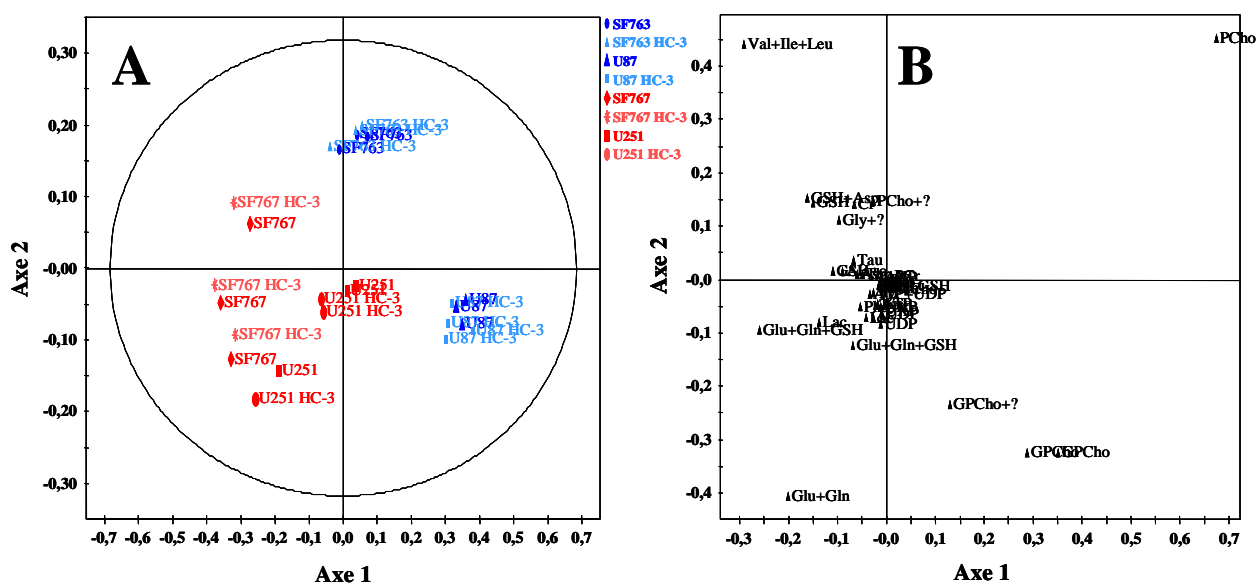


Figure 38. Résultats en ACP (sans UV) de l'effet de l'HC-3 sur les lignées RR et RS :

(A) Score plot ; (B) Loading plot.

## II.4.2. Analyse ciblée des composés à choline

Une analyse ciblée sur les composés à choline hydrosolubles (Cho, PCho et GPCho) a ensuite été réalisée. Nous avons déterminé l'aire relative des signaux de chaque composé par rapport à la somme des aires dans chaque spectre (*divided by*). Les résultats sont présentés dans la figure 39 et le tableau 18.

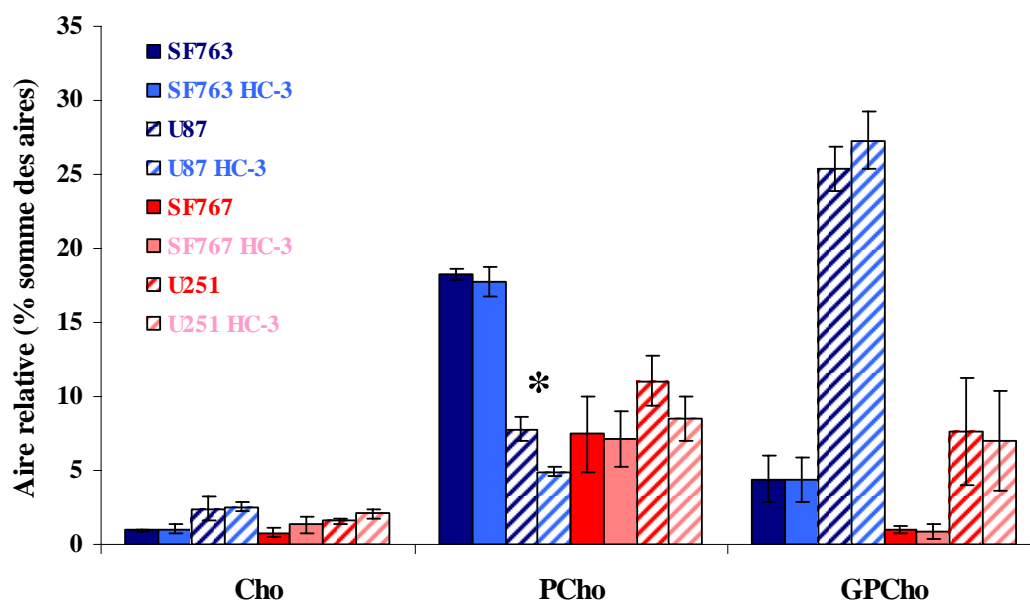


Figure 39. Aires relatives des composés à choline hydrosolubles.

Tableau 14. Aires relatives des composés à choline hydrosolubles (% de la somme des aires).

Métabolites	SF763	SF763 HC-3	U87	U87 HC-3	SF767	SF767 HC-3	U251	U251 HC-3
Cho	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,3	2,4 ± 0,8	2,5 ± 0,3	0,8 ± 0,3	1,35 ± 0,6	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3
PCho	18,3 ± 0,4	17,8 ± 1,0	* 7,8 ± 0,8	* 4,9 ± 0,3	7,4 ± 2,6	7,1 ± 1,9	11,1 ± 1,7	8,5 ± 1,5
GPCho	4,4 ± 1,6	4,4 ± 1,5	25,4 ± 1,5	27,3 ± 1,9	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,5	7,6 ± 3,6	7,0 ± 3,4

\* p < 0,05



### II.4.3. Interprétation

Les deux lignées qui semblent être affectées par le traitement à l'HC-3 sont la lignée U87 et, dans une moindre mesure, la lignée U251. En effet, le *pool* de PCho dans ces deux lignées a tendance à baisser (Fig. 39), alors que ceux de la Cho et de la GPCCho ne semblent être pas perturbés. Néanmoins, la seule différence significative ( $p < 0,05$ ) observée concerne la lignée U87 (Tab. 14). Les deux autres lignées (SF767 et SF763) ne semblent pas être affectées par le traitement à l'HC-3.

Selon les résultats de cette étude, il semblerait que ce ne soit pas une incorporation accrue de choline qui puisse expliquer les différences de concentrations en GPCCho et PCho observées entre les lignées RR et RS (Fig. 36).

Néanmoins, le protocole utilisé pour cette étude n'a pas été optimisé (nombre d'échantillons, concentration en HC-3 pour chaque lignée, temps de traitement...) et nous ne connaissons pas précisément la contribution des divers types de transporteurs de choline dans les quatre lignées étudiées.

Nous avons donc décidé de mieux caractériser le métabolisme des PtdCho en mettant au point une méthode d'analyse des flux métaboliques des composés à choline dans les quatre lignées cellulaires étudiées, par marquage à la choline deutérée (Cho-d<sub>9</sub>).

## II.4. Etude du métabolisme des PtdCho par marquage deutéré

Cette étude avait pour but de répondre à plusieurs problématiques concernant le métabolisme des PtdCho dans les quatre modèles cellulaires étudiés. Une méthode d'analyse des flux métaboliques de composés à choline a donc été mise au point, par marquage à la  $d_9$ -Cho. Dans un premier temps, nous essayions de savoir si la forte concentration des composés à choline dans les lignées RR pouvait être due à une incorporation accrue de Cho, bien que les résultats de l'étude HC-3 précédente semblent nous suggérer le contraire. Ensuite, cette méthode devait nous permettre *in situ* de mettre en évidence d'éventuelles différences d'activités enzymatiques entre les lignées.

### II.3.1. Cinétiques des composés $d_9$ -Cho

La cinétique d'incorporation de la choline deutérée ( $d_9$ -Cho), ainsi que les cinétiques de formation des composés à choline deutérée hydro- et liposolubles ont été réalisées sur huit heures et dans les quatre lignées cellulaires (régression polynomiale d'ordre 4, Fig. 40).

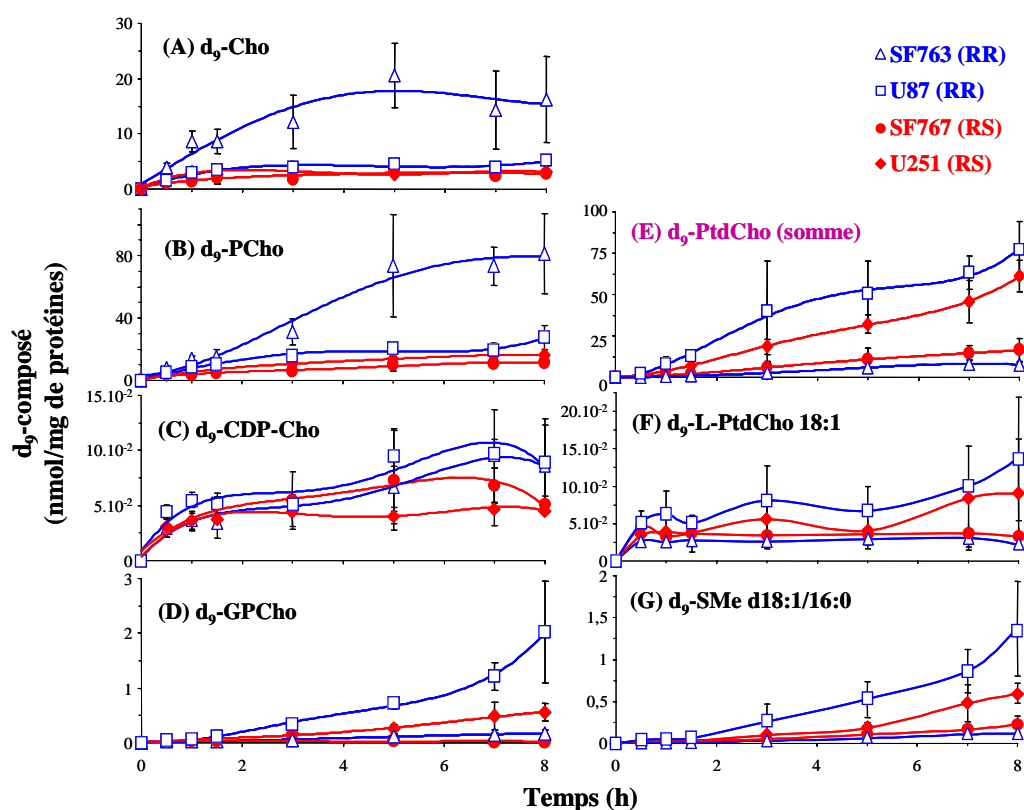


Figure 40. Cinétiques d'incorporation ou de formation des composés deutérés (nmol/mg de protéines) : (A)  $d_9$ -Cho ; (B)  $d_9$ -PCho ; (C)  $d_9$ -CDP-Cho, (D)  $d_9$ -GPCho, (E)  $d_9$ -PtdCho (somme), (F)  $d_9$ -L-PtdCho 18:1 et (G)  $d_9$ -SMe d18:1/16:0.

Les concentrations des composés d<sub>9</sub>-Cho au bout de huit heures sont représentées dans le tableau 15 ( $\pm$  SD). Le tableau croisé 16 donne les concentrations des composés d<sub>9</sub>-Cho significativement différentes inter-lignées au bout de huit heures. Dans ce dernier tableau, les d<sub>9</sub>-PtdCho ont été considérées dans leur globalité (somme des d<sub>9</sub>-PtdCho).

**Tableau 15. Concentration des composés à choline deutérés (en nmol/mg de protéines) au bout de 8 h.**

Composés à choline deutérés	Concentration (nmol/mg de protéines)			
	SF763 (RR)	U87 (RR)	SF767 (RS)	U251 (RS)
<u>Métabolites</u>				
d <sub>9</sub> -Cho	16,2 $\pm$ 7,8	5,1 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,3
d <sub>9</sub> -PCho	81,5 $\pm$ 25,6	27,6 $\pm$ 7,9	11,3 $\pm$ 1,2	16,2 $\pm$ 1,6
d <sub>9</sub> -CDP-Cho (x 10 <sup>-3</sup> )	85 $\pm$ 38	89 $\pm$ 40	51 $\pm$ 8	46 $\pm$ 1
d <sub>9</sub> -GPCho (x 10 <sup>-3</sup> )	174 $\pm$ 67	2018 $\pm$ 930	22 $\pm$ 5	562 $\pm$ 166
<u>Lipides</u>				
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/14:0 (x 10 <sup>-3</sup> )	89 $\pm$ 35	915 $\pm$ 489	64 $\pm$ 50	976 $\pm$ 470
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/16:0	0,5 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 3,1	0,7 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 1,2
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/16:1	1,1 $\pm$ 0,3	7,7 $\pm$ 2,6	1,9 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 0,9
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/18:1	2,7 $\pm$ 1,0	46,0 $\pm$ 13,6	6,9 $\pm$ 3,5	27,9 $\pm$ 4,7
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/18:2	0,4 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 1,8	1,2 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,5
d <sub>9</sub> -PtdCho 18:0/18:2	1,5 $\pm$ 0,4	12,6 $\pm$ 5,4	3,6 $\pm$ 1,4	10,0 $\pm$ 2,0
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/20:4	0,4 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 3,6	0,9 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,1
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0alk/16:0 (x 10 <sup>-3</sup> )	59 $\pm$ 29	344 $\pm$ 210	66 $\pm$ 38	249 $\pm$ 30
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0alk/18:0 (x 10 <sup>-3</sup> )	31 $\pm$ 40	1600 $\pm$ 718	124 $\pm$ 89	741 $\pm$ 72
<b>d<sub>9</sub>-PtdCho (somme)</b>	<b>7,5 <math>\pm</math> 1,8</b>	<b>77,0 <math>\pm</math> 17,1</b>	<b>16,4 <math>\pm</math> 7,2</b>	<b>61,3 <math>\pm</math> 9,6</b>
d <sub>9</sub> -L-PtdCho 18:1 (x 10 <sup>-3</sup> )	23 $\pm$ 3	137 $\pm$ 83	32 $\pm$ 12	91 $\pm$ 72
d <sub>9</sub> -SMe d18:1/16:0 (x 10 <sup>-3</sup> )	119 $\pm$ 33	1370 $\pm$ 568	231 $\pm$ 99	597 $\pm$ 121

*NB. Les valeurs données ont été déterminées à partir de trois expériences distinctes (moyenne  $\pm$  SD).*

**Tableau 16. Composés à d<sub>9</sub>-Cho significativement différents inter-lignées au bout de 8 h (*p*-values sur les valeurs en nmol/mg de protéines).**

	SF767 (RS)	SF763 (RR)	U87 (RR)
<b>U251 (RS)</b>	d <sub>9</sub> -PCho (0,01) d <sub>9</sub> -GPCho (0,005) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,003) d <sub>9</sub> -SMe (0,02)	d <sub>9</sub> -Cho (0,04) d <sub>9</sub> -PCho (0,02) d <sub>9</sub> -GPCho (0,02) d <sub>9</sub> -SMe (0,03) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,0007)	d <sub>9</sub> -Cho (0,02)
<b>SF767 (RS)</b>	X	d <sub>9</sub> -Cho (0,04) d <sub>9</sub> -PCho (0,009) d <sub>9</sub> -GPCho (0,02)	d <sub>9</sub> -Cho (0,01) d <sub>9</sub> -PCho (0,02) d <sub>9</sub> -GPCho (0,02) d <sub>9</sub> -SMe (0,03) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,005)
<b>SF763 (RR)</b>	X	X	d <sub>9</sub> -PCho (0,03) d <sub>9</sub> -GPCho (0,03) d <sub>9</sub> -SMe (0,02) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,002)

### II.3.2. Turnover des composés à choline

Le *turnover* des composés à choline représente le renouvellement de chaque *pool* de composés à choline sur huit heures (Fig. 41). Les données sont exprimées en pourcentage car elles correspondent à la fraction d'un composé d<sub>9</sub>-Cho par rapport à la somme de ce même composé et de son homologue non marqué (*pool*).

La fraction de chaque composé deutéré mesuré au bout de huit heures est présentée dans le tableau 17 ( $\pm$  SD). Le tableau croisé 18 représente les valeurs des fractions significativement différentes inter-lignées, à t = 8 h. Dans ce dernier tableau, les d<sub>9</sub>-PtdCho ont été considérées dans leur globalité (somme des d<sub>9</sub>-PtdCho).

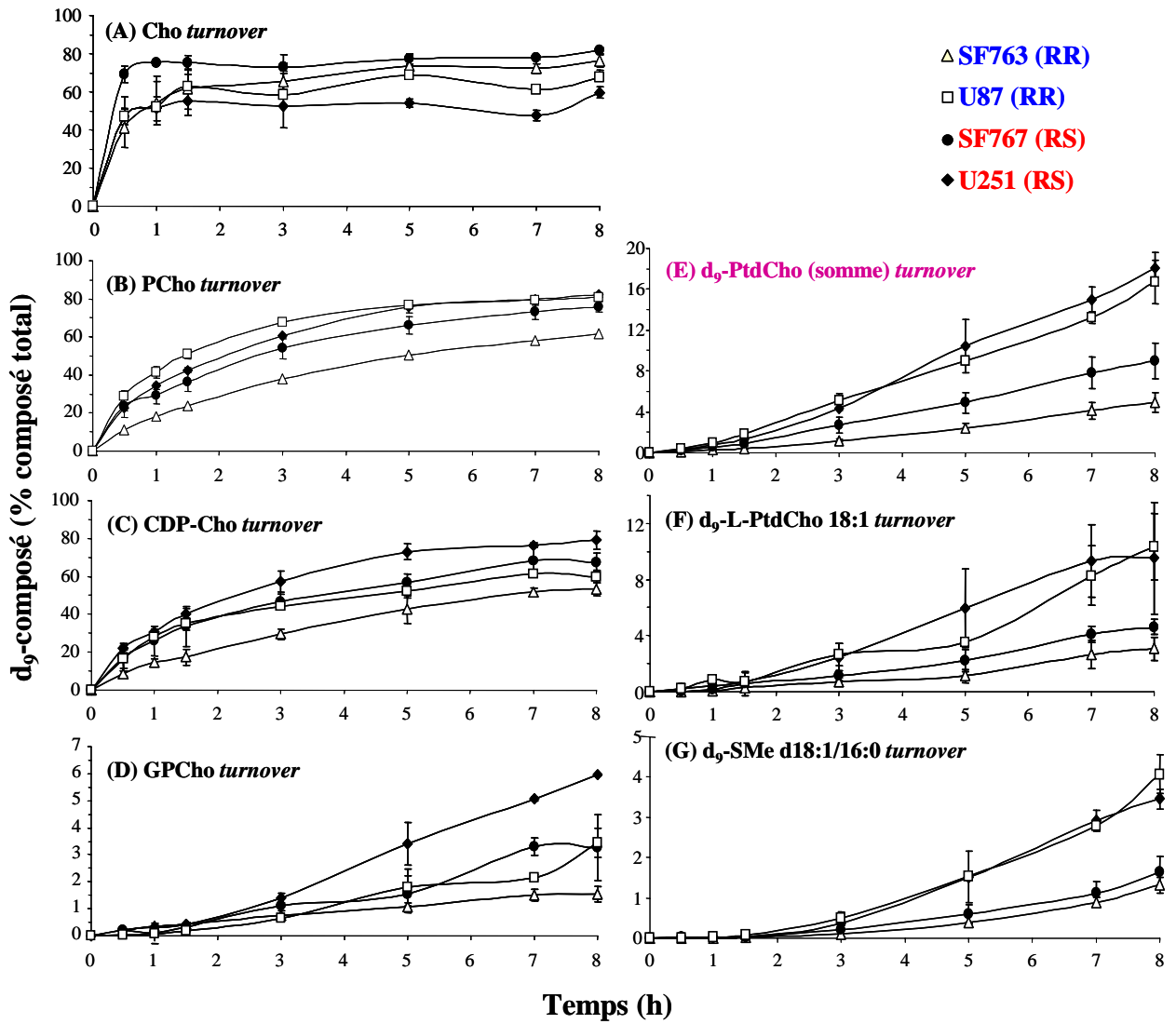


Figure 41. Turnover des composés à choline hydrosolubles : (A) Cho ; (B) PCho ; (C) CDP-Cho ; (D) GPCho, (E) PtdCho (somme) ; (F) L-PtdCho 18:1 et (G) SMe d18:1/16:0.

**Tableau 17. Turnover des composés à choline (fraction du composé deutéré considéré par rapport au pool du composé considéré) au bout de 8 h.**

Composés à choline deutérés	Turnover (%) à t = 8 h			
	SF763 (RR)	U87 (RR)	SF767 (RS)	U251 (RS)
<u>Métabolites</u>				
d <sub>9</sub> -Cho	76 ± 3	68 ± 3	81 ± 2	60 ± 3
d <sub>9</sub> -PCho	61 ± 1	81 ± 0	76 ± 3	82 ± 1
d <sub>9</sub> -CDP-Cho	53 ± 4	60 ± 3	68 ± 5	79 ± 5
d <sub>9</sub> -GPCho	2 ± 0	3 ± 1	3 ± 1	6 ± 0
<u>Lipides</u>				
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/14:0	2 ± 1	7 ± 1	3 ± 1	8 ± 2
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/16:0	4 ± 0	17 ± 2	7 ± 1	20 ± 2
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/16:1	5 ± 1	16 ± 2	10 ± 1	17 ± 2
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/18:1	5 ± 1	19 ± 3	10 ± 2	19 ± 2
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/18:2	4 ± 1	11 ± 0	8 ± 1	13 ± 0
d <sub>9</sub> -PtdCho 18:0/18:2	6 ± 1	13 ± 1	10 ± 1	19 ± 1
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0/20:4	4 ± 0	18 ± 0	8 ± 1	18 ± 1
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0alk/16:0	5 ± 2	13 ± 0	8 ± 2	15 ± 2
d <sub>9</sub> -PtdCho 16:0alk/18:0	4 ± 1	19 ± 2	7 ± 0	20 ± 2
<b>d<sub>9</sub>-PtdCho (somme)</b>	<b>5 ± 1</b>	<b>17 ± 2</b>	<b>9 ± 2</b>	<b>18 ± 2</b>
d <sub>9</sub> -L-PtdCho 18:1	3 ± 1	10 ± 2	5 ± 1	10 ± 4
d <sub>9</sub> -SMe d18:1/16:0	1 ± 0	4 ± 0	2 ± 0	3 ± 0

NB. Les valeurs données ont été déterminées à partir de trois expériences distinctes (moyenne ± SD).

**Tableau 18. Fraction des composés à d<sub>9</sub>-Cho (par rapport à leur *pool* respectif) significativement différents inter-lignées au bout de 8 h (*p-values* sur les fractions).**

	SF767 (RS)	SF763 (RR)	U87 (RR)
U251 (RS)	d <sub>9</sub> -Cho (0,0003) d <sub>9</sub> -PCho (0,02) d <sub>9</sub> -CDP-Cho (0,04) d <sub>9</sub> -GPCho (0,01) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,003) d <sub>9</sub> -SMe (0,002)	d <sub>9</sub> -Cho (0,003) d <sub>9</sub> -PCho (0,000004) d <sub>9</sub> -CDP-Cho (0,002) d <sub>9</sub> -GPCho (0,00002) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,0003) d <sub>9</sub> -SMe (0,0003)	d <sub>9</sub> -Cho (0,04) d <sub>9</sub> -PCho (0,04) d <sub>9</sub> -CDP-Cho (0,005) d <sub>9</sub> -GPCho (0,001)
SF767 (RS)		d <sub>9</sub> -PCho (0,0009) d <sub>9</sub> -CDP-Cho (0,01) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,02)	d <sub>9</sub> -Cho (0,003) d <sub>9</sub> -PCho (0,03) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,008) d <sub>9</sub> -L-PtdCho (0,02) d <sub>9</sub> -SMe (0,002)
SF763 (RR)			d <sub>9</sub> -Cho (0,04) d <sub>9</sub> -PCho (0,000002) d <sub>9</sub> -GPCho (0,006) d <sub>9</sub> -PtdCho (0,001) d <sub>9</sub> -SMe (0,0008)

### II.3.3. Interprétation

Nous constatons que sur 8 h, l'incorporation de d<sub>9</sub>-Cho (Fig. 40A) est plus significativement plus importante ( $p < 0,05$ ) dans les lignées RR que dans les lignées RS, en particulier pour la lignée RR SF763 (Tab. 15). Lorsque les données sont exprimées en nmol/million de cellules (**Annexe 2**), la concentration en d<sub>9</sub>-Cho reste significativement plus importante dans les lignées RR ( $p < 0,05$ ) par rapport aux lignées RS.

En revanche, nous remarquons que le *turnover* du *pool* de Cho est rapide dans les quatre lignées, en particulier dans la lignée RS SF767 (Fig. 41A). En effet, à  $t = 30$  min, la proportion de d<sub>9</sub>-Cho est d'environ 70% alors que dans les autres lignées, elle se trouve autour de 45%. A  $t = 1,5$  h, la proportion de d<sub>9</sub>-Cho atteint un plateau dans les quatre lignées et à  $t = 8$  h, elle est de  $81 \pm 2\%$ ,  $76 \pm 3\%$ ,  $68 \pm 3\%$  et  $60 \pm 3\%$  pour les lignées SF767, SF763, U87 et U251 respectivement (Tab. 17). Cette proportion est significativement inférieure ( $p < 0,05$ ) dans la lignée U251, comparée aux trois autres lignées (Tab. 18).

Ce rapide *turnover* dans les quatre lignées pourrait s'expliquer par une forte concentration de d<sub>9</sub>-Cho dans le milieu (97% d'enrichissement en Cho) d'une part, et par le fait que la Cho est rapidement phosphorylée par la ChoK en PCho dans les cellules.

La cinétique de formation de la d<sub>9</sub>-PCho suit la même tendance que celle de l'incorporation de la d<sub>9</sub>-Cho (Fig. 40B) : une accumulation significative ( $p < 0,05$ ) à  $t = 8$  h est observée dans les lignées RR comparées aux lignées RS, sauf lorsque la lignée RR U87 est comparée à la lignée RS U251 (Tab. 16). Ceci devient néanmoins significatif ( $p < 0,05$ ) lorsque les données sont ramenées en nmol/million de cellules (**Annexe 2**). Cette accumulation est par ailleurs beaucoup plus importante dans la lignée SF763 (Tab. 15). La PCho étant considérée comme une forme de stockage de la Cho dans les cellules (Vance & Vance, 2004), il est cohérent de détecter une importante accumulation de d<sub>9</sub>-PCho, en particulier pour les SF763. Il se pourrait que la ChoK ait une activité accrue dans les lignées RR, mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette supposition.

Par ailleurs, le *turnover* du *pool* de PCho est significativement ( $p < 0,005$  à  $t = 8$  h) moins important dans la lignée RR SF763 comparée aux trois autres lignées (Fig. 41B et Tabs. 17 et 18), ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le *pool* de PCho est beaucoup plus important dans cette lignée.

La formation de la d<sub>9</sub>-CDP-Cho est faible et relativement semblable dans les quatre lignées (Fig. 40C). A  $t = 8$  h, sa concentration est légèrement supérieure dans les lignées RR, mais reste cependant très faible puisqu'elle ne dépasse pas les 100 pmol/mg de protéines (Tab. 15). Ceci suggère qu'il n'y pas de différence dans la régulation de l'enzyme clé CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase (CT) dans la synthèse des PtdCho des quatre modèles étudiés (Sugimoto et al., 2008).

Néanmoins, le *turnover* de CDP-Cho est légèrement supérieur dans les lignées RS (Fig. 41C), en particulier pour la lignée U251 ( $p < 0,05$ ) comparé aux trois autres lignées (Tab. 18). A  $t = 8$  h, la proportion de d<sub>9</sub>-CDP-Cho atteint  $79 \pm 5\%$ ,  $68 \pm 5\%$ ,  $60 \pm 3\%$  et  $53 \pm 4\%$ , respectivement pour les lignées U251, SF767, U87 et SF763. Une fois de plus, cela pourrait s'expliquer par un *pool* de CDP-Cho légèrement plus important dans les lignées RR, en particulier la lignée SF763.



La concentration des d<sub>9</sub>-PtdCho totales (Fig. 40E) est significativement plus élevée pour les lignées RS U251 et RR U87 comparée aux lignées RS SF767 et RR SF763 ( $p < 0,01$  à  $t = 8$  h, Tabs. 15 et 16). L'allure des courbes de cinétique est sensiblement la même pour toutes les espèces de d<sub>9</sub>-PtdCho étudiées (**Annexe 3**). A  $t = 8$  h, la concentration en d<sub>9</sub>-PtdCho totales atteint  $61,3 \pm 9,6$ ,  $77,0 \pm 17,1$ ,  $16,4 \pm 7,2$  et  $7,5 \pm 1,8$  nmol/mg de protéines respectivement pour les lignées U251, U87, SF767 et SF763 (Tab. 15). Les PtdCho étant principalement impliqués dans la constitution des membranes cellulaires, cela suggère une cinétique de croissance cellulaire accrue pour les deux lignées RS U251 et RR U87 comparées à la lignée RS SF767 et plus encore ( $p < 0,005$ ) à la lignée RS SF763 (Tab. 16). Cette hypothèse est confirmée par la cinétique du *turnover* des PtdCho totales (Fig. 42E). En effet, elle est significativement plus importante dans les lignées U251 et U87 ( $p < 0,01$  à  $t = 8$  h, Tab. 18) comparées aux lignées SF767 et SF763 (Tab. 17).

Notons par ailleurs que la quantité de d<sub>9</sub>-PtdCho dans les quatre types cellulaires est majoritairement composée, dans l'ordre décroissant, des espèces 34:1, 36:2, 32:1 et 32:0. Enfin, nous observons que les espèces alkylées telles que 32:0alk-acyl et 34:0alk-acyl ont une cinétique plus lente que celle des autres espèces (**Annexe 3**) et que leurs concentrations ne dépassent pas les 800 pmol/mg de protéines à  $t = 8$  h, pour les lignées SF763, SF767 et U251 (Tab. 15).

Les cinétiques de formation du composé d<sub>9</sub>-SMe d18:1/16:0 (Fig. 40G), espèce fortement majoritaire des d<sub>9</sub>-SMe et du *turnover* du *pool* de SMe d18:1/16:0 (Fig. 41G) suivent la même tendance que celles décrites pour les phospholipides, bien que les valeurs soient beaucoup plus faibles. En effet, à  $t = 8$  h, la concentration en d<sub>9</sub>-SMe d18:1/16:0 ne dépasse pas les 2 nmol/mg de protéines dans les quatre lignées (Tab. 15) et la fraction en d<sub>9</sub>-SM d18:1/16:0 est inférieure à 5% (Tab. 17).

La formation du composé d<sub>9</sub>-L-PtdCho 18:1 (Fig. 40F), espèce fortement majoritaire des d<sub>9</sub>-L-PtdCho, est très faible dans les quatre lignées (inférieure à 150 pmol/mg de protéines à  $t = 8$  h, Tab. 15), même si une concentration plus élevée est mesurée dans les lignées RS U251 et RR U87. La proportion en d<sub>9</sub>-L-PtdCho 18:1 dans le *pool* de L-PtdCho 18:1 (Fig. 41F) est plus conséquente dans les lignées U251 et U87 comparées aux lignées SF767 et SF763 (Tab. 17). Cela est significatif pour la lignée U87 ( $p < 0,05$ , Tab. 18). Cela semble traduire un *pool* de L-PtdCho plus conséquent dans les deux lignées les plus prolifératives, ce qui serait logique. Néanmoins, ces *pools* sont faibles, compte-tenu du fait que les cellules

stockent en très faible quantité les L-PtdCho. Ces dernières sont notamment utilisées comme messagers secondaires lors de divers processus biologiques (Maeda et al., 2009).

Enfin, la formation de d<sub>9</sub>-GPCho, provenant de l'hydrolyse des d<sub>9</sub>-PtdCho (Fig. 40D), est très élevée dans la lignée RR U87, élevée dans la lignée RS U251, faible dans la lignée RR SF763 et quasiment inexistante dans la lignée RS SF767. Notons par ailleurs que la présence de ce composé dans les cellules est détectée après t = 2 h. A t = 8h, la concentration en d<sub>9</sub>-GPCho est de 2018 ± 930, 562 ± 166, 174 ± 67 et 22 ± 5 pmol/mg de protéines, respectivement pour les lignées U87, U251, SF763 et SF767 (Tab. 15). Cette différence de concentration est significative (p < 0,05) pour la lignée RR U87 comparée aux deux lignées RS et pour la lignée RS SF767 comparée aux trois autres (Tab. 15). Notons par ailleurs que la cinétique du *turnover* du *pool* de GPCho est significativement plus importante (p < 0,05 à t = 8 h, Tab. 18) dans la lignée U251, comparée aux trois autres lignées (Fig. 41D). Cependant, la fraction de d<sub>9</sub>-GPCho à t = 8 h reste faible (inférieure à 6 %) dans les quatre lignées (Tab. 17), ce qui peut s'expliquer par le fait que le temps de l'expérience est trop court pour voir apparaître une forte proportion de d<sub>9</sub>-GPCho dans les cellules.

La concentration élevée de d<sub>9</sub>-GPCho dans les lignées RR U87 et RS U251 est cohérente compte tenu que ce composé est issu de l'hydrolyse des d<sub>9</sub>-PtdCho dont les concentrations sont plus élevées dans les lignées U251 et U87 (Fig. 40E). Néanmoins, la forte accumulation de d<sub>9</sub>-GPCho dans la lignée RR U87 suggère un *pool* de GPCho très important dans cette lignée, ce qui est confirmé par la cinétique du *turnover* de la GPCho : à t = 8 h, la fraction de d<sub>9</sub>-GPCho n'est que de 3 ± 1% (Tab. 17), alors que sa concentration est déjà de 2018 ± 930 pmol/mg de protéines (Tab. 15).

A ce stade de l'investigation, nous avons mis en évidence des *pools* de composés à choline hydrosolubles (Cho, PCho et GPCho) plus importants dans les deux lignées RR (U87 et SF763) par rapport aux deux lignées RS (U251 et SF767). Ces différences de *pools* sont principalement dues à une incorporation de Cho significativement plus importante dans les lignées RR, en particulier la lignée SF763.

Ces accumulations de composés à choline ne sont pas systématiquement corrélées à une cinétique de *turnover* des composés à choline accrue, qui se traduit par une prolifération plus importante des lignées. En effet, la lignée RR SF763 est celle qui accumule le plus de d<sub>9</sub>-PCho, alors qu'elle est la moins proliférative. Par ailleurs, les lignées U87 et U251 sont celles qui semblent les plus prolifératives (Fig. 40J) et les plus similaires concernant le *turnover* global (Fig. 41J). Néanmoins, la lignée RR U87 accumule deux fois plus de d<sub>9</sub>-Cho et d<sub>9</sub>-PCho et quatre fois plus d<sub>9</sub>-GPCho que la lignée RS U251.

## II.5. Etude transcriptomique

### II.5.1. Expression des gènes du métabolisme des PtdCho

Dans un premier temps, l'étude a consisté à déterminer l'expression des gènes (et leurs isoformes) susceptibles d'être impliqués dans la biosynthèse des PtdCho. Quatre lames par lignée ont été utilisées. Une liste de 26 gènes présents sur les lames RNG\_human\_25K a été sélectionnée. Les gènes étaient les suivants : CHAT, CHDH, CHKA, CHPT1, COLQ, LYPLA1, PCYT1B, PLA2G6, PLCB1, PLCB2, PLCB3, PLCB4, PLCD1, PLCD3, PLCD4, PLCE1, PLCG1, PLCG2, PLCH1, PLCL1, PLCL2, PLCXD1, PLCXD2, PLCXD3, PLCZ1 et SLC5A7.

A l'aide des logiciels Biplot et Bioclust, nous avons comparé l'expression de ces gènes dans les lignées RR par rapport à celle dans les lignées RS (Fig. 42 et Tab. 19). Les données ont été traitées selon les conditions suivantes : intensité moyenne, normalisation (*quantile*), échelle logarithmique ( $\log_{10}$ ). Deux gènes semblent être légèrement sur-exprimés dans les lignées RS : PLCB1 et SLC5A7.

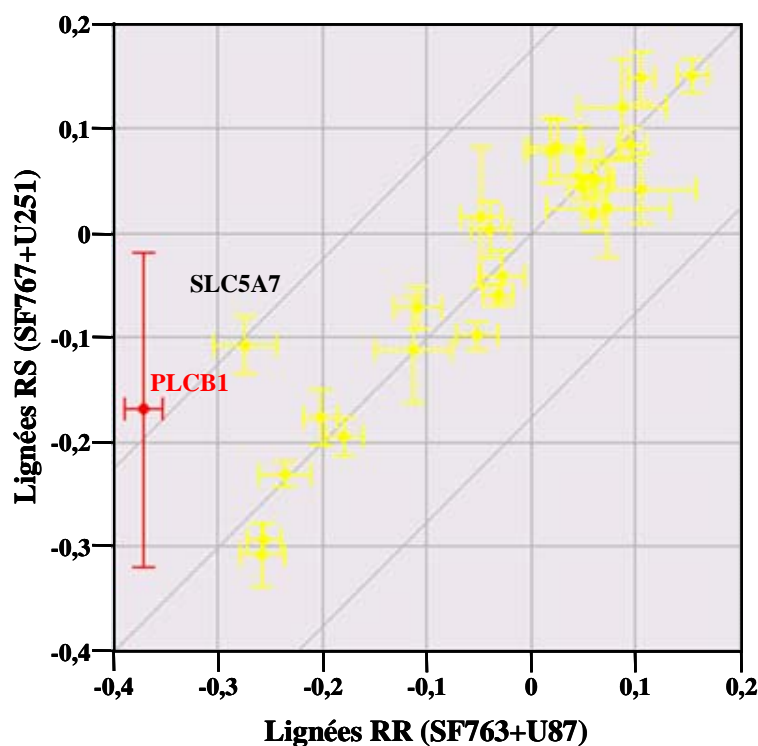


Figure 42. Scatter plot de l'expression des 26 gènes sélectionnés (échelle logarithmique) impliqués dans la biosynthèse des PtdCho.

**Tableau 19. Expression des gènes (valeurs originales) PLCB1 et SLC5A7 dans les quatre lignées.**

<i>Gene ID</i>	<i>Nom usuel</i>	<i>GenBank</i>	<b>SF763</b>	<b>U87</b>	<b>SF767</b>	<b>U251</b>
SLC5A7	CHT1	NM_021815	0,565	0,501	0,731	* <b>0,836</b>
PLCB1	PLC-β1	NM_015192	0,417	0,435	<b>0,974</b>	0,471

\*  $p < 0,01$

D'après les résultats obtenus avec cette approche biostatistique, l'expression du gène SLC5A7 (CHT1) est significativement sur-exprimée ( $p < 0,01$ ) dans la lignée U251 et légèrement accrue dans la lignée SF767, comparée aux deux lignées RR, SF763 et U87. En revanche, même si l'expression du gène PLCB1 (PLC-β1) est deux fois plus élevée dans la lignée SF767, cette augmentation n'est pas significative, ce qui est probablement dû à une inhomogénéité des quatre biopuces de cette lignée.

## II.5.2. Recherche de (groupe de) gènes différentiellement exprimés

Nous nous sommes ensuite intéressés aux gènes différentiellement exprimés dans les lignées RR par rapport aux lignées RS. Nous avons ainsi étudié les 26068 oligonucléotides présents sur les biopuces.

La première approche biostatistique a été effectuée au laboratoire à l'aide des logiciels Bioplot et Bioclust. Les critères d'astringence pour considérer l'expression d'un gène comme significativement différente entre les lignées RR et RS étaient les suivants : *ratio* d'expression RR/RS  $< 0,714$  (sous-expression) ou *ratio* d'expression RR/RS  $> 1,4$  (sur-expression) et  $p < 0,1$ . Ces conditions devaient être respectées pour les deux lignées RR, comparées à chacune des lignées RS. Cinq gènes ont ainsi pu être mis en évidence (Tab. 20).

Les données ont ensuite été retraitées avec P. Martin, spécialiste en transcriptomique. Nous avons, dans un premier temps, déterminé les gènes différentiellement exprimés dans les lignées RR par rapport aux lignées RS. A l'aide du logiciel R et de plusieurs traitements biostatistiques, dix gènes sur- ou sous-exprimés ont été mis en évidence dont certains sont communs avec ceux trouvés précédemment. Pour cette approche, les critères d'astringence pour considérer l'expression d'un gène comme significativement différente entre les lignées RR et RS étaient les suivants :  $\log_2(\text{RR/RS}) \neq 0$  et FDR  $< 5\%$ . Ces deux conditions devaient être respectées pour les deux lignées RR comparées à chacune des lignées RS.

Dans un deuxième temps, en utilisant la liste des gènes différentiellement exprimés dans les lignées RR comparées aux lignées RS mais avec un FDR beaucoup moins astringent (FDR < 20%), nous nous sommes intéressés à la probabilité (seuil :  $p < 0,01$ ) de retrouver des gènes appartenant à un même groupe GO (*Gene Ontology*) donné. Sept gènes appartenant à deux groupes GO différents ont retenu notre attention (Tab. 20).

Enfin, dans une dernière approche, nous avons considéré la sur- ou sous-expression d'ensembles de gènes différentiellement exprimés dans les lignées RR comparées aux lignées RS et appartenant à des mêmes groupes de gènes GO (approche PGSEA). Deux groupes GO enrichis dans les lignées RR ou RS ont ainsi été mis en évidence (Tab. 20).

**Tableau 20. Gènes ou groupes de gènes différentiellement exprimés dans les lignées RR (sur-exprimés : ↑ RR ou sous-exprimés : ↓ RR) par rapport aux lignées RS.**

Gene ID	GenBank	Groupe <i>Gene Ontology</i> (GO)	Approches biostatistiques		
			Bioplot/ Bioclust	R	
			0,714 > RR/RS > 1,4 p < 0,1	FDR < 5% log <sub>2</sub> (RR/RS) ≠ 0	FDR < 20% p < 0,01 (gp GO)
FTH1	NM_002032	<i>Metal ion transport</i> (GO : 0030001)	↑ RR	↑ RR	↑ RR
FTMT	NM_177478	<i>Metal ion transport</i> (GO : 0030001)	-	-	↑ RR
SLC6A8	NM_005629	<i>Metal ion transport</i> (GO : 0030001)	-	-	↑ RR
HSXGFB1	-	-	-	↑ RR	-
TOP1MT	NM_052963	-	↑ RR	-	-
FLJ32658	NM_144688	-	↑ RR	-	-
HMG1L10	NM_172363	<i>DNA replication</i> (GO : 0006260)	↓ RR	↓ RR	↓ RR
MSH4	NM_002440	<i>DNA replication</i> (GO : 0006260)	-	↓ RR	↓ RR
NFIC	NM_005597	<i>DNA replication</i> (GO : 0006260)	-	↓ RR	↓ RR
PHB	NM_007273	<i>DNA replication</i> (GO : 0006260)	-	↓ RR	↓ RR
RPS6	NM_001010	-	↓ RR	↓ RR	-
MAX	NM_145112	-	-	↓ RR	-
RCL1	NM_005772	-	-	↓ RR	-
LOC283129	NM_001037225	-	-	↓ RR	-
Groupe <i>Gene Ontology</i> (GO)			Approche biostatistique PGSEA (sous R)		
<i>Oxidoreductase activity</i> (GO : 0016706)			↑ RR (22 gènes impliqués)		
<i>Regulation of translational initiation</i> (GO : 0006446)			↓ RR (29 gènes impliqués)		

Les 23 gènes globalement sur-exprimés dans les lignées RR et appartenant au groupe GO « activité oxydo-réductase » sont les suivants : LEPREL2, EGLN2, EGLN3, FBXL11, ASPHD1, ASPH, P4HA1, P4HB, PLOD1, PLOD2, EGLN1, PH-4, LEPREL1, OGFOD1, HIF1AN, ASPHD2, ASPHD2, LEPRE1, OGFOD2, FLJ22222, BBOX1, FBXL10 et JMJD2A.

Les 29 gènes globalement sous-exprimés dans les lignées RR et appartenant au groupe GO « régulation de l'initiation traductionnelle » sont les suivants : EIF1B, DAZL, EIF2S1, EIF4B, EIF4EBP1, EIF4EBP2, EIF4G2, EIF5A, EIF2C1, EIF2AK1, EIF3K, HSPB1, KIAA1155, EIF2AK4, MTIF2, TRMT6, TNF, EIF4H, EIF4EBP3, EIF3A, EIF3CL, EIF3D, EIF3F, EIF3G, EIF3I, EIF2B2, EIF2B5, EIF2AK3 et BZW1.

### II.5.3. Interprétation

Concernant les gènes codant pour les protéines impliquées dans la biosynthèse des PtdCho, seul le transcrit SLC5A7, codant pour la protéine appartenant à la famille des CHT1 (*high affinity choline transporters*), semble être légèrement sur-exprimé dans les lignées RS et, de manière significative, dans la lignée U251. Néanmoins, l'expression de ce gène n'a pas été retrouvée avec P. Martin, tout comme celle du gène PLCB1.

En ce qui concerne les gènes différentiellement exprimés dans les lignées RR par rapport aux lignées RS, seuls ceux mis en évidence par P. Martin ont été considérés. Le gène HSXGFB1, codant pour une protéine indéterminée, n'a pas été considéré. En revanche, il est intéressant de remarquer que trois gènes appartenant au groupe GO « transporteurs d'ions métalliques » sont sur-exprimés dans les lignées RR : FTH1, FTMT et SLC6A8 (FDR < 20%,  $p < 0,01$ ). Le gène FTH1 est sur-exprimé dans les lignées RR pour un FDR < 5%. Les gènes FTH1 et FTMT codent respectivement pour la ferritine et la ferritine mitochondriale, deux protéines impliquées dans le stockage du fer dans la cellule. Quant au gène SLC6A8, il code pour la protéine membranaire du même nom impliquée dans le transport de la créatine. Cette protéine a été identifiée dans le cerveau du rat sous le nom de CHOT1 et serait un transporteur de choline. Par ailleurs, elle présenterait une forte affinité à la choline, serait sodium-dépendante et insensible à l'HC-3 dans des ovocytes (Happe & Murrin, 1995).

Concernant les gènes sous-exprimés dans les lignées RR, nous pouvons noter quatre gènes appartenant au groupe GO « réplication de l'ADN ». Ces gènes sont : HMG1L10, MSH4, NFIC et PHB. Les quatre gènes sont sous-exprimés de manière significative (FDR < 5%). Ils codent respectivement pour les protéines HMGB1L10 (*High-Mobility Group Box 1-Like 10*), MSH4 (*MutS Homolog 4*), NFIC (*Nuclear Factor I/C*) et la prohibitine. Ces deux dernières seraient des suppresseurs de tumeur (Eeckhoute et al., 2006), et la prohibitine serait en outre un régulateur de la prolifération cellulaire (Rajalingam & Rudel, 2005).

Les gènes RPS6, MAX, RCL1 et LOC283129 se retrouvent eux aussi significativement (FDR < 5%) sous-exprimés dans les lignées RS. Ils codent respectivement pour les protéines RPS6 (*Ribosomal Protein S6*), MAX (*Myc Associated factor X*) et RCL1 (*RNA terminal phosphate Cyclase-Like 1*) et pour la protéine hypothétique LOC283129. Peu d'informations concernent la protéine RCL1. La protéine RPS6 serait un médiateur sélectif de la mort apoptotique induite par la protéine TRAIL (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) dans les cellules Jurkat et HeLa (Jeon et al., 2008). Quant à la protéine MAX, elle peut former des hétérodimères avec d'autres protéines, notamment Myc qui est une oncoprotéine impliquée dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires. L'expression des gènes MAX et RB1 a déjà été détectée dans des gliomes et dans des lignées cellulaires gliales, dont U87 et U251. L'expression de MAX est, selon cette étude, plus prononcée dans la lignée U87 (Hirvonen et al., 1994).

Notons pour terminer sur cette étude transcriptomique que, par une approche PGSEA, P. Martin a mis en évidence la sur-expression globale dans les lignées RR du groupe de gènes appartenant au groupe GO « activité oxido-réductase ». *A contrario*, le groupe de gènes GO « régulation de l'initiation traductionnelle » est sous-exprimé dans les lignées RR.

A ce stade de l'investigation, nous avons pu mettre en évidence quelques gènes différemment exprimés dans les lignées RR, par rapport aux lignées RS. Quelques gènes appartenant au groupe GO « *Metal Ion Transport* » semblent être sur-exprimés dans les RR, dont le gène FTH1 de la ferritine. *A contrario*, quelques gènes appartenant au groupe GO « *DNA replication* » semblent être sous-exprimés dans les RS, dont le gène MAX. Aucun gène différemment exprimé ne sort variament du lot et l'expression de certains gènes mis en évidence doit être confirmée individuellement et de manière plus sensible par qRT-PCR.

## II.6. Etude par qRT-PCR

### II.6.1. Expression de certains gènes

L'expression de certains transcrits décrits précédemment a été confirmée ou infirmée par qRT-PCR. Ainsi, l'expression des gènes SLC6A8, FTMT, FTH1, NFIC, MAX et PHB a été vérifiée dans les quatre lignées cellulaires en prenant comme gènes de référence la  $\beta$ -actine (Fig. 43) et la  $\beta$ 2M (Fig. 44). La lignée U87 a été considérée comme la lignée contrôle (expression de ses gènes fixée à 1).

Nous avons également voulu déterminer l'expression de toutes les isoformes des gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme des PtdCho, certaines comme la ChoK- $\beta$  n'étant pas présente sur les biopuces utilisées. Malheureusement, le temps ne nous a pas permis d'aller jusqu'au bout de notre investigation. Nous nous sommes contentés de vérifier l'expression des gènes suivants : SLC5A7, ChoK- $\alpha$ , ChoK- $\beta$ , CT- $\alpha$  et CT- $\beta$  (Figs. 48 et 49).

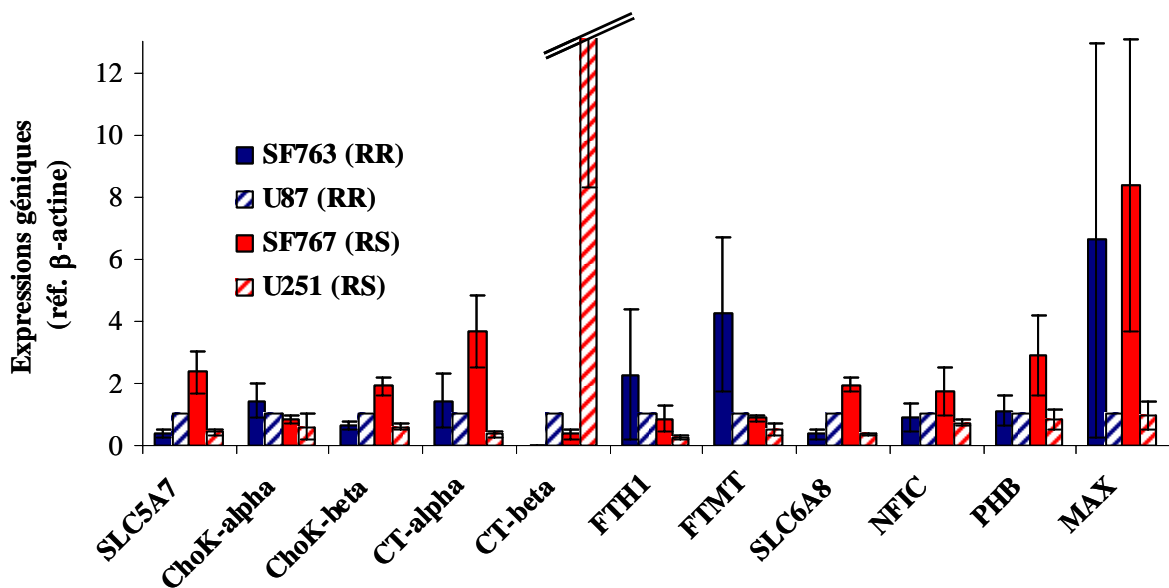


Figure 43. Expressions géniques, par rapport au gène de référence  $\beta$ -actine, de certains gènes dans les quatre lignées cellulaires (U87 : lignée contrôle). Abréviation : réf., gène de référence.



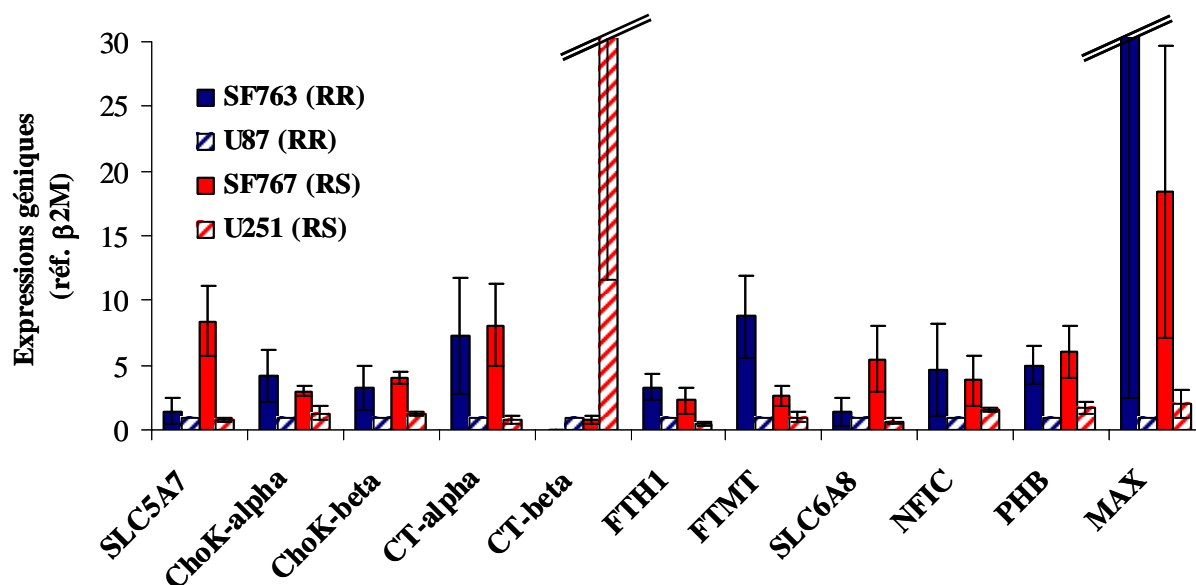


Figure 44. Expressions géniques, par rapport au gène de référence  $\beta 2M$ , de certains gènes dans les quatre lignées cellulaires (U87 : lignée contrôle).

Le tableau 21 présente les expressions des gènes par rapport à chacun des deux gènes de référence et en considérant la lignée U87 comme la lignée contrôle (expressions géniques fixées à 1).

Tableau 21. Expressions géniques ( $\pm$  SD) par rapport à chacun des gènes de référence ( $\beta$ -actine et  $\beta 2M$ ) et en considérant la lignée U87 comme lignée contrôle.

Gène/Réf	SF763 (RR)		SF767 (RS)		U251 (RS)	
	$\beta$ -actine	$\beta 2M$	$\beta$ -actine	$\beta 2M$	$\beta$ -actine	$\beta 2M$
SLC5A7	0,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 1,0	2,4 $\pm$ 0,7	8,4 $\pm$ 2,7	0,4 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2
ChoK- $\alpha$	1,4 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 2,0	0,8 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,6
ChoK- $\beta$	0,6 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 1,6	1,9 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2
CT- $\alpha$	1,4 $\pm$ 0,8	7,2 $\pm$ 4,5	3,7 $\pm$ 1,2	8,1 $\pm$ 3,2	0,4 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2
CT- $\beta$	<b>0</b>	<b>0</b>	0,4 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	<b>22,6 <math>\pm</math> 14,3</b>	<b>48,4 <math>\pm</math> 36,9</b>
FTH1	2,3 $\pm$ 2,1	3,3 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 1,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1
FTMT	4,2 $\pm$ 2,5	8,8 $\pm$ 3,1	0,9 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,8	0,5 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,4
SLC6A8	0,4 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 1,1	2,0 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 2,5	0,4 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,2
NFIC	0,9 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 3,5	1,8 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 1,9	0,7 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2
PHB	1,1 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 1,4	2,9 $\pm$ 1,3	6,0 $\pm$ 2,1	0,8 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,4
MAX	6,6 $\pm$ 6,4	32,2 $\pm$ 29,7	8,4 $\pm$ 4,7	18,4 $\pm$ 11,3	1,0 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 1,1

NB : Les valeurs ont été déterminées à partir des résultats de trois expériences distinctes.

Le tableau croisé 22 montre les expressions géniques significativement différentes inter-lignées. Pour qu'un gène soit considéré comme différentiellement exprimé entre deux lignées, nous avons fixé les critères suivants : *ratio* d'expression < 0,5 (sous-expression) ou *ratio* d'expression > 2 (sur-expression),  $p < 0,1$  et ceci pour les deux gènes de référence utilisés.

**Tableau 22. Expressions géniques significativement différentes inter-lignées (*p-values* obtenues par le test de Student).**

	SF767 (RS)	SF763 (RR)	U87 (RR)
U251 (RS)	↑ SLC5A7 ( $p < 0,01$ ) ↑ ChoK- $\beta$ ( $p < 0,005$ ) ↑ CT- $\alpha$ ( $p < 0,05$ ) ↓ CT- $\beta$ ( $p < 0,1$ ) ↑ FTH1 ( $p < 0,1$ ) ↑ SLC6A8 ( $p < 0,05$ ) ↑ PHB ( $p < 0,1$ ) ↑ MAX ( $p < 0,1$ )	↑ ChoK- $\alpha$ ( $p < 0,1$ ) ↑ CT- $\alpha$ ( $p < 0,1$ ) CT- $\beta$ (SF763: absent) ↑ FTMT ( $p < 0,05$ )	↓ CT- $\beta$ ( $p < 0,1$ ) ↑ FTH1 ( $p < 0,005$ )
SF767 (RS)	X	CT- $\beta$ (SF763: absent) ↑ FTMT ( $p < 0,1$ ) ↓ SLC6A8 ( $p < 0,1$ )	↓ SLC5A7 ( $p < 0,05$ ) ↓ CT- $\alpha$ ( $p < 0,05$ ) ↓ PHB ( $p < 0,1$ ) ↓ MAX ( $p < 0,1$ )
SF763 (RR)	X	X	CT- $\beta$ (SF763: absent) ↓ FTMT ( $p < 0,1$ )

**NB :** Les variations d'expression génique (↑ : sur-expression et ↓ : sous-expression) sont lues en comparant la lignée à l'entrée verticale du tableau par rapport à la lignée à l'entrée horizontale.

## II.6.2. Interprétation

D'après les résultats obtenus au cours de cette étude par qRT-PCR, nous ne pouvons pas confirmer de manière formelle les gènes trouvés différentiellement exprimés lors de l'étude transcriptomique. En effet, le gène FTH1, significativement sur-exprimé dans les lignées RR en transcriptomique (Tab. 20), l'est seulement pour la lignée RR U87 comparée à la lignée RS U251 ( $p < 0,005$ , Tab. 22). Le gène FTMT est sur-exprimé significativement ( $p < 0,1$ , Tab. 22) uniquement dans la lignée RR SF763 comparée aux deux lignées RS. Le gène SLC6A8, sur-exprimé dans les lignées RR lors de l'étude transcriptomique (Tab. 20), est sur-exprimé dans la lignée RS SF767 comparativement à la lignée RR SF763 (Tab. 22).

Les gènes NFIC, PHB et MAX, sous-exprimés dans les lignées RR de manière significative (Tab. 20), ne le sont pas dans cette étude. L'étude par qRT-PCR a mis en évidence la grande disparité transcriptomique entre les quatre lignées. En effet, nous pouvons remarquer que globalement, l'expression des gènes de la lignée U251 est plus faible que celle des autres lignées (Tab. 21). Ainsi, les gènes SLC5A7, ChoK- $\beta$ , CT- $\alpha$ , FTH1, SLC6A8, PHB et MAX sont sur-exprimés de manière significative dans la lignée RS SF767 comparée à l'autre lignée RS U251 (Tab. 22). Cependant, l'expression du gène CT- $\beta$  est très fortement sur-exprimée dans la lignée RS U251 (Tab. 21) comparativement aux trois autres lignées. *A contrario*, ce gène n'est pas exprimé dans la lignée SF763 (Tab. 21).

Par ailleurs, nous remarquons que le gène CT- $\alpha$  est sur-exprimé de manière significative dans la lignée RS SF767 comparée à la lignée RR U87 (Tab. 22) et que cette expression est légèrement supérieure comparée à la lignée SF763. Ainsi, nous pouvons constater que le gène CT, sous ses deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ , est globalement sur-exprimé dans les lignées RS par rapport aux lignées RR. Les deux isoformes sont en effet présentées comme étant ubiquitairement exprimées dans le cerveau (Jackowski & Fagone, 2005). Il semblerait donc qu'une sous-expression globale du gène codant pour l'enzyme clé CT dans la synthèse des PtdCho soit observée dans les lignées RR. Ceci pourrait être une des raisons de l'accumulation de PCho dans les lignées RR (Fig. 40B). Néanmoins, cela ne se traduit pas par une perturbation dans la synthèse de la CDP-Cho (Fig. 40C) et une sous-expression d'un gène ne conduit pas nécessairement à une diminution de l'activité de l'enzyme codée. L'étude de l'expression de tous les gènes et leurs isoformes impliqués dans le métabolisme des PtdCho des quatre lignées doit être prolongée afin de compléter ces résultats.

### III. Discussion générale

Le projet avait initialement pour but d'identifier aux niveaux du transcriptome, du lipidome et du métabolome d'éventuels biomarqueurs permettant de prévoir la radiorésistance des quatre lignées cellulaires humaines de GBM étudiées. A ce stade de l'investigation, nous avons déterminé un seul biomarqueur de radiorésistance discriminant significativement les deux lignées RR (SF763 et U87) des deux lignées RS (SF767 et U251) : la **PCho** (Figs. 33 et 36, Tabs. 9 et 11). Ce métabolite possède un *pool* plus important dans les cellules SF763, décrites comme les plus radiorésistantes (SF2 ~ 85%) (Delmas et al., 2002; Wang et al., 2006).

Par ailleurs, nous avons montré que l'accumulation de PCho est due à une incorporation accrue de d<sub>9</sub>-Cho dans les lignées RR, et donc de Cho par analogie, en particulier dans la lignée SF763 (Fig. 40A, Tabs. 15 et 16). Cela suggère une activité de la ChoK plus importante dans les lignées RR (Fig. 40B, Tabs. 15 et 16), bien que les observations ne permettent pas d'affirmer cette supposition.

En revanche, l'accumulation de PCho ne se traduit pas par une vitesse de croissance cellulaire accrue des lignées RR, et encore moins par un *turnover* des PtdCho plus important. En effet, bien que la lignée RR U87 ait un *turnover* des PtdCho rapide (Fig. 40E, Tab. 15) et qu'elle ait été observée expérimentalement comme ayant une vitesse de croissance plutôt rapide, la lignée RR SF763 a un *turnover* lipidique faible et une vitesse de croissance plus faible que ceux des autres lignées. L'étude menée par marquage deutéré ne permet pas de déterminer si les enzymes PLC ou PLD ont une activité accrue dans les lignées RR. En revanche, la cinétique de formation de la d<sub>9</sub>-GPCCho est accrue dans la lignée U87 comparée aux trois autres lignées (Fig. 40D). Cela se traduit par un *pool* de GPCCho plus important dans cette lignée (Fig. 36, Tabs. 10 et 11). L'accumulation de GPCCho pourrait avoir pour rôle de réduire le taux de dégradation des phospholipides membranaires afin d'assurer l'homéostasie de ces phospholipides dans les cellules cérébrales (Fallbrook et al., 1999).

Au niveau transcriptomique, les lignées RR sous-expriment globalement l'enzyme CT sous ses deux formes (Tabs. 21 et 22). De plus, il est intéressant de noter que la lignée RR SF763 n'exprime pas l'isoforme CT- $\beta$ , alors que la lignée RS U251 la sur-exprime (Figs. 43 et 44, Tab. 21). L'enzyme CT étant l'enzyme régulatrice de la biosynthèse des PtdCho et utilisant comme substrat la PCho et le CTP, il semble donc logique de voir une accumulation de PCho dans les lignées RR.

Ces résultats sont cohérents si nous partons de l'hypothèse que les différences de radiosensibilité des quatre lignées cellulaires étudiées seraient corrélées à un processus de cancérisation plus ou moins avancé. En effet, une concentration en composés à choline plus importante dans la tumeur par rapport aux cellules saines voisines est généralement le résultat d'un processus de cancérisation (Glunde et al., 2006b). Certains auteurs proposent à cet égard la PCho comme biomarqueur du cancer du sein (Eliyahu *et al.*, 2007). Pour d'autres (Glunde et al., 2006a), l'altération du métabolisme des PtdCho dans les cellules cancéreuses est majoritairement associée à une plus forte incorporation de Cho dans les cellules, à une sur-expression et/ou une plus forte activité de la ChoK et à une plus grande activité des phospholipases.

Il semblerait que sur les quatre modèles cellulaires étudiés, une partie des caractéristiques requises soient vérifiées, avec toutefois quelques spécificités pour chaque modèle. Selon une revue (Kiss, 1999), la forte concentration intracellulaire de PCho n'est pas impliquée dans la biosynthèse des PtdCho mais le serait dans la régulation de la croissance des cellules et dans la tumorigenèse. Enfin, une étude récente sur des gliomes de bas et haut grades (Righi et al., 2009) montre que le *ratio* GPCho/PCho < 1 dans les gliomes de haut grade est dû à une accumulation de PCho. Cette accumulation est le résultat d'une sur-expression des gènes codant pour les protéines ChoK- $\beta$  et PLC et d'une sous-expression du gène codant pour la CT- $\beta$ .

Un classement moléculaire des GBM est en train d'être réalisé (Mischel *et al.*, 2003; Frenel *et al.*, 2009). Il permet de grouper les malades en fonction de leur réponse au TMZ selon le statut du promoteur du gène MGMT (Stupp et al., 2005). Ce classement devrait permettre très prochainement de grouper les malades en fonction de leur réponse future à la radiothérapie. A ce jour, seule une équipe de chercheurs (Liu et al., 2009) a mis en évidence *in vitro* un marqueur prédictif de radiorésistance dans quatre lignées cellulaires de GBM. Les auteurs montrent que la différence de méthylation du promoteur du gène ERCC1 est corrélée à la radiorésistance des lignées étudiées. Une autre équipe a montré que sur des cellules souches myéloïdes 32D de souris cancérisées, l'augmentation du taux de DG est corrélée à la radiorésistance de ces clones, comparés aux cellules souches initiales non cancéreuses (Pacini et al., 1995). Ces mêmes auteurs ont par ailleurs observé une concentration accrue de PCho intracellulaire corrélée à une plus grande radiorésistance dans des cellules 32D transfectées avec l'oncogène *v-erbB*.

Le lien entre le métabolisme des PtdCho et la radiorésistance n'a jusqu'à présent jamais été établi dans des cellules de GBM. En revanche, une équipe de chercheurs (Vanpouille et al., 2009) a récemment montré une incorporation accrue de  $^{18}\text{F}$ -Cho dans des cellules U87 rendues résistantes au cisplatine ou à la doxorubicine. Les auteurs ont également mis en évidence une sur-expression des gènes codant pour les protéines CHT1 et ChoK dans les cellules chimio-résistantes comparées aux cellules parentes U87. Par ailleurs, le lien entre le métabolisme des PtdCho et l'hypoxie a été établi par d'autres chercheurs (Glunde et al., 2008) sur un modèle cellulaire humain de cancer de la prostate (PC-3). Les auteurs montrent que sous hypoxie, la ChoK- $\alpha$  est activée par HIF-1, ce qui se traduit par une augmentation de la PCho intracellulaire.

Pour conforter l'hypothèse selon laquelle le métabolisme des PtdCho et la radiorésistance des GBM seraient liés, nous pouvons souligner le fait que beaucoup d'espoirs sont portés sur l'utilisation d'alkylphospholides en tant qu'anti-cancéreux mais aussi en tant qu'agents radiosensibilisants (Vink et al., 2007) perturbant le métabolisme des PtdCho (van Blitterswijk & Verheij, 2008). Des ALP tels que l'érucylphosphocholine ou l'érucylphosphohomocholine testés *in vitro* sur des modèles cellulaires de GBM (T98G, A172 et U87) induisent des morts cellulaires apoptotiques et nécrotiques radio-induites (Rubel et al., 2006).

## IV. Conclusion et perspectives

La PCho apparaît comme biomarqueur prédictif de la radiorésistance des GBM *in vitro*. Cependant, plusieurs points restent à élucider. Le premier concerne les lignées étudiées et plus particulièrement la lignée U87. En effet, dans le cas des gliomes, il est possible de grader les gliomes de bas et de haut grades, en fonction de leur profil métabolique. Dans le premier cas, le *ratio* GPCho/PCho est supérieur à un alors que, dans le second cas, ce *ratio* est inférieur à un (Sabatier *et al.*, 1999; Lehnhardt *et al.*, 2005; Sabatier *et al.*, 2005). Le *ratio* GPCho/PCho est supérieur à un pour la lignée U87. Cela signifierait donc que cette dernière n'a pas un profil de GBM, mais celui d'un gliome de bas grade. Cette lignée reste cependant une des lignées cellulaires humaines de GBM la plus étudiée dans le monde et est présentée par l'ATCC ([www.lgcstandards-atcc.org/](http://www.lgcstandards-atcc.org/)) comme GBM. Le *ratio* GPCho/PCho comme critère de distinction entre les gliomes de bas et haut grades n'est donc pas infaillible, du moins pour les modèles cellulaires.

L'investigation portant sur le métabolisme des PtdCho dans les cellules de GBM doit être poursuivie. De nombreux arguments laissent supposer un lien entre ce métabolisme et la radiorésistance des GBM (van Blitterswijk & Verheij, 2008). L'étude transcriptomique des gènes (et de leurs isoformes) impliqués dans le métabolisme des PtdCho doit être prolongée, ainsi que celle des gènes appartenant aux groupes GO « Transporteurs d'ions métalliques », « Réplication de l'ADN », « Activité oxydo-réductase » et « Régulation de l'induction de la traduction ».

Une attention particulière doit être portée sur la voie anabolique des PtdCho dans les cellules de GBM, en particulier sur les protéines impliquées dans le transport de la Cho. Actuellement, nous ne savons pas précisément quelle est la contribution de chaque type de transporteurs pour l'incorporation de Cho dans ces types cellulaires. Le recours à des inhibiteurs ciblant les enzymes du métabolisme des PtdCho semble intéressant. L'utilisation des alkylphospholipides (ALP) comme agents radiosensibilisants en sont l'illustration (van Blitterswijk & Verheij, 2008).

Afin de confirmer l'intérêt de la PCho comme biomarqueur de radio-résistance *in vitro*, il serait intéressant d'augmenter le panel de lignées étudiées.

Il faut garder présent à l'esprit que le phénotype radio-résistance pourrait être propre à chaque lignée et peut ne pas être comparable d'une lignée à l'autre. Nous nous sommes bien rendus compte de la difficulté de comparer quatre lignées différentes ayant chacune une morphologie et des caractéristiques moléculaires propres.

Pour cela, nous pourrions nous inspirer des travaux d'une équipe qui a travaillé sur la lignée U87 rendue chimio-résistante (Vanpouille et al., 2009). Nous pourrions étudier les caractéristiques moléculaires des lignées RS (U251 et SF763) rendues radio-résistantes par des expositions régulières aux rayonnements ionisants.

*A contrario*, il serait intéressant d'étudier les perturbations métaboliques de cellules RR radiosensibilisées par des agents chimiothérapeutiques ou par inhibition de protéines impliquées dans les voies de signalisation de la radio-résistance des GBM. Les études qui ont été menées au laboratoire et qui sont présentées dans la partie II de ce manuscrit vont dans ce sens.

Les liens entre radio- et chimio-résistance des GBM d'une part, entre chimio-résistance et métabolisme des PtdCho d'autre part, restent à établir.

Dans le premier cas, il semblerait que la sur-expression du gène MDR1 (*Multidrug resistance 1*), codant pour la protéine Pgp impliquée dans le phénomène de résistance multi-médicaments (MDR) des GBM, confère une radio-résistance accrue aux cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 et aux cellules souches hématopoïétiques humaines CD34<sup>+</sup> (Maier et al., 2006; Maier et al., 2008).

*A contrario*, la sur-expression de HIF-1 $\alpha$  augmente la chimio-résistance des cellules cancéreuses épidermoïdes (Sasabe et al., 2007).



En ce qui concerne le lien possible entre la chimio-résistance des GBM et le métabolisme des PtdCho, Vanpouille et ses collaborateurs ont montré que les cellules U87 rendues chimiorésistantes au cisplatine ou à la doxorubicine sur-expriment les protéines Pgp et/ou MRP1, tandis que le métabolisme des PtdCho est accru (Vanpouille et al., 2009). Alors qu'une équipe de chercheurs (Carrella et al., 1999) a montré une corrélation entre la sur-expression du gène MRP2 codant pour la protéine Pgp et une augmentation de la biosynthèse des PtdCho dans la vésicule biliaire du rat, plusieurs études suggèrent que la Pgp possède une activité translocase des phospholipides au niveau membranaire (Romsicki & Sharom, 2001; Eckford & Sharom, 2005).

Enfin, l'étude de biopsies de GBM devra être réalisée afin de vérifier la corrélation entre l'augmentation de la PCho dans plusieurs régions tumorales et la durée de survie des malades. Par ailleurs, une investigation plus approfondie devra être menée sur les zones de récurrences tumorales suspectées d'être le siège de cellules souches cancéreuses connues pour être radiorésistantes (Kanu et al., 2009). Le lien entre ces zones de récurrence et une augmentation de tCho a déjà été établi par  $^1\text{H}$  SRM par plusieurs équipes (Park *et al.*, 2007; Laprie, 2009).

***Chapitre III - Partie II :***  
***Recherche de biomarqueurs***  
***de mort radio-induite dans***  
***une lignée cellulaire humaine***  
***radiosensibilisée (Projets FTI-***  
***277, Y, URB14 et KILK2).***

## I. Projet FTI-277

### I.1. Présentation du projet

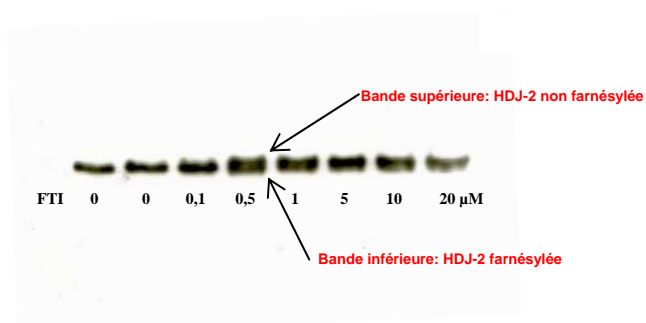
Le projet a porté sur l'étude des perturbations métaboliques à long terme (quatre à six jours après irradiation) occasionnées par la présence d'un radiosensibilisateur qui est un inhibiteur de la farnésyltransférase, le FTI-277, sur la lignée radiorésistante U87, avant et après une irradiation de 2 Gy. Pour cette étude, quatre conditions ont été considérées : U87 contrôles (témoins), U87 traitées (U87-FTI), U87 irradiées (U87-2Gy) et U87 traitées et irradiées (U87-FTI/2Gy).

Nous avons supposé que l'utilisation d'un agent radiosensibilisant sur des cellules radiorésistantes entraînerait une modification métabolique des cellules leur conférant un profil métabolique de cellules radiosensibles, comme observé dans le projet RR vs RS. Une attention particulière a ainsi été accordée aux composés à choline, PCho et GPCCho.

### I.2. Contrôle de l'inhibition de la farnésyltransférase par WB

L'inhibition de la farnésyltransférase a été vérifiée en observant l'altération de la farnésylation de la protéine HDJ-2 par *Western-Blot* (WB). La protéine HDJ-2 farnésylée est apparue sur la membrane à un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Au-delà d'une concentration de 0,5  $\mu\text{M}$  en FTI-277, une deuxième bande est apparue au-dessus de la première, correspondant à la forme non-farnésylée d'HDJ-2. Cette deuxième bande s'est substituée à la première pour des concentrations supérieures à 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 45).

Nous avons donc utilisé la dose de 10  $\mu\text{M}$  pour le traitement des cellules, comme cela avait été décrit précédemment (Maity *et al.*, 2000).



**Figure 45. Vérification par *Western-Blot* de l'inhibition de la farnésyltransférase sur la protéine HDJ-2 (poids moléculaire ~ 50 kDa).**

### I.3. Etude métabolomique

Pour cette étude, les quatre conditions considérées : témoins, U87-FTI, U87-2Gy et U87-FTI/2Gy ont été comparées deux à deux. Le nombre d'individus est respectivement de : 8, 7, 8 et 8. Les comparaisons considérées sont les suivantes :

- **Comparaison 1** : témoins vs U87-FTI ;
- **Comparaison 2** : témoins vs U87-2Gy ;
- **Comparaison 3** : U87-2Gy vs U87-FTI/2Gy ;
- **Comparaison 4** : témoins vs U87-FTI/2Gy.

La première comparaison permet de mettre en évidence les métabolites qui varient de manière significative après traitement des cellules au FTI-277. La seconde comparaison permet de vérifier l'influence de l'irradiation sur le profil métabolique des cellules. La troisième comparaison montre les métabolites qui varient de manière significative après traitement des cellules au FTI-277 et irradiation. En effet, en comparant les items 1 et 3, nous pouvons vérifier si l'association irradiation plus traitement a un effet antagoniste, cumulé ou synergique sur les variations métaboliques. Enfin, la comparaison 4 est effectuée en tenant compte des comparaisons 1 et 3. En effet, les éventuelles variations métaboliques observées peuvent être aussi bien dues au FTI, aux rayonnements ionisants (RI) ou à l'association des deux.

Le détail de la procédure d'analyses statistiques adoptée au sein de l'équipe sera décrit explicitement pour la comparaison 1 uniquement.

#### I.3.1. Attribution spectrale et *bucketing*

L'attribution spectrale a été effectuée au préalable à partir des bases de données métaboliques dont nous disposons pour chaque lignée cellulaire de GBM (voir partie Matériel et méthodes). La liste des *buckets* (ou variables, notées var.) considérés (numéros de variables, déplacements chimiques et attributions) dans cette étude est décrite dans le tableau 23.

**Tableau 23. Liste des *buckets* (numéros de variables, déplacements chimiques et attributions) pour l'étude métabolomique du projet FTI-277.**

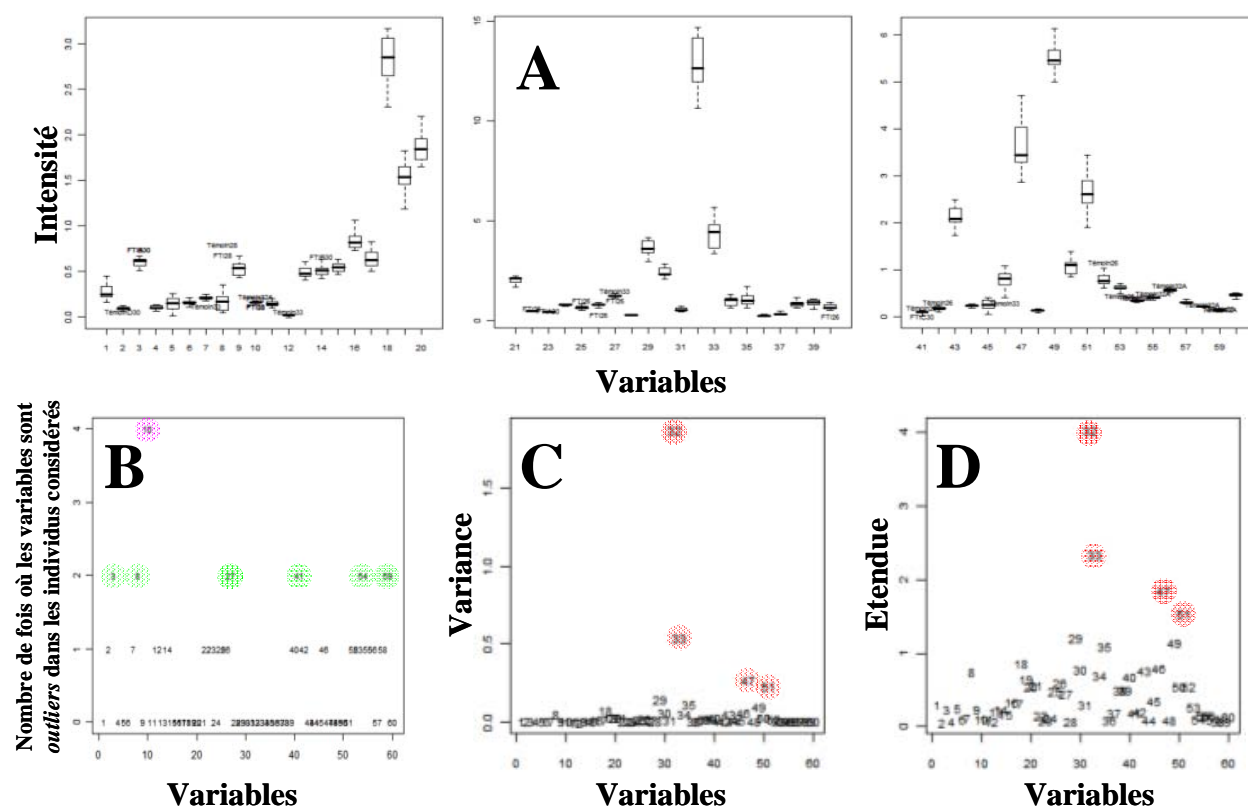
N°	$\delta$ (ppm)	attribution	N°	$\delta$ (ppm)	attribution
1	8.458595 8.448595	AXP	31	3.378448 3.369448	Gly+Gln
2	8.379593 8.370593	?	32	3.243444 3.229444	GPCho
3	8.283590 8.268590	AXP	33	3.229444 3.215443	PCho
4	8.165587 8.156586	?	34	3.215443 3.200443	Cho
5	7.796576 7.767575	?	35	3.085440 3.074439	Tau
6	7.735574 7.720574	?	36	3.048438 3.043438	PCr
7	7.715574 7.698573	UDP	37	3.043438 3.036438	Cr
8	7.689573 7.677572	UXP	38	3.003437 2.952436	GSH_ox
9	7.404565 7.283561	Phe	39	2.952436 2.892434	GSH_red
10	7.127557 7.094556	Tyr	40	2.837432 2.773430	GSH_red
11	6.791547 6.759546	Tyr	41	2.773430 2.754430	Asp
12	6.523539 6.518539	Fum	42	2.735429 2.714429	Asp
13	6.178529 6.150528	AXP	43	2.498423 2.411420	GSH_ox+red
14	5.996524 5.973523	?	44	2.411420 2.399420	Succ+GSH_ox+red
15	5.901521 5.869520	UDP	45	2.399420 2.383419	?
16	4.516481 4.465479	UDP	46	2.369419 2.317417	Gln
17	4.445479 4.396477	AXP	47	2.309417 2.249415	Glu
18	4.361476 4.303475	GPCho	48	2.131412 2.122412	Met
19	4.303475 4.254473	GSH_red	49	2.058410 1.923406	GSH+Glu+Gln
20	4.254473 4.193472	AXP+UXP	50	1.905405 1.849404	GSH+Glu+Gln
21	4.193472 4.127470	PCho	51	1.394391 1.359390	Ala
22	4.127470 4.097469	Lac	52	1.344389 1.315388	Lac
23	3.955465 3.947464	PCr	53	1.231386 1.211385	Thr
24	3.939464 3.927464	Cr	54	1.001379 0.978379	Val
25	3.793460 3.783460	GSH_ox	55	0.978379 0.956378	Ile
26	3.783460 3.775460	GSH_red	56	0.956378 0.937377	Leu
27	3.775460 3.764459	GSH_ox+red	57	0.937377 0.929377	Val+Ile
28	3.732458 3.724458	Asp+GSH_ox+red	58	0.929377 0.921377	Leu
29	3.705457 3.668456	GPCho	59	0.921377 0.917377	Val
30	3.514452 3.463450	Glu	60	0.917377 0.892376	Ile

« ? » signifie que la variable n'a pas été attribuée.

### I.3.2. Comparaison 1 : témoins vs U87-FTI

#### I.3.2.1. Analyse univariée non supervisée

L'analyse univariée non supervisée des 60 variables considérées indistinctement pour les deux conditions a pour but de trouver les variables susceptibles d'être *outliers*, celles qui présentent une forte variance et/ou une forte étendue (Fig. 46), et enfin le nombre de variables *outliers* par individu donné (Fig. 47).



**Figure 46. Résultats en analyse univariée non supervisée : (A) Box plots des 60 variables, (B) Nombre de fois où les variables sont *outliers* dans les quinze individus considérés, (C) variance et (D) étendue de chaque variable.**

La figure 46B montre que la **variable 10** (Tyr) est *outlier* dans quatre individus sur quinze (27%). Elle devra donc être considérée avec attention si elle apparaît plus tard comme variable discriminante dans les analyses multivariées. De la même façon, les **variables 3, 8, 27, 41, 54** et **59** sont *outliers* dans deux individus sur quinze (13%). Les **variables 32** (GPCho), **33** (PCho), **47** (Glu) et **51** (Ala) ont une variance (Fig. 46C) et une étendue (Fig 46D) élevées par rapport à celles des autres variables. Si leur variance est principalement due à une hétérogénéité intra-condition, il sera nécessaire de normaliser les données en les divisant par leur variance (*UV scaling*) pour les analyses multivariées.

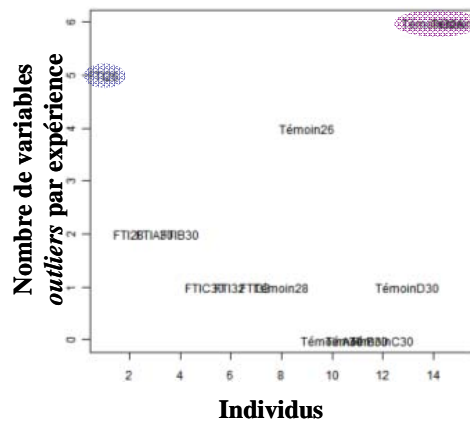


Figure 47. Résultat en analyse univariée non supervisée : nombre de variables *outliers* pour chaque individu.

La figure 47 montre que six variables (10%) sont *outliers* dans les **individus témoin32A** et **témoin33**, alors que cinq (9%) le sont dans l'**individu FTI26**. Les individus devront être considérés avec attention par la suite.

### I.3.2.2. Analyse multivariée non supervisée

L'analyse multivariée non supervisée en ACP, avec ou sans UV, montre : (i) la présence ou non d'individus *outliers* dans les groupes analysés séparément (ACP-Class, Fig. 48) et (ii) lorsque les deux groupes sont considérés ensemble (ACP-X, Fig. 49), leur éventuelle séparation en fonction des variances de leurs variables.

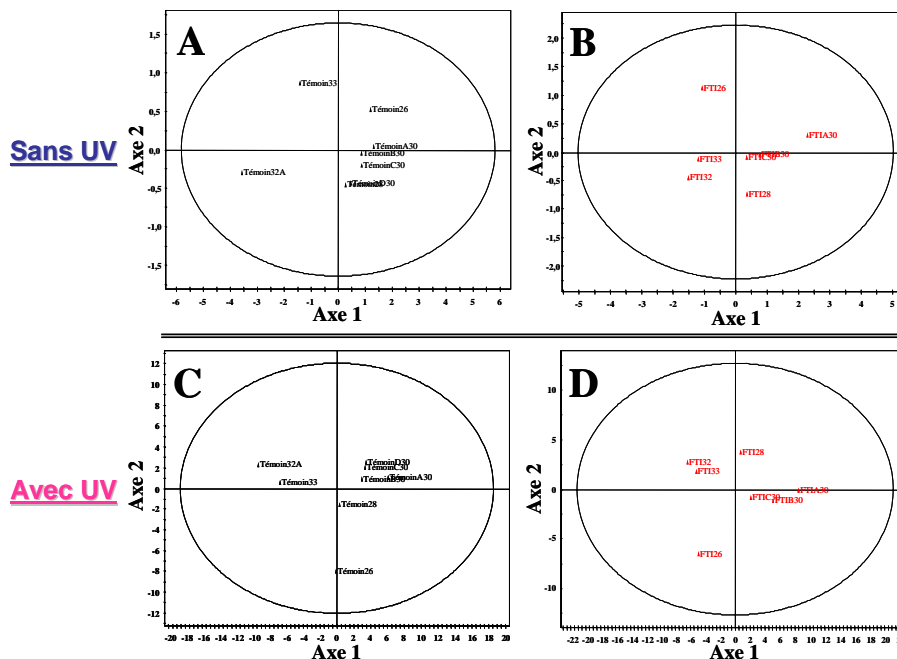
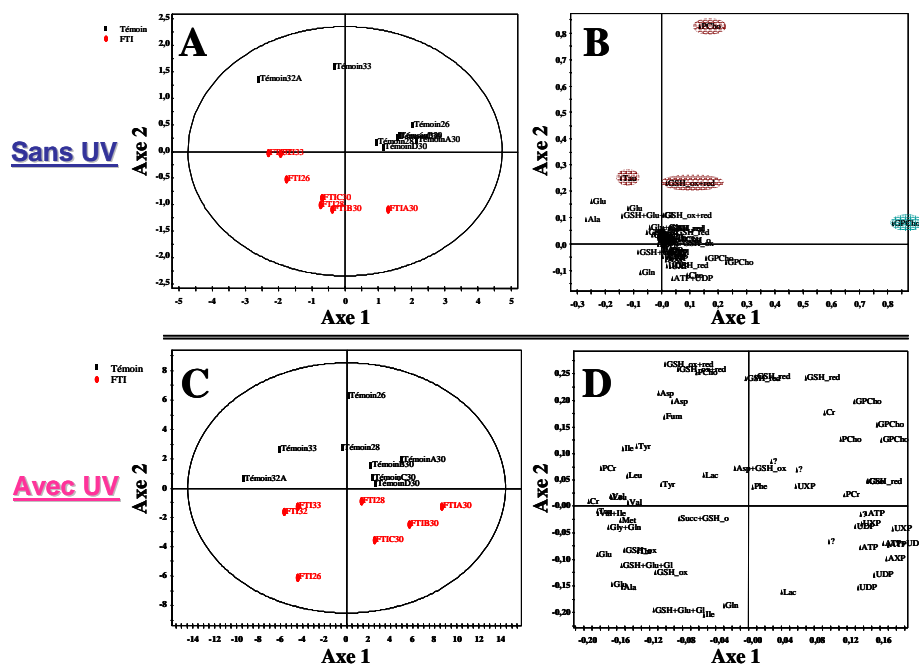


Figure 48. *Score plots* des ACP-Class : groupe témoins sans (A) et avec (C) UV ; groupe U87-FTI sans (B) et avec (D) UV.



**Figure 49. Résultats en ACP-X : Score plot sans (A) et avec (C) UV ; Loading plot sans (B) et avec (D) UV.**

La figure 48 confirme que les deux groupes étudiés (témoins et U87-FTI) sont homogènes, avec et sans UV. Les individus témoin32A et témoin33 se détachent légèrement, mais restent néanmoins dans la sphère de confiance (Figs. 48A et C) et ne doivent donc pas être considérés comme *outliers*. Il en est de même pour l'individu FTI26 (Figs. 48B et D).

Les figures 49A et 49C montrent une séparation des deux groupes suivant l'axe 2, avec et sans UV. Sans UV, cette séparation est principalement imputable à la **variable PCho** (var. 33) et, dans une moindre mesure, aux **variables GSH\_ox+red** (var. 43) et **Tau** (var. 35) (Fig. 49B). En revanche, la forte variance de la **variable GPCho** (var. 32) selon l'axe 1 montre l'hétérogénéité intra-groupe de ce métabolite.

Lorsque les données sont normalisées en UV, les variables possédant une forte variance (GPCho, PCho...) voient leur poids diminué pour la séparation des groupes (Fig. 49D). Cela entraîne un regroupement des individus selon l'axe 1, mais une moins nette séparation selon l'axe 2. En effet, le poids de la variable PCho (var. 33) est atténué avec cette procédure. Pour cette comparaison, l'analyse multivariée non supervisée des données en UV n'est donc pas nécessaire.



### I.3.2.3. Analyse univariée supervisée

L'analyse univariée supervisée a pour but d'identifier les variables significativement discriminantes selon le test de Welch ( $p < 0,05$ ), en tenant compte de l'allure des *box plots* et des *violin plots* par niveau et de la distribution intra-groupe de leurs valeurs. En effet, pour que deux groupes de données soient comparables selon le test de Welch, leur distribution doit être normale. Seules les variables identifiées et correspondant au signal d'un seul métabolite seront considérées.

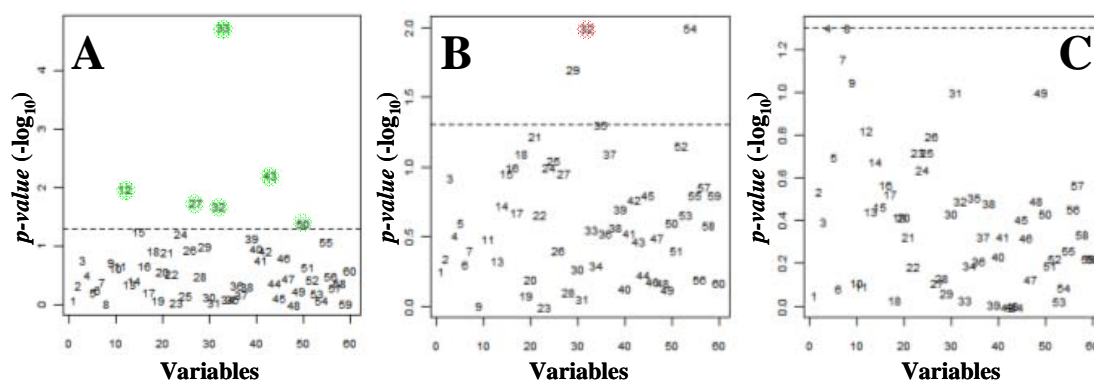


Figure 50. Résultats en analyse univariée supervisée : (A) test de Welch ; tests de normalité du groupe témoins (B) et du groupe U87-FTI (C).

Selon les résultats de la figure 50A, les **variables 12** (Fum), **27** (GSH\_ox+red), **32** (GPCho), **33** (PCho), **43** (GSH\_ox+red) et **50** (GSH+Glu+Gln) (cette dernière n'étant pas considérée car non attribuée à un seul métabolite) ont une *p-value* inférieure à 0,05. Cependant, la **variable 32** (GPCho) ne suit pas une loi normale pour le groupe témoin (Fig. 50B). Cette variable doit donc être considérée avec précaution.

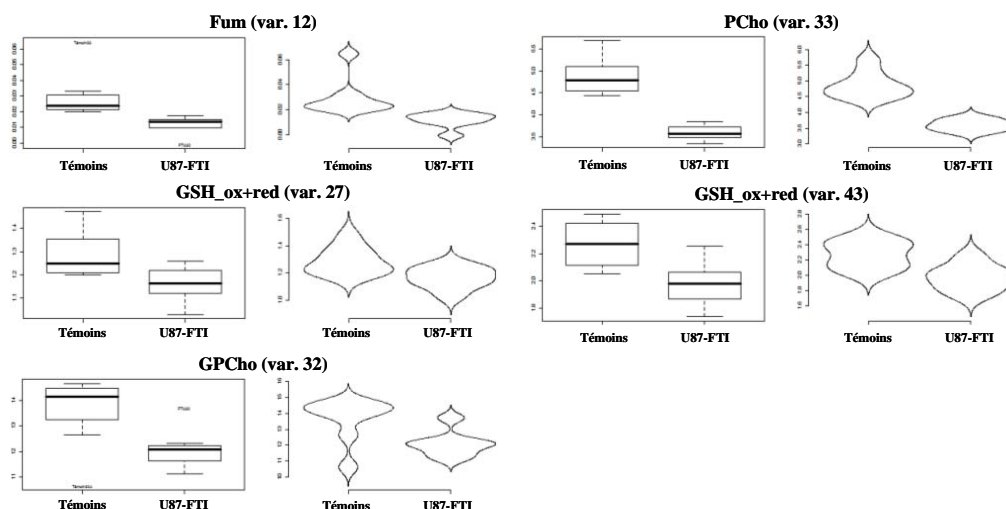


Figure 51. *Box plots* et *violin plots* par niveau des variables significativement discriminantes ( $p < 0,05$ ) entre les groupes témoins et U87-FTI.

D'après les *box plots* et *violin plots* (Fig. 51), seules les variables GPCho (var. 32) et PCho (var. 33) sont véritablement discriminantes. La variable Fum (var. 12) correspondant à un signal très affecté par le bruit de fond sur les spectres RMN ne sera plus considérée par la suite. Les variables 27 et 43 (GSH\_ox+red) ont tendance à être plus élevées dans les individus témoins, mais les *violin plots* montrent qu'il y a un recouvrement dans leur distribution entre les deux groupes. La variable GPCho est néanmoins *outlier* dans deux individus (témoin32A et FTIA30). Si l'on ne tenait pas compte de ces deux individus, ses *violin plots* seraient bien différenciés et les valeurs de cette variable dans le groupe témoins tendraient vers une distribution normale. Nous conserverons cependant ces deux individus dans la suite de l'analyse. La variable PCho suit quant à elle une distribution normale dans les deux groupes et il n'y pas de chevauchement entre les deux *violin plots*.

### I.3.2.4. Analyse multivariée supervisée

La PLS-DA est une méthode d'analyse multivariée supervisée qui prend en compte la connaissance préalable des groupes étudiés afin d'en optimiser la séparation.

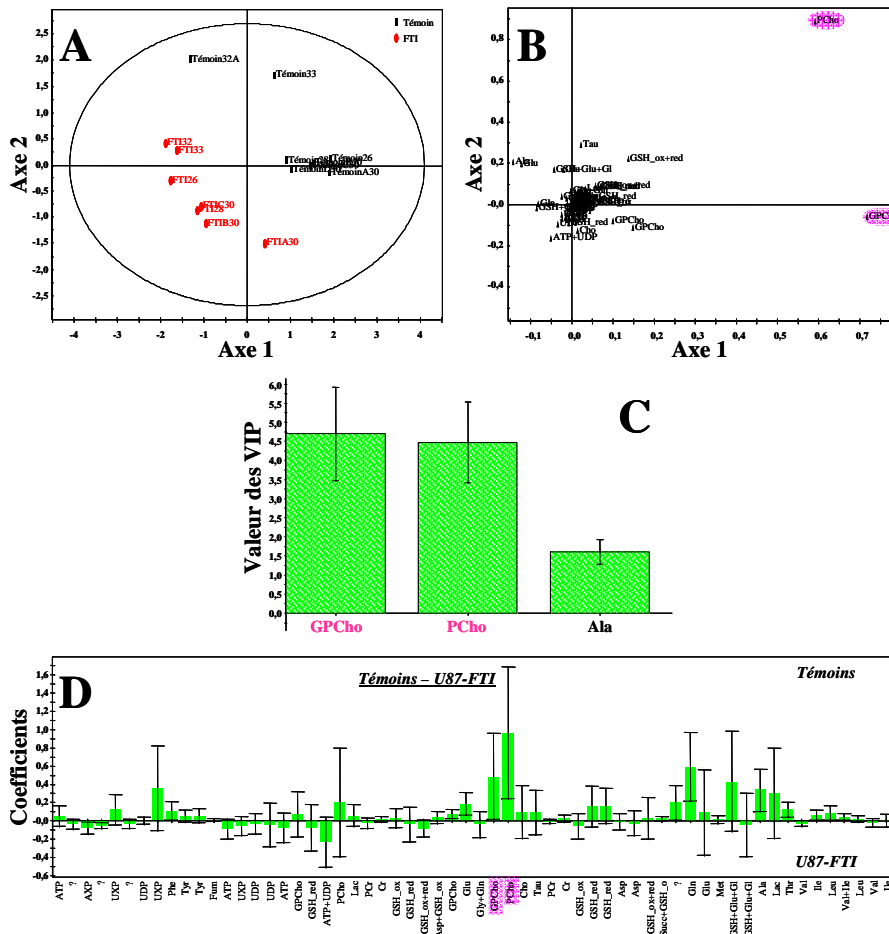


Figure 52. Résultats de l'analyse multivariée supervisée (PLS-DA sans UV) de la comparaison « témoins vs U87-FTI » : (A) *Score plot*, (B) *Loading plot*, (C) *VIP plot* et (D) *Coefficient plot* (Témoins – U87-FTI).

Les résultats de la PLS-DA de la figure 52 sont les suivants : nombre d'axes : 4 ;  $R^2X = 0,927$  ;  $R^2Y = 0,989$  ;  $Q^2 = 0,922$  ;  $CV\text{-ANOVA} = 5.10^{-3}$ .

La qualité du modèle prédictif est attestée par la valeur du  $Q^2$  proche de 1 et la valeur élevée du  $R^2Y$ . Le *score plot* (Fig. 52A) montre une bonne séparation des groupes témoins et U87-FTI. Cette discrimination est principalement due aux variables GPCho (var. 32) et PCho (var. 33) (Fig. 52B). La contribution de ces deux variables à la construction du modèle est confirmée par les valeurs élevées de leur VIP (Fig. 52C). Les histogrammes du *coefficient plot* confirment que les concentrations de ces métabolites sont significativement plus élevées dans les individus témoins. En effet, leur écart-type ne coupe pas l'axe des abscisses (Fig. 52D). Les variables 43 et 27 (GSH\_ox+red) ne ressortent pas sur le *coefficient plot* de la PLS-DA, ce qui signifie que leur impact dans la séparation des deux groupes est mineur.

### I.3.2.5. Bilan

Compte-tenu des différentes analyses statistiques reportées ci-dessus, seuls les métabolites PCho et GPCho permettent de discriminer les deux groupes témoins et U87-FTI.

Le tableau 24 regroupe les *p-values* (test de Welch) et les pourcentages de variation des métabolites PCho, GPCho et GSH\_ox+red obtenus en comparant leurs valeurs moyennes dans les individus U87-FTI par rapport à celles des témoins.

**Tableau 24. Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants dans la comparaison « témoins vs U87-FTI » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).**

Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre variable	Intervenant dans la construction du modèle
PCho (var. 33)	$1,80.10^{-5}$	$-26 \pm 4\%$	-	Oui
GSH_ox+red (var. 43)	$6,07.10^{-3}$	$-13 \pm 8\%$	var. 27	-
GPCho (var. 32)	$2,04.10^{-2}$	$-11 \pm 6\%$	-	Oui

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs moyennes des individus U87-FTI par rapport à celles des individus témoins.

### I.3.3. Comparaison 2 : témoins vs U87-2Gy

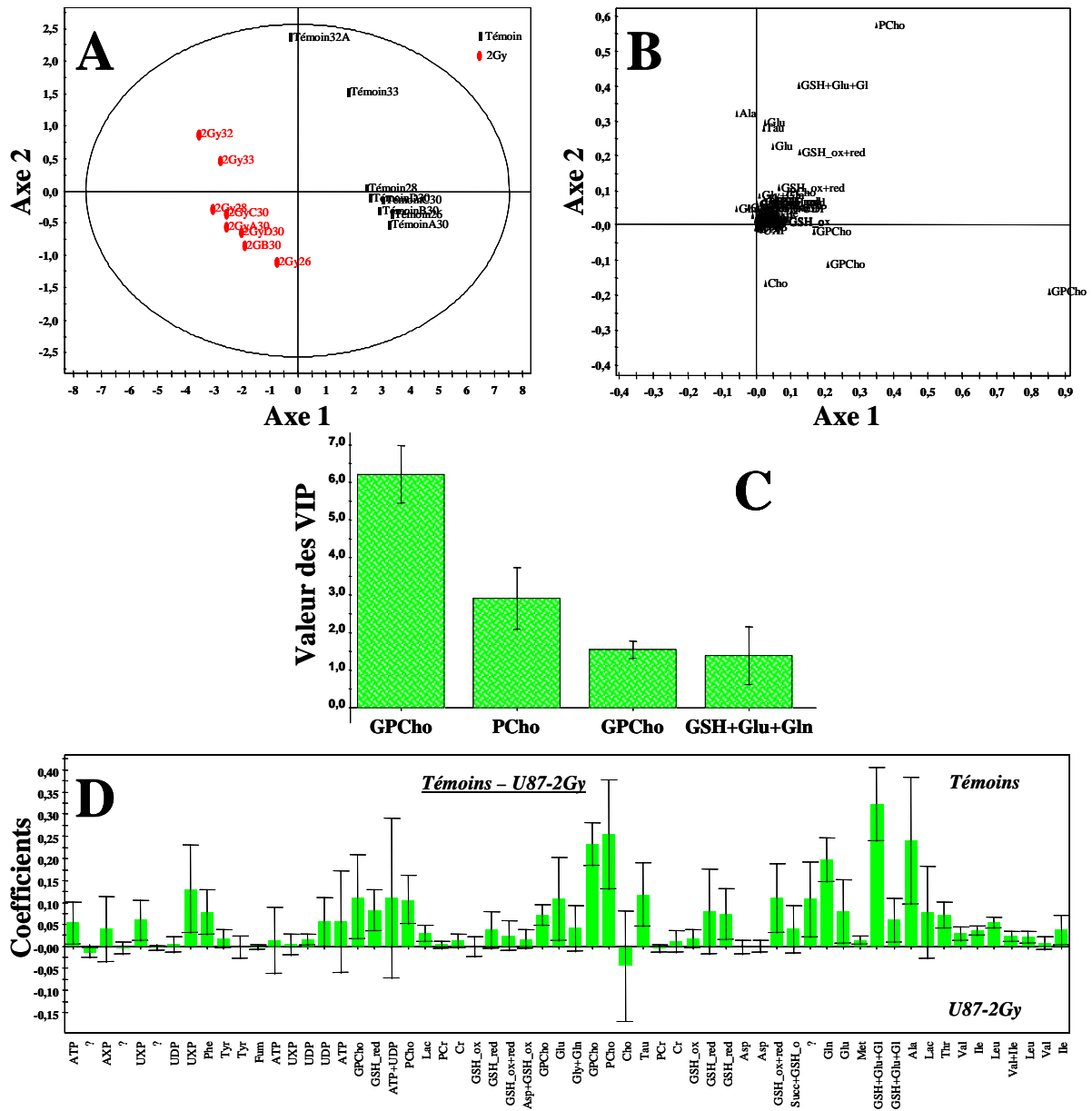
La même procédure que pour la comparaison 1 a été adoptée. Elle ne sera pas détaillée et seuls les principaux résultats seront présentés.

L'irradiation des cellules modifie très fortement leur métabolisme. Trente-sept variables possèdent une *p-value* significativement différente ( $p < 0,05$ ) entre les deux groupes étudiés (Tab. 25).

De plus, la concentration de la quasi-totalité des métabolites est inférieure dans le groupe irradié (Fig. 53D).

**Tableau 25. Liste (ordre décroissant) des variables possédant une *p-value* significative ( $p < 0,05$ ) entre les groupes témoins et U87-2Gy.**

N°	Variable	<i>p-value</i>	N°	Variable	<i>p-value</i>	N°	Variable	<i>p-value</i>
21	PCho	1,24E-09	15	UXP	7,89E-04	58	Leu	1,01E-02
24	Cr	3,74E-07	10	Tyr	1,04E-03	25	GSH_ox	1,17E-02
33	PCho	6,69E-07	49	GSH+Glu+Gln	1,12E-03	6	?	1,51E-02
43	GSH_ox+red	3,57E-06	40	GSH_red	1,73E-03	9	Phe	1,55E-02
19	GSH_red	4,67E-06	39	GSH_red	1,80E-03	13	AXP	1,69E-02
27	GSH_ox+red	6,60E-06	55	Ile	2,25E-03	12	Fum	1,77E-02
32	GPCho	1,28E-05	56	Leu	2,75E-03	46	Gln	1,83E-02
18	GPCho	2,37E-05	20	AXP+UXP	2,84E-03	30	Glu	3,78E-02
26	GSH_red	2,51E-05	3	?	3,08E-03	17	AXP	3,92E-02
28	Asp+GSH_ox+red	7,15E-05	53	Thr	4,02E-03	60	Ile	4,58E-02
29	GPCho	9,42E-05	57	Val+Ile	4,18E-03	22	Lac	4,95E-02
16	UXP	1,42E-04	14	?	5,82E-03			
23	PCr	3,27E-04	42	Asp	8,67E-03			



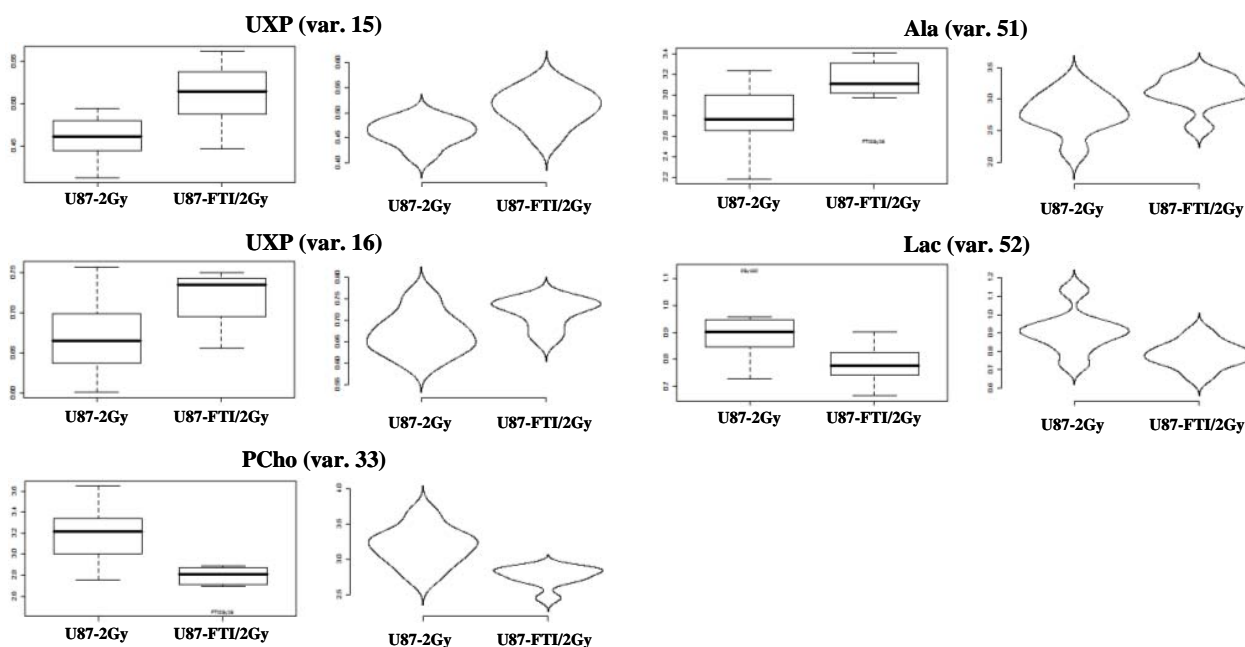
**Figure 53. Résultats en analyse multivariée supervisée (PLS-DA sans UV) de la comparaison « témoins vs U87-2Gy » : (A) Score plot, (B) Loading plot, (C) VIP plot et (D) Coefficient plot (Témoins – U87-2Gy)**

Les résultats en analyse multivariée non supervisée avec et sans UV ont déjà montré qu'il est facilement possible de distinguer sans *a priori* les individus non irradiés et irradiés. Les résultats de l'analyse multivariée supervisée en PLS-DA sans UV présentés dans la figure 53 ont confirmé la qualité du modèle (3 axes,  $R^2X = 0,967$ ,  $R^2Y = 0,997$ ,  $Q^2 = 0,991$ , CV-ANOVA =  $6,8 \cdot 10^{-8}$ ). Les variables GPCho (var. 29 et 32) et PCho (var. 33) contribuent fortement à la construction du modèle.

Néanmoins, nous ne tirerons aucune conclusion de cette comparaison.

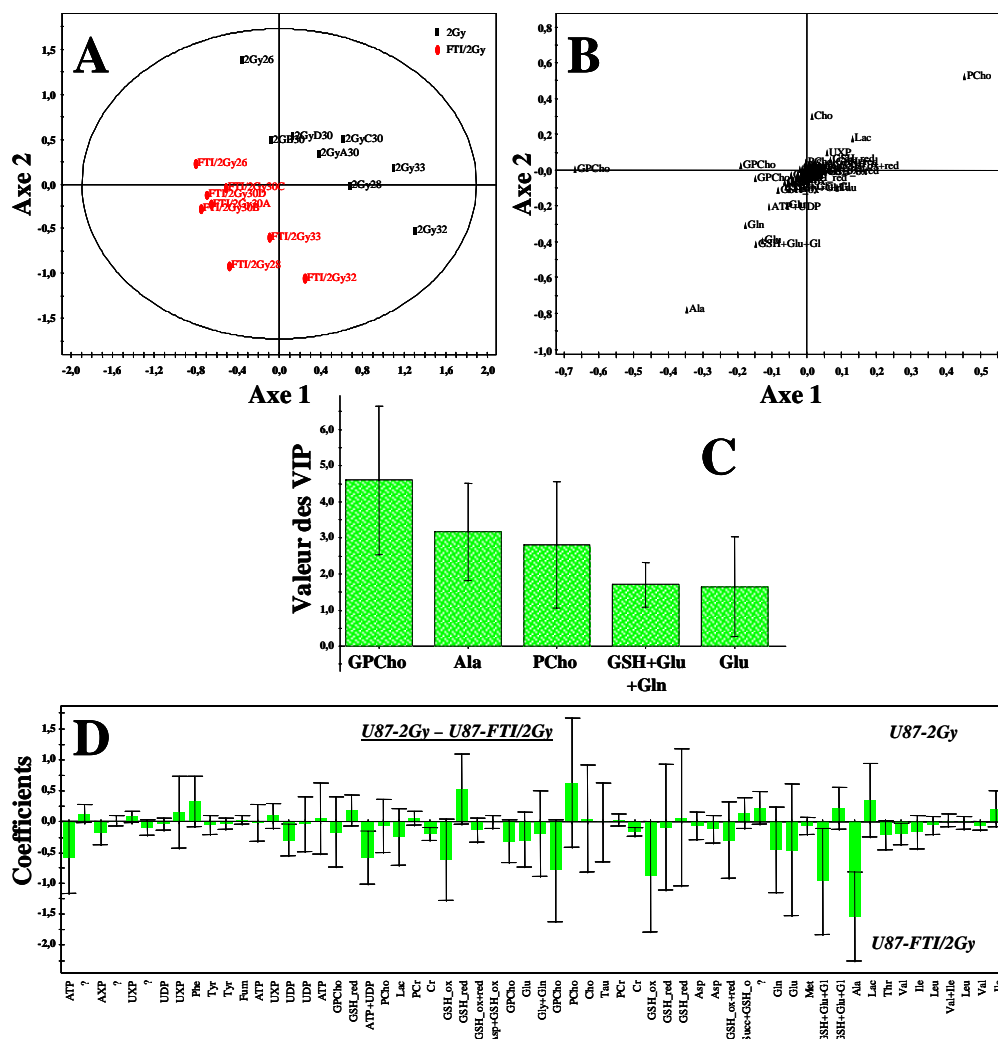
### I.3.4. Comparaison 3 : U87-2Gy vs U87-FTI/2Gy

Les variables, classées dans l'ordre décroissant, 33 (PCho), 15 (UXP), 52 (Lac), 24 (Cr), 16 (UXP), 51 (Ala) et 20 (AXP+UXP) sont significativement discriminantes ( $p < 0,05$ ). Les var. 24 et 20 n'ont pas été considérées par la suite. La première ne correspond pas au signal de la Cr le mieux résolu sur le spectre et n'est pas confirmée par l'autre signal de la Cr sur le spectre (var. 37). La seconde n'est pas spécifique d'un seul métabolite : elle confirme néanmoins le caractère discriminant d'UXP. L'allure des *box plots* et *violin plots* par niveau des variables 33 (PCho), 15 et 16 (UXP), 52 (Lac) et 51 (Ala) confirment les résultats du test de Welch (Fig. 54).



**Figure 54. Box plots et violin plots par niveau des variables significativement discriminantes ( $p < 0,05$ ) entre les groupes U87-2Gy et U87-FTI/2Gy.**

Le modèle obtenu en PLS-DA sans UV est prédictif (Fig. 55) : 4 axes,  $R^2X = 0,884$ ,  $R^2Y = 0,986$ ,  $Q^2 = 0,929$ ,  $CV\text{-ANOVA} = 3,05 \cdot 10^{-3}$ . Les variables GPCho (32), PCho (33) et Ala (51) contribuent fortement à la construction du modèle, bien que GPCho ne soit pas discriminant. Le *coefficient plot* confirme que l'Ala est plus important dans les individus U87-FTI/2Gy.



**Figure 55.** Résultats en analyse multivariée supervisée (PLS-DA sans UV) de la comparaison « U87-2Gy vs U87-FTI/2Gy » : (A) *Score plot*, (B) *Loading plot*, (C) *VIP plot* et (D) *Coefficient plot* (U87-2Gy – U87-FTI/2Gy).

Le tableau 26 regroupe les métabolites discriminants dans la comparaison « U87-2Gy vs U87-FTI/2Gy ».

**Tableau 26.** Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants dans la comparaison « U87-2Gy vs U87-FTI/2Gy » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).

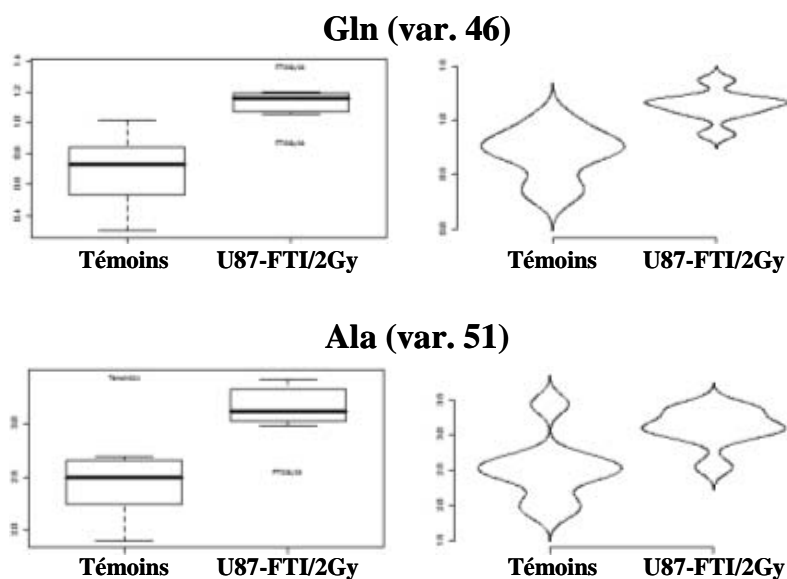
Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre variable	Intervient dans la construction du modèle
PCho (var. 15)	$2,80 \cdot 10^{-3}$	$-13 \pm 5\%$	-	Oui
UXP (var. 15)	$7,16 \cdot 10^{-3}$	$+11 \pm 8\%$	var. 16	-
Lac (var. 52)	$2,52 \cdot 10^{-2}$	$-14 \pm 8\%$	-	-
Ala (var. 51)	$4,54 \cdot 10^{-2}$	$+12 \pm 10\%$	-	Oui

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs moyennes des individus U87-FTI/2Gy par rapport à celles des individus U87-2Gy.

### I.3.5. Comparaison 4 : témoins vs U87-FTI/2Gy

Comme pour la comparaison 2, il est très difficile de tirer un quelconque résultat de cette comparaison. En effet, les individus U87-FTI/2Gy (traités et irradiés) ont globalement une valeur de leurs variables inférieures à celles des individus témoins. Trente-quatre variables possèdent une valeur de leur *p-value* significativement différente ( $p < 0,05$ ) entre les deux groupes étudiés. Les variables PCho (33), GSH\_ox+red (43) et GPCho (32) ont des valeurs de *p-value* inférieures à  $10^{-4}$ .

Notons par ailleurs que des variables autres que PCho (var. 33), GPCho (var. 32) ou GSH (var. 43) observées dans les comparaisons précédentes sont significativement plus élevées dans les individus U87-FTI/2Gy par rapport aux individus témoins (Fig. 56). C'est le cas des variables Ala (51) et Gln (46) dont les valeurs de *p-values* sont respectivement de  $8,92 \cdot 10^{-3}$  et  $6,85 \cdot 10^{-4}$ . L'allure de leurs *box plots* et *violin plots* par niveau confirment leur caractère discriminant.



**Figure 56. Box plots et violin plots des variables significativement discriminantes Gln (46) et Ala (51) entre les groupes témoins et U87-FTI/2Gy.**

Le modèle obtenu en PLS-DA sans UV est prédictif : 3 axes,  $R^2X = 0,967$ ,  $R^2Y = 0,997$ ,  $Q^2 = 0,987$ ,  $CV\text{-ANOVA} = 4,4 \cdot 10^{-7}$  et les variables PCho (33) et GPCho (32) contribuent principalement à la séparation des deux groupes et à la construction du modèle. Les résultats de la PLS-DA pour cette comparaison ne sont pas présentés, compte tenu du fait qu'ils sont liés à l'irradiation des cellules et qu'ils n'apportent pas d'information supplémentaire par rapport aux résultats de la comparaison 2 (Fig. 55).



### I.3.6. Interprétation

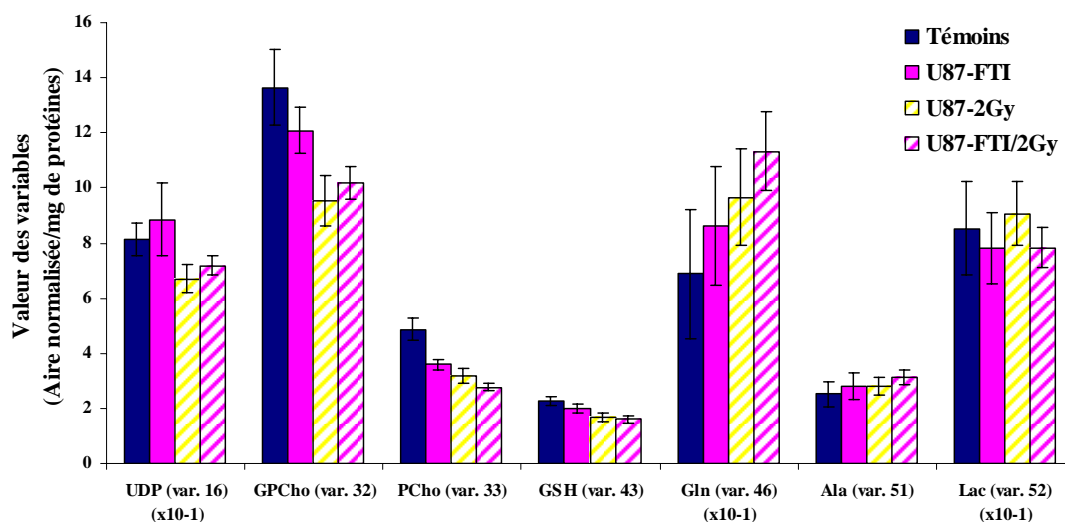
Afin de pouvoir observer l'impact de l'association irradiation plus traitement au FTI-277 sur le profil métabolique des cellules U87, nous avons comparé les variations métaboliques entre les individus témoins et U87-FTI d'une part (comparaison 1) et les variations métaboliques entre les individus U87-2Gy et U87-FTI/2Gy d'autre part (comparaison 3). Nous avons par ailleurs observé que les variables Ala (51) et Gln (46) sont plus importantes dans les individus U87-FTI/2Gy, comparés aux individus Témoins (Fig. 56).

Nous avons ainsi pu sélectionner des variables discriminantes que nous avons quantifiées dans les quatre groupes (Tab. 27). Pour un individu d'un groupe donné, chaque variable est exprimée en «  $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines ». L'aire normalisée  $A_{\text{normalisée}}$  correspond à l'aire de chaque variable divisée par l'aire du signal du TSP, puis divisée par la somme des aires des variables de l'individu considéré et enfin multipliée par la moyenne des sommes des aires des variables des individus appartenant à un groupe donné. Pour plus de précision sur la méthodologie de traitement des données, voir le paragraphe II.3.7. de la partie Matériel et Méthodes.

**Tableau 27. Valeurs des variables discriminantes des comparaisons 1 et 3 dans les quatre conditions et  $p$ -values de ces variables entre les groupes U87-FTI/2Gy et Témoins.**

Variable		Moyenne ( $\pm$ SD) des variables dans les quatre conditions (en $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines)				Comparaison entre les conditions U87-FTI /2Gy et Témoins	
N°	Métabolite	Témoins	U87-FTI	U87-2Gy	U87-FTI/2Gy	$p$ -value (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)
16	UXP ( $\times 10^{-1}$ )	8,13 $\pm$ 0,59	8,86 $\pm$ 1,34	6,70 $\pm$ 0,50	7,19 $\pm$ 0,34	<b>2,41.10<sup>-3</sup></b>	<b>-12 <math>\pm</math> 4%</b>
27	GSH	1,29 $\pm$ 0,10	1,11 $\pm$ 0,08	0,97 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,07	<b>2,42.10<sup>-6</sup></b>	<b>-27 <math>\pm</math> 6%</b>
32	GPCCho	13,64 $\pm$ 1,37	12,09 $\pm$ 0,83	9,55 $\pm$ 0,92	10,17 $\pm$ 0,59	<b>8,11.10<sup>-5</sup></b>	<b>-25 <math>\pm</math> 4%</b>
33	PCho	4,87 $\pm$ 0,42	3,59 $\pm$ 0,18	3,19 $\pm$ 0,28	2,76 $\pm$ 0,14	<b>4,93.10<sup>-7</sup></b>	<b>-43 <math>\pm</math> 3%</b>
43	GSH	2,27 $\pm$ 0,17	1,98 $\pm$ 0,17	1,67 $\pm$ 0,15	1,59 $\pm$ 0,12	<b>6,75.10<sup>-7</sup></b>	<b>-30 <math>\pm</math> 6%</b>
46	Gln ( $\times 10^{-1}$ )	6,88 $\pm$ 2,35	8,63 $\pm$ 2,15	9,67 $\pm$ 1,74	11,34 $\pm$ 1,41	<b>6,85.10<sup>-4</sup></b>	<b>+65 <math>\pm</math> 21%</b>
51	Ala	2,51 $\pm$ 0,46	2,82 $\pm$ 0,49	2,78 $\pm$ 0,32	3,11 $\pm$ 0,27	<b>8,92.10<sup>-3</sup></b>	<b>+24 <math>\pm</math> 11%</b>
52	Lac ( $\times 10^{-1}$ )	8,52 $\pm$ 1,69	7,81 $\pm$ 1,30	9,07 $\pm$ 1,17	7,83 $\pm$ 0,71	<b>3,08.10<sup>-1</sup></b>	<b>-8 <math>\pm</math> 8%</b>

Afin de faciliter l'interprétation du tableau 27, les valeurs sont représentées sous forme d'histogrammes dans la figure 57. Le métabolite GSH\_ox+red (ou GSH, var. 27 et 43) n'a été représenté qu'une seule fois (var. 43).



**Figure 57. Valeurs des variables sélectionnées (en Aire normalisée/mg de protéines) dans les individus témoins, U87-FTI, U87-2Gy et U87-FTI/2Gy.**

Les valeurs de GPCho, PCho et GSH sont significativement inférieures dans les individus U87-FTI/2Gy comparés aux témoins. *A contrario*, les valeurs des métabolites Gln et Ala sont significativement supérieures dans les individus U87-FTI/2Gy comparés aux témoins. Nous pouvons donc noter une potentialisation de l'association FTI + RI sur les métabolites cités.

### I.3.7. Discussion et conclusion

L'hypothèse selon laquelle les cellules U87 radiosensibilisées (U87-FTI/2Gy) auraient un profil de leurs composés à choline (PCho et GPCho) semblable à celui des cellules radiosensibles est difficilement vérifiable d'après les résultats de cette étude. Bien que PCho et GPCho diminuent dans les individus U87-FTI/2Gy comparés aux témoins, et que la somme PCho + GPCho soit sensiblement la même dans les deux groupes irradiés, nous pensons que ces résultats sont davantage le reflet d'un état cellulaire que d'un effet de l'agent radiosensibilisant.

En effet, nous nous sommes aperçus que la confluence des cellules avait une grande influence sur la concentration de ces deux métabolites. Ce constat avait déjà été fait sur les cellules U87 par D. Bon, une ancienne doctorante du laboratoire (Bon, 2008). Elle avait notamment montré qu'entre 60 et 80% de confluence, la concentration intracellulaire des métabolites PCho et GPCho diminue sensiblement.

Au cours de cette étude, nous avons fait en sorte que les cellules récoltées soient à 60% de confluence, ce qui s'est avéré exact pour les individus témoins. Toutefois, le traitement des cellules au FTI et/ou l'irradiation ont perturbé leur prolifération entraînant une différence de confluence au moment de la récolte.

Nous avons essayé de contourner ce problème en récoltant les individus témoins, U87-FTI, U87-2Gy et U87-FTI/2Gy aux temps respectifs de J<sub>7</sub>, J<sub>8</sub>, J<sub>8</sub> et J<sub>9</sub>. En quantité de protéines dosées dans chaque échantillon, cette différence n'a pas été visible. En effet, la moyenne des quantités mesurées pour chaque groupe était respectivement de :  $1,23 \pm 0,51$ ,  $1,21 \pm 0,55$ ,  $1,38 \pm 0,40$  et  $1,39 \pm 0,53$  mg de protéines.

En revanche, évaluée au microscope, la confluence des individus U87-FTI et U87-2Gy était autour de 50% et celle des U87-FTI/2Gy légèrement inférieure, ce qui s'est traduit par un nombre moyen de cellules récoltées de :  $5,18 \pm 1,19$ ,  $3,66 \pm 1,39$ ,  $4,51 \pm 0,96$  et  $2,93 \pm 1,16$  M cellules, respectivement.

Les valeurs de la Gln ont été observées comme étant croissante des groupes Témoins à U87-FTI/2Gy (Fig. 57) et sont donc anti-corrélées avec le nombre moyen de cellules récoltées. Le profil de la Gln conforte l'hypothèse selon laquelle les différences de confluence des différents groupes seraient responsables des variations métaboliques observées. En effet, plusieurs études présentent la Gln comme une source d'énergie pour les cellules tumorales (DeBerardinis *et al.*, 2007; DeBerardinis *et al.*, 2008; Szeliga & Obara-Michlewska, 2009). Son accumulation dans les cellules est corrélée à une activité du cycle de Krebs plus intense, donc à des cellules en prolifération. Cela se traduit par une production accrue de lipides, de protéines et de nucléotides, et une sécrétion d'Ala notamment.

Cette hypothèse serait cohérente si on considère que moins les cellules sont confluentes, plus les cellules ont une activité proliférative accrue compte tenu de l'espace supplémentaire dont elles disposent pour se multiplier. Une étude de 2006 montre en effet que sur un modèle tumoral de foie (HepG2), le profil métabolique du milieu extracellulaire est différent suivant que les cellules sont subconfluentes ou confluentes (Miccheli *et al.*, 2006). Ces variations métaboliques ont été corrélées à des états physiologiques cellulaires différents. En effet, lorsque les cellules sont à confluence, environ 70% se trouvent en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> alors que ce nombre tombe à 48% lorsque les cellules sont subconfluentes.

Il aurait donc été plus judicieux d'étudier ces perturbations quelques heures après le traitement au FTI et/ou l'irradiation. En effet, dans notre protocole, plusieurs cycles cellulaires se sont produits entre l'irradiation et la récolte des échantillons. Ainsi, nous observons les conséquences à long terme de stress occasionnés sur des cellules redevenues « stables » au moment de la récolte et non pas les conséquences immédiates de ces stress. Il est donc difficile de tirer une conclusion définitive de cette étude.

Une analyse plus fine aurait néanmoins pu être envisagée sur le lien potentiel entre la radiosensibilisation de cellules radiorésistantes et leur composition en composés à choline. L'étude des flux métaboliques des composés à choline hydro- et liposolubles de cellules saines, traitées, et/ou irradiées par marquage à la  $d_9$ -Cho aurait été intéressante.

## II. Projet Y

### II.1. Présentation du projet

Le projet a porté sur l'étude des perturbations métaboliques à long terme (quatre jours après irradiation) occasionnées par la présence d'un radiosensibilisateur potentiel, le composé Y, sur la lignée radiorésistante U87, avec et sans irradiation de 2 Gy. Pour cette étude, quatre conditions ont été considérées : U87 contrôles (témoins), U87 traitées (U87-Y), U87 irradiées (U87-2Gy) et U87 traitées et irradiées (U87-Y/2Gy).

Comme pour le projet précédent, nous avons supposé que l'utilisation d'un agent radiosensibilisant sur des cellules radiorésistantes entraînerait une modification métabolique des cellules. Ces cellules radiosensibilisées possèderaient alors un profil métabolique de cellules radiosensibles, comme nous avons pu le constater dans le projet RR vs RS. Une attention particulière a ainsi été accordée aux composés à choline, PCho et GPCho.

### II.2. Etude métabolomique

Pour cette étude, les quatre conditions considérées, témoins, U87-Y, U87-2Gy et U87-Y/2Gy, ont été comparées deux à deux. Contrairement à l'étude FTI présentée précédemment, les différents individus ont tous été récoltés à J<sub>7</sub>. Pour les quatre conditions, le nombre d'individus est respectivement de : 8, 5, 5 et 4. Les comparaisons considérées sont les suivantes :

- **Comparaison 1** : témoins vs U87-Y ;
- **Comparaison 2** : témoins vs U87-2Gy ;
- **Comparaison 3** : U87-2Gy vs U87-Y/2Gy ;
- **Comparaison 4** : témoins vs U87-Y/2Gy.

La normalisation des données a été effectuée en divisant la valeur des variables de chaque individu par la somme de ses variables (*divided by*). La même méthodologie que celle décrite pour la comparaison 1 de l'étude FTI-277 précédente a été adoptée pour chaque comparaison de cette étude.

## II.2.1. Attribution spectrale et *bucketing*

L'attribution spectrale a été effectuée au préalable à partir des bases de données métaboliques dont nous disposons pour chaque lignée cellulaire de GBM (voir partie Matériel et méthodes). La liste des *buckets* (ou variables, notées var.) considérés (numéros de variables, déplacements chimiques et attributions) est décrite dans le tableau 28.

**Tableau 28. Liste des *buckets* (numéros de variables, déplacements chimiques et attributions) pour l'étude métabolomique du projet Y.**

N°	$\delta$ (ppm)	attribution	N°	$\delta$ (ppm)	attribution
1	8.457980 8.444980	AXP	29	3.229492 3.215492	PCho
2	8.379980 8.370480	?	30	3.215492 3.199992	Cho
3	8.283480 8.268980	AXP	31	3.086492 3.074492	Tau
4	8.165481 8.158481	?	32	3.048492 3.042992	PCr
5	7.732982 7.701982	?	33	3.042992 3.035992	Cr
6	7.403482 7.285483	Phe	34	3.001992 2.952493	GSH_ox
7	7.127983 7.094983	Tyr	35	2.952493 2.895993	GSH_red
8	6.792484 6.759984	Tyr	36	2.895993 2.865993	GSH_red
9	6.176485 6.150985	AXP	37	2.835493 2.775993	GSH_red
10	5.994986 5.970986	?	38	2.772493 2.754993	Asp
11	5.902486 5.871486	UXP	39	2.731493 2.714493	Asp
12	4.524989 4.454489	UXP	40	2.500494 2.410994	GSH_ox+red
13	4.454489 4.369989	AXP	41	2.410994 2.398494	Succ+GSH_ox+red
14	4.369989 4.295989	GPCho	42	2.372494 2.315994	Gln
15	4.295989 4.250490	GSH_red	43	2.310494 2.245994	Glu
16	4.250490 4.199490	AXP+UXP	44	2.131494 2.122994	Met
17	4.199490 4.132490	PCho	45	2.046995 1.924995	GSH+Glu+Gln
18	4.132490 4.096990	Lac	46	1.915995 1.855495	GSH+Glu+Gln
19	3.954990 3.947490	PCr	47	1.397996 1.358496	Ala
20	3.937490 3.924490	Cr	48	1.348496 1.313496	Lac
21	3.793991 3.782491	GSH_ox	49	1.231496 1.212996	Thr
22	3.782491 3.775491	GSH_red	50	1.002497 0.977997	Val
23	3.775491 3.765491	GSH_ox+red	51	0.977997 0.956997	Ile
24	3.733491 3.724491	Asp+GSH_ox+red	52	0.956997 0.937497	Leu
25	3.704491 3.669491	GPCho	53	0.937497 0.929497	Val+Ile
26	3.514991 3.462991	Glu	54	0.929497 0.921997	Leu
27	3.381492 3.366992	Gly+Gln	55	0.921997 0.917497	Val
28	3.246492 3.229492	GPCho	56	0.917497 0.892497	Ile

« ? » signifie que la variable n'a pas été attribuée.

### III.2.2. Comparaison 1 : témoins vs U87-Y

L'analyse univariée supervisée révèle seulement deux variables ayant une *p-value* significative : AXP (var. 3) et GSH+Glu+Gln (var. 46), avec des valeurs respectivement de  $4,3 \cdot 10^{-2}$  et  $4,2 \cdot 10^{-2}$ . L'allure de leurs *box plots* et *violin plots* n'est pas satisfaisante, dans le sens où il y a un net recouvrement dans la distribution des valeurs de ces variables dans les deux groupes. Ces variables ne seront donc pas considérées par la suite.

L'analyse multivariée non supervisée (ACP-X) n'a pas montré de séparation des deux groupes, ce qui a été confirmé par les résultats obtenus en PLS-DA avec et sans UV. En effet, en PLS-DA sans UV, le modèle n'est pas du tout prédictif : 2 axes,  $R^2X = 0,749$ ,  $R^2Y = 0,386$ ,  $Q^2 = 0,087$ , CV-ANOVA = 1.

Pour cette étude, il n'est donc pas possible de différencier les individus témoins des individus U87-Y.

### III.2.3. Comparaison 2 : témoins vs U87-2Gy

L'analyse univariée supervisée révèle six variables discriminantes ayant une *p-value* significative : UXP (var. 11) et GSH\_ox+red (var. 23), GPCho (25), GSH\_ox+red (var. 40), Ile (51) et Val (55). L'allure de leurs *box plots* et *violin plots* est correcte avec une relativement bonne séparation des distributions des valeurs de ces variables dans les deux groupes (Tab. 29).

Le modèle obtenu en OPLS-DA avec UV est prédictif (Fig. 58) : 1 axe (+ 2 OSC),  $R^2X = 0,570$ ,  $R^2Y = 0,986$ ,  $Q^2 = 0,896$ , CV-ANOVA =  $2,5 \cdot 10^{-3}$ . Les variables UXP (11), GSH\_ox+red (23 et 40), GPCho (25) et Ile (51) contribuent fortement à la construction du modèle. Le *coefficient plot* confirme que GPCho est plus important dans les individus U87-2Gy ; à l'inverse, UXP, GSH, Ile et Val sont plus importants dans les individus témoins. Les variables PCho (29) et GPCho (28) participent dans une moindre mesure à la construction du modèle (Fig. 58D).

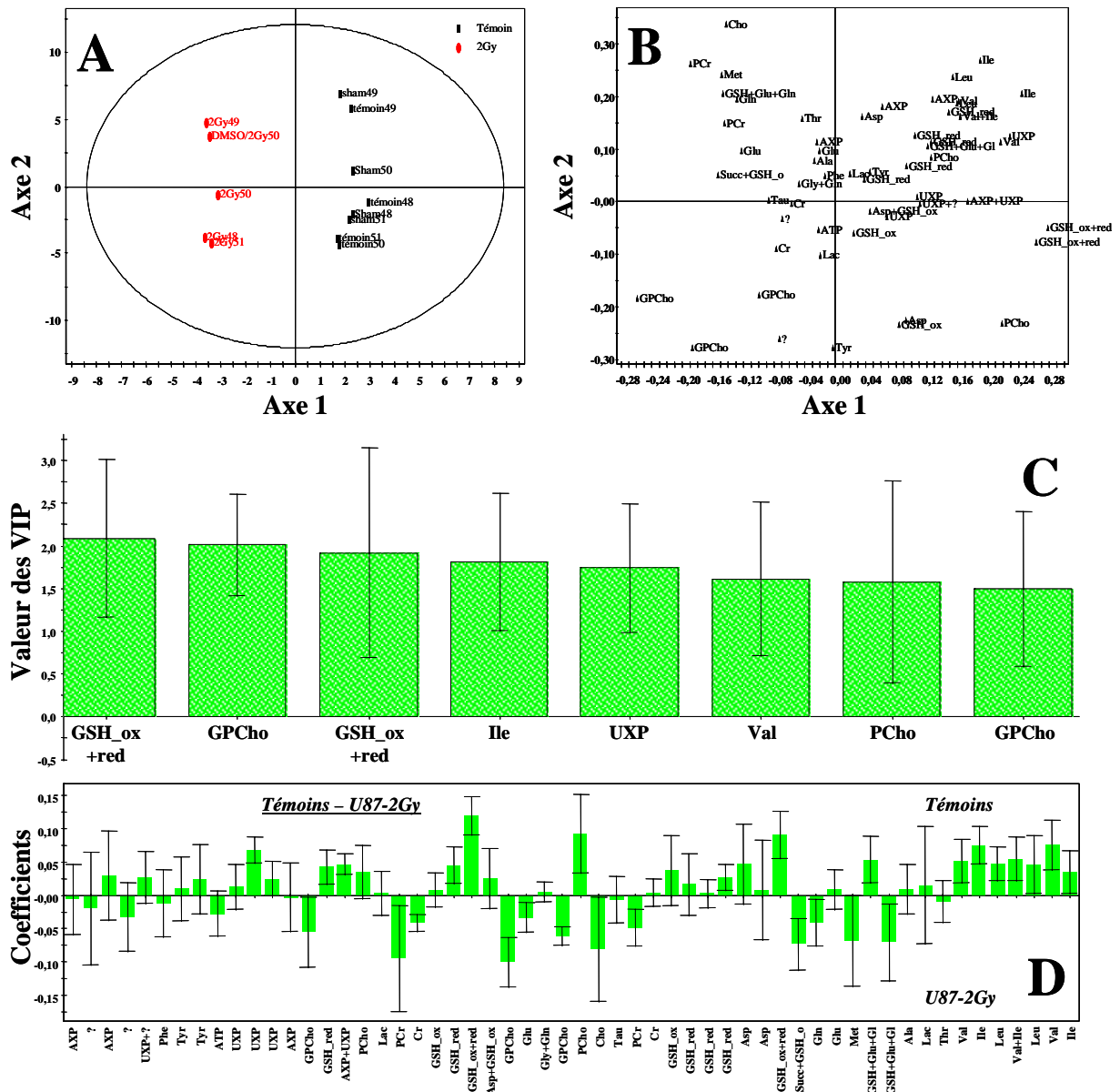


Figure 58. Résultats en analyse multivariée supervisée (OPLS-DA avec UV) de la comparaison « témoins vs U87-2Gy » : (A) *Score plot*, (B) *Loading plot*, (C) *VIP* et (D) *Coefficient plots* (Témoins – U87-2Gy).

Tableau 29. Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants dans la comparaison « témoins vs U87-2Gy » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).

Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre variable	Intervient dans la construction modèle
UXP (var. 11)	$7,07 \cdot 10^{-3}$	$-14 \pm 6\%$	-	Oui
GSH_ox+red (var. 23)	$8,47 \cdot 10^{-3}$	$-12 \pm 6\%$	var. 40	Oui
GPCho (var. 25)	$9,60 \cdot 10^{-3}$	$+12 \pm 6\%$	-	Oui
Ile (var. 51)	$2,24 \cdot 10^{-2}$	$-15 \pm 10\%$	-	Oui
Val (var. 55)	$4,99 \cdot 10^{-2}$	$-21 \pm 17\%$	-	Oui

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs moyennes des individus U87-2Gy par rapport à la moyenne des individus témoins.



### III.2.4. Comparaison 3 : U87-2Gy vs U87-Y/2Gy

Les analyses univariées et multivariées supervisées ne montrent pas de variable discriminante. Le modèle généré en OPLS-DA n'est pas prédictif et ne permet pas de distinguer les individus U87-2Gy des individus U87-Y/2Gy : 1 axe (+ 1 OSC),  $R^2X = 0,296$ ,  $R^2Y = 0,907$ ,  $Q^2 = -0,224$ , CV-ANOVA = 1.

Pour cette étude, il n'est donc pas possible de différencier les individus U87-2Gy des individus U87-Y/2Gy.

### III.2.5. Comparaison 4 : témoins vs U87-Y/2Gy

L'analyse univariée supervisée révèle douze variables ayant une *p-value* significative (dans l'ordre décroissant) : 50 (Ile), 51 (Leu), 32 (PCr), 25 (GPCho), 29 (PCho), 54 (Leu), 40 (GSH\_ox+red), 52 (Leu), 53 (Val+Ile), 56 (Ile), 23 (GSH\_ox+red) et 26 (Glu). L'allure de leurs *box plots* et *violin plots* est correcte, avec une relativement bonne séparation des distributions des valeurs de ces variables dans les deux groupes, sauf pour la variable 26 (Glu). Cette dernière n'a donc pas été retenue dans le tableau récapitulatif ; de même pour la variable 53 (Val+Ile) qui n'est pas spécifique d'un seul métabolite (Tab. 30).

Le modèle obtenu en OPLS-DA avec UV est prédictif (Fig. 59) : 1 axe (+ 1 OSC),  $R^2X = 0,485$ ,  $R^2Y = 0,951$ ,  $Q^2 = 0,718$ , CV-ANOVA =  $4,2 \cdot 10^{-2}$ . Les variables 50 (Val), 51 (Ile), 32 (PCr), 25 (GPCho), 29 (PCho), 54 (Leu), 40 (GSH\_ox+red), 52 (Leu), 53 (Val+Ile), 56 (Ile) contribuent fortement à la construction du modèle (Fig. 59C). Le *coefficient plot* confirme que les métabolites GPCho et PCr sont plus importants dans les individus U87-Y/2Gy ; à l'inverse, les autres métabolites sont plus importants dans les individus témoins (Fig. 59D).

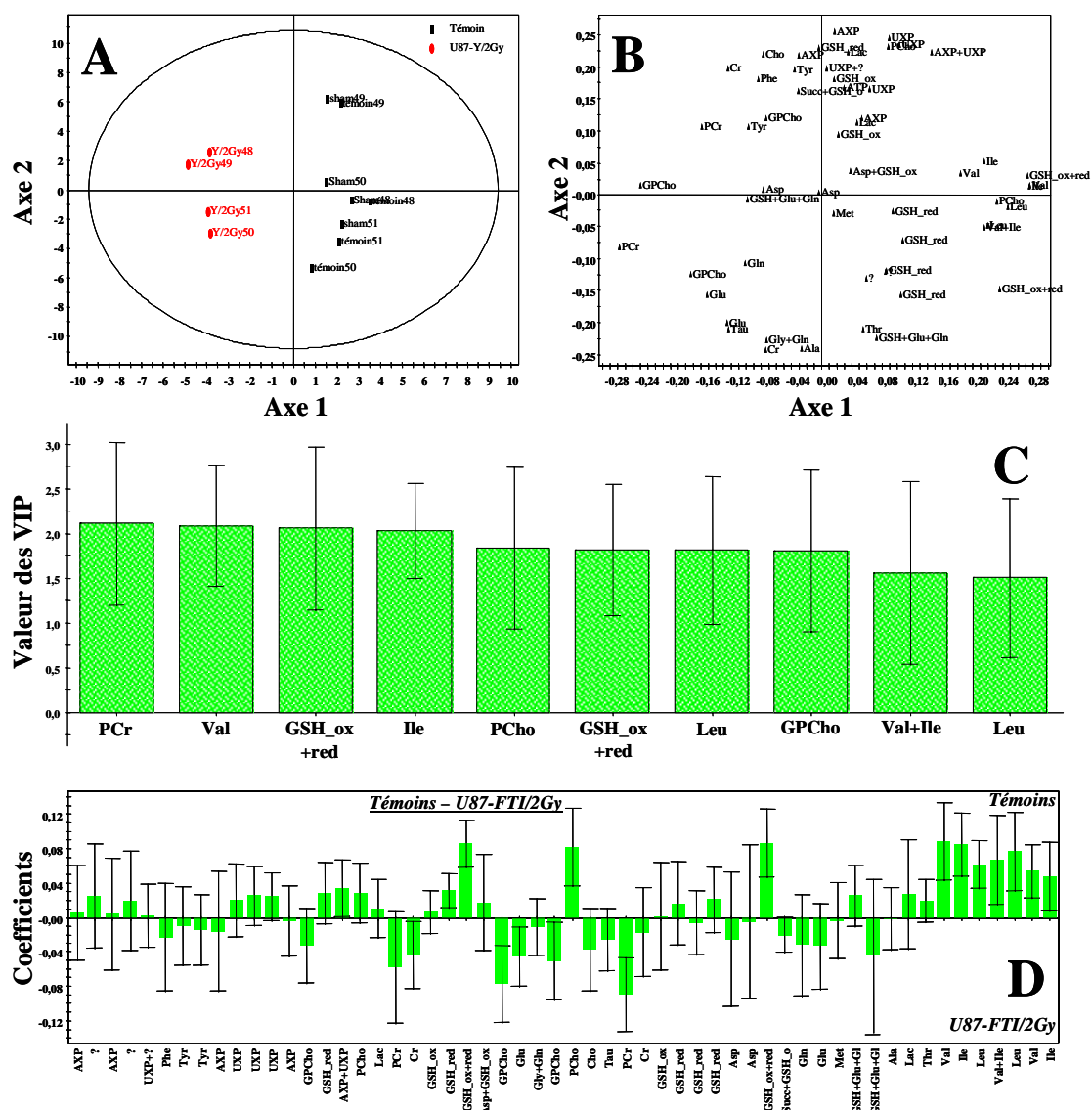


Figure 59. Résultats en analyse multivariée supervisée (OPLS-DA avec UV) de la comparaison « Témoin vs U87-Y/2Gy » : (A) Score plot, (B) Loading plot, (C) VIP plot et (D) Coefficient plots (Témoin – U87-FTI/2Gy).

Tableau 30. Valeurs des *p-values* discriminant dans la comparaison « témoins vs U87-Y/2Gy » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).

Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre variable	Intervient dans la construction du modèle
Val (var. 50)	$7,98.10^{-5}$	$-17 \pm 3\%$	-	Oui
Ile (var. 51)	$4,37.10^{-4}$	$-20 \pm 5\%$	var. 56	Oui
PCr (var. 32)	$8,83.10^{-4}$	$+13 \pm 4\%$	-	Oui
GPCCho (var. 25)	$1,86.10^{-3}$	$+9 \pm 3\%$	-	Oui
PCho (var. 29)	$2,39.10^{-3}$	$-11 \pm 4\%$	-	Oui
Leu (var. 54)	$2,72.10^{-3}$	$-18 \pm 6\%$	var. 52	Oui
GSH_ox+red (var. 40)	$7,32.10^{-3}$	$-8 \pm 3\%$	var. 23	Oui

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs moyennes des individus U87-Y/2Gy par rapport à celles des individus témoins.

## II.2.6. Interprétation

Afin de pouvoir mesurer l'effet de l'association irradiation plus traitement avec le composé Y sur le profil métabolique des cellules U87, nous avons comparé deux à deux les variations métaboliques entre les individus témoins et les trois autres conditions (comparaisons 1, 2 et 4) et entre les individus U87-2Gy et U87-Y/2Gy (comparaison 3).

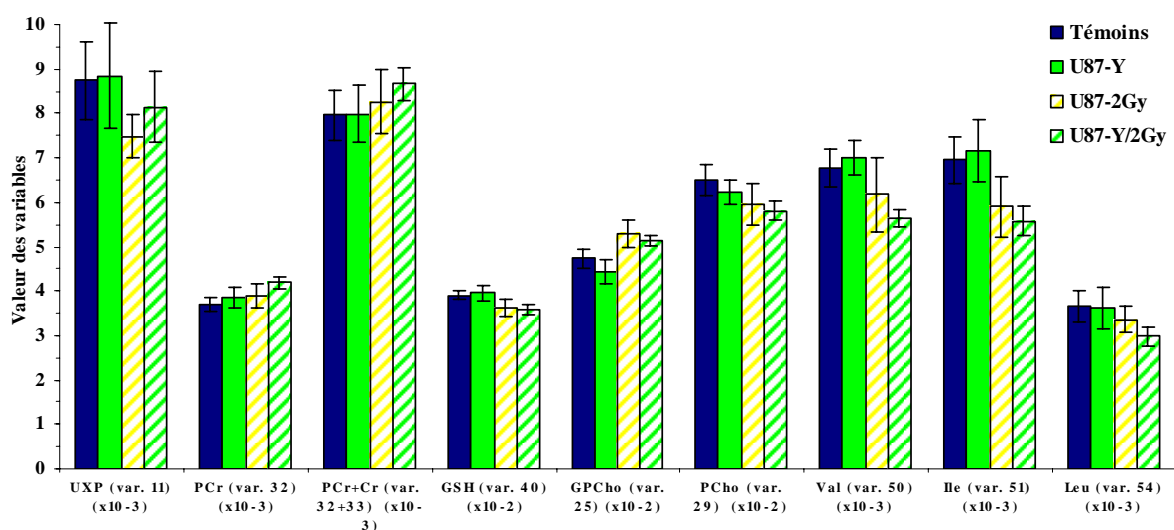
Nous avons ainsi pu mettre en évidence un certain nombre de variables discriminantes (Tabs. 29 et 30). Le tableau 31 illustre les différences de moyennes des valeurs de ces variables sélectionnées pour les quatre conditions témoins, U87-Y, U87-2Gy et U87-Y/2Gy. Ainsi, il est possible de mettre en évidence les variations métaboliques entre les individus témoins et U87-FTI/2Gy imputables aux RI, au composé Y ou à l'association des deux. Afin de vérifier la pertinence de certaines variables, les variables 12 (UXP), 19 (PCr) et 28 (GPCho) ont été ajoutées dans le tableau 31. Nous avons par ailleurs regroupé les variables 32 et 33 : PCr+Cr.

Afin de faciliter la lecture du tableau, les histogrammes des valeurs sont représentés sur la figure 60. Pour plus de clarté, les variables redondantes telles que les variables 12, 19, 23, 28, 52, 55 et 56 ne sont pas présentées.

**Tableau 31. Valeurs des variables discriminantes (en rouge) ou complémentaires (en noir) des comparaisons 2 et 4 dans les quatre conditions et *p-values* de ces variables entre les groupes témoins et U87-Y/2Gy.**

N°	Métabolite	Moyenne (± SD) des variables dans les quatre conditions (sans unité)				Comparaison entre les conditions U87-Y /2Gy et témoins	
		Témoins	U87-Y	U87-2Gy	U87-Y/2Gy	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation (± SD)
11	UXP (x10 <sup>-3</sup> )	8,74 ± 0,89	8,85 ± 1,20	7,48 ± 0,49	8,15 ± 0,81	<b>2,88.10<sup>-1</sup></b>	<b>-7 ± 9%</b>
12	UXP (x10 <sup>-2</sup> )	1,85 ± 0,24	1,92 ± 0,20	1,71 ± 0,17	1,71 ± 0,15	2,49.10 <sup>-1</sup>	-8 ± 8%
19	PCr (x10 <sup>-3</sup> )	5,51 ± 0,31	5,52 ± 0,17	5,84 ± 0,26	5,84 ± 0,26	8,90.10 <sup>-2</sup>	+6 ± 5%
32	PCr (x10 <sup>-3</sup> )	3,71 ± 0,15	3,84 ± 0,24	3,88 ± 0,28	4,19 ± 0,13	<b>8,83.10<sup>-4</sup></b>	<b>+13 ± 4%</b>
32+33	PCr+Cr (x10 <sup>-3</sup> )	7,97 ± 0,56	7,99 ± 0,65	8,26 ± 0,73	8,67 ± 0,37	5,03.10 <sup>-2</sup>	+9 ± 5%
23	GSH (x10 <sup>-2</sup> )	1,52 ± 0,61	1,51 ± 0,93	1,34 ± 0,96	1,38 ± 0,73	2,04.10 <sup>-2</sup>	-9 ± 5%
40	GSH (x10 <sup>-2</sup> )	3,90 ± 0,10	3,95 ± 0,16	3,62 ± 0,20	3,58 ± 0,13	<b>7,32.10<sup>-3</sup></b>	<b>-8 ± 3%</b>
25	GPCho (x10 <sup>-2</sup> )	4,74 ± 0,22	4,43 ± 0,28	5,29 ± 0,30	5,15 ± 0,12	<b>1,86.10<sup>-3</sup></b>	<b>+9 ± 3%</b>
28	GPCho (x10 <sup>-1</sup> )	1,54 ± 0,12	1,41 ± 0,17	1,70 ± 0,14	1,67 ± 0,96	6,60.10 <sup>-2</sup>	+9 ± 6%
29	PCho (x10 <sup>-2</sup> )	6,50 ± 0,34	6,23 ± 0,26	5,94 ± 0,47	5,81 ± 0,22	<b>2,39.10<sup>-3</sup></b>	<b>-11 ± 3%</b>
50	Val (x10 <sup>-3</sup> )	6,77 ± 0,41	7,00 ± 0,38	6,17 ± 0,83	5,64 ± 0,20	<b>7,98.10<sup>-5</sup></b>	<b>-17 ± 3%</b>
55	Val (x10 <sup>-3</sup> )	2,54 ± 0,32	2,57 ± 0,24	2,01 ± 0,43	2,14 ± 0,30	7,20.10 <sup>-2</sup>	-16 ± 12%
51	Ile (x10 <sup>-3</sup> )	6,95 ± 0,53	7,15 ± 0,70	5,91 ± 0,68	5,58 ± 0,34	<b>4,37.10<sup>-4</sup></b>	<b>-20 ± 5%</b>
56	Ile (x10 <sup>-3</sup> )	8,09 ± 1,01	8,62 ± 1,35	7,00 ± 0,83	6,95 ± 0,35	1,84.10 <sup>-2</sup>	-14 ± 4%
52	Leu (x10 <sup>-3</sup> )	1,00 ± 0,11	1,06 ± 0,81	1,03 ± 0,83	8,52 ± 0,45	9,40.10 <sup>-3</sup>	-15 ± 4%
54	Leu (x10 <sup>-3</sup> )	3,66 ± 0,35	3,62 ± 0,45	3,36 ± 0,28	2,98 ± 0,22	<b>2,72.10<sup>-3</sup></b>	<b>-18 ± 6%</b>

Les variables en rouge correspondent aux variables discriminantes présentées dans les tableaux 29 et 30.



**Figure 60. Valeurs des variables sélectionnées dans les quatre groupes.**

Les différentes variations métaboliques observées sont globalement imputables à l'irradiation. En effet, on observe une diminution des valeurs des variables 11 et 12 (UXP), 23 et 40 (GSH\_ox+red), 29 (PCho), 50 et 55 (Val), 51 et 56 (Ile) et 52 et 54 (Leu) lorsque les cellules sont irradiées (U87-2Gy et U87-Y/2Gy). Néanmoins, lorsque l'on compare les valeurs de ces variables entre les individus U87-2Gy et U87-Y/2Gy, il semblerait que la baisse soit plus prononcée dans les U87-Y/2Gy, mais cela reste non significatif. En revanche, il est possible d'observer une augmentation des variables 19 et 32 (PCr), 25 et 28 (GPCho) sous l'effet de l'irradiation. En ce qui concerne la variable 32 (PCr), il semblerait qu'il y ait une potentialisation de l'association composé Y + irradiation. Cette potentialisation n'est malheureusement pas vérifiée sur l'autre signal de la PCr (var. 19). Néanmoins, lorsque l'on considère la variable PCr+Cr (var. 32+33), cette synergie semble confirmée (bien qu'à la limite de la significativité :  $p = 5,03.10^{-2}$ ) si l'on compare les individus témoins et U87-Y/2Gy.

### II.2.7. Discussion et conclusion

Cette étude fait apparaître les tendances suivantes : augmentation du couple PCr+Cr et diminution de PCho et des acides aminés (Val, Ile et Leu) dans les cellules U87 traitées avec le composé Y et irradiées. Malheureusement, elle souffre d'un manque d'individus pour être statistiquement fiable. L'hypothèse selon laquelle les cellules U87 radiosensibilisées (U87-Y/2Gy) auraient un profil de leurs composés à choline (PCho et GPCho) semblable à celui des cellules radiosensibles est difficilement vérifiable. Bien que PCho et GPCho varient dans les différents groupes, le constat semble le même que pour l'étude précédente : les variations de ces deux métabolites sont davantage dues à l'état cellulaire qu'à l'agent radiosensibilisant.

En effet, des variations de confluence encore plus marquées ont été observées pour cette étude. Les différents échantillons des quatre conditions ont été récoltés en même temps (J<sub>7</sub>), ce qui se traduit par une variation importante du nombre de cellules et donc de l'état de confluence des échantillons. La moyenne du nombre de cellules récoltées par échantillon pour les groupes témoins, U87-Y, U87-2Gy et U87-Y/2Gy est respectivement :  $12,0 \pm 4,5$  ;  $10,1 \pm 2,2$  ;  $6,4 \pm 2,8$  et  $6,3 \pm 3,5 \cdot 10^6$  cellules.

Il semble donc très délicat de tirer une conclusion de cette étude, si ce n'est de souligner les difficultés de réaliser des études métabolomiques sur des cellules en culture.

## III. Projet URB14

### III.1. Présentation du projet

Le projet porte sur l'étude des perturbations métaboliques et lipidomiques occasionnées par l'induction par la dexaméthasone (Dex) de l'expression d'une forme dominante négative de RhoB (RhoBN19), sur la lignée URB14, avant et après irradiation de 2 Gy. Cette lignée est dérivée de la lignée radiorésistante U87. Les études lipidomiques et métabolomiques ont été complétées d'une étude par cytométrie en flux, afin de vérifier si l'inhibition de RhoB par sa forme dominante négative RhoBN19 était susceptible d'induire une mort apoptotique et/ou nécrotique des cellules avec ou sans irradiation.

Il nous a semblé intéressant de réaliser ces études sur une lignée radiorésistante radiosensibilisée après l'inhibition d'une protéine clé dans le contrôle de la radiorésistance des cellules de GBM : RhoB (Delmas et al., 2002). En effet, aucun travail ne présente les perturbations métaboliques et lipidiques occasionnées sur des cellules de GBM radiosensibilisées.

Pour ce projet, six conditions ont été considérées : URB14 contrôles (14-), URB14 en présence de Dex (14+), URB14 irradiées selon les protocoles A (14-/2) et B (14-/2bis) et URB14 en présence de Dex et irradiées selon les protocoles A (14+/2) et B (14+/2bis). Les individus obtenus selon le protocole A ont été mis en présence de Dex (ou non) pendant 24 h avant l'irradiation (ou non), puis récoltés 24 h après l'irradiation. Les individus obtenus selon le protocole B ont été mis en présence de Dex (ou non) pendant 48 h avant l'irradiation, puis récoltés 24 h après l'irradiation. Pour plus de détails, voir le paragraphe III.4. de la partie Matériel et Méthodes.

### III.2. Etude métabolomique

Pour cette étude, les six conditions considérées 14-, 14+, 14-/2, 14-/2bis, 14+/2 et 14+/2bis ont été comparées deux à deux. Le nombre d'individus est respectivement de : 13, 13, 12, 13, 6 et 6. Les comparaisons considérées sont les suivantes :

- **Comparaison 1** : 14- vs 14+ ;
- **Comparaison 2** : 14-/2 vs 14+/2 ;
- **Comparaison 3** : 14-/2bis vs 14+/2bis.

La première comparaison permet de mettre en évidence les métabolites qui varient de manière significative après que les cellules aient été induites par la Dex. L'innocuité de la Dex (concentration finale de 25 nM) sur les cellules a par ailleurs été vérifiée sur quelques échantillons de la lignée U87. Nous ne présenterons pas la comparaison 14- vs 14-/2 qui renseigne sur l'effet de l'irradiation sur les cellules URB14, sans Dex. En effet, le constat est sensiblement le même que celui dressé lors de l'étude FTI-277 : cinquante-sept variables sur cinquante-huit ont une *p-value* inférieure à 0,05. Il en est de même pour la comparaison 14- vs 14+/2 (cinquante-deux variables significatives).

Il n'a donc pas été possible d'étudier directement l'association Dex + irradiation sur les cellules URB14 (comparaison 14- vs 14+/2). Pour palier ce problème, nous avons comparé les individus 14-/2 vs 14+/2 (comparaison 2) obtenus selon le protocole A (début du traitement à la Dex 24 h avant l'irradiation). Une troisième comparaison a consisté à comparer les individus 14-/2bis vs 14+/2bis, obtenus selon le protocole B (début du traitement à la Dex 48 h avant l'irradiation). Les résultats de cette comparaison ont été corrélés à ceux de la comparaison 2.

### **III.2.1. Attribution spectrale et *bucketing***

L'attribution spectrale a été effectuée au préalable en fonction des bases de données métaboliques dont nous disposons pour chaque lignée cellulaire de GBM (voir partie Matériel et Méthodes). La liste des *buckets* (ou variables, notées var.) considérés (numéros de variables, déplacements chimiques et attributions) dans cette étude est décrite dans le tableau 32.

**Tableau 32. Liste des *buckets* (numéros de variables, déplacements chimiques et attributions) pour l'étude métabolomique du projet URB14.**

N°	$\delta$ (ppm)	attribution	N°	$\delta$ (ppm)	attribution
1	8.457765 8.448765	AXP	30	3.230614 3.215613	PCho
2	8.380763 8.370763	?	31	3.215613 3.201613	Cho
3	8.284760 8.267760	?	32	3.088610 3.072609	Tau
4	8.166757 8.158756	?	33	3.048608 3.036608	Cr+PCr
5	7.689743 7.679743	?	34	3.004607 2.922605	GSH_ox
6	7.406735 7.281731	Phe	35	2.919605 2.890604	GSH_red
7	7.129727 7.095726	Tyr	36	2.843603 2.774601	GSH_red
8	6.794717 6.758716	Tyr	37	2.774601 2.754600	Asp
9	6.526709 6.515709	Fum	38	2.734599 2.713599	Asp
10	6.181699 6.151698	AXP	39	2.500593 2.410590	GSH_ox+red
11	5.997694 5.968693	?	40	2.410590 2.399590	Succ+GSH_ox+red
12	5.914691 5.868690	UXP	41	2.399590 2.385589	?
13	4.519651 4.471650	UXP	42	2.369589 2.359589	Gln
14	4.446649 4.393647	AXP	43	2.349588 2.336588	Gln
15	4.365647 4.303645	GPCho	44	2.327588 2.319587	Gln
16	4.303645 4.252643	GSH_red	45	2.310587 2.250585	Glu
17	4.252643 4.208642	AXP+UXP	46	2.131582 2.122582	Met
18	4.194642 4.141640	PCho	47	2.058580 1.923576	GSH+Glu+Gln
19	4.128640 4.097639	Lac	48	1.915576 1.855574	GSH+Glu+Gln
20	3.957635 3.947634	PCr	49	1.396561 1.360560	Ala
21	3.947634 3.925634	Cr	50	1.346559 1.316558	Lac
22	3.794630 3.783630	GSH_ox	51	1.231556 1.211555	Thr
23	3.783630 3.776630	GSH_red	52	1.006549 0.978549	Val
24	3.776630 3.766629	GSH_ox+red	53	0.978549 0.957548	Ile
25	3.733628 3.724628	Asp+GSH_ox+red	54	0.957548 0.937547	Leu
26	3.705627 3.669626	GPCho	55	0.937547 0.930547	Val+Ile
27	3.524622 3.459620	Glu	56	0.930547 0.922547	Leu
28	3.381618 3.367618	Gly+Gln	57	0.922547 0.916547	Val
29	3.248614 3.230614	GPCho	58	0.916547 0.888546	Ile

« ? » signifie que la variable n'a pas été attribuée.



### III.2.2. Comparaison 1 : 14- vs 14+

L'analyse univariée supervisée a révélé quinze variables ayant une *p-value* significative (par ordre décroissant) : 32 (Tau), 53 (Ile), 54 (Leu), 55 (Val+Ile), 58 (Ile), 56 (Leu), 7 (Tyr), 57 (Val), 51 (Thr), 8 (Tyr), 52 (Val), 6 (Phe), 33 (Cr+PCr), 46 (Met) et 30 (PCho). L'allure de leurs *box plots* et *violin plots* est correcte avec une relativement bonne séparation des distributions des valeurs de ces variables dans les deux groupes, sauf pour les variables 52 (Val), 6 (Phe), 33 (Cr+PCr), 46 (Met) et 30 (PCho). Ces dernières n'ont donc pas été retenues dans le tableau récapitulatif, ni d'ailleurs la variable 55 (Val+Ile) qui n'est pas spécifique d'un seul métabolite (Tab. 33). Le modèle obtenu en PLS-DA avec UV est prédictif (Fig. 61) : 3 axes,  $R^2X = 0,532$ ,  $R^2Y = 0,968$ ,  $Q^2 = 0,772$ ,  $CV\text{-ANOVA} = 7,4.10^{-5}$ . Toutes les variables retenues en analyse univariée supervisée contribuent fortement à la construction du modèle (Fig. 61C). Le *coefficient plot* confirme que le métabolite Tau est plus important dans les individus 14+ ; à l'inverse, les autres métabolites sont plus importants dans les individus 14- (Fig. 61D).

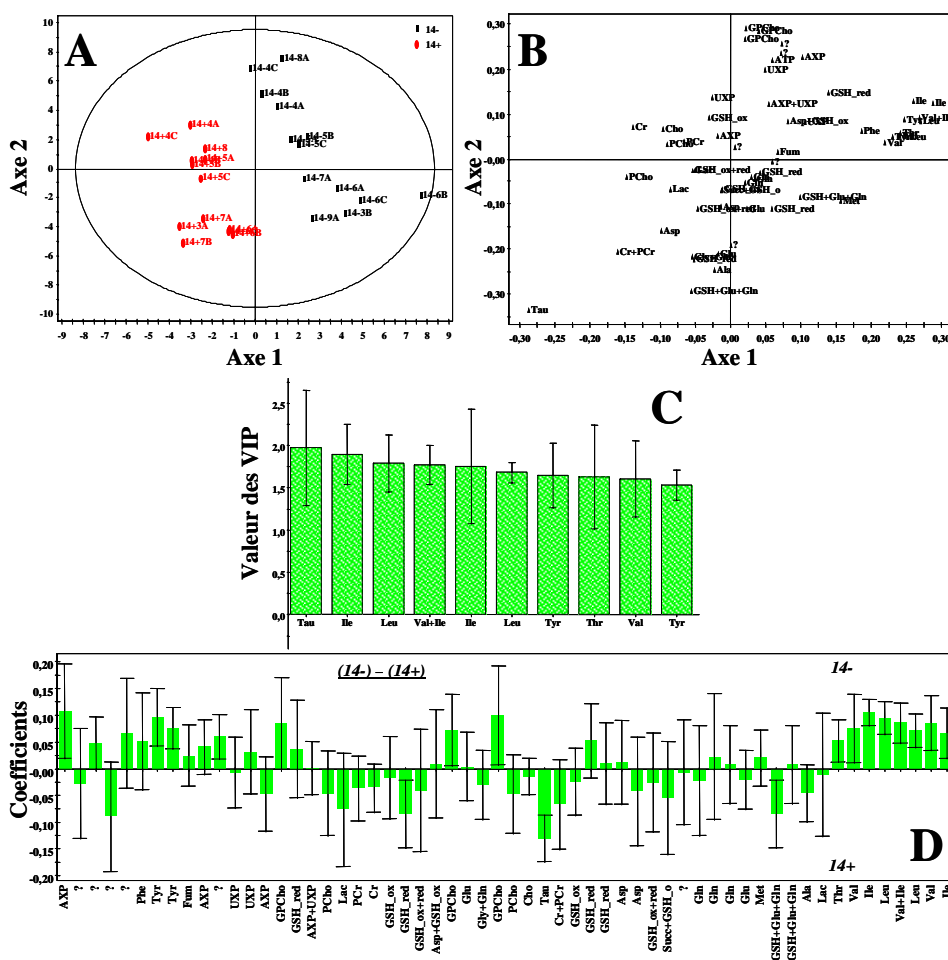


Figure 61. Résultats en analyse multivariée supervisée (PLS-DA avec UV) de la comparaison « 14- vs 14+ » : (A) *Score plot*, (B) *Loading plot*, (C) *VIP plot* et (D) *Coefficient plot* [(14-) - (14+)].

**Tableau 33. Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants de la comparaison « 14- vs 14+ » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).**

Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD) <sup>*</sup>	Confirmation par une autre variable	Intervenant dans la construction du modèle
Tau (var. 32)	$5,98.10^{-6}$	$+101 \pm 48\%$	-	Oui
Ile (var. 53)	$7,29.10^{-6}$	$-27 \pm 10\%$	var. 58	Oui
Leu (var. 54)	$5,42.10^{-5}$	$-25 \pm 9\%$	var. 56	Oui
Tyr (var. 7)	$3,17.10^{-4}$	$-83 \pm 17\%$	var. 8	Oui
Val (var. 57)	$4,62.10^{-4}$	$-24 \pm 12\%$	var. 52	Oui
Thr (var. 51)	$8,86.10^{-4}$	$-17 \pm 5\%$	-	Oui

<sup>\*</sup> Le pourcentage est calculé en comparant les moyennes des valeurs des individus 14+ par rapport à celle des individus 14-.

### III.2.3. Vérification de la Dex sur les cellules U87

Afin de vérifier si les variations métaboliques présentées précédemment pouvaient être imputables à la Dex elle-même (concentration finale de 25 nM), nous avons testé l'effet de la Dex sur des cellules U87, dans les mêmes conditions que pour les individus 14- et 14+. Nous avons analysé quatre individus pour la condition U87 sans Dex (U87-) et trois individus pour la condition U87 avec Dex (U87+). Le faible nombre d'échantillons obtenus n'a pas permis de réaliser l'analyse standard (univariée et multivariée). Néanmoins, nous avons été en mesure de comparer les moyennes des variables des deux groupes par un test de Welch. Les variables ont été normalisées suivant le même protocole que celui utilisé pour les cellules URB14. La comparaison des moyennes des variables des groupes 87- et 87+ a révélé quatre variables possédant une valeur de leur *p-value* significative (dans l'ordre décroissant) : var. 34 (GSH\_ox), 51 (Thr), 7 (Tyr) et 24 (GSH\_ox+red) (Tab. 34).

**Tableau 34. Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants entre les groupes 87- et 87+, ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).**

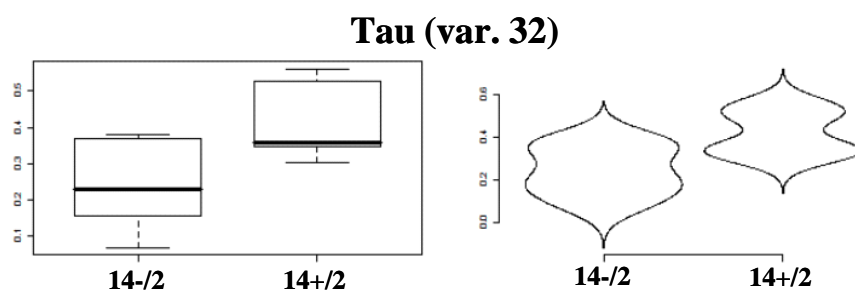
Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD) <sup>*</sup>	Confirmation par une autre variable
GSH_ox (var. 34)	$4,48.10^{-3}$	$+16 \pm 1\%$	-
Thr (var. 51)	$1,38.10^{-2}$	$-22 \pm 7\%$	-
Tyr (var. 7)	$2,68.10^{-2}$	$-50 \pm 5\%$	-
GSH_ox+red (var. 24)	$3,65.10^{-2}$	$+10 \pm 3\%$	-

<sup>\*</sup> Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus 87+ par rapport à celles des individus 87-.

Il semblerait que la Dex ait une influence sur le profil métabolique des cellules U87. Une diminution significative des acides aminés Thr et Tyr est observée ainsi que de Val, Ile et Leu (non significatifs) dans les individus 87+. *A contrario*, une légère augmentation du GSH semble avoir lieu dans les individus U87+. En revanche, nous n'avons pas noté de variation du métabolite Tau entre les deux groupes (% variation :  $-5 \pm 32\%$ , *p-value* = 0,86).

### III.2.4. Comparaison 2 : 14-/2 vs 14+/2

L'analyse univariée supervisée a révélé dix-sept variables ayant une *p-value* significative (par ordre décroissant) : 58 (Ile), 30 (PCho), 7 (Tyr), 56 (Leu), 8 (Tyr), 53 (Ile), 57 (Val), 55 (Val+Ile), 32 (Tau), 6 (Phe), 54 (Leu), 52 (Val), 16 (GSH\_red), 18 (PCho), 3 (?), 51 (Thr) et 17 (AXP+UXP). L'allure de leurs *box plots* et *violin plots* est correcte avec une relativement bonne séparation des distributions des valeurs de ces variables dans les deux groupes, sauf pour les variables 32 (Tau), 6 (Phe), 54 (Leu), 52 (Val), 16 (GSH\_red), 18 (PCho), 3 (?), 51 (Thr) et 17 (AXP+UXP). Ces dernières n'ont donc pas été retenues dans le tableau récapitulatif, ni d'ailleurs la variable 55 (Val+Ile) qui n'est pas spécifique d'un seul métabolite (Tab. 35). La variable 32 (Tau) a quand même été considérée pour la suite des analyses du fait de la tendance observée dans la distribution de ses valeurs (Fig. 62).



**Figure 62. Box plots et violin plots de la variable Tau (var. 32) dans les groupes 14-/2 et 14+/2.**

Le modèle obtenu en PLS-DA avec UV est prédictif (Fig. 63) : 2 axes,  $R^2X = 0,532$ ,  $R^2Y = 0,959$ ,  $Q^2 = 0,878$ ,  $CV-ANOVA = 1,0.10^{-7}$ . Toutes les variables retenues en analyse univariée supervisée contribuent fortement à la construction du modèle (Fig. 63C). Le *coefficient plot* confirme que les métabolites Tau et PCho sont plus importants dans les individus 14+/2 ; à l'inverse, les autres métabolites sont plus importants dans les individus 14-/2 (Fig. 63D).

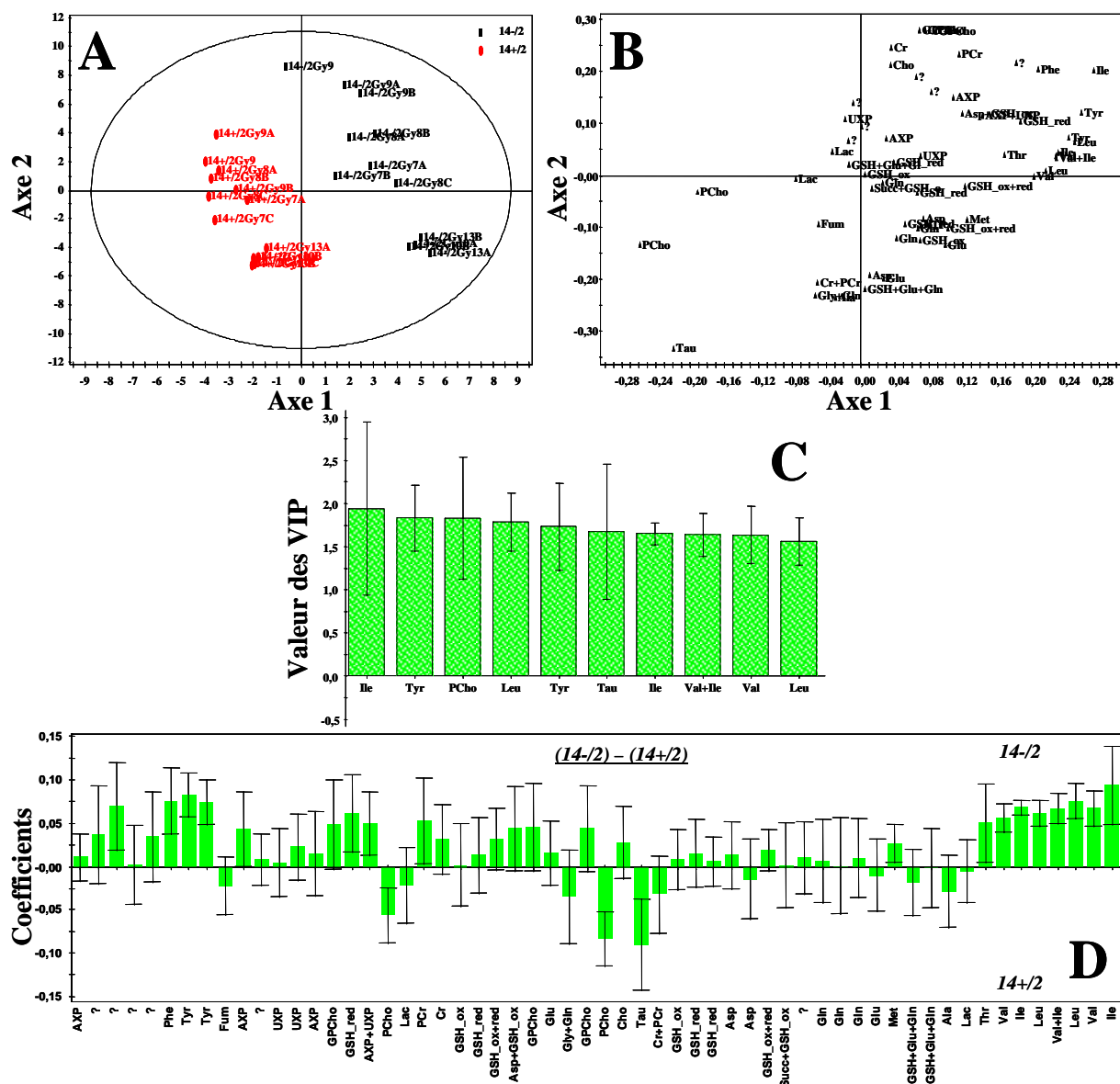


Figure 63. Résultats en analyse multivariée supervisée (PLS-DA avec UV) du modèle « 14-/2 vs 14+/2 » : (A) Score plot, (B) Loading plot, (C) VIP plot et (D) Coefficient plot (14-/2 – 14+/2).

Tableau 35. Valeurs des *p*-values des métabolites discriminants dans la comparaison « 14-/2 vs 14+/2 » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).

Métabolite discriminant	<i>p</i> -value (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD) <sup>*</sup>	Confirmation par une autre variable	Intervient dans la construction du
Ile (var. 58)	$7,83 \cdot 10^{-7}$	$-17 \pm 6\%$	var. 53	Oui
PCho (var. 30)	$7,41 \cdot 10^{-6}$	$+10 \pm 4\%$	var. 18	Oui
Tyr (var. 7)	$1,72 \cdot 10^{-5}$	$-34 \pm 11\%$	var. 8	Oui
Leu (var. 56)	$3,59 \cdot 10^{-5}$	$-24 \pm 9\%$	var. 54	Oui
Val (var. 57)	$3,33 \cdot 10^{-4}$	$-26 \pm 11\%$	var. 52	Oui
Tau (var. 32)	$4,51 \cdot 10^{-4}$	$+74 \pm 42\%$	-	Oui

<sup>\*</sup>Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus 14+/2 par rapport à celles des individus 14-/2.

### III.2.5. Comparaison 3 : 14-/2bis vs 14+/2bis

L'analyse univariée supervisée a révélé vingt-neuf variables ayant une *p-value* significative (dans l'ordre décroissant) : 32, 16, 27, 47, 45, 17, 3, 1, 10, 38, 8, 6, 52, 57, 55, 20, 58, 35, 14, 25, 39, 53, 7, 12, 4, 56, 37, 11 et 54. L'allure de leurs *box plots* et *violin plots* est correcte, sauf pour les variables 20, 35, 14, 25, 39, 7, 12, 4, 37, et 11. Ces dernières n'ont donc pas été retenues dans le tableau récapitulatif (Tab. 36), ni d'ailleurs les variables 17 (AXP+UXP), 47 (GSH+Glu+Gln) et 55 (Val+Ile) qui ne sont pas spécifiques d'un seul métabolite. Les variables inconnues (var. 3) ou non confirmées par d'autres variables correspondant à d'autres signaux du même métabolite (var. 16 et 38) n'ont pas non plus été conservées.

Le modèle obtenu en PLS-DA avec UV est prédictif (Fig. 64) : 2 axes,  $R^2X = 0,721$ ,  $R^2Y = 0,996$ ,  $Q^2 = 0,933$ ,  $CV\text{-ANOVA} = 3,3 \cdot 10^{-4}$ . Les var. 32 (Tau), 27 (Glu) et 16 (GSH\_red) contribuent fortement à la construction du modèle (Fig. 64C). Le *coefficient plot* confirme que le métabolite Tau est plus important dans les individus 14+/2bis ; à l'inverse, les autres métabolites sont plus importants dans les individus 14-/2bis (Fig. 64D).

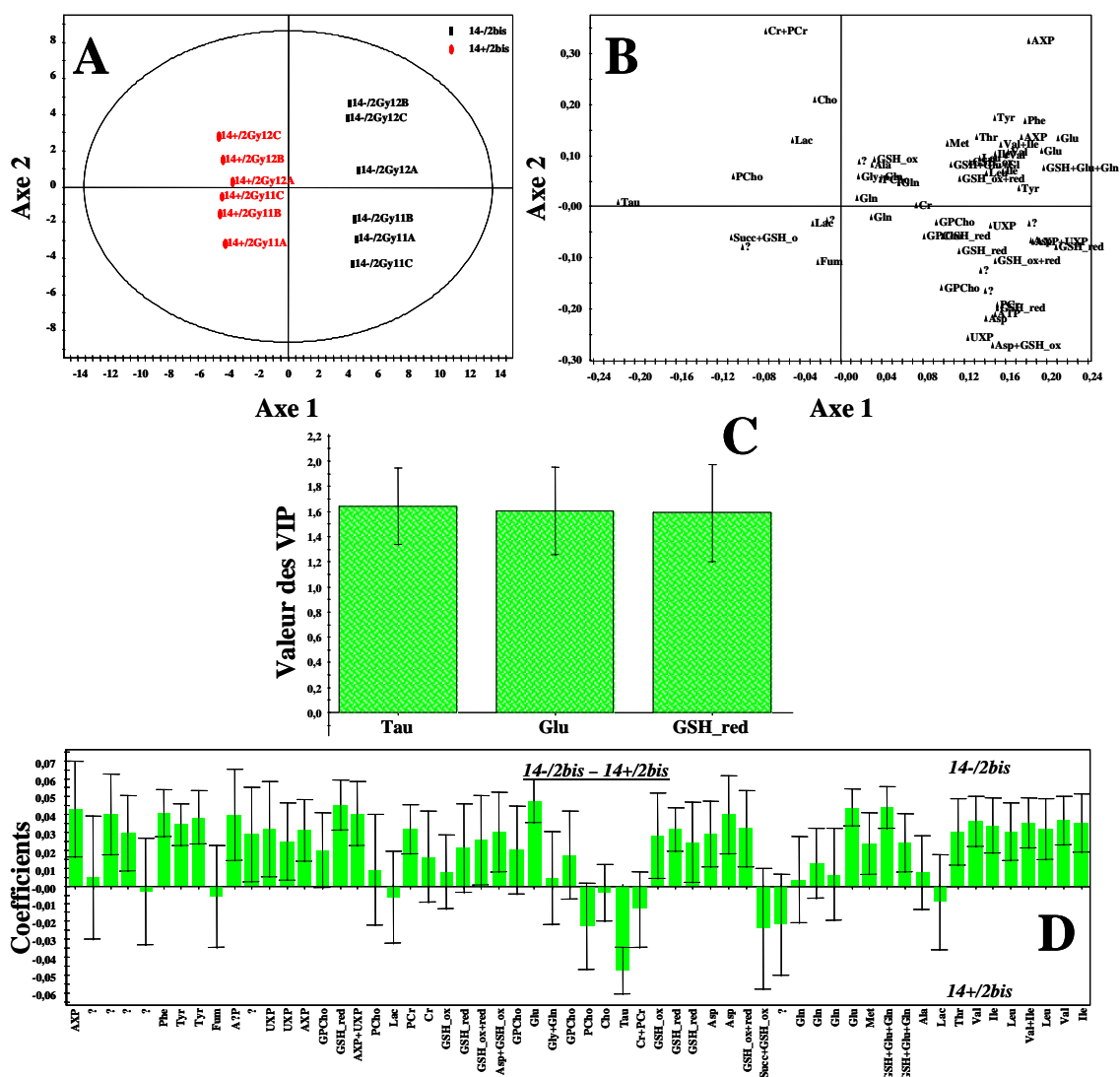


Figure 64. Résultats en analyse multivariée supervisée (PLS-DA avec UV) de la comparaison « 14-/2bis vs 14+/2bis » : (A) Score plot, (B) Loading plot, (C) VIP plot et (D) Coefficient plot (14-/2bis – 14+/2bis).

Tableau 36. Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants de la comparaison « 14-/2bis vs 14+/2bis » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).

Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre variable	Intervenant dans la construction du modèle
Tau (var. 32)	$2,04 \cdot 10^{-7}$	$+60 \pm 9\%$	-	Oui
Glu (var. 27)	$2,04 \cdot 10^{-5}$	$-18 \pm 2\%$	var. 45	Oui
AXP (var. 10)	$2,32 \cdot 10^{-3}$	$-18 \pm 8\%$	var. 1	-
Tyr (var. 8)	$5,90 \cdot 10^{-3}$	$-37 \pm 9\%$	var. 7	-
Phe (var. 6)	$5,97 \cdot 10^{-3}$	$-30 \pm 4\%$	-	-
Val (var. 52)	$9,63 \cdot 10^{-3}$	$-37 \pm 15\%$	var. 57	-
Ile (var. 53)	$2,08 \cdot 10^{-2}$	$-33 \pm 13\%$	var. 58	-
Leu (var. 56)	$3,12 \cdot 10^{-2}$	$-34 \pm 15\%$	var. 54	-

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus 14+/2bis par rapport à celles des individus 14-/2bis.

## **III.2.6. Interprétation et discussion**

### **III.2.6.1. Effet de l'association irradiation + induction de RhoBN19**

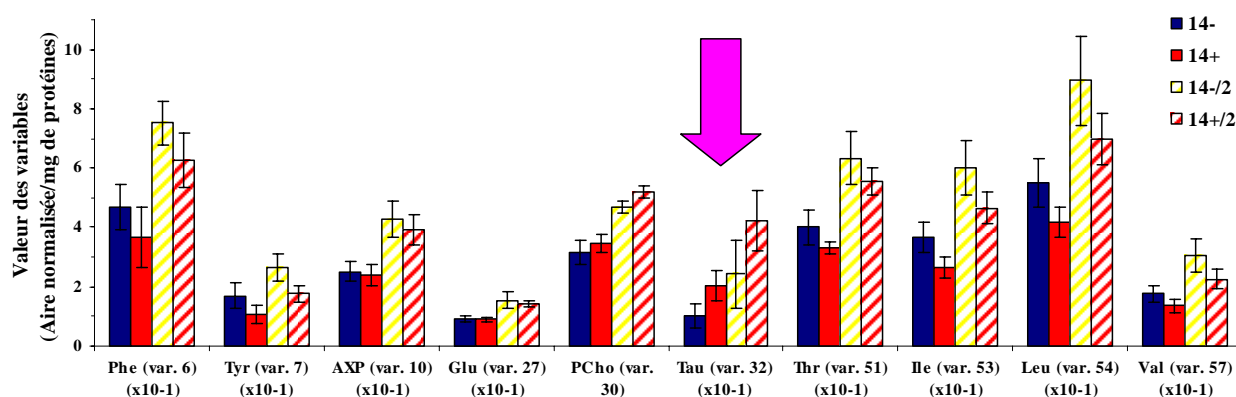
Afin de montrer l'effet de l'association irradiation + inhibition de la protéine RhoB par induction à la Dex sur le profil métabolique des cellules URB14, nous avons comparé les variations métaboliques entre les individus 14- et 14+ dans un premier temps (comparaison 1). Puis nous avons regardé les variations métaboliques entre les individus 14-/2 et 14+/2 dans un deuxième temps (comparaison 2) et enfin les variations métaboliques entre les individus 14-/2bis et 14+/2bis (comparaison 3) (Tabs. 33, 34 et 35). Ceci nous a permis d'identifier quelques variables discriminantes.

En comparant les différences de moyennes des valeurs de ces variables pour les quatre conditions 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2, il est possible de déterminer les variations métaboliques entre les individus 14- et 14+/2 imputables aux RI, à l'inhibition de RhoB ou à l'association des deux (Tab. 37). Comme pour les études précédentes, le tableau sera complété par les histogrammes des valeurs des variables les plus marquantes, auxquelles nous avons ajouté la variable GPCho (var. 29) (Fig. 65).

**Tableau 37. Valeurs des variables discriminantes entre les individus 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2 (protocole A), ainsi que la valeur des *p-values* des variables entre les groupes 14- et 14+/2.**

N°	Métabolite	Moyenne ( $\pm$ SD) des variables dans les quatre groupes obtenues selon le protocole A (en $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines)				Comparaison entre les conditions 14+/2 et 14-	
		14-	14+	14-/2	14+/2	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*
6	Phe ( $\times 10^{-1}$ )	4,68 $\pm$ 0,77	3,68 $\pm$ 1,01	7,52 $\pm$ 0,74	6,27 $\pm$ 0,90	<b>6,39.10<sup>-5</sup></b>	+34 $\pm$ 19%
7	Tyr ( $\times 10^{-1}$ )	1,70 $\pm$ 0,45	1,06 $\pm$ 0,30	2,66 $\pm$ 0,46	1,76 $\pm$ 0,30	<b>7,00.10<sup>-1</sup></b>	+3 $\pm$ 17%
10	AXP ( $\times 10^{-1}$ )	2,52 $\pm$ 0,31	2,41 $\pm$ 0,36	4,28 $\pm$ 0,60	3,92 $\pm$ 0,51	<b>5,19.10<sup>-8</sup></b>	+56 $\pm$ 20%
27	Glu	0,92 $\pm$ 0,09	0,91 $\pm$ 0,07	1,55 $\pm$ 0,26	1,44 $\pm$ 0,11	<b>6,44.10<sup>-12</sup></b>	+56 $\pm$ 12%
29	GPCCho	4,44 $\pm$ 0,54	4,39 $\pm$ 0,31	7,42 $\pm$ 1,59	6,90 $\pm$ 0,90	<b>4,94.10<sup>-8</sup></b>	+56 $\pm$ 20%
30	PCho	3,17 $\pm$ 0,40	3,46 $\pm$ 0,31	4,70 $\pm$ 0,21	5,18 $\pm$ 0,20	<b>5,56.10<sup>-12</sup></b>	+63 $\pm$ 6%
<b>32</b>	<b>Tau (<math>\times 10^{-1}</math>)</b>	<b>1,02 <math>\pm</math> 0,40</b>	<b>2,04 <math>\pm</math> 0,49</b>	<b>2,43 <math>\pm</math> 1,15</b>	<b>4,22 <math>\pm</math> 1,01</b>	<b>1,36.10<sup>-8</sup></b>	<b>+315 <math>\pm</math> 99%</b>
51	Thr ( $\times 10^{-1}$ )	4,00 $\pm$ 0,57	3,31 $\pm$ 0,21	6,34 $\pm$ 0,89	5,56 $\pm$ 0,46	<b>8,99.10<sup>-8</sup></b>	+39 $\pm$ 12%
53	Ile ( $\times 10^{-1}$ )	3,68 $\pm$ 0,50	2,63 $\pm$ 0,35	6,01 $\pm$ 0,91	4,65 $\pm$ 0,55	<b>5,10.10<sup>-5</sup></b>	+28 $\pm$ 15%
54	Leu ( $\times 10^{-1}$ )	5,52 $\pm$ 0,82	4,16 $\pm$ 0,50	8,95 $\pm$ 1,50	6,98 $\pm$ 0,86	<b>1,74.10<sup>-4</sup></b>	+26 $\pm$ 16%
57	Val ( $\times 10^{-1}$ )	1,76 $\pm$ 0,29	1,35 $\pm$ 0,21	3,06 $\pm$ 0,54	2,25 $\pm$ 0,34	<b>6,19.10<sup>-4</sup></b>	+28 $\pm$ 19%

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus 14+/2 par rapport à celles des individus 14-.



**Figure 65. Valeurs (en  $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines) des variables sélectionnées dans les quatre groupes obtenues selon le protocole A : 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2.**



L'irradiation augmente de manière significative la valeur des variables acides aminés (Phe, Tyr, Glu, Thr, Ile, Leu et Val), ainsi que celle des métabolites tels que l'AXP (AMP, ADP et/ou ATP), le Glu, la GPCho et la PCho, par rapport aux cellules non irradiées (Tab. 37 et Fig. 65).

La première explication concernant l'augmentation totale du *pool* de métabolites dans les cellules irradiées pourrait être attribuée à la méthodologie de normalisation des variables (voir paragraphe II.3.7. de la partie Matériel et Méthodes). En effet, les variables brutes (aire des *buckets* des spectres RMN) sont divisées par la quantité de protéines mesurée pour chaque individu. Or, cette quantité varie pour les quatre conditions 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2. La moyenne des quantités de protéines mesurée dans chaque groupe est respectivement de  $1,46 \pm 0,50$ ,  $1,31 \pm 0,42$ ,  $1,20 \pm 0,64$  et  $1,07 \pm 0,44$  mg de protéines. Les quantités moyennes déterminées dans les individus non irradiés (14- et 14+) sont sensiblement les mêmes, alors qu'une diminution est observée pour les individus irradiés (14-/2 et 14+/2). En effet, en prenant l'exemple caractéristique de la variable 54 (Leu), sa valeur augmente d'un facteur  $\sim 1,6$  entre les individus 14- et 14-/2 (Tab. 37). Or, la quantité moyenne de protéines mesurée dans les individus 14-/2 diminue d'un facteur 1,2 dans les individus 14-/2, comparés aux témoins (14-). Cela peut nous laisser douter de la pertinence de comparer des cellules irradiées par rapport à des cellules non irradiées. Il reste néanmoins un différentiel de 0,4, qui n'est pas imputable à la méthodologie de normalisation.

Cette première explication n'est donc pas suffisante. Une autre explication pourrait consister à supposer un grossissement des cellules irradiées rentrant en sénescence et/ou en mort radio-induite. En effet, l'irradiation des cellules conduit principalement à un arrêt des cellules en phase G1 ou G2, ainsi qu'à des morts radio-induites telles que : l'apoptose, l'autophagie, la mort mitotique, la mort mitotique différée ou l'oncose (Favaudon, 2000). Par ailleurs, il a été récemment montré, sur des cellules humaines de GBM (CGNH-89) irradiées, que le taux de cellules « larges » est à son maximum 48 h après l'irradiation (Oishi et al., 2008). Ce changement dans la morphologie cellulaire s'accompagne d'une transformation ou d'un grossissement de la mitochondrie, organe où a lieu un grand nombre de synthèses de protéines. Les acides aminés joueraient alors le rôle d'osmolytes organiques qui contrôlèrent l'homéostasie des cellules lors de leur gonflement (Shennan, 2008).

Le traitement des cellules URB14 à la Dex a pour but d'induire l'expression d'une forme dominante négative de la protéine RhoB (RhoBN19). RhoB est impliquée dans le processus de radiorésistance des GBM (Milia et al., 2005). Le traitement des cellules à la Dex (individus 14+ et 14+/2) a tendance à globalement diminuer les concentrations des acides aminés (Tab. 33). Néanmoins, cette diminution a été observée de manière significative pour quelques acides aminés (Tyr et Thr, Tab. 34) dans les individus U87 traités à la Dex (U87+, n = 3), par rapport aux individus U87 non traités (U87-, n = 4). Nous pouvons donc supposer que cette diminution du *pool* d'acides aminés dans les cellules est imputable à la Dex, un glucocorticoïde de synthèse décrit comme réducteur de l'invasion tumorale des cellules U87 (Lin et al., 2008). Par ailleurs, à une dose supérieure à la nôtre (10  $\mu$ M), la Dex induit l'apoptose de cellules humaines de GBM (1242-MG) en augmentant l'activité de la monoamine oxydase (MAO) (Tazik et al., 2009) dont l'isoforme MAO-B est décrite comme étant suractivée dans les tumeurs gliales comparées aux cellules saines (Gabilondo et al., 2008). Cette enzyme est responsable de la dégradation de monoamines neurotransmetteurs telles que la sérotonine, la norépinéphrine, la dopamine ou la phényléthylamine (Ou *et al.*, 2006). Bien qu'elle n'ait jamais été décrite comme étant responsable de la désamination oxydative des acides aminés, son activité sur les monoamines pourrait avoir une répercussion sur le *pool* total des acides aminés présents dans les cellules. En effet, certains d'entre eux (Tyr et Phe notamment) sont des précurseurs de la biosynthèse des monoamines.

En revanche, nous pouvons observer un léger effet additif de l'irradiation et du traitement à la Dex sur le métabolite PCho. En effet, sa concentration augmente significativement sous l'effet de l'irradiation (individus 14-/2) (ainsi que celle de la GPCho) et également, mais de façon moindre, dans les individus traités à la Dex (14+) (Tab. 37). Cela entraîne donc une augmentation significative de ce métabolite dans les individus 14+/2, comparés aux individus 14-. Comme nous l'avons observé pour les études métabolomiques précédentes, les composés à choline (PCho et GPCho) sont très affectés par l'état de confluence des cellules. Néanmoins, pour cette étude, la variation de ces métabolites est anti-corrélée avec l'état de confluence des différents groupes d'individus : 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2. En effet, la moyenne des cellules récoltées pour les quatre groupes est respectivement de  $7,89 \pm 3,04$ ,  $6,92 \pm 2,31$ ,  $6,03 \pm 2,38$  et  $5,28 \pm 2,18 \cdot 10^6$  cellules.

Concernant les deux métabolites PCho et GPCho, nous pouvons en conclure que leur variation est principalement imputable à l'irradiation comme pour tous les autres métabolites (sauf Tau). En effet, lorsque l'on compare le pourcentage d'augmentation des métabolites dans les individus 14+/2 par rapport aux individus 14-, les métabolites tels que l'AXP, le Glu, la GPCho et la PCho augmentent globalement de 60%, et les acides aminés augmentent d'environ 30% (Tab. 37). Il est donc difficile de conclure sur ces variations métaboliques.

Les variations observées pour le métabolite Tau sont plus intéressantes. En effet, nous remarquons une augmentation significative (d'un facteur deux) de sa concentration après traitement des cellules URB14 à la Dex (Tab. 37). Cette augmentation n'est pas observée dans les cellules U87 traitées, ce qui suggère que cette variation est imputable à l'expression de la forme dominante négative RhoBN19 et non à la Dex elle-même.

Par ailleurs, une augmentation significative (d'un facteur deux également, Tab. 37) est également observée dans les individus 14-/2 comparés aux individus 14-. Cela se traduit par un effet cumulé entre l'irradiation et l'expression de la forme dominante RhoBN19. En effet, le pourcentage de variation entre les individus 14- et 14+ d'une part ( $+101 \pm 48\%$ , Tab. 33) et celui entre les individus 14-/2 et 14+/2 d'autre part ( $+74 \pm 42\%$ , Tab. 35) sont du même ordre de grandeur, ce qui ne suggère pas un effet synergique mais plutôt un effet cumulé.

Etant donné que nous n'avons pas remarqué de variation de la Tau dans les individus U87+ comparés aux individus U87-, nous pouvons admettre un effet cumulé de l'irradiation et de l'induction de la forme dominante RhoBN19, sur les cellules radiorésistantes URB14. D'un point de vue métabolique, cela se traduit par une augmentation significative d'un facteur quatre (environ) de la Tau dans les individus 14+/2, comparés aux individus 14-.

Il semblerait donc que nous ayons identifié un biomarqueur de perturbations métaboliques radio-induites, sur des cellules de GBM humain après inhibition de la protéine RhoB impliquée dans le phénomène de radiorésistance.

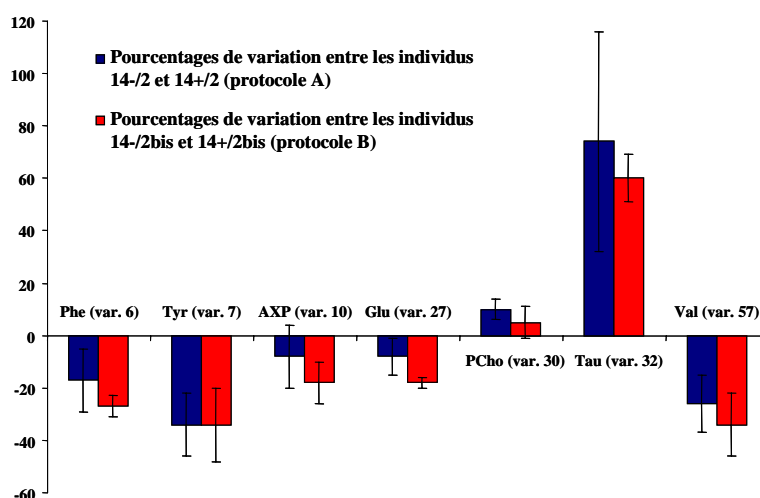
### III.2.6.2. Effet d'une induction prolongée de RhoBN19 (protocole B)

Nous allons maintenant comparer les variations de certains métabolites (Phe, Tyr, AXP, Glu, PCho, Tau et Val) dans les individus 14-/2 et 14+/2 (protocole A) et 14-/2bis et 14+/2bis (protocole B) (comparaisons 2 et 3), afin de mesurer l'effet d'une induction prolongée de 24 h de l'expression de RhoBN19 (Tab. 38 et Fig. 66). Pour éviter d'alourdir le tableau, les métabolites Leu et Ile n'ont pas été considérés. Nous avons vu précédemment qu'ils évoluaient de manière similaire à la Val.

**Tableau 38. Valeurs de quelques métabolites dans les individus 14-/2 et 14+/2 (protocole A) et 14-/2bis et 14+/2bis (protocole B), ainsi que leurs *p-values* et leurs pourcentages de variation.**

N° Métabolite	Comparaison entre les groupes 14+/2 et 14-/2 (protocole A)				Comparaison entre les groupes 14+/2bis et 14-/2bis (protocole B)			
	Moyenne ( $\pm$ SD) en $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines		<i>p-value</i>	% variation ( $\pm$ SD) *	Moyenne ( $\pm$ SD) en $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines		<i>p-value</i>	% variation ( $\pm$ SD) **
	14-/2	14+/2			14-/2bis	14+/2bis		
6 Phe ( $\times 10^{-1}$ )	7,52 $\pm$ 0,74	6,27 $\pm$ 0,90	<b>8,85.10<sup>-4</sup></b>	-17 $\pm$ 12%	10,65 $\pm$ 1,58	7,78 $\pm$ 3,76	<b>5,97.10<sup>-3</sup></b>	-30 $\pm$ 4%
7 Tyr ( $\times 10^{-1}$ )	2,66 $\pm$ 0,46	1,76 $\pm$ 0,30	<b>1,72.10<sup>-5</sup></b>	-34 $\pm$ 11%	4,09 $\pm$ 1,04	2,70 $\pm$ 0,57	<b>2,12.10<sup>-2</sup></b>	-34 $\pm$ 14%
10 AXP ( $\times 10^{-1}$ )	4,28 $\pm$ 0,60	3,92 $\pm$ 0,51	<b>1,19.10<sup>-1</sup></b>	-8 $\pm$ 12%	6,26 $\pm$ 0,44	5,11 $\pm$ 0,53	<b>2,32.10<sup>-3</sup></b>	-18 $\pm$ 8%
27 Glu	1,55 $\pm$ 0,26	1,44 $\pm$ 0,11	<b>1,70.10<sup>-1</sup></b>	-8 $\pm$ 7%	2,85 $\pm$ 0,12	2,33 $\pm$ 0,58	<b>2,04.10<sup>-5</sup></b>	-18 $\pm$ 2%
30 PCho	4,70 $\pm$ 0,21	5,18 $\pm$ 0,20	<b>7,41.10<sup>-6</sup></b>	+10 $\pm$ 4%	7,03 $\pm$ 0,28	7,38 $\pm$ 0,42	<b>1,27.10<sup>-1</sup></b>	+5 $\pm$ 6%
<b>32 Tau (<math>\times 10^{-1}</math>)</b>	<b>2,43 <math>\pm</math> 1,15</b>	<b>4,22 <math>\pm</math> 1,01</b>	<b>4,51.10<sup>-4</sup></b>	<b>+74 <math>\pm</math> 42%</b>	<b>5,81 <math>\pm</math> 0,40</b>	<b>9,28 <math>\pm</math> 0,51</b>	<b>2,04.10<sup>-7</sup></b>	<b>+60 <math>\pm</math> 9%</b>
57 Val ( $\times 10^{-1}$ )	3,06 $\pm$ 0,54	2,25 $\pm$ 0,34	<b>3,33.10<sup>-4</sup></b>	-26 $\pm$ 11%	5,04 $\pm$ 1,09	3,30 $\pm$ 0,61	<b>9,76.10<sup>-3</sup></b>	-34 $\pm$ 12%

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus 14+/2 par rapport à celles des individus 14-/2 ; \*\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus 14+/2bis par rapport à celles des individus 14-/2bis.



**Figure 66. Pourcentages de variation des métabolites entre les protocoles A et B.**

Les échantillons obtenus selon le protocole A n'ont pas été récoltés en même temps et dans les mêmes conditions que ceux obtenus selon le protocole B, ce qui pourrait expliquer les différences entre les individus des protocoles A et B présentés dans le tableau 38. Il manque par ailleurs les individus des groupes 14-bis et 14+bis pour faire directement l'analogie avec tous les individus obtenus selon le protocole A. Les valeurs des variables dans les quatre conditions : 14-/2 et 14+/2 (protocole A) et 14-/2bis et 14+/2bis (protocole B) ne seront donc pas comparées directement.

Néanmoins, il est parfaitement possible de comparer les pourcentages de variation de certains métabolites entre les individus 14-/2 et 14+/2 (protocole A) d'un côté, et entre les individus 14-/2bis et 14+/2bis (protocole B) (Tab. 38 et Fig. 71). Ainsi, nous pouvons remarquer que la diminution des acides aminés (Phe, Glu, Val) entre les groupes traités et non traités est plus importante lorsque les cellules sont en présence de la Dex pendant 72 h (protocole B), que lorsque cette dernière est présente seulement pendant 48 h (protocole A). Cette observation est logique si, comme nous l'avons supposé précédemment, cette diminution du *pool* des acides aminés est imputable à la Dex elle-même.

Par ailleurs, le pourcentage de variation de la PCho selon le protocole B reste insignifiant ( $+5 \pm 6\%$ ). Cela montre que ce métabolite est principalement affecté par l'irradiation et non par la Dex, c'est-à-dire l'induction de l'expression de RhoBN19.

Enfin, le pourcentage de variation de la Tau entre le protocole A et B est sensiblement le même, bien que légèrement inférieur et moins bruité dans le protocole B. Ceci suggère que le traitement optimal des cellules à la Dex est plutôt de 24 h avant l'irradiation (protocole A) que de 48 h avant l'irradiation (le protocole B). Etant donné que l'inhibition de RhoB est théoriquement optimale 48 h après le début de l'induction par la Dex (Delmas et al., 2002), cela suggère que le pic d'inhibition de la protéine RhoB par l'expression de sa forme RhoBN19 doit avoir lieu quelques heures après l'irradiation, afin que l'effet sur les cellules URB14 radiosensibilisées soit optimal.

### III.3. Etude lipidomique

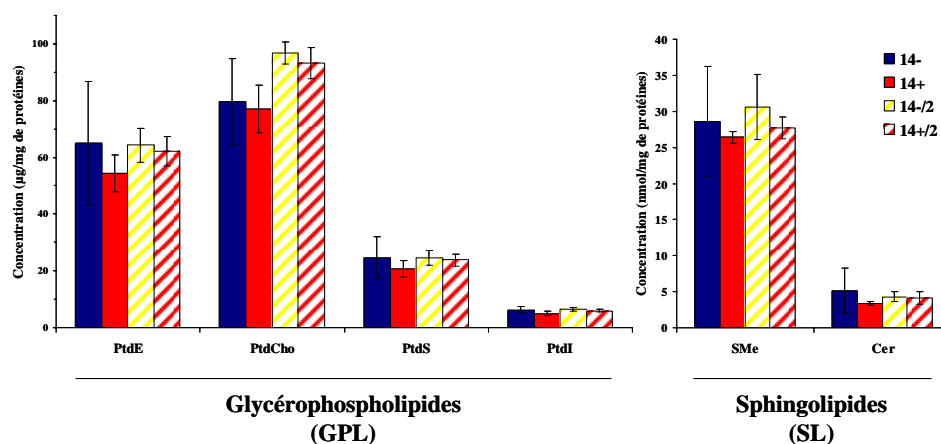
#### III.3.1. Présentation de l'étude et résultats

Une étude lipidomique, complémentaire de l'étude métabolomique présentée précédemment, a été réalisée afin d'observer les variations lipidiques sur des cellules URB14 témoins, irradiées ou pour lesquelles RhoB a été inhibée, avec ou sans irradiation. Pour cela, différentes familles de lipides, pour les quatre conditions (n= 3 pour chaque condition) obtenues selon le protocole A : 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2 ont été quantifiées. Seules les familles de lipides appartenant à la classe des glycérophospholipides (GPL : PtdCho, PtdE, PtdS et PtdI) et à la classe des sphingolipides (SL : SMe et Cer) ont été dosées. Les résultats pour les GPL sont exprimés en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines, tandis que ceux pour les SL sont exprimés en  $\text{nmol}/\text{mg}$  de protéines (Tab. 39 et Fig. 67).

**Tableau 39. Concentration des GPL (en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines) et des SL (en  $\text{nmol}/\text{mg}$  de protéines) dans les individus 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2.**

Classe	Famille	14-	14+	14-/2	14+/2
GPL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de prot.)	PtdE	65,0 $\pm$ 21,6	54,4 $\pm$ 6,5	64,2 $\pm$ 5,9	62,1 $\pm$ 5,2
	PtdCho	79,6 $\pm$ 15,2	77,0 $\pm$ 8,5*	96,8 $\pm$ 4,0*	93,1 $\pm$ 5,5
	PtdS	24,5 $\pm$ 7,4	20,6 $\pm$ 2,9	24,6 $\pm$ 2,5	23,8 $\pm$ 2,0
	PtdI	6,2 $\pm$ 1,2	5,0 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 0,4
SL ( $\text{nmol}/\text{mg}$ de prot.)	SMe	28,5 $\pm$ 7,6	26,4 $\pm$ 0,8	30,6 $\pm$ 4,5	27,7 $\pm$ 1,5
	Cer	5,1 $\pm$ 3,1	3,4 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,7	4,1 $\pm$ 0,8

\*  $p < 0,05$  (test de Student)



**Figure 67. Concentration des GPL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines) et des SL (en  $\text{nmol}/\text{mg}$  de protéines) dans les individus 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2**

### III.3.2. Interprétation

Le faible nombre d'individus par groupe peut expliquer le peu de variables significativement différentes entre les groupes. Seule la concentration des PtdCho est significativement plus faible dans les 14+ par rapport au 14-/2 (Tab. 39).

Les concentrations en PtdE, PtdCho, PtdS, PtdI, SMe et Cer sont globalement légèrement plus basses (non significatives) dans les individus 14+ par rapport aux 14- (Fig. 67, Tab. 39). Cette baisse est plus faible lorsque sont comparés les individus 14+/2 et 14-/2. Le traitement à la Dex, soit l'induction de l'expression de la forme RhoBN19, ne semble donc pas avoir d'influence notable sur le contenu lipidique des cellules URB14.

En revanche, l'irradiation a pour effet d'augmenter la concentration des PtdCho dans les individus 14-/2 comparés aux individus 14-, alors que la concentration des autres familles de lipides ne semble pas varier. En effet, les PtdCho augmentent de  $22 \pm 5\%$  (pourcentage calculé en comparant les valeurs moyennes des PtdCho dans les 14-/2 par rapport à la moyenne des 14-) avec une *p-value* de 0,013. La moyenne des quantités de protéines mesurées dans les quatre groupes (14-, 14+, 14-/2 et 14+/2) est relativement proche et est respectivement de  $3,07 \pm 1,75$ ,  $3,23 \pm 0,01$ ,  $2,75 \pm 0,11$  et  $2,90 \pm 0,31$  mg de protéines. Les différences observées dans les PtdCho ne sont donc pas imputables à la normalisation des données par les quantités de protéines mesurées dans chaque individu.

L'augmentation de la concentration des PtdCho dans les cellules irradiées pourrait conforter l'hypothèse suggérée précédemment selon laquelle les cellules irradiées ont tendance à grossir quelques heures après l'irradiation (Oishi et al., 2008). En effet, les PtdCho sont les glycérophospholipides majoritaires constitutifs des membranes cellulaires. Le grossissement de ces cellules après irradiation corrèlerait donc avec un taux de PtdCho plus important.

## III.4. Etude de la mort cellulaire par cytométrie en flux

### III.3.1. Présentation de l'étude

Une étude par cytométrie en flux (ou FACS) a été réalisée afin d'évaluer les effets de l'irradiation, de l'induction de la forme dominante négative RhoB et de l'association des deux sur la mort des cellules URB14.

Pour cette étude, huit conditions ont été considérées : 14-, 14+, 14-/2, 14+/2 (protocole A) et 14-bis, 14+bis, 14-/2bis et 14+/2bis (protocole B). Chaque condition a été évaluée en triplicata ( $n = 3$ ) et les échantillons ont été récoltés lors de deux expériences distinctes : une dans les conditions du protocole A, l'autre dans les conditions du protocole B.

Quatre états cellulaires ont été considérés (Fig. 68) : les cellules saines (marquage double négatif, région sud-ouest sur les *dot plots*), les cellules nécrotiques (marquage positif à l'Iodure de Propidium, région nord-ouest), les cellules apoptotiques (marquage positif à l'Annexine, région sud-est) et les cellules apoptotiques tardives (double marquage positif, région nord-est). Ces dernières sont considérées comme des cellules apoptotiques dont les membranes plasmiques sont perméabilisées.

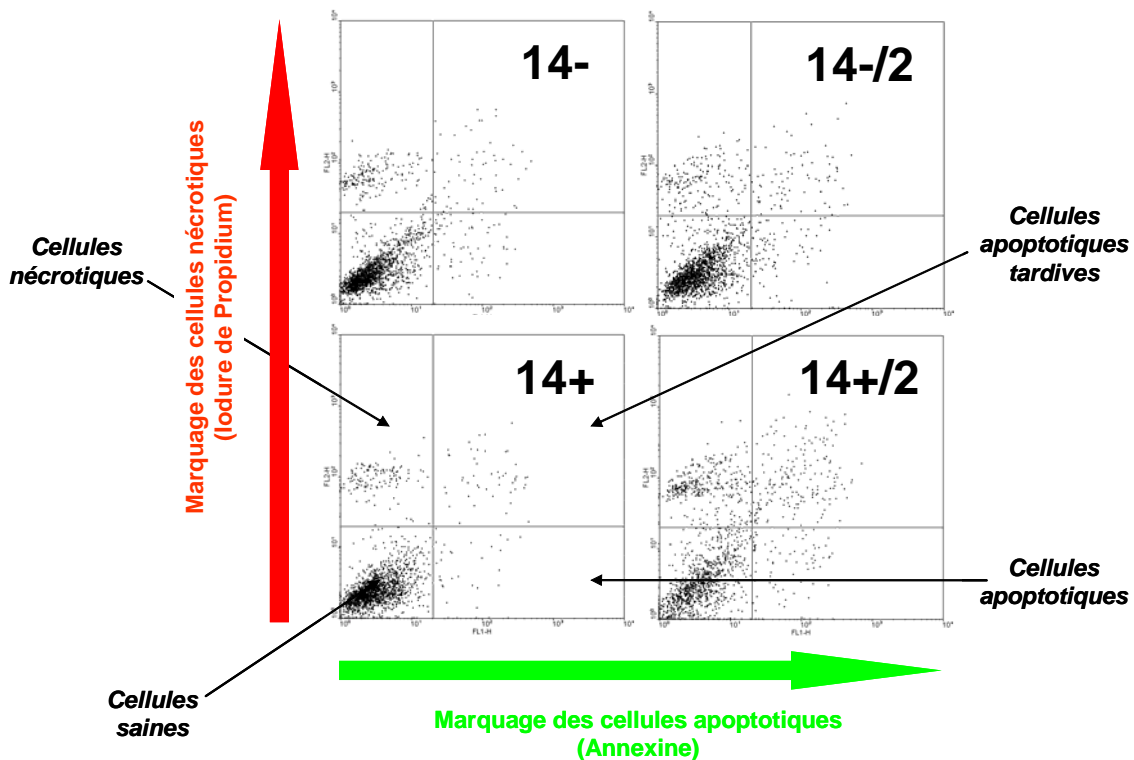


Figure 68. Exemples de *dot plots* obtenus par cytométrie en flux pour les individus 14-, 14+, 14-/2 et 14+/2.

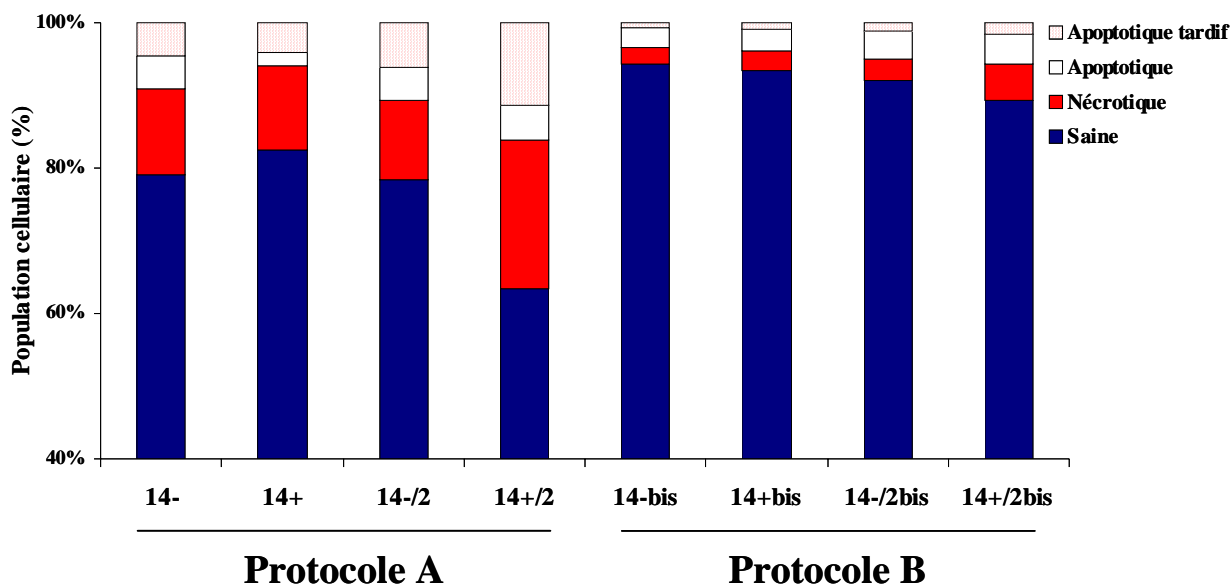


### III.3.2. Résultats

Les pourcentages relatifs ( $\pm$  SD) des quatre états cellulaires pour chacune des conditions sont présentés dans le tableau 39 et les histogrammes suivants (Fig. 69).

**Tableau 40. Pourcentages relatifs ( $\pm$  SD) obtenus par cytométrie en flux des quatre états cellulaires considérés dans les huit conditions des cellules URB14.**

Etat cellulaire	Pourcentage relatif ( $\pm$ SD)							
	Protocole A				Protocole B			
	14-	14+	14-/2	14+/2	14-bis	14+bis	14-/2bis	14+/2bis
Saine	79,2 $\pm$ 7,5	82,5 $\pm$ 5,4	78,4 $\pm$ 8,0	63,5 $\pm$ 3,0	94,4 $\pm$ 0,4	93,5 $\pm$ 2,0	92,1 $\pm$ 0,6	89,3 $\pm$ 0,8
Nécrotique	11,7 $\pm$ 4,8	11,5 $\pm$ 4,3	11,0 $\pm$ 3,6	20,4 $\pm$ 3,4	2,3 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 1,1	2,8 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,4
Apoptotique	4,5 $\pm$ 1,2	2,0 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 1,5	4,7 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,9	3,9 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,7
Apoptotique tardif	4,6 $\pm$ 1,7	4,0 $\pm$ 1,7	6,2 $\pm$ 3,1	11,4 $\pm$ 0,6	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2



**Figure 69. Population cellulaire (en %) dans les huit conditions obtenues selon les protocoles A et B.**

### III.3.3. Interprétation et discussion

Entre les individus obtenus selon les protocoles A et B, une différence de population cellulaire est indéniable. Par exemple, les individus 14- possèdent 15% de cellules saines en moins que les individus 14-bis (Tab. 40). Cela suggère un état cellulaire différent au moment de la réalisation des deux expériences. En effet, dans le cas du protocole B, les cellules ont adhéré 24 h de plus avant d'être traitées à la Dex ou de subir un changement de milieu. Les conditions utilisées lors de ce protocole sont vraisemblablement plus « douces » pour les cellules.

Néanmoins, que ce soit pour les individus obtenus selon le protocole A ou B, les résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet notable de l'induction de l'expression de RhoBN19 seule ou de l'irradiation seule sur la population des cellules URB14. En effet, les populations des individus 14- et 14+ sont très voisines. Il en est de même si l'on compare les individus 14-bis vs 14+bis et 14- vs 14-/2. Il semblerait toutefois qu'il y ait une légère augmentation (1,8%) des cellules apoptotiques totales dans les individus 14-/2bis par rapport aux 14-bis.

En revanche, les résultats suggèrent un effet net de l'association irradiation + induction de l'expression de RhoBN19 (Tab. 40 et Fig. 69). En effet, lorsque sont comparés les individus 14+/2 et 14+/2bis par rapport à leur témoin respectif (14- et 14-bis), nous pouvons observer une diminution d'environ 16 et 5% dans les deux cas des cellules saines. Cela se traduit par un doublement du pourcentage de cellules nécrotiques et par une nette augmentation (d'un facteur  $\sim 1,7$ ) des cellules apoptotiques totales (apoptotiques et apoptotiques tardives).

L'augmentation du pourcentage de cellules nécrotiques et de cellules apoptotiques tardives dans les cellules irradiées radiosensibilisées est en accord avec le possible gonflement des cellules provoqué par l'irradiation. En effet, ce gonflement est une des caractéristiques de la mort par nécrose radio-induite des cellules ainsi qu'une des étapes de l'apoptose tardive (Favaudon, 2000).

### III.5. Conclusion du projet URB14

Au cours des différentes études réalisées pour le projet URB14, nous avons obtenu plusieurs indices nous permettant de constater l'influence de l'inhibition de RhoB sur les cellules URB14, *via* l'induction de l'expression d'une forme dominante négative RhoBN19, avec et sans irradiation.

La première observation concerne l'identification d'un biomarqueur caractéristique de l'induction supposée de l'expression de RhoBN19. Nous n'avons malheureusement pas réussi à obtenir un résultat fiable par *Western-Blot* confirmant cette induction. Néanmoins, une augmentation significative d'un facteur 2 (Fig. 65 et Tab. 37) de la Tau a été observée dans les cellules URB14 traitées à la Dex par rapport aux cellules non traitées (14 vs 14+). Cette augmentation n'est pas imputable à la Dex elle-même, contrairement à la diminution des autres métabolites. Cette modification métabolique ne s'accompagne ni de changement lipidique net (Fig. 67, Tab. 39), ni de changement dans la population cellulaire (Fig. 69 et Tab. 40).

L'augmentation de Tau pourrait donc être une des conséquences de l'inhibition de RhoB. Cette première observation suggère un lien entre RhoB et la régulation des flux d'osmolytes organiques des cellules URB14. En effet, suite à un stress tel que la présence de Dex dans le milieu, les cellules sont susceptibles de gonfler subitement. Elles régulent ensuite la diminution de leur volume (*regulatory volume decrease* ou RVD) en activant des canaux par lesquelles sont expulsés des ions ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ) et des osmolytes, dont le principal est la Tau (Kirk, 1997; Lambert, 2004). Une étude a montré que la protéine RhoA participe à l'activation de ces flux osmotiques (Pedersen et al., 2002). Les auteurs suggèrent également une implication globale des Rho GTPases dans le contrôle de la RVD. Enfin, une autre équipe a montré que les protéines ERK et JNK, appartenant à la famille des MAP kinases, étaient impliquées dans l'efflux de la Tau. Leur inhibition dans des cellules d'astrocytome de rat (C6) entraîne des diminutions de cet efflux et de la prolifération cellulaire (Belsey et al., 2007).

Ainsi, si nous émettons l'hypothèse que RhoB contribue à l'efflux de Tau, son inhibition est susceptible de perturber ce dernier et donc d'augmenter la concentration intracellulaire de cet osmolyte.

La deuxième observation importante concerne les modifications métabolique et lipidomique dans le groupe irradié (14-/2) par rapport au groupe 14- (Tabs. 37 et 39). Ces

modifications ne s'accompagnent pas de changement notable dans la population cellulaire des individus obtenus selon le protocole A (Tab. 40). Néanmoins, il semblerait qu'il y ait une légère augmentation des cellules apoptotiques totales (apoptotiques et apoptotiques tardives) dans le groupe 14-/2bis.

Les modifications métabolique et lipidomique se caractérisent par une nette augmentation des métabolites intracellulaires en général, dont la Tau (d'un facteur 2,4). Cette augmentation corrèle avec une augmentation des PtdCho, les glycérophospholipides majoritaires des membranes cellulaires. Nous pouvons donc en déduire que l'irradiation entraîne un stress oxydant brutal, qui se traduit notamment par un gonflement rapide des cellules (Shennan, 2008). Au moment de leur récolte, soit 24 h après l'irradiation, certaines ont retrouvé leur volume initial (phénomène de RVD) et continuent de proliférer, tandis que d'autres ont continué à gonfler et sont entrées en sénescence ou en mort cellulaire indéterminée, mais non apoptotique. Cela est confirmé par les travaux d'auteurs qui ont montré que le taux de cellules CGNH-89 (GBM) « larges » était à son maximum 48 h après irradiation (Oishi et al., 2008).

L'augmentation significative de Tau conforte l'hypothèse selon laquelle l'irradiation est susceptible d'entraîner de la mort radio-induite majoritairement non-apoptotique, autrement dit nécrotique (Iwadata et al., 2001). En effet, une étude métabolomique par HR-MAS a montré, sur des cellules leucémiques (HL60), qu'une diminution de la Tau corrèle avec les cellules induites en apoptose (par irradiation ou par traitement à la doxorubicine), tandis que son augmentation témoigne de cellules nécrotiques (après chauffage à 57°C) (Rainaldi et al., 2008). Par ailleurs, l'étude lipidomique n'a pas révélé d'augmentation du taux des Cer qui augmente dans les cellules apoptotiques (Bieberich et al., 1999). Néanmoins, d'autres auteurs proposent la Tau comme étant un marqueur fiable de l'apoptose des gliomes *in vivo* (Opstad et al., 2009).

L'augmentation de Tau pourrait notamment venir du fait que l'expression de RhoB est induite sous irradiation (Vega & Ridley, 2008), ce qui entraîne une inactivation d'une des isoformes de PKC (Baldwin et al., 2008). Or, cette dernière est impliquée dans la régulation de la protéine TauT, un transporteur responsable de l'incorporation de Tau dans les cellules (Lambert, 2004). La Tau étant le principal osmolyte des cellules, son incorporation est indispensable pour assurer leur homéostasie, qui plus est après une irradiation.

L'association irradiation plus inhibition de la protéine RhoB entraîne bien une mort cellulaire radio-induite des cellules URB14, comme déjà décrit (Delmas et al., 2002). D'un point de vue métabolique, cela se traduit encore par une augmentation de la Tau (environ d'un

facteur 1,6) lorsque l'on compare les individus 14-/2 vs 14+/2 et 14-/2bis vs 14+/2bis (Tab. 38). Cette augmentation est bien sûr beaucoup plus importante si on compare les individus 14+/2 vs 14- (environ d'un facteur 4). Cette augmentation semble être la somme de l'effet de l'inhibition de RhoB d'une part, et de l'irradiation d'autre part. Il n'y en revanche pas de différence significative dans le contenu lipidique des individus 14+/2 par rapport aux individus 14-/2, bien qu'une légère baisse globale soit observée. Cette baisse pourrait être imputée à une lyse cellulaire un peu plus importante dans les 14+/2. Cela serait cohérent avec les résultats obtenus par cytométrie en flux (Tab. 40). En effet, une nette diminution des cellules saines est observée dans les individus 14+/2 et 14+/2bis, ce qui se traduit par une augmentation des cellules apoptotiques totales et un doublement des cellules nécrotiques par rapport à leur témoin respectif (14- et 14-bis).

Il semblerait bien que la mort cellulaire radio-induite qui prédomine pour ces cellules radiosensibilisées soit la nécrose (autophagie, mort mitotique, mort post-mitotique ou oncose), bien que l'apoptose et l'apoptose tardive semblent être faiblement impliquées. Ces résultats semblent confirmer le contrôle des morts radio-induites mitotique et post-mitotique des cellules de GBM U87 radorésistantes par la protéine RhoB (Delmas *et al.*, 2002; Ader *et al.*, 2003; Milia *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'augmentation de l'osmolyte Tau semble être corrélée à la fois à l'inhibition de RhoB et à la mort cellulaire radio-induite non apoptotique des cellules URB14.

## IV. Projet KILK2

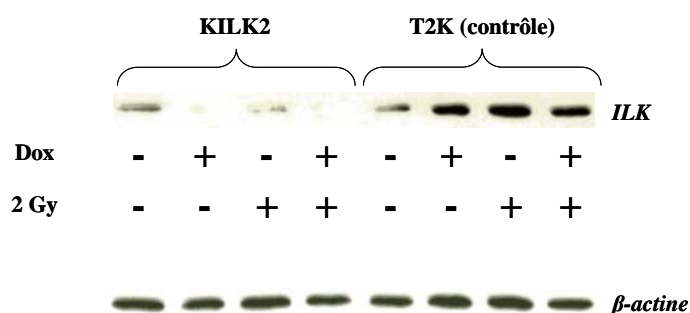
### IV.1. Présentation du projet

A travers cette étude, il nous a semblé intéressant d'étudier les perturbations métaboliques à court terme occasionnées par l'inhibition de la transcription de la protéine *Integrin-Linked Kinase* (ILK) sur la lignée cellulaire KILK2, avec ou sans irradiation de 2 Gy. La protéine ILK intervient dans les mécanismes de radio-résistance des cellules de GBM (Monferran et al., 2008). L'inhibition est inducible à la doxycycline (Dox). Cette lignée est dérivée de la lignée radio-résistante U87, tout comme la lignée contrôle T2K pour lesquelles le traitement à la Dox n'a aucun effet sur l'expression de la protéine ILK.

Nous avons considéré quatre conditions pour la lignée KILK2 : KILK2 sans traitement et sans irradiation (**K-**), KILK2 avec Dox (**K+**), KILK2 avec irradiation (**K-/2**) et KILK2 avec Dox plus irradiation (**K+/2**) et quatre conditions pour la lignée T2K : T2K sans traitement et sans irradiation (**T-**), T2K avec Dox (**T+**), T2K avec irradiation (**T-/2**) et T2K avec Dox plus irradiation (**T+/2**).

### IV.2. Contrôle de l'inhibition de la transcription d'ILK par WB

L'inhibition de la transcription de la protéine ILK a été vérifiée par *Western-Blot* (WB) pour les huit conditions considérées lors de cette étude. La protéine ILK est visible sur la membrane à un poids moléculaire d'environ 59 kDa (Fig. 70). Que ce soit sans ou avec irradiation, l'inhibition d'ILK dans les cellules KILK2 semble évidente après induction à la Dox. La présence de Dox n'a effectivement aucun effet sur l'expression d'ILK dans les cellules T2K (contrôle).



**Figure 70. Vérification de l'inhibition de la transcription de la protéine ILK (~ 59 kDa) dans les cellules KILK2 et T2K après induction à la doxycycline (Dox), avec et sans irradiation (2 Gy).**

### IV.3. Etude métabolomique

Pour cette étude, les huit conditions considérées : K-, K+, K-/2, K+/2, T-, T+, T- /2 et T+/2 ont été comparées deux à deux. Le nombre d'individus est respectivement de 9, 9, 7, 7, 10, 11, 10 et 10, après que des individus *outliers* aient été écartés. Les comparaisons considérées sont les suivantes :

- **Comparaison 1** : K- vs K+ ;
- **Comparaison 2** : T- vs T+ ;
- **Comparaison 3** : K-/2 vs K+/2 ;
- **Comparaison 4** : T-/2 vs T+/2 ;
- **Comparaison 5** : K- vs K+/2 ;
- **Comparaison 6** : T- vs T+/2.

La première comparaison (K- vs K+) permet de mettre en évidence les métabolites qui varient de manière significative après que les cellules KILK2 aient été induites à la doxycycline (Dox). La comparaison 2 (T- vs T+) permet de vérifier l'effet de la Dox (concentration finale de 1 µg/mL) sur les cellules T2K (cellules contrôles). Nous ne présenterons pas la comparaison K- vs K-/2 (ou T- vs T-/2) qui montrerait l'effet de l'irradiation sur les cellules KILK2 (ou T2K), sans Dox. En effet, le constat est le même que celui dressé lors des études précédentes ; il est difficile de comparer un groupe d'individus irradiés avec un groupe d'individu non irradiés. En effet, trente-cinq variables sur cinquante sept ont une *p-value* inférieure à 0,05, en comparant K- vs K-/2. Il en est de même pour les comparaisons 5 et 6 (vingt-neuf et cinquante variables significatives, respectivement). Il n'est donc pas possible d'étudier directement l'association Dox + irradiation sur les cellules KILK2 (comparaison 5) et T2K (comparaison 6, contrôle). Pour palier ce problème, nous comparons les individus K-/2 vs K+/2 (comparaison 3), ainsi que T-/2 vs T+/2 (comparaison 4) comme individus contrôles. Les résultats de ces comparaisons seront corrélés à ceux des comparaisons 1 et 2.

### IV.3.1. Attribution spectrale et *bucketing*

La liste des *buckets* (ou variables, notées var.) considérés (numéros de variables, déplacements chimiques et attributions) dans cette étude est décrite dans le tableau 41.

**Tableau 41. Liste des *buckets* (numéros de variables, déplacements chimiques et attributions) pour l'étude métabolomique du projet KILK2.**

N°	$\delta$ (ppm)	attribution	N°	$\delta$ (ppm)	attribution
1	8.457635 8.446635	AXP	30	3.229484 3.216483	PCho
2	8.380633 8.369633	?	31	3.216483 3.198483	Cho
3	8.284630 8.264630	?	32	3.086480 3.071479	Tau
4	8.166627 8.155626	?	33	3.049479 3.043478	PCr
5	7.693613 7.676613	UXP	34	3.043478 3.034478	Cr
6	7.455606 7.279601	Phe	35	3.010477 2.922475	GSH_ox
7	7.126597 7.094596	Tyr	36	2.922475 2.887474	GSH_red
8	6.792587 6.757586	Tyr	37	2.843473 2.773471	GSH_red
9	6.527579 6.515579	Fum	38	2.773471 2.752470	Asp
10	6.180569 6.150568	AXP	39	2.736469 2.711469	Asp
11	6.004564 5.964563	?	40	2.501463 2.410460	GSH_ox+red
12	5.914561 5.865560	UXP	41	2.410460 2.399460	Succ+GSH_ox+red
13	4.526521 4.454519	UXP	42	2.399460 2.382459	?
14	4.454519 4.377517	AXP	43	2.370459 2.313457	Gln
15	4.377517 4.303515	GPCho	44	2.313457 2.245455	Glu
16	4.303515 4.253513	GSH_red	45	2.131452 2.121452	Met
17	4.253513 4.198512	AXP+UXP	46	2.057450 1.923446	GSH+Glu+Gln
18	4.198512 4.131510	PCho	47	1.915446 1.849444	GSH+Glu+Gln
19	4.131510 4.091509	Lac	48	1.398431 1.358430	Ala
20	3.956505 3.944504	PCr	49	1.348429 1.311428	Lac
21	3.944504 3.924504	Cr	50	1.232426 1.211425	Thr
22	3.794500 3.783500	GSH_ox	51	1.005419 0.978419	Val
23	3.783500 3.776500	GSH_red	52	0.978419 0.956418	Ile
24	3.776500 3.764499	GSH_ox+red	53	0.956418 0.937417	Leu
25	3.732498 3.723498	Asp+GSH_ox+red	54	0.937417 0.929417	Val+Ile
26	3.705498 3.669496	GPCho	55	0.929417 0.922417	Leu
27	3.516492 3.459490	Glu	56	0.922417 0.916417	Val
28	3.379488 3.366488	Gly+Gln	57	0.916417 0.888416	Ile
29	3.246484 3.229484	GPCho			

« ? » signifie que la variable n'a pas été attribuée.



### IV.3.2. Comparaison 1 : K- vs K+

Une première analyse a été effectuée pour comparer ces deux groupes et a montré un *outlier* dans le groupe des K- : l'individu K-8A. Il n'a donc pas été considéré dans la suite de notre étude.

L'analyse univariée supervisée a révélé vingt-sept variables ayant une *p-value* significative (dans l'ordre décroissant) : 40, 24, 27, 46, 47, 44, 28, 21, 48, 53, 32, 15, 43, 25, 52, 35, 26, 18, 29, 7, 55, 49, 20, 45, 34, 19 et 10. L'allure des *box plots* et *violin plots*, avec une relativement bonne séparation des distributions des valeurs de ces variables dans les deux groupes, est correcte pour les variables suivantes : 40 (GSH\_ox+red), 24 (GSH\_ox+red), 27 (Glu), 46 (GSH+Glu+Gln), 47 (GSH+Glu+Gln), 44 (Glu), 21 (Cr) et 48 (Ala). La variable 21 (Cr) n'a pas été retenue car elle n'a pas été confirmée par l'autre signal de la variable Cr (var. 34) ; de la même façon, les variables 46 et 47 (GSH+Glu+Gln) qui ne sont pas spécifiques d'un seul métabolite n'ont pas été concernées (Tab. 42).

La grande variance des variables 26 (GPCho), 44 (Glu) et 46 (GSH+Glu+Gln) nous a amené à travailler en UV pour l'analyse multivariée supervisée. Ainsi, le modèle obtenu en PLS-DA avec UV est prédictif (Fig. 71) : 3 axes,  $R^2X = 0,555$ ,  $R^2Y = 0,995$ ,  $Q^2 = 0,959$ , CV-ANOVA =  $3,9 \cdot 10^{-5}$ . Les variables retenues en analyse univariée supervisée, 24 et 40 (GSH\_ox+red) et 27 (Glu), contribuent fortement à la construction du modèle (Fig. 71C). Le *coefficient plot* confirme que globalement toutes les variables sont plus importantes dans les individus K+, en particulier celles retenues en analyse univariée supervisée (Fig. 71D).

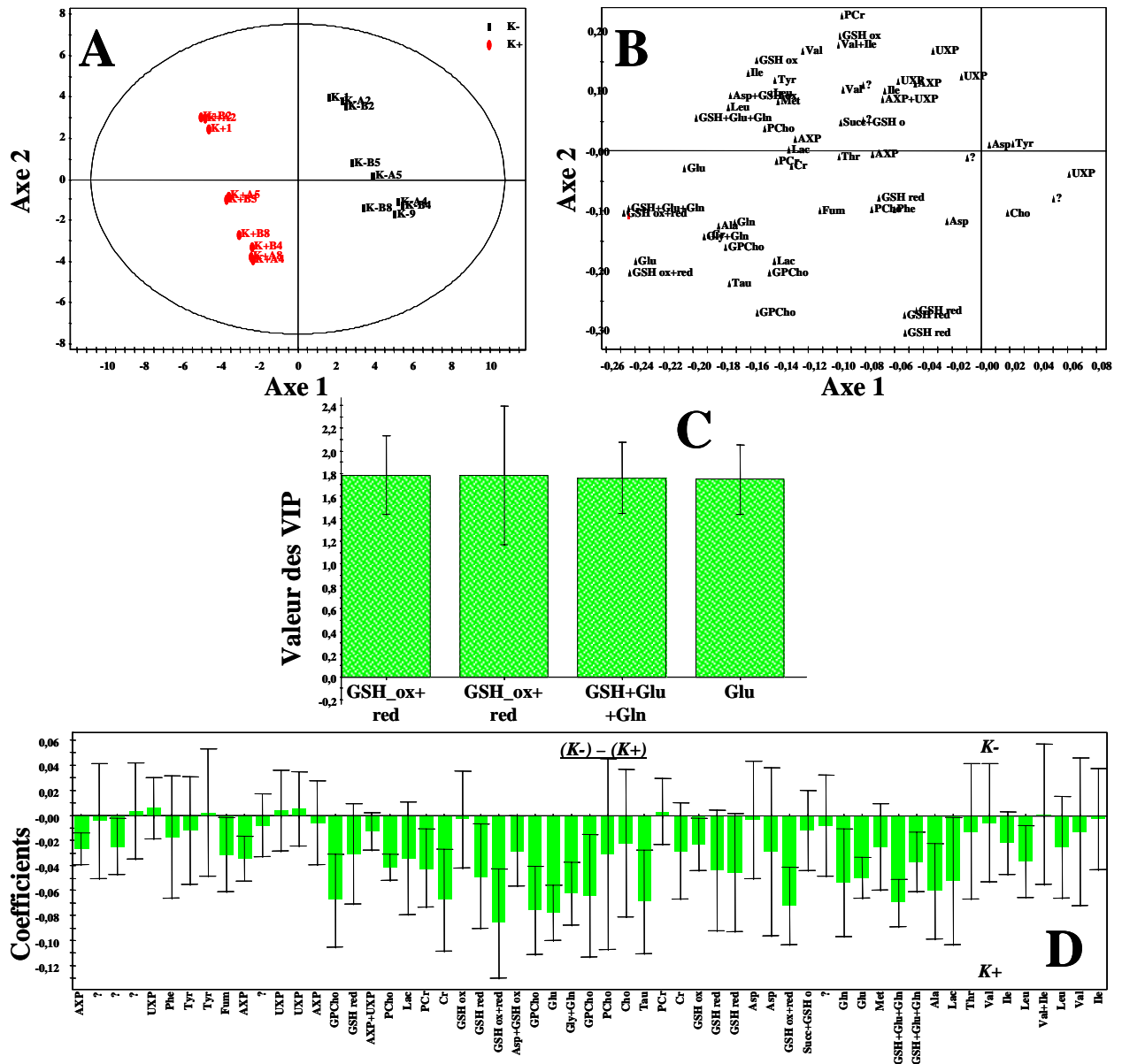


Figure 71. Résultats en analyse multivariée supervisée (PLS-DA avec UV) de la comparaison « K- vs K+ » : (A) Score plot, (B) Loading plot, (C) VIP plot et (D) Coefficient plot [(K-) - (K+)].

Tableau 42. Valeurs des *p*-values des métabolites discriminants du modèle « K- vs K+ » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).

Métabolite discriminant	<i>p</i> -value (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre variable	Intervenant dans la construction du modèle
GSH_ox+red (var. 40)	$5,98.10^{-7}$	$+18 \pm 3\%$	var. 24	Oui
Glu (var. 27)	$2,92.10^{-6}$	$+24 \pm 5\%$	var. 44	Oui
Ala (var. 48)	$2,29.10^{-3}$	$+25 \pm 13\%$	-	-

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus K+ par rapport à celles des individus K-.

### IV.3.3. Comparaison 2 : T- vs T+

L'analyse univariée supervisée a révélé vingt-quatre variables ayant une *p-value* significative (dans l'ordre décroissant) : 40, 24, 46, 21, 27, 25, 48, 35, 30, 33, 28, 47, 15, 10, 34, 32, 54, 29, 44, 3, 17, 26, 18 et 9. L'allure des *box plots* et *violin plots*, avec une relativement bonne séparation des distributions des valeurs de ces variables dans les deux groupes, est correcte pour les variables suivantes : 40 (GSH\_ox+red), 24 (GSH\_ox+red), 46 (GSH+Glu+Gln), 21 (Cr) et 27 (Glu). La variable 21 (Cr) n'a pas été retenue car elle n'a pas été confirmée par l'autre signal de la variable Cr (var. 34) ; de même pour la variable 46 (GSH+Glu+Gln) qui n'est pas spécifique d'un seul métabolite. Enfin, la var. 48 (Ala) a été ajoutée afin de pouvoir comparer sa variation avec celle déterminée dans la comparaison 1 (Tab. 43).

Les résultats obtenus en analyse multivariée supervisée sont très similaires à ceux obtenus pour la comparaison 1. C'est pourquoi ils sont simplement décrits mais non représentés. La grande variance des variables 26 (GPCho), 44 (Glu) et 46 (GSH+Glu+Gln) nous a conduit à travailler en UV. Ainsi, le modèle obtenu en PLS-DA est prédictif : 2 axes,  $R^2X = 0,384$ ,  $R^2Y = 0,988$ ,  $Q^2 = 0,947$ ,  $CV\text{-ANOVA} = 4,7 \cdot 10^{-7}$ . Les variables retenues en analyse univariée supervisée, 24 et 40 (GSH\_ox+red) et 46 (GSH+Glu+Gln), contribuent fortement à la construction du modèle. Le *coefficient plot* confirme que globalement toutes les variables sont plus importantes dans les individus T+, en particulier celles retenues en analyse univariée supervisée.

**Tableau 43. Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants de la comparaison « T- vs T+ » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).**

Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre	Intervenant dans la construction du modèle
GSH_ox+red (var. 40)	$7,00 \cdot 10^{-7}$	+17 $\pm$ 5%	var. 24	Oui
Glu (var. 27)	$6,72 \cdot 10^{-4}$	+22 $\pm$ 10%	-	-
Ala (var. 48)	$2,15 \cdot 10^{-3}$	+20 $\pm$ 11%	-	-

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus T+ par rapport à celles des individus T-.

#### IV.3.4. Comparaison 3 : K-/2 vs K+/2

Une première analyse (univariée et multivariée) a été effectuée entre ces deux groupes (K-/2 vs K+/2), initialement chacun constitué de onze individus. Mais une forte hétérogénéité intra-groupe nous a amené à écarter quatre individus de chaque groupe (correspondant aux expériences 7 et 11).

L'analyse univariée supervisée a révélé une seule variable ayant une *p-value* inférieure à 0,05 : Val (56) avec  $p = 4,21.10^{-2}$ . L'allure de ses *box plot* et *violin plot* n'est pas très bonne. Afin d'essayer d'extraire des informations de cette comparaison, nous nous sommes fixé un critère d'astringence moins restrictif. En fixant le seuil de *p-value* à 0,1, nous avons obtenu seulement deux variables répondant au critère (dans l'ordre décroissant) : 56 (Val) et 55 (Leu) (Tab. 44). L'allure des *box plots* et *violin plots* a montré que les valeurs de ces variables étaient légèrement plus élevées dans les K-/2.

La grande variance des variables 26 et 29 (GPCho), 44 (Glu) et 49 (Ala) nous a encouragé à travailler en UV pour l'analyse multivariée supervisée. Néanmoins, le modèle obtenu en PLS-DA avec UV n'est pas du tout prédictif (Fig. 72) : 2 axes,  $R^2X = 0,450$ ,  $R^2Y = 0,805$ ,  $Q^2 = 0,304$ ,  $CV\text{-ANOVA} = 4,5.10^{-1}$ .

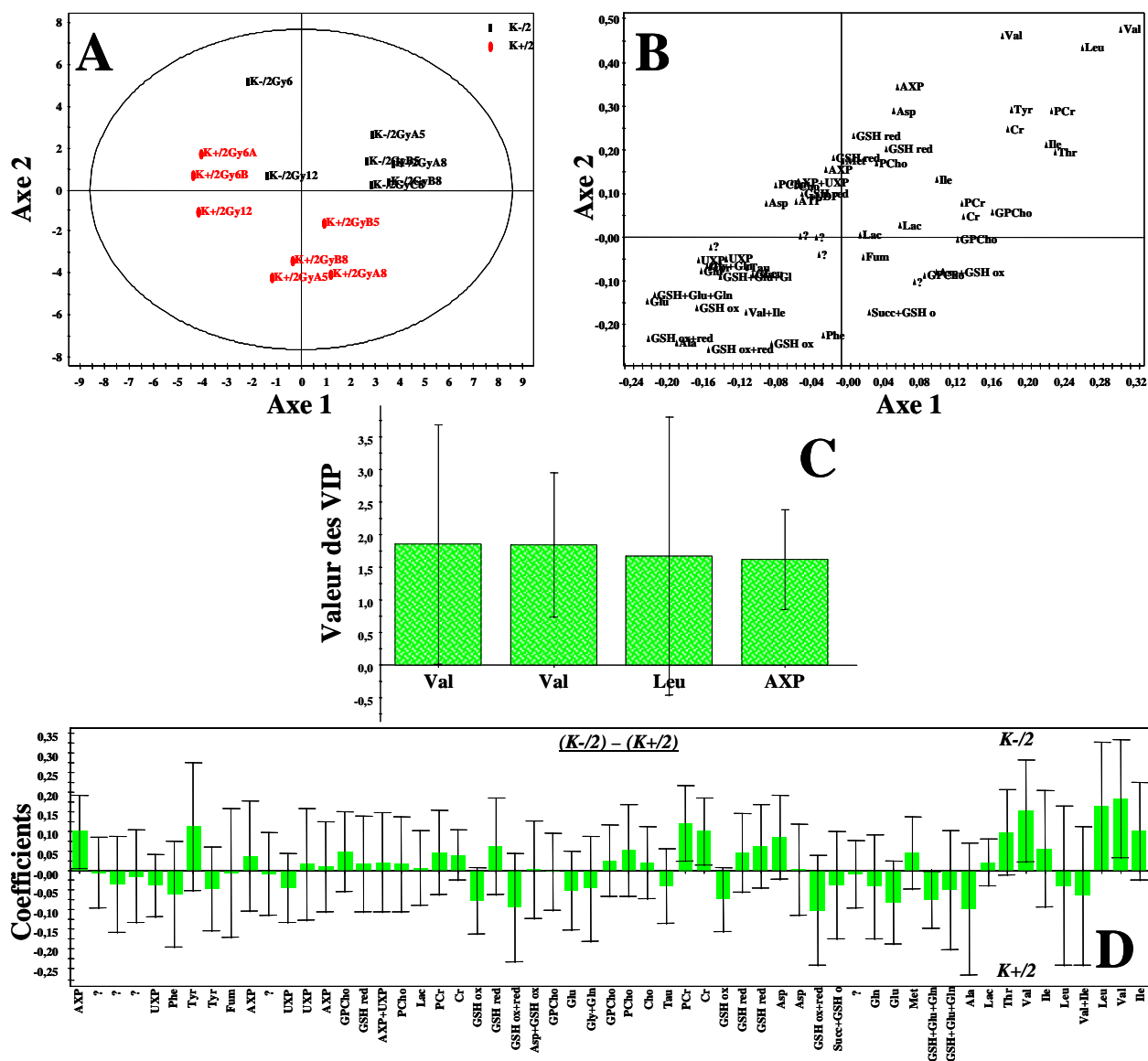


Figure 72. Résultats en analyse multivariée supervisée (PLS-DA avec UV) du modèle « K-/2 vs K+/2 » : (A) Score plot, (B) Loading plot, (C) VIP plot et (D) Coefficient plot [(K-/2) – (K+/2)].

Tableau 44. Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants de la comparaison « K-/2 vs K+/2 » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).

Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre variable	Intervient dans la construction du modèle
Val (var. 56)	$4,21.10^{-2}$	$-9 \pm 6\%$	-	-
Leu (var. 55)	$8,65.10^{-2}$	$-5 \pm 6\%$	-	-

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus K+/2 par rapport à celles des individus K-/2.

### IV.3.5. Comparaison 4 : T-/2 vs T+/2

L'analyse univariée supervisée a révélé trente-quatre variables ayant une *p-value* inférieure à 0,05 (dans l'ordre décroissant) : 24, 21, 46, 27, 54, 40, 11, 30, 53, 56, 52, 44, 18, 47, 35, 20, 15, 7, 38, 32, 3, 8, 55, 28, 9, 34, 51, 41, 12, 48, 45, 19, 57 et 26. L'allure des *box plots* et *violin plots*, avec une relativement bonne séparation entre les deux groupes, a été validée pour les variables suivantes : 24 (GSH\_ox+red), 21 (Cr), 46 (GSH+Glu+Gln), 27 (Glu), 54 (Val+Ile), 40 (GSH\_ox+red), 11 (?), 53 (Leu), 56 (Val), 52 (Ile) et 44 (Glu). Dans le tableau récapitulatif (Tab. 45), nous avons conservé seulement les variables qui correspondent à un seul métabolite. La var. 21 (Cr) a été conservée, bien qu'elle n'ait pas été confirmée de manière non anbigüe par son autre variable (var. 34).

Le modèle obtenu en PLS-DA avec UV est prédictif (Fig. 73) : 3 axes,  $R^2X = 0,567$ ,  $R^2Y = 0,994$ ,  $Q^2 = 0,932$ ,  $CV\text{-ANOVA} = 4,9 \cdot 10^{-5}$ . Les variables retenues en analyse univariée supervisée, 21 (Cr) et 24 (GSH\_ox+red), contribuent fortement à la construction du modèle (Fig. 73C). Le *coefficient plot* confirme que globalement toutes les variables sont plus importantes dans les individus T+/2 (Fig. 73D).

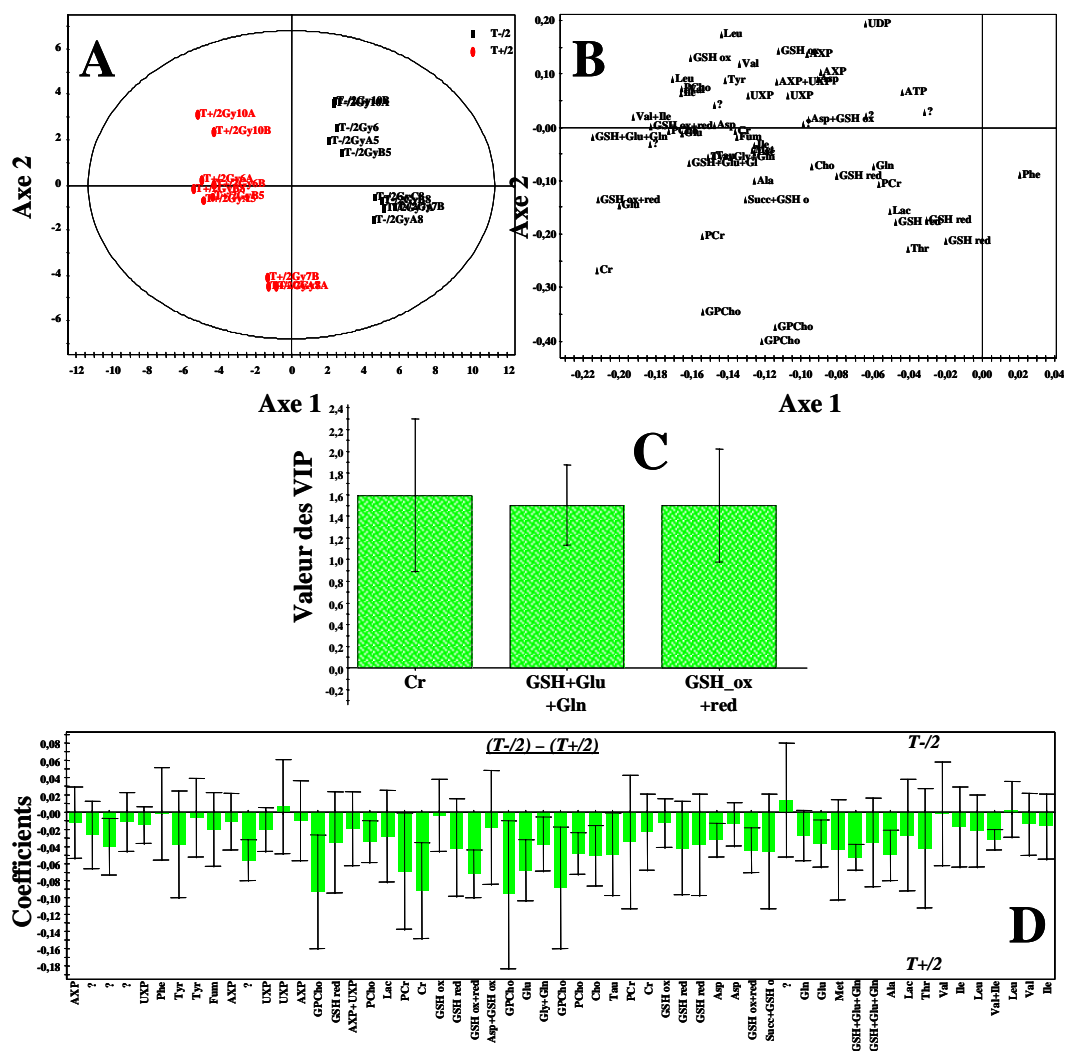


Figure 73. Résultats en analyse multivariée supervisée (PLS-DA avec UV) de la comparaison « T-/2 vs T+/2 » : (A) *Score plot*, (B) *Loading plot*, (C) *VIP plot* et (D) *Coefficient plot [(T-/2) – (T+/2)]*.

Tableau 45. Valeurs des *p-values* des métabolites discriminants de la comparaison « T-/2 vs T+/2 » ainsi que leur pourcentage de variation ( $\pm$  SD).

Métabolite discriminant	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*	Confirmation par une autre variable	Intervient dans la construction du modèle
GSH_ox+red (var. 24)	$1,59.10^{-5}$	$+13 \pm 5\%$	var. 40	Oui
Cr (var. 21)	$1,64.10^{-5}$	$+10 \pm 4\%$	var. 34	Oui
Glu (var. 27)	$1,25.10^{-4}$	$+12 \pm 4\%$	var. 44	-
Leu (var. 55)	$2,39.10^{-3}$	$+20 \pm 15\%$	var. 55	-
Val (var. 56)	$3,26.10^{-3}$	$+18 \pm 12\%$	var. 51	-
Ile (var. 52)	$3,43.10^{-3}$	$+17 \pm 13\%$	var. 57	-

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus T+/2 par rapport à celles des individus T-/2.

### IV.3.6. Comparaisons 5 et 6 : K- vs K+/2 et T- vs T+/2

Afin de pouvoir apprécier l'effet de l'association irradiation plus inhibition de l'expression de la protéine ILK par induction à la Dox sur le profil métabolique des cellules KILK2 (comparaison 5 : K- vs K+/2), nous avons comparé dans un premier temps les variations métaboliques entre les individus K- et K+ (comparaison 1), puis les variations métaboliques entre les individus K-/2 et K+/2 dans un deuxième temps (comparaison 2) (Tabs. 42 et 44). Les comparaisons réalisées sur les individus T2K (comparaison 2 et 4) nous ont permis de voir l'influence du traitement des cellules par la Dox. La comparaison 6 (T- vs T+/2) a donc été réalisée en parallèle de la comparaison 5.

Nous avons ainsi été en mesure d'identifier des métabolites discriminants entre les différents groupes. En comparant les différences de moyennes des valeurs de ces variables dans les huit groupes, il a été possible de mettre en évidence les variations métaboliques entre les individus K- vs K+/2 et T- vs T+/2 imputables aux RI, à l'inhibition de l'expression d'ILK (ou à la présence de Dox) ou à l'association des deux (Tabs. 46 et 47). La var. 32 (Tau) et la somme des var. 33+34 (Cr+PCr) ont été ajoutées dans les tableaux présentés ci-dessous. Ces derniers ont été complétés par des histogrammes des valeurs des variables les plus marquantes (Fig. 74).

**Tableau 46. Valeur des variables discriminantes entre les individus K-, K+, K-/2 et K+/2, et *p-values* des variables entre les groupes K- et K+/2.**

Variable		Moyenne ( $\pm$ SD) des variables dans les quatre groupes (en $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines)				Comparaison entre les conditions K+/2 et K-	
		K-	K+	K-/2	K+/2	<i>p-value</i> (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*
N°	Métabolite						
21	Cr	1,08 $\pm$ 0,07	1,20 $\pm$ 0,03	1,26 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,09	<b>2,29.10<sup>-3</sup></b>	+13 $\pm$ 8%
33+34	Cr+PCr ( $\times 10^{-1}$ )	5,59 $\pm$ 0,48	6,25 $\pm$ 0,45	6,96 $\pm$ 0,75	6,48 $\pm$ 0,47	<b>2,27.10<sup>-3</sup></b>	+16 $\pm$ 8%
27	Glu	2,14 $\pm$ 0,15	2,65 $\pm$ 0,10	2,92 $\pm$ 0,12	3,00 $\pm$ 0,19	<b>8,86.10<sup>-8</sup></b>	+40 $\pm$ 9%
32	Tau	1,16 $\pm$ 0,21	1,60 $\pm$ 0,30	1,87 $\pm$ 0,30	1,97 $\pm$ 0,31	<b>2,08.10<sup>-5</sup></b>	+70 $\pm$ 27%
40	GSH	2,15 $\pm$ 0,09	2,53 $\pm$ 0,06	2,66 $\pm$ 0,06	2,74 $\pm$ 0,14	<b>8,43.10<sup>-8</sup></b>	+28 $\pm$ 7%
48	Ala	1,89 $\pm$ 0,26	2,36 $\pm$ 0,25	2,62 $\pm$ 0,25	2,80 $\pm$ 0,32	<b>1,73.10<sup>-5</sup></b>	+48 $\pm$ 17%
52	Ile ( $\times 10^{-1}$ )	3,42 $\pm$ 0,31	3,97 $\pm$ 0,37	4,35 $\pm$ 0,19	4,28 $\pm$ 0,20	<b>2,08.10<sup>-5</sup></b>	+25 $\pm$ 6%
55	Leu ( $\times 10^{-1}$ )	1,75 $\pm$ 0,08	1,94 $\pm$ 0,15	2,18 $\pm$ 0,09	2,06 $\pm$ 0,13	<b>6,58.10<sup>-5</sup></b>	+17 $\pm$ 8%
56	Val ( $\times 10^{-1}$ )	1,61 $\pm$ 0,13	1,74 $\pm$ 0,16	2,01 $\pm$ 0,17	1,83 $\pm$ 0,12	<b>4,40.10<sup>-3</sup></b>	+14 $\pm$ 7%

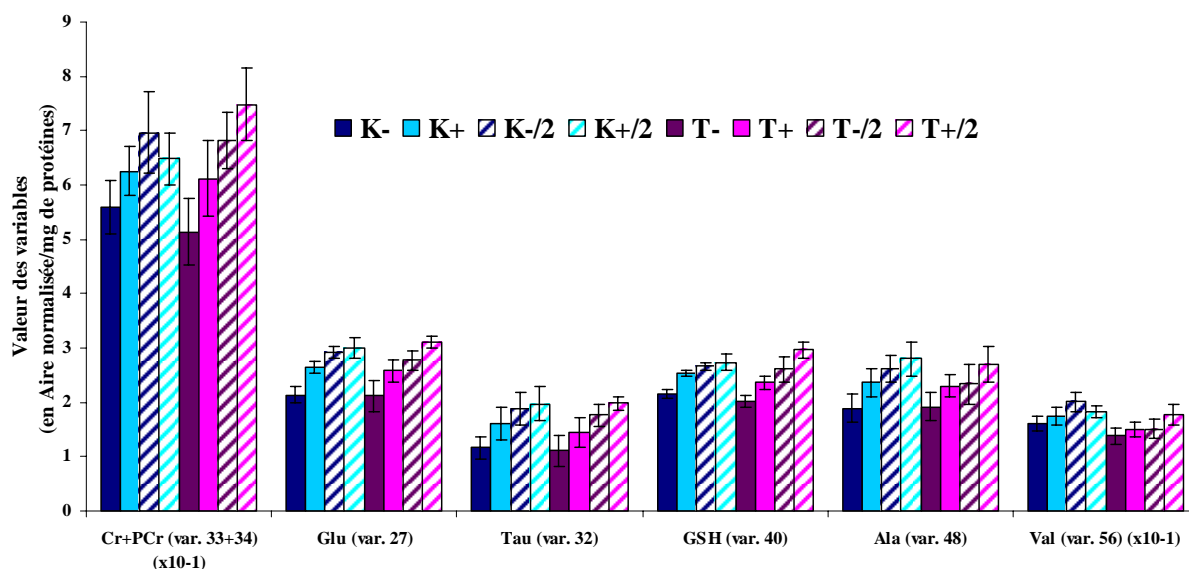
\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus K+/2 par rapport à celles des individus K-.



**Tableau 47. Valeur des variables discriminantes entre les individus T-, T+, T-/2 et T+/2, et p-values des variables entre les groupes T- et T+/2.**

Variable		Moyenne ( $\pm$ SD) des variables dans les quatre groupes (en $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines)				Comparaison entre les conditions T+/2 et T-	
N°	Métabolite	T-	T+	T-/2	T+/2	p-value (test de Welch)	Pourcentage de variation ( $\pm$ SD)*
21	Cr	1,15 $\pm$ 0,07	1,27 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,05	1,46 $\pm$ 0,06	<b>2,95.10<sup>-9</sup></b>	+27 $\pm$ 5%
33+34	Cr+PCr ( $\times 10^{-1}$ )	5,14 $\pm$ 0,61	6,12 $\pm$ 0,70	6,82 $\pm$ 0,52	7,48 $\pm$ 0,67	<b>1,83.10<sup>-7</sup></b>	+45 $\pm$ 13%
27	Glu	2,12 $\pm$ 0,28	2,58 $\pm$ 0,21	2,77 $\pm$ 0,18	3,11 $\pm$ 0,12	<b>5,56.10<sup>-9</sup></b>	+47 $\pm$ 6%
32	Tau	1,11 $\pm$ 0,28	1,45 $\pm$ 0,28	1,76 $\pm$ 0,20	1,98 $\pm$ 0,12	<b>3,83.10<sup>-8</sup></b>	+78 $\pm$ 11%
40	GSH	2,02 $\pm$ 0,11	2,36 $\pm$ 0,11	2,61 $\pm$ 0,23	2,96 $\pm$ 0,14	<b>1,87.10<sup>-12</sup></b>	+47 $\pm$ 7%
48	Ala	1,92 $\pm$ 0,26	2,30 $\pm$ 0,21	2,34 $\pm$ 0,37	2,70 $\pm$ 0,32	<b>1,37.10<sup>-5</sup></b>	+41 $\pm$ 17%
52	Ile ( $\times 10^{-1}$ )	2,97 $\pm$ 0,49	3,28 $\pm$ 0,42	3,26 $\pm$ 0,42	3,82 $\pm$ 0,44	<b>6,72.10<sup>-4</sup></b>	+29 $\pm$ 15%
55	Leu ( $\times 10^{-1}$ )	1,52 $\pm$ 0,19	1,62 $\pm$ 0,20	1,62 $\pm$ 0,12	1,88 $\pm$ 0,26	<b>2,10.10<sup>-3</sup></b>	+24 $\pm$ 17%
56	Val ( $\times 10^{-1}$ )	1,38 $\pm$ 0,14	1,51 $\pm$ 0,14	1,51 $\pm$ 0,17	1,78 $\pm$ 0,19	<b>3,19.10<sup>-5</sup></b>	+29 $\pm$ 14%

\* Le pourcentage est calculé en comparant les valeurs des moyennes des individus T+/2 par rapport à celles des individus T-.



**Figure 74. Valeurs des variables sélectionnées (en  $A_{\text{normalisée}}$ /mg de protéines) dans les quatre groupes respectifs des lignées KILK2 et T2K : K-, K+, K-/2, K+/2, T-, T+, T-/2 et T+/2.**

### IV.3.7. Interprétation et discussion

La première observation est que les résultats des comparaisons 1 (K- vs K+) et 2 (T vs T+) suggèrent que les variations métaboliques observées entre les K- et K+ sont finalement imputables à la Dox elle-même. Sa concentration élevée dans le milieu (2,25  $\mu\text{M}$ ) afin d'induire l'inhibition de l'expression d'ILK peut expliquer ces fortes variations.

En effet, les variations des métabolites GSH, Glu et Ala entre les K- et K+ d'une part (Tab. 42) et les T- et T+ d'autre part (Tab. 43) sont pratiquement identiques pour les deux lignées. L'allure des histogrammes de ces quatre groupes confirme cette observation (Fig. 74). La Dox semble provoquer une augmentation du *pool* total des osmolytes (Tau, Glu, Val, Ile et Leu) dans les cellules KILK2 et T2K traitées. Il n'est pas possible de mettre en évidence des variations métaboliques imputables exclusivement à l'inhibition de la protéine ILK dans les cellules KILK2, bien que la protéine ait bien été inhibée dans les individus K+, comme le confirme le résultat du *Western-Blot* (Fig. 70).

Une étude par cytométrie en flux nous aurait permis de contrôler la population cellulaire dans les quatre groupes et notamment dans les individus K+. En effet, la protéine ILK est impliquée dans de nombreux processus dont le contrôle du cycle cellulaire, la survie et la division cellulaire. Le fait d'inhiber ILK diminue la prolifération de plusieurs lignées cellulaires de GBM, dont U87 (Koul et al., 2005).

La seule information concernant une perturbation possible de la croissance cellulaire est donnée par le nombre moyen de cellules récoltées pour chaque condition. Pour les groupes K-, K+, T- et T+, ce nombre est respectivement de :  $4,76 \pm 1,19$ ,  $4,10 \pm 0,62$ ,  $5,35 \pm 1,49$  et  $5,05 \pm 1,71 \cdot 10^6$  cellules. La diminution du nombre de cellules dans les individus K+ est d'environ 14% (par rapport aux K-), alors qu'elle est d'environ 6% dans les T+ (par rapport aux T-). Une différence de 8% est observée entre les cellules KILK2 et T2K témoins. L'inhibition d'ILK semblerait légèrement perturber la prolifération des cellules KILK2 non irradiées.

La deuxième observation a trait à l'augmentation globale du *pool* des métabolites dans les cellules irradiées KILK2 et T2K (K-/2 et T-/2) (Tab. 47 et Fig. 74), par rapport à leur témoin respectif non irradié. Le constat semble être le même que pour l'étude métabolomique du projet URB14, à savoir une éventuelle proportion plus élevée de cellules gonflées du fait des rayonnements ionisants (Oishi et al., 2008). Une fois de plus, la seule information dont nous disposons est le nombre moyen de cellules récoltées :  $3,84 \pm 1,03$  (K-/2) et  $5,05 \pm 1,71$  (T-/2)  $10^6$  cellules. La diminution du nombre de cellules dans les individus K-/2 est d'environ

19% (par rapport aux K-), alors qu'elle est d'environ 6% dans les T-/2 par rapport aux T-. Il semble bien y avoir une altération de la prolifération cellulaire dans les cellules KILK2 irradiées et dans une moindre mesure, dans les cellules T2K.

La troisième observation concerne les perturbations métaboliques dues à l'inhibition d'ILK dans les cellules KILK2 irradiées. Les variations métaboliques sont négligeables si les individus K+/2 sont comparées aux K-/2 (Tab. 44), alors que le *Western-Blot* montre bien l'inhibition d'ILK (Fig. 70). Seule la Val (56) diminue de manière significative dans les K+/2 (Fig. 74). Lorsque les individus K+/2 sont comparés aux individus K-, tous les métabolites augmentent de manière significative (Tab. 47). De manière surprenante, le nombre moyen de cellules récolté pour le groupe K+/2 est de  $4,40 \pm 1,47 \cdot 10^6$  cellules, soit un peu plus que pour le groupe K-/2 ( $3,84 \pm 1,03 \cdot 10^6$  cellules).

Les variations métaboliques observées dans les individus T+/2 par rapport aux T-/2 sont beaucoup plus franches : trente-quatre variables augmentent de manière significative. L'association Dox et irradiation pourrait augmenter le nombre de cellules « larges ». En effet, le nombre moyen de cellules récolté est de  $4,01 \pm 0,90 \cdot 10^6$  cellules, soit une baisse de 21% (environ) par rapport aux T-/2. L'altération de la prolifération cellulaire semble beaucoup plus marquée pour ce type cellulaire que pour les cellules KILK2, en présence de Dox et après irradiation.

Plusieurs travaux ont montré l'implication d'ILK comme régulateur de la mort mitotique radio-induite ou de l'apoptose des GBM (Koul et al., 2005; Monferran et al., 2008). Néanmoins, les résultats métabolomiques obtenus dans cette étude ne nous ont pas permis de mettre en évidence des métabolites dont les variations seraient provoquées par l'inhibition de l'expression d'ILK avec et sans irradiation.

# *Conclusion générale*

Ce travail de thèse a permis de mettre en application la métabolomique, stratégie exploratoire à la frontière entre la biologie et la physique-chimie et parfaitement complémentaire des autres approches « -omiques ». Nous avons pu mettre en avant l'intérêt de cet outil holistique dédié à la recherche, mais aussi ses limites.

Plusieurs projets ont été menés au cours de ces années de doctorat, avec malheureusement des résultats contrastés.

Le projet principal, appelé projet RR vs RS, avait pour but d'identifier des biomarqueurs prédictifs de radiorésistance dans quatre lignées cellulaires humaines de GBM dont le phénotype de radiorésistance avait été préalablement établi par une des équipes partenaires du projet.

Par RMN  $^1\text{H}$  métabolomique, nous avons étudié les métabolites majoritaires présents dans les quatre lignées cellulaires. Dans un premier temps, le profil métabolique hétérogène des quatre lignées a été mis en évidence. Nous avons néanmoins réussi à montrer que les lignées cellulaires les plus radiorésistantes (RR), SF763 et U87, possédaient chacune une quantité basale de composés à choline, glycérophosphorylcholine (GPCho) plus phosphorylcholine (PCho), supérieure à celle des deux lignées les plus radiosensibles (RS), SF767 et U251. De plus, le *pool* du métabolite PCho était significativement plus important dans les deux lignées RR comparées aux deux lignées RS.

Ces résultats nous ont encouragé à axer les études suivantes sur le métabolisme des phosphatidylcholines (PtdCho) des quatre lignées cellulaires.

L'étude métabolomique des lignées après traitement par l'hémicholinium (HC-3), inhibiteur des transporteurs de choline CTL1, n'a pas permis de vérifier si la forte concentration des composés à choline dans les lignées RR, comparée à celle des lignées RS, pouvait être due à une incorporation plus importante de choline.

Cette hypothèse a néanmoins été vérifiée par une étude des flux métaboliques des composés à choline par marquage deutéré. Cette méthode a été mise au point dans notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Service de Spectrométrie de Masse de l'Université Paul Sabatier. Nous avons par ailleurs observé que la forte accumulation de composés à choline dans les cellules SF763 n'était pas corrélée à une prolifération plus importante des cellules, comparée à celle dans les trois autres modèles étudiés.

L'étude par qRT-PCR a permis de mettre en évidence la sous-expression de l'enzyme régulatrice du métabolisme des PtdCho (CTP:phosphocholine cytidyltransférase ou CT) dans les lignées RR. En considérant la somme de ses deux isoformes, sa sous-expression pourrait en partie expliquer l'accumulation de PCho dans ces cellules.

Nous avons cependant souhaité prolonger notre investigation holistique des lignées étudiées par des études lipidomique et transcriptomique, réalisées en collaboration avec différentes plateformes de recherche toulousaines. Les résultats obtenus par lipidomique n'ont pas permis d'observer des différences majeures dans le contenu lipidique des lignées. Les résultats par transcriptomique ont mis en avant la sur-expression dans les modèles RR de gènes appartenant au groupe GO (*Gene Ontology*) « *Metal Ion Transport* », dont celui codant pour la ferritine, et la sous-expression dans les lignées RS de gènes appartenant au groupe GO « *DNA Replication* ». Néanmoins, aucun gène codant pour une protéine impliquée dans le métabolisme des PtdCho et différenciellement exprimé entre les lignées RR et RS n'a été détecté.

Ces résultats laissent supposer que les différences de radiosensibilité des quatre lignées cellulaires étudiées pourraient être liées à un processus de cancérisation plus ou moins avancé qui se traduirait par diverses altérations moléculaires particulièrement visibles au niveau du métabolisme des PtdCho.

Le lien entre la radiorésistance des GBM et le métabolisme des PtdCho a été le point de départ de nos études. Néanmoins, il n'a pas pu être formellement établi au cours de nos investigations. En revanche, le lien entre la chimiorésistance et le métabolisme des PtdCho a lui été démontré sur le modèle de GBM U87 (Vanpouille et al., 2009).

Les autres projets majoritairement constitués d'études métabolomiques ont connu des fortunes diverses.

Les deuxième et troisième projets, appelés projets FTI-277 et Y, ont mis exclusivement en application la métabolomique par RMN  $^1\text{H}$ . Nous avons étudié les perturbations métaboliques à long terme (quatre à six jours après irradiation) sur la lignée radorésistante U87 après irradiation et/ou radiosensibilisation par un inhibiteur de farnésyltransférase pour le projet FTI-277 ou un radiosensibilisant Y pour l'autre projet.

Les résultats n'ont pas été à la hauteur de nos espérances. Bien que l'irradiation ou le traitement des cellules par l'un des deux radiosensibilisants ait semblé perturber la prolifération des cellules, les variations métaboliques observées plus de quatre jours après l'irradiation seraient majoritairement imputables à des différences de confluence cellulaire au moment de la récolte des échantillons. Ces résultats de métabolomique n'ont pas conduit à des conclusions claires et doivent être complétés par d'autres études pour déterminer l'effet de ces radiosensibilisants.

Le quatrième projet a consisté en l'étudier les perturbations métaboliques et lipidiques, 24 h après irradiation, sur une lignée dérivée de la lignée U87 (URB14). Sa protéine RhoB, impliquée dans la radorésistance des cellules de GBM, est inhibée par l'induction à la dexaméthasone de l'expression d'une forme dominante négative (RhoBN19). Nous avons mis en évidence une augmentation des *pools* métaboliques et lipidiques que nous proposons d'expliquer par un gonflement des cellules imputables à l'irradiation. Nous avons montré l'augmentation d'un biomarqueur témoin de l'inhibition (supposée car non confirmée par *Western-Blot*) de RhoB : la taurine (Tau). Lorsque les cellules sont radiosensibilisées puis irradiées, la concentration en Tau est quadruplée dans les cellules URB14. Cela se traduit par une nette augmentation du nombre de cellules nécrotiques, apoptotiques et apoptotiques tardives.

Nous avons émis l'hypothèse que Tau puisse être un biomarqueur de mort nécrotique, comme cela a été décrit précédemment (Rainaldi et al., 2008) et que RhoB puisse être impliquée dans l'efflux de l'osmolyte Tau.

Enfin, le dernier projet a consisté en l'étude métabolomique des perturbations métaboliques occasionnées sur la lignée KILK2, dérivée d'U87. Bien que l'inhibition d'ILK, impliquée dans la radiorésistance des cellules de GBM (Monferran et al., 2008), ait bien été observée par *Western-Blot*, nous n'avons pas observé de variations métaboliques imputables à l'inhibition d'ILK. L'augmentation du *pool* total des métabolites est majoritairement due aux rayonnements ionisants, comme cela a été montré pour le projet URB14, mais aussi à la doxycycline elle-même, ce qui n'est pas dans notre intérêt.

La métabolomique est un outil d'analyse holistique pertinent et indispensable pour étudier différents systèmes biologiques à un instant et dans un environnement donné. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue ce que l'on recherche. Une connaissance approfondie des systèmes étudiés est indispensable afin d'exploiter au mieux les nombreuses données obtenues avec cet outil d'analyse.

La métabolomique ne se suffit pas à elle seule. Seules des collaborations efficaces et rigoureuses peuvent permettre des avancées scientifiques majeures dans des domaines où des liens étroits doivent être créés entre les biologistes, les biochimistes, les chimistes, les statisticiens, etc... La métabolomique est une passerelle entre tous ces mondes et tient une place essentielle dans la recherche de biomarqueurs pathologiques.



# *Bibliographie*

## Bibliographie

---

(2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061-8.

ADER, I., TOULAS, C., DALENC, F., DELMAS, C., BONNET, J., COHEN-JONATHAN, E. & FAVRE, G. (2002). RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* **21**, 5998-6006.

ADER, I., DELMAS, C., BONNET, J., ROCHAIX, P., FAVRE, G., TOULAS, C. & COHEN-JONATHAN-MOYAL, E. (2003). Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* **22**, 8861-9.

AHN, B. H., MIN, G., BAE, Y. S., BAE, Y. S. & MIN, D. S. (2006). Phospholipase D is activated and phosphorylated by casein kinase-II in human U87 astrogloma cells. *Exp Mol Med* **38**, 55-62.

AHN, B. H., PARK, M. H., LEE, Y. H., KWON, T. K. & MIN DO, S. (2007). Up-regulation of cyclooxygenase-2 by cobalt chloride-induced hypoxia is mediated by phospholipase D isozymes in human astrogloma cells. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1721-31.

AKECH, J., SINHA ROY, S. & DAS, S. K. (2005). Modulation of cholinephosphotransferase activity in breast cancer cell lines by Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor agonist. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 35-41.

ALTANER, C. (2008). Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma* **55**, 369-74.

ARANIBAR, N., OTT, K. H., ROONGTA, V. & MUELLER, L. (2006). Metabolomic analysis using optimized NMR and statistical methods. *Anal Biochem* **355**, 62-70.

AWASTHI, S., VIVEKANANDA, J., AWASTHI, V., SMITH, D. & KING, R. J. (2001). CTP:phosphocholine cytidyltransferase inhibition by ceramide via PKC- $\alpha$ , p38 MAPK, cPLA2, and 5-lipoxygenase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L108-18.

BALDWIN, R. M., PAROLIN, D. A. & LORIMER, I. A. (2008). Regulation of glioblastoma cell invasion by PKC  $\iota$  and RhoB. *Oncogene* **27**, 3587-95.

BAO, S., WU, Q., MCLENDON, R. E., HAO, Y., SHI, Q., HJELMELAND, A. B., DEWHIRST, M. W., BIGNER, D. D. & RICH, J. N. (2006a). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-60.

BAO, S., WU, Q., SATHORNSUMETEE, S., HAO, Y., LI, Z., HJELMELAND, A. B., SHI, Q., MCLENDON, R. E., BIGNER, D. D. & RICH, J. N. (2006b). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **66**, 7843-8.

BARRANS, A., COLLET, X., BARBARAS, R., JASPARD, B., MANENT, J., VIEU, C., CHAP, H. & PERRET, B. (1994). Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J Biol Chem* **269**, 11572-7.

BAUDRIMONT, M. (1991). [Astrocytes: morphology and functional role]. *Ann Med Interne (Paris)* **142**, 526-9.

BELOUECHE-BABARI, M., PEAK, J. C., JACKSON, L. E., TIET, M. Y., LEACH, M. O. & ECCLES, S. A. (2009). Changes in choline metabolism as potential biomarkers of phospholipase C $\gamma$ 1 inhibition in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.*

## Bibliographie

---

- BELSEY, M. J., DAVIES, A. R., WITCHEL, H. J. & KOZLOWSKI, R. Z. (2007). Inhibition of ERK and JNK decreases both osmosensitive taurine release and cell proliferation in glioma cells. *Neurochem Res* **32**, 1940-9.
- BENYAHIA, B., HUGUET, S., DECLEVES, X., MOKHTARI, K., CRINIÈRE, E., BERNAUDIN, J. F., SCHERRMANN, J. M. & DELATTRE, J. Y. (2004). Multidrug resistance-associated protein MRP1 expression in human gliomas: chemosensitization to vincristine and etoposide by indomethacin in human glioma cell lines overexpressing MRP1. *J Neurooncol* **66**, 65-70.
- BIEBERICH, E., FREISCHUTZ, B., SUZUKI, M. & YU, R. K. (1999). Differential effects of glycolipid biosynthesis inhibitors on ceramide-induced cell death in neuroblastoma cells. *J Neurochem* **72**, 1040-9.
- BLAZEK, E. R., FOUTCH, J. L. & MAKI, G. (2007). Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**, 1-5.
- BLEIJERVELD, O. B., HOUWELING, M., THOMAS, M. J. & CUI, Z. (2006). Metabolipidomics: profiling metabolism of glycerophospholipid species by stable isotopic precursors and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **352**, 1-14.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-7.
- BON, D., GILARD, V., MASSOU, S., PÉRÈS, G., MALET-MARTINO, M., MARTINO, R. & DESMOULIN, F. (2006). In vivo <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H HR-MAS NMR spectroscopy analysis of the unstarved *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). *Biology and Fertility of Soils* **43**, 191-198.
- BON, D. (2008). Evaluation de deux nouveaux outils pour l'étude d'échantillons biologiques par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire: La RMN HR-MAS (High-Resolution Magic Angle Spinning): une technique d'analyse d'échantillons bruts; La Métabolomique: une méthode d'analyse statistique des spectres pour la recherche de signatures métaboliques., Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- BUNNEY, T. D., BAXENDALE, R. W. & KATAN, M. (2009). Regulatory links between PLC enzymes and Ras superfamily GTPases: signalling via PLCepsilon. *Adv Enzyme Regul* **49**, 54-8.
- CARRARO, S., GIORDANO, G., RENIERO, F., PERILONGO, G. & BARALDI, E. (2009). Metabolomics: a new frontier for research in pediatrics. *J Pediatr* **154**, 638-44.
- CARRELLA, M., FELDMAN, D., COGOI, S., CSILLAGHY, A. & WEINHOLD, P. A. (1999). Enhancement of mdr2 gene transcription mediates the biliary transfer of phosphatidylcholine supplied by an increased biosynthesis in the pravastatin-treated rat. *Hepatology* **29**, 1825-32.
- CHA, S. (2009). Neuroimaging in neuro-oncology. *Neurotherapeutics* **6**, 465-77.
- CHAKRAVARTI, A., ZHAI, G., SUZUKI, Y., SARKESH, S., BLACK, P. M., MUZIKANSKY, A. & LOEFFLER, J. S. (2004). The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol* **22**, 1926-33.
- CHAKRAVARTI, A., ERKKINEN, M. G., NESTLER, U., STUPP, R., MEHTA, M., ALDAPE, K., GILBERT, M. R., BLACK, P. M. & LOEFFLER, J. S. (2006). Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms. *Clin Cancer Res* **12**, 4738-46.

## Bibliographie

---

- CHEN, J. K., HU, L. J., WANG, J., LAMBORN, K. R., KONG, E. L. & DEEN, D. F. (2005). Hypoxia-induced BAX overexpression and radiation killing of hypoxic glioblastoma cells. *Radiat Res* **163**, 644-53.
- CHENG, L. L., ANTHONY, D. C., COMITE, A. R., BLACK, P. M., TZIKA, A. A. & GONZALEZ, R. G. (2000). Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro Oncol* **2**, 87-95.
- CHINOT, O. (2005). [New place of the chemotherapy in gliomas]. *Bull Cancer* **92**, 343-54.
- CLOAREC, O., DUMAS, M. E., CRAIG, A., BARTON, R. H., TRYGG, J., HUDSON, J., BLANCHER, C., GAUGUIER, D., LINDON, J. C., HOLMES, E. & NICHOLSON, J. (2005). Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic <sup>1</sup>H NMR data sets. *Anal Chem* **77**, 1282-9.
- COHEN-JONATHAN MOYAL, E. (2009). [Angiogenic inhibitors and radiotherapy: from the concept to the clinical trial]. *Cancer Radiother* **13**, 562-7.
- COMBS, S. E., HEEGER, S., HASELMANN, R., EDLER, L., DEBUS, J. & SCHULZ-ERTNER, D. (2006). Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. *BMC Cancer* **6**, 133.
- CULICCHIA, F., CUI, J. G., LI, Y. Y. & LUKIW, W. J. (2008). Upregulation of beta-amyloid precursor protein expression in glioblastoma multiforme. *Neuroreport* **19**, 981-5.
- CURRAN, W. J., JR., SCOTT, C. B., HORTON, J., NELSON, J. S., WEINSTEIN, A. S., FISCHBACH, A. J., CHANG, C. H., ROTMAN, M., ASBELL, S. O., KRISCH, R. E. & ET AL. (1993). Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst* **85**, 704-10.
- CZERNICKI, T., ZEGARSKA, J., PACZEK, L., CUKROWSKA, B., GRAJKOWSKA, W., ZAJACZKOWSKA, A., BRUDZEWSKI, K., ULACZYK, J. & MARCHEL, A. (2007). Gene expression profile as a prognostic factor in high-grade gliomas. *Int J Oncol* **30**, 55-64.
- DALY, P. F., LYON, R. C., FAUSTINO, P. J. & COHEN, J. S. (1987). Phospholipid metabolism in cancer cells monitored by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **262**, 14875-8.
- DAUMAS-DUPORT, C., BEUVON, F., VARLET, P. & FALLET-BIANCO, C. (2000). [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol* **20**, 413-28.
- DE BOUARD, S. & GUILLAMO, J. S. (2005). [Angiogenesis and anti-angiogenic strategies for glioblastoma]. *Bull Cancer* **92**, 360-72.
- DEBERARDINIS, R. J., MANCUSO, A., DAIKHIN, E., NISSIM, I., YUDKOFF, M., WEHRLI, S. & THOMPSON, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19345-50.
- DEBERARDINIS, R. J., LUM, J. J., HATZIVASSILIOU, G. & THOMPSON, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* **7**, 11-20.
- DECLEVES, X., FAJAC, A., LEHMANN-CHE, J., TARDY, M., MERCIER, C., HURBAIN, I., LAPLANCHE, J. L., BERNAUDIN, J. F. & SCHERRMANN, J. M. (2002). Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines. *Int J Cancer* **98**, 173-80.

## Bibliographie

---

DELMAS, C., HELIEZ, C., COHEN-JONATHAN, E., END, D., BONNET, J., FAVRE, G. & TOULAS, C. (2002). Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int J Cancer* **100**, 43-8.

DESMOULIN, F., BON, D., MARTINO, R. & MALET-MARTINO, M. (2008). Etude critique de l'utilisation de la RMN HR-MAS pour l'analyse des tissus biologiques. *Comptes Rendus de Chimie* **11**, 423-433.

DESOUZDANNE, D., CLAPAROLS, C., MARTINS-FROMENT, N., ZEDDE, C., BALAYSSAC, S., GILARD, V., TERCE, F., MARTINO, R. & MALET-MARTINO, M. (2010). Analysis of hydrophilic and lipophilic choline compounds in radioresistant and radiosensitive glioblastoma cell lines by HILIC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* (**acceptée**).

DHERMAIN, F., DUCREUX, D., BIDAULT, F., BRUNA, A., PARKER, F., ROUJEAU, T., BEAUDRE, A., ARMAND, J. P. & HAIE-MEDER, C. (2005). [Use of the functional imaging modalities in radiation therapy treatment planning in patients with glioblastoma]. *Bull Cancer* **92**, 333-42.

DIETZMANN, K., KIRCHES, E. & MAWRIN, C. (2002). Effects of phospholipase Cgamma on Polo-like kinase 1 expression in human glioma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **128**, 265-70.

DRAPPATZ, J., WONG, E. T., SCHIFF, D., KESARI, S., BATCHELOR, T. T., DOHERTY, L., LAFRANKIE, D. C., RAMAKRISHNA, N., WEISS, S., SMITH, S. T., CIAMPA, A., ZIMMERMAN, J., OSTROWSKY, L., DAVID, K., NORDEN, A., BARRON, L., SCEPPA, C., BLACK, P. M. & WEN, P. Y. (2009). A pilot safety study of lenalidomide and radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**, 222-7.

DYMOND, M., ATTARD, G. & POSTLE, A. D. (2008). Testing the hypothesis that amphiphilic antineoplastic lipid analogues act through reduction of membrane curvature elastic stress. *J R Soc Interface* **5**, 1371-86.

EBBELS, T. M. D. & CAVILL, R. (2009). Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **55**, 361-374.

ECKFORD, P. D. & SHAROM, F. J. (2005). The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. *Biochem J* **389**, 517-26.

EECKHOUTE, J., CARROLL, J. S., GEISTLINGER, T. R., TORRES-ARZAYUS, M. I. & BROWN, M. (2006). A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes Dev* **20**, 2513-26.

ELIYAHU, G., KREIZMAN, T. & DEGANI, H. (2007). Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: molecular and biochemical studies. *Int J Cancer* **120**, 1721-30.

ELLIS, D. I., DUNN, W. B., GRIFFIN, J. L., ALLWOOD, J. W. & GOODACRE, R. (2007). Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* **8**, 1243-66.

ELSBACH, P. (1967). Metabolism of lysophosphatidyl ethanolamine and lysophosphatidyl choline by homogenates of rabbit polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages. *J Lipid Res* **8**, 359-65.

ERB, G., ELBAYED, K., PIOTTO, M., RAYA, J., NEUVILLE, A., MOHR, M., MAITROT, D., KEHRLI, P. & NAMER, I. J. (2008). Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics. *Magn Reson Med* **59**, 959-65.

FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, H. A., GLASS, C. K., MERRILL, A. H., JR., MURPHY, R. C., RAETZ, C. R., RUSSELL, D. W., SEYAMA, Y., SHAW, W., SHIMIZU, T., SPENER, F., VAN MEER, G., VANNIEUWENHZE, M. S.,

## Bibliographie

---

- WHITE, S. H., WITZTUM, J. L. & DENNIS, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* **46**, 839-61.
- FALLBROOK, A., TURENNE, S. D., MAMALIAS, N., KISH, S. J. & ROSS, B. M. (1999). Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolites may regulate brain phospholipid catabolism via inhibition of lysophospholipase activity. *Brain Res* **834**, 207-10.
- FAN, T. W. M. & LANE, A. N. (2008). Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **52**, 69-117.
- FAVAUDON, V. (2000). [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiother* **4**, 355-68.
- FELSBERG, J., RAPP, M., LOESER, S., FIMMERS, R., STUMMER, W., GOEPPERT, M., STEIGER, H. J., FRIEDENSDORF, B., REIFENBERGER, G. & SABEL, M. C. (2009). Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* **15**, 6683-93.
- FISCHER, U., RADERMACHER, J., MAYER, J., MEHRAEIN, Y. & MEESE, E. (2008). Tumor hypoxia: Impact on gene amplification in glioblastoma. *Int J Oncol* **33**, 509-15.
- FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- FRENEL, J. S., BOTTI, M., LOUSSOUARN, D. & CAMPONE, M. (2009). [Prognostic and predictive factors for gliomas in adults]. *Bull Cancer* **96**, 357-67.
- GABILONDO, A. M., HOSTALOT, C., GARIBI, J. M., MEANA, J. J. & CALLADO, L. F. (2008). Monoamine oxidase B activity is increased in human gliomas. *Neurochem Int* **52**, 230-4.
- GALANAUD, D., NICOLI, F., CONFORT-GOUNY, S., LE FUR, Y., DORMONT, D., GIRARD, N., RANJEVA, J. & COZZONE, P. (2007). [Brain magnetic resonance spectroscopy]. *J Radiol* **88**, 483-96.
- GALLAZZINI, M., FERRARIS, J. D. & BURG, M. B. (2008). GDPD5 is a glycerophosphocholine phosphodiesterase that osmotically regulates the osmoprotective organic osmolyte GPC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11026-31.
- GALLEGO-ORTEGA, D., RAMIREZ DE MOLINA, A., RAMOS, M. A., VALDES-MORA, F., BARDERAS, M. G., SARMENTERO-ESTRADA, J. & LACAL, J. C. (2009). Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipid metabolism: implications in cancer onset and treatment. *PLoS One* **4**, e7819.
- GAO, Z., SARSOUR, E. H., KALEN, A. L., LI, L., KUMAR, M. G. & GOSWAMI, P. C. (2008). Late ROS accumulation and radiosensitivity in SOD1-overexpressing human glioma cells. *Free Radic Biol Med* **45**, 1501-9.
- GHOSH, A., AKECH, J., MUKHERJEE, S. & DAS, S. K. (2002). Differential expression of cholinephosphotransferase in normal and cancerous human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 1043-8.
- GILL, S. S., THOMAS, D. G., VAN BRUGGEN, N., GADIAN, D. G., PEDEN, C. J., BELL, J. D., COX, I. J., MENON, D. K., ILES, R. A., BRYANT, D. J. & ET AL. (1990). Proton MR spectroscopy of intracranial tumours: in vivo and in vitro studies. *J Comput Assist Tomogr* **14**, 497-504.
- GLUNDE, K., ACKERSTAFF, E., MORI, N., JACOBS, M. A. & BHUJWALLA, Z. M. (2006a). Choline phospholipid metabolism in cancer: consequences for molecular pharmaceutical interventions. *Mol Pharm* **3**, 496-506.

## Bibliographie

---

- GLUNDE, K., JACOBS, M. A. & BHUJWALLA, Z. M. (2006b). Choline metabolism in cancer: implications for diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn* **6**, 821-9.
- GLUNDE, K., JIE, C. & BHUJWALLA, Z. M. (2006c). Mechanisms of indomethacin-induced alterations in the choline phospholipid metabolism of breast cancer cells. *Neoplasia* **8**, 758-71.
- GLUNDE, K., SHAH, T., WINNARD, P. T., JR., RAMAN, V., TAKAGI, T., VESUNA, F., ARTEMOV, D. & BHUJWALLA, Z. M. (2008). Hypoxia regulates choline kinase expression through hypoxia-inducible factor-1 alpha signaling in a human prostate cancer model. *Cancer Res* **68**, 172-80.
- GRIFFIN, J. L. & SHOCKCOR, J. P. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 551-61.
- GRIFFIN, J. L. (2006). Understanding mouse models of disease through metabolomics. *Curr Opin Chem Biol* **10**, 309-15.
- GRIFFIN, J. L. & KAUPPINEN, R. A. (2007). A metabolomics perspective of human brain tumours. *Febs J* **274**, 1132-9.
- GRIFFITHS, W. J. & WANG, Y. (2009). Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem Soc Rev* **38**, 1882-96.
- GUEGUEN, G., GRANCI, V., ROGALLE, P., BRIAND-MESANGE, F., WILSON, M., KLAEBE, A., TERCE, F., CHAP, H., SALLES, J. P., SIMON, M. F. & GAITS, F. (2002). A lysophosphatidic acid analogue is revealed as a potent inhibitor of phosphatidylcholine synthesis, inducing apoptosis. *Biochem J* **368**, 447-59.
- HAAS-KOGAN, D. A., KOGAN, S. S., YOUNT, G., HSU, J., HAAS, M., DEEN, D. F. & ISRAEL, M. A. (1999). p53 function influences the effect of fractionated radiotherapy on glioblastoma tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **43**, 399-403.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- HAPPE, H. K. & MURRIN, L. C. (1995). In situ hybridization analysis of CHOT1, a creatine transporter, in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **351**, 94-103.
- HARDEN, T. K. & SONDEK, J. (2006). Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 355-79.
- HEGI, M. E., DISERENS, A. C., GORLIA, T., HAMOU, M. F., DE TRIBOLET, N., WELLER, M., KROS, J. M., HAINFELLNER, J. A., MASON, W., MARIANI, L., BROMBERG, J. E., HAU, P., MIRIMANOFF, R. O., CAIRNCROSS, J. G., JANZER, R. C. & STUPP, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 997-1003.
- HEHLGANS, S., HAASE, M. & CORDES, N. (2007). Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* **1775**, 163-80.
- HENNEQUIN, C., QUERO, L. & FAVAUDON, V. (2009). [Biological basis of chemo-radiotherapy associations]. *Bull Cancer* **96**, 329-36.
- HERNANDEZ, M., BURILLO, S. L., CRESPO, M. S. & NIETO, M. L. (1998). Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1. *J Biol Chem* **273**, 606-12.

## Bibliographie

---

- HERNANDEZ, M., BAYON, Y., SANCHEZ CRESPO, M. & NIETO, M. L. (1999). Signaling mechanisms involved in the activation of arachidonic acid metabolism in human astrocytoma cells by tumor necrosis factor-alpha: phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and transactivation of cyclooxygenase-2. *J Neurochem* **73**, 1641-9.
- HIRVONEN, H. E., SALONEN, R., SANDBERG, M. M., VUORIO, E., VASTRIK, I., KOTILAINEN, E. & KALIMO, H. (1994). Differential expression of myc, max and RB1 genes in human gliomas and glioma cell lines. *Br J Cancer* **69**, 16-25.
- HOANG-XUAN, K., IDBAIH, A., MOKHTARI, K. & SANSON, M. (2005). [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bull Cancer* **92**, 310-6.
- HOLDHOFF, M., KREUZER, K. A., APPELT, C., SCHOLZ, R., NA, I. K., HILDEBRANDT, B., RIESS, H., JORDAN, A., SCHMIDT, C. A., VAN ETTEN, R. A., DORKEN, B. & LE COUTRE, P. (2005). Imatinib mesylate radiosensitizes human glioblastoma cells through inhibition of platelet-derived growth factor receptor. *Blood Cells Mol Dis* **34**, 181-5.
- HUNT, A. N., CLARK, G. T., NEALE, J. R. & POSTLE, A. D. (2002). A comparison of the molecular specificities of whole cell and endonuclear phosphatidylcholine synthesis. *FEBS Lett* **530**, 89-93.
- ISSAQ, H. J., VAN, Q. N., WAYBRIGHT, T. J., MUSCHIK, G. M. & VEENSTRA, T. D. (2009). Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *J Sep Sci* **32**, 2183-99.
- IWADATE, Y., MIZOE, J., OSAKA, Y., YAMAURA, A. & TSUJII, H. (2001). High linear energy transfer carbon radiation effectively kills cultured glioma cells with either mutant or wild-type p53. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **50**, 803-8.
- JACKOWSKI, S. & FAGONE, P. (2005). CTP: Phosphocholine cytidyltransferase: paving the way from gene to membrane. *J Biol Chem* **280**, 853-6.
- JANARDHAN, S., SRIVANI, P. & SASTRY, G. N. (2006). Choline kinase: an important target for cancer. *Curr Med Chem* **13**, 1169-86.
- JENSEN, R. L. (2009). Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol* **92**, 317-35.
- JEON, Y. J., KIM, I. K., HONG, S. H., NAN, H., KIM, H. J., LEE, H. J., MASUDA, E. S., MEYUHAS, O., OH, B. H. & JUNG, Y. K. (2008). Ribosomal protein S6 is a selective mediator of TRAIL-apoptotic signaling. *Oncogene* **27**, 4344-52.
- KANU, O. O., HUGHES, B., DI, C., LIN, N., FU, J., BIGNER, D. D., YAN, H. & ADAMSON, C. (2009). Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol* **3**, 39-52.
- KAUR, B., KHWAJA, F. W., SEVERSON, E. A., MATHENY, S. L., BRAT, D. J. & VAN MEIR, E. G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* **7**, 134-53.
- KENNEDY, E. P. & WEISS, S. B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* **222**, 193-214.
- KENT, C. (1990). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog Lipid Res* **29**, 87-105.



## Bibliographie

---

- KHOSHYOMN, S., PENAR, P. L., ROSSI, J., WELLS, A., ABRAMSON, D. L. & BHUSHAN, A. (1999). Inhibition of phospholipase C-gamma1 activation blocks glioma cell motility and invasion of fetal rat brain aggregates. *Neurosurgery* **44**, 568-77; discussion 577-8.
- KIM, S. Y., AHN, B. H., KIM, J., BAE, Y. S., KWAK, J. Y., MIN, G., KWON, T. K., CHANG, J. S., LEE, Y. H., YOON, S. H. & MIN, D. S. (2004). Phospholipase C, protein kinase C, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II, and redox state are involved in epigallocatechin gallate-induced phospholipase D activation in human astrogloma cells. *Eur J Biochem* **271**, 3470-80.
- KIM, S. Y. & VOLSKY, D. J. (2005). PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC Bioinformatics* **6**, 144.
- KINSEY, G. R., CUMMINGS, B. S., BECKETT, C. S., SAAVEDRA, G., ZHANG, W., MCHOWAT, J. & SCHNELLMANN, R. G. (2005). Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2. *Biochem Biophys Res Commun* **327**, 287-93.
- KIRK, K. (1997). Swelling-activated organic osmolyte channels. *J Membr Biol* **158**, 1-16.
- KIRKPATRICK, J., DESJARDINS, A., QUINN, J. & AL., E. (2007). Phase II open-label, safety, pharmacokinetic and efficacy study of 2-methoxyestradiol nanocrystal colloidal dispersion administered orally to patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **25**, 2065.
- KISHI, Y., OKUDAIRA, S., TANAKA, M., HAMA, K., SHIDA, D., KITAYAMA, J., YAMORI, T., AOKI, J., FUJIMAKI, T. & ARAI, H. (2006). Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **281**, 17492-500.
- KISS, Z. (1999). Regulation of mitogenesis by water-soluble phospholipid intermediates. *Cell Signal* **11**, 149-57.
- KLEIHUES, P. & OHGAKI, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* **1**, 44-51.
- KLEIN, J. (2005). Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J Neurochem* **94**, 1473-87.
- KNIZETOVA, P., EHRMANN, J., HLOBILKOVA, A., VANCOVA, I., KALITA, O., KOLAR, Z. & BARTEK, J. (2008). Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle* **7**, 2553-61.
- KOC, H., MAR, M. H., RANASINGHE, A., SWENBERG, J. A. & ZEISEL, S. H. (2002). Quantitation of choline and its metabolites in tissues and foods by liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry. *Anal Chem* **74**, 4734-40.
- KOIVUSALO, M., HAIMI, P., HEIKINHEIMO, L., KOSTIAINEN, R. & SOMERHARJU, P. (2001). Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. *J Lipid Res* **42**, 663-72.
- KOUJI, H., INAZU, M., YAMADA, T., TAJIMA, H., AOKI, T. & MATSUMIYA, T. (2009). Molecular and functional characterization of choline transporter in human colon carcinoma HT-29 cells. *Arch Biochem Biophys* **483**, 90-8.
- KOUL, D., SHEN, R., BERGH, S., LU, Y., DE GROOT, J. F., LIU, T. J., MILLS, G. B. & YUNG, W. K. (2005). Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma. *Mol Cancer Ther* **4**, 1681-8.

- KRISHNAN, S., BROWN, P. D., BALLMAN, K. V., FIVEASH, J. B., UHM, J. H., GIANNINI, C., JAECKLE, K. A., GEOFFROY, F. J., NABORS, L. B. & BUCKNER, J. C. (2006). Phase I trial of erlotinib with radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: results of North Central Cancer Treatment Group protocol N0177. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**, 1192-9.
- LAI, A., FILKA, E., MCGIBBON, B., NGHIEMPHU, P. L., GRAHAM, C., YONG, W. H., MISCHEL, P., LIAU, L. M., BERGSNEIDER, M., POPE, W., SELCH, M. & CLOUGHESY, T. (2008). Phase II pilot study of bevacizumab in combination with temozolomide and regional radiation therapy for up-front treatment of patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: interim analysis of safety and tolerability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **71**, 1372-80.
- LAIGLE-DONADEY, F., DEHAIS, C., MAZERON, J. J. & SANSON, M. (2009). [Association of radiotherapy and chemotherapy-targeted therapies in glioblastomas]. *Bull Cancer* **96**, 291-7.
- LAMBERT, I. H. (2004). Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem Res* **29**, 27-63.
- LAPRIE, A. (2009). [Proton magnetic resonance spectroscopic imaging and other types of metabolic imaging for radiotherapy planning in adult and pediatric high-grade gliomas]. *Cancer Radiother* **13**, 556-61.
- LE GUILLOUX, J. & CARPENTIER, A. F. (2008). [New therapeutic approaches in glioblastomas]. *Rev Neurol (Paris)* **164**, 554-9.
- LEFRANC, F. & KISS, R. (2006). Autophagy, the Trojan horse to combat glioblastomas. *Neurosurg Focus* **20**, E7.
- LEFRANC, F., FACCHINI, V. & KISS, R. (2007). Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist* **12**, 1395-403.
- LEHNHARDT, F. G., ROHN, G., ERNESTUS, R. I., GRUNE, M. & HOEHN, M. (2001). <sup>1</sup>H- and (<sup>31</sup>P)-MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors in vitro: malignancy-characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. *NMR Biomed* **14**, 307-17.
- LEHNHARDT, F. G., BOCK, C., ROHN, G., ERNESTUS, R. I. & HOEHN, M. (2005). Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopic investigation. *NMR Biomed* **18**, 371-82.
- LEVIN, V., PHURPHANICH, S., GLANTZ, M. & AL., E. (2002). Randomized phase II study of temozolomide (TMZ) with and without the matrix metalloprotease (MMP) inhibitor prinomastat in patients (pts) with glioblastoma multiforme (GBM) following best surgery and radiation therapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* **21**, abstr 100.
- LI, H. F., KIM, J. S. & WALDMAN, T. (2009). Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiat Oncol* **4**, 43.
- LIKAVCANOVA, K., DOBROTA, D., LIPTAJ, T., PRONAYOVA, N., MLYNARIK, V., BELAN, V., GALANDA, M., BERES, A. & DE RIGGO, J. (2005). In vitro study of astrocytic tumour metabolism by proton magnetic resonance spectroscopy. *Gen Physiol Biophys* **24**, 327-35.
- LIN, Y. M., JAN, H. J., LEE, C. C., TAO, H. Y., SHIH, Y. L., WEI, H. W. & LEE, H. M. (2008). Dexamethasone reduced invasiveness of human malignant glioblastoma cells through a MAPK phosphatase-1 (MKP-1) dependent mechanism. *Eur J Pharmacol* **593**, 1-9.
- LINDON, J. C. & NICHOLSON, J. K. (2008). Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. *Trends in Analytical Chemistry* **27**, 194-204.

- LINDON, J. C., BECKONERT, O. P., HOLMES, E. & NICHOLSON, J. K. (2009). High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: Application to biomedical studies. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **55**, 79-100.
- LIU, Z. G., CHEN, H. Y., CHENG, J. J., CHEN, Z. P., LI, X. N. & XIA, Y. F. (2009). Relationship between methylation status of ERCC1 promoter and radiosensitivity in glioma cell lines. *Cell Biol Int* **33**, 1111-7.
- LOUIS, D. N., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., CAVENEE, W. K., BURGER, P. C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B. W. & KLEIHUES, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97-109.
- LUCAS, K. K. & DENNIS, E. A. (2005). Distinguishing phospholipase A2 types in biological samples by employing group-specific assays in the presence of inhibitors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**, 235-48.
- MACHOVA, E., O'REGAN, S., NEWCOMBE, J., MEUNIER, F. M., PRENTICE, J., DOVE, R., LISA, V. & DOLEZAL, V. (2009). Detection of choline transporter-like 1 protein CTL1 in neuroblastoma x glioma cells and in the CNS, and its role in choline uptake. *J Neurochem* **110**, 1297-309.
- MADALINSKI, G., GODAT, E., ALVES, S., LESAGE, D., GENIN, E., LEVI, P., LABARRE, J., TABEL, J. C., EZAN, E. & JUNOT, C. (2008). Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. *Anal Chem* **80**, 3291-303.
- MAEDA, S., SAKAMOTO, K., MATSUOKA, I., IWAMOTO, T. & KIMURA, J. (2009). Lysophosphatidylcholine increases Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger expression via RhoB-geranylgeranylation in H9c2 cells. *J Pharmacol Sci* **109**, 565-72.
- MAIER, P., FLECKENSTEIN, K., LI, L., LAUFS, S., ZELLER, W. J., BAUM, C., FRUEHAUF, S., HERSKIND, C. & WENZ, F. (2006). Overexpression of MDR1 using a retroviral vector differentially regulates genes involved in detoxification and apoptosis and confers radioprotection. *Radiat Res* **166**, 463-73.
- MAIER, P., HERSKIND, C., FLECKENSTEIN, K., SPIER, I., LAUFS, S., ZELLER, W. J., FRUEHAUF, S. & WENZ, F. (2008). MDR1 gene transfer using a lentiviral SIN vector confers radioprotection to human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Radiat Res* **169**, 301-10.
- MAIRE, J. P., HUCHET, A. & CATRY-THOMAS, I. (2008). [Radiotherapy of adult glial tumors: new developments and perspectives]. *Rev Neurol (Paris)* **164**, 531-41.
- MAITY, A., PORE, N., LEE, J., SOLOMON, D. & O'ROURKE, D. M. (2000). Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res* **60**, 5879-86.
- MALKIN, D. (2001). The role of p53 in human cancer. *J Neurooncol* **51**, 231-43.
- MALLAMPALLI, R. K., RYAN, A. J., SALOME, R. G. & JACKOWSKI, S. (2000). Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem* **275**, 9699-708.
- MARTIN, R., HERNANDEZ, M., IBEAS, E., FUENTES, L., SALICIO, V., ARNES, M. & NIETO, M. L. (2009). Secreted phospholipase A2-IIA modulates key regulators of proliferation on astrocytoma cells. *J Neurochem* **111**, 988-99.

- MAWRIN, C., DIETE, S., TREUHEIT, T., KROPF, S., VORWERK, C. K., BOLTZE, C., KIRCHES, E., FIRSCHING, R. & DIETZMANN, K. (2003). Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol* **23**, 641-8.
- MAXWELL, R. J., MARTINEZ-PEREZ, I., CERDAN, S., CABANAS, M. E., ARUS, C., MORENO, A., CAPDEVILA, A., FERRER, E., BARTOMEUS, F., APARICIO, A., CONESA, G., RODA, J. M., CARCELLER, F., PASCUAL, J. M., HOWELLS, S. L., MAZUCCO, R. & GRIFFITHS, J. R. (1998). Pattern recognition analysis of <sup>1</sup>H NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumor biopsies. *Magn Reson Med* **39**, 869-77.
- MAZERON, J. J., MAUGIS, A., BARRET, C. & MORNEX, F. (2005). *Techniques d'irradiation des cancers: la radiothérapie conformationnelle*. Maloine, Paris.
- MAZERON, R., BOURHIS, J. & DEUTSCH, E. (2009). [Angiogenesis inhibitors and radiation therapy: concept and preliminary results]. *Bull Cancer* **96**, 299-310.
- MCKNIGHT, T. R., VON DEM BUSSCHE, M. H., VIGNERON, D. B., LU, Y., BERGER, M. S., MCDERMOTT, M. W., DILLON, W. P., GRAVES, E. E., PIRZKALL, A. & NELSON, S. J. (2002). Histopathological validation of a three-dimensional magnetic resonance spectroscopy index as a predictor of tumor presence. *J Neurosurg* **97**, 794-802.
- MICCHELI, A. T., MICCHELI, A., DI CLEMENTE, R., VALERIO, M., COLUCCIA, P., BIZZARRI, M. & CONTI, F. (2006). NMR-based metabolic profiling of human hepatoma cells in relation to cell growth by culture media analysis. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1723-31.
- MICHEL, V., YUAN, Z., RAMSUBIR, S. & BAKOVIC, M. (2006). Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 490-504.
- MILIA, J., TEYSSIER, F., DALENC, F., ADER, I., DELMAS, C., PRADINES, A., LAJOIE-MAZENC, I., BARON, R., BONNET, J., COHEN-JONATHAN, E., FAVRE, G. & TOULAS, C. (2005). Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ* **12**, 492-501.
- MIQUEL, K., PRADINES, A., TERCE, F., SELMI, S. & FAVRE, G. (1998). Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J Biol Chem* **273**, 26179-86.
- MIRACCO, C., COSCI, E., OLIVERI, G., LUZI, P., PACENTI, L., MONCIATTI, I., MANNUCCI, S., DE NISI, M. C., TOSCANO, M., MALAGNINO, V., FALZARANO, S. M., PIRTOLI, L. & TOSI, P. (2007). Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol* **30**, 429-36.
- MISCHEL, P. S., SHAI, R., SHI, T., HORVATH, S., LU, K. V., CHOE, G., SELIGSON, D., KREMEN, T. J., PALOTIE, A., LIAU, L. M., CLOUGHESY, T. F. & NELSON, S. F. (2003). Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene* **22**, 2361-73.
- MOFFAT, B. A., CHENEVERT, T. L., LAWRENCE, T. S., MEYER, C. R., JOHNSON, T. D., DONG, Q., TSIEN, C., MUKHERJI, S., QUINT, D. J., GEBARSKI, S. S., ROBERTSON, P. L., JUNCK, L. R., REHEMTULLA, A. & ROSS, B. D. (2005). Functional diffusion map: a noninvasive MRI biomarker for early stratification of clinical brain tumor response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5524-9.
- MONFERRAN, S., SKULI, N., DELMAS, C., FAVRE, G., BONNET, J., COHEN-JONATHAN-MOYAL, E. & TOULAS, C. (2008). Alpha5beta3 and alpha5beta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* **123**, 357-64.

- MOYAL, E. C., LAPRIE, A., DELANNES, M., POUBLANC, M., CATALAA, I., DALENC, F., BERCHERY, D., SABATIER, J., BOUSQUET, P., DE PORRE, P., ALAUX, B. & TOULAS, C. (2007). Phase I trial of tipifarnib (R115777) concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **68**, 1396-401.
- MUKHERJEE, B., MCELLIN, B., CAMACHO, C. V., TOMIMATSU, N., SIRASANAGANDALA, S., NANNEPAGA, S., HATANPAA, K. J., MICKEY, B., MADDEN, C., MAHER, E., BOOTHMAN, D. A., FURNARI, F., CAVENEE, W. K., BACHOO, R. M. & BURMA, S. (2009). EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Res* **69**, 4252-9.
- NAKAGAWA, T., IDO, K., SAKUMA, T., TAKEUCHI, H., SATO, K. & KUBOTA, T. (2009). Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas. *Neuropathology* **29**, 379-88.
- NAKAMURA, J. L., KARLSSON, A., ARVOLD, N. D., GOTTSCHALK, A. R., PIEPER, R. O., STOKOE, D. & HAAS-KOGAN, D. A. (2005). PKB/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas. *J Neurooncol* **71**, 215-22.
- NAKANISHI, M. & ROSENBERG, D. W. (2006). Roles of cPLA2alpha and arachidonic acid in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 1335-43.
- NARENDRA SHARATH CHANDRA, J. N., PONNAPPA, K. C., SADASHIVA, C. T., PRIYA, B. S., NANDA, B. L., GOWDA, T. V., VISHWANATH, B. S. & RANGAPPA, K. S. (2007). Chemistry and structural evaluation of different phospholipase A2 inhibitors in arachidonic acid pathway mediated inflammation and snake venom toxicity. *Curr Top Med Chem* **7**, 787-800.
- NICHOLSON, J. K., LINDON, J. C. & HOLMES, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* **29**, 1181-9.
- NICHOLSON, J. K. & WILSON, I. D. (2003). Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 668-76.
- NIEMELA, P. S., CASTILLO, S., SYSI-AHO, M. & ORESIC, M. (2009). Bioinformatics and computational methods for lipidomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**, 2855-62.
- NIKNAMI, M., PATEL, M., WITTING, P. K. & DONG, Q. (2009). Molecules in focus: cytosolic phospholipase A2-alpha. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 994-7.
- NODA, S. E., EL-JAWAHRI, A., PATEL, D., LAUTENSCHLAEGER, T., SIEDOW, M. & CHAKRAVARTI, A. (2009). Molecular advances of brain tumors in radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* **19**, 171-8.
- NOZAKI, M., TADA, M., KOBAYASHI, H., ZHANG, C. L., SAWAMURA, Y., ABE, H., ISHII, N. & VAN MEIR, E. G. (1999). Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol* **1**, 124-37.
- OISHI, T., SASAKI, A., HAMADA, N., ISHIUCHI, S., FUNAYAMA, T., SAKASHITA, T., KOBAYASHI, Y., NAKANO, T. & NAKAZATO, Y. (2008). Proliferation and cell death of human glioblastoma cells after carbon-ion beam exposure: morphologic and morphometric analyses. *Neuropathology* **28**, 408-16.
- OPSTAD, K. S., BELL, B. A., GRIFFITHS, J. R. & HOWE, F. A. (2009). Taurine: a potential marker of apoptosis in gliomas. *Br J Cancer* **100**, 789-94.

## Bibliographie

---

- ORESIC, M. (2009). Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **19**, 816-24.
- OTOMO, T., HISHII, M., ARAI, H., SATO, K. & SASAI, K. (2004). Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *J Radiat Res (Tokyo)* **45**, 53-60.
- OU, X. M., CHEN, K. & SHIH, J. C. (2006). Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase A is regulated differently by R1 and Sp1. *J Biol Chem* **281**, 21512-25.
- PACINI, S., RUGGIERO, M., CASAMASSIMA, F., SANTUCCI, M. A., MILANO, F., RANALDI, F., VANNI, S. & GIACHETTI, E. (1995). Study of second messenger levels and of sugar catabolism enzyme activities in transformed cells resistant to ionizing radiations. *Biochem Mol Biol Int* **37**, 81-8.
- PARK, I., TAMAI, G., LEE, M. C., CHUANG, C. F., CHANG, S. M., BERGER, M. S., NELSON, S. J. & PIRZKALL, A. (2007). Patterns of recurrence analysis in newly diagnosed glioblastoma multiforme after three-dimensional conformal radiation therapy with respect to pre-radiation therapy magnetic resonance spectroscopic findings. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **69**, 381-9.
- PARK, M. H., AHN, B. H., HONG, Y. K. & MIN DO, S. (2009). Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF-kappaB/Sp1-mediated signaling pathways. *Carcinogenesis* **30**, 356-65.
- PATTERSON, A. D., LI, H., EICHLER, G. S., KRAUSZ, K. W., WEINSTEIN, J. N., FORNACE, A. J., JR., GONZALEZ, F. J. & IDLE, J. R. (2008). UPLC-ESI-TOFMS-based metabolomics and gene expression dynamics inspector self-organizing metabolomic maps as tools for understanding the cellular response to ionizing radiation. *Anal Chem* **80**, 665-74.
- PEDERSEN, S. F., BEISNER, K. H., HOUGAARD, C., WILLUMSEN, B. M., LAMBERT, I. H. & HOFFMANN, E. K. (2002). Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Physiol* **541**, 779-96.
- PEELING, J. & SUTHERLAND, G. (1992). High-resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. *Magn Reson Med* **24**, 123-36.
- PEIRCE, C. B. & BOUCHARD, J. (1950). Role of radiation therapy in the control of malignant neoplasms of the brain and brain stem. *Radiology* **55**, 337-43.
- PELECH, S. L. & VANCE, D. E. (1989). Signal transduction via phosphatidylcholine cycles. *Trends in Biochemical Sciences* **14**, 28-30.
- PODO, F. (1999). Tumour phospholipid metabolism. *NMR Biomed* **12**, 413-39.
- POSTLE, A. D., WILTON, D. C., HUNT, A. N. & ATTARD, G. S. (2007). Probing phospholipid dynamics by electrospray ionisation mass spectrometry. *Prog Lipid Res* **46**, 200-24.
- QUISTAD, G. B. & CASIDA, J. E. (2004). Lysophospholipase inhibition by organophosphorus toxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* **196**, 319-26.
- RAINALDI, G., ROMANO, R., INDOVINA, P., FERRANTE, A., MOTTA, A., INDOVINA, P. L. & SANTINI, M. T. (2008). Metabolomics using <sup>1</sup>H-NMR of apoptosis and Necrosis in HL60 leukemia cells: differences between the two types of cell death and independence from the stimulus of apoptosis used. *Radiat Res* **169**, 170-80.

RAJALINGAM, K. & RUDEL, T. (2005). Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell Cycle* **4**, 1503-5.

RAMIREZ DE MOLINA, A., RODRIGUEZ-GONZALEZ, A., GUTIERREZ, R., MARTINEZ-PINEIRO, L., SANCHEZ, J., BONILLA, F., ROSELL, R. & LACAL, J. (2002). Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 580-3.

RAMIREZ DE MOLINA, A., GALLEGO-ORTEGA, D., SARMENTERO, J., BANEZ-CORONEL, M., MARTIN-CANTALEJO, Y. & LACAL, J. C. (2005). Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer Res* **65**, 5647-53.

RAMIREZ DE MOLINA, A., GALLEGO-ORTEGA, D., SARMENTERO-ESTRADA, J., LAGARES, D., GOMEZ DEL PULGAR, T., BANDRES, E., GARCIA-FONCILLAS, J. & LACAL, J. C. (2008). Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: implications in cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1753-63.

RAU, G. A., DOMBROWSKY, H., GEBERT, A., THOLE, H. H., VON DER HARDT, H., FREIHORST, J. & BERNHARD, W. (2003). Phosphatidylcholine metabolism of rat trachea in relation to lung parenchyma and surfactant. *J Appl Physiol* **95**, 1145-52.

REARDON, D. A. & WEN, P. Y. (2006). Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist* **11**, 152-64.

REDDY, S. P., BRITTO, R., VINNAKOTA, K., APARNA, H., SREEPATHI, H. K., THOTA, B., KUMARI, A., SHILPA, B. M., VRINDA, M., UMESH, S., SAMUEL, C., SHETTY, M., TANDON, A., PANDEY, P., HEGDE, S., HEGDE, A. S., BALASUBRAMANIAM, A., CHANDRAMOULI, B. A., SANTOSH, V., KONDAIAH, P., SOMASUNDARAM, K. & RAO, M. R. (2008). Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through transcriptome analysis. *Clin Cancer Res* **14**, 2978-87.

RIGHI, V., RODA, J. M., PAZ, J., MUCCI, A., TUGNOLI, V., RODRIGUEZ-TARDUCHY, G., BARRIOS, L., SCHENETTI, L., CERDAN, S. & GARCIA-MARTIN, M. L. (2009). 1H HR-MAS and genomic analysis of human tumor biopsies discriminate between high and low grade astrocytomas. *NMR Biomed* **22**, 629-37.

ROBERT, J. (2006). [From conventional chemotherapy to targeted therapies of cancer : mechanisms of oncogenesis at the molecular and cellular levels]. *Bull Cancer hors série*, 5-16.

ROBERT, O., SABATIER, J., DESOUBZDANNE, D., LALANDE, J., BALAYSSAC, S., GILARD, V., MARTINO, R. & MALET-MARTINO, M. pH optimization for a reliable quantification of brain tumor cell and tissue extracts with 1H MRS: focus on choline containing-compounds and taurine. *Anal Bioanal Chem (soumise)*.

ROBERT, O. (2004). RMN et extraits tissulaires cérébraux: RMN du proton et gradation des tumeurs cérébrales primitives humaines; RMN du proton et modifications métaboliques chez les brebis atteintes de tremblante; RMN du fluor et métabolisme du 5-fluorouracile dans les tumeurs gliales chez le rat., Université Toulouse III- Paul Sabatier.

RODA, J. M., PASCUAL, J. M., CARCELLER, F., GONZALEZ-LLANOS, F., PEREZ-HIGUERAS, A., SOLIVERA, J., BARRIOS, L. & CERDAN, S. (2000). Nonhistological diagnosis of human cerebral tumors by 1H magnetic resonance spectroscopy and amino acid analysis. *Clin Cancer Res* **6**, 3983-93.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, A., RAMIREZ DE MOLINA, A., BENITEZ-RAJAL, J. & LACAL, J. C. (2003). Phospholipase D and choline kinase: their role in cancer development and their potential as drug targets. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 191-201.

## Bibliographie

---

- ROMSICKI, Y. & SHAROM, F. J. (2001). Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* **40**, 6937-47.
- ROSA, A. O. & RAPOPORT, S. I. (2009). Intracellular- and extracellular-derived Ca(2+) influence phospholipase A(2)-mediated fatty acid release from brain phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 697-705.
- ROSS, B. M., SHERWIN, A. L. & KISH, S. J. (1995). Multiple forms of the enzyme glycerophosphodiesterase are present in human brain. *Lipids* **30**, 1075-81.
- RUBEL, A., HANDRICK, R., LINDNER, L. H., STEIGER, M., EIBL, H., BUDACH, W., BELKA, C. & JENDROSSEK, V. (2006). The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro. *Radiat Oncol* **1**, 6.
- SABATIER, J., GILARD, V., MALET-MARTINO, M., RANJEVA, J. P., TERRAL, C., BREIL, S., DELISLE, M. B., MANELFE, C., TREMOULET, M. & BERRY, I. (1999). Characterization of choline compounds with in vitro 1H magnetic resonance spectroscopy for the discrimination of primary brain tumors. *Invest Radiol* **34**, 230-5.
- SABATIER, J., ROBERT, O., DELISLE, M. B. & MALET-MARTINO, M. (2005). Usefulness of in vitro 1H magnetic resonance spectroscopy for the characterization of primary brain tumors: report of two cases. *Stereotact Funct Neurosurg* **83**, 122-6; discussion 126-7.
- SAKAGAMI, H., AOKI, J., NATORI, Y., NISHIKAWA, K., KAKEHI, Y., NATORI, Y. & ARAI, H. (2005). Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *J Biol Chem* **280**, 23084-93.
- SAMPSON, J. H., ARCHER, G. E. & BIGNER, D. D. (2008). Heimberger Effect of EGFRvIII-targeted vaccine (CDX-110) on immune response and TTP when given with simultaneous standard and continuous temozolomide in patients with GBM. *Proc Am Soc Clin Oncol* **26**, 2011.
- SASABE, E., ZHOU, X., LI, D., OKU, N., YAMAMOTO, T. & OSAKI, T. (2007). The involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* **120**, 268-77.
- SHAPIRO, W. R., GREEN, S. B., BURGER, P. C., MAHALEY, M. S., JR., SELKER, R. G., VANGILDER, J. C., ROBERTSON, J. T., RANSOHOFF, J., MEALEY, J., JR., STRIKE, T. A. & ET AL. (1989). Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *J Neurosurg* **71**, 1-9.
- SHENNAN, D. B. (2008). Swelling-induced taurine transport: relationship with chloride channels, anion-exchangers and other swelling-activated transport pathways. *Cell Physiol Biochem* **21**, 15-28.
- SIBTAIN, N. A., HOWE, F. A. & SAUNDERS, D. E. (2007). The clinical value of proton magnetic resonance spectroscopy in adult brain tumours. *Clin Radiol* **62**, 109-19.
- SIJEN, A. E., MCINTYRE, J. B., ROLDAN, G. B., EASAW, J. C., YAN, E., FORSYTH, P. A., PARNEY, I. F., MAGLIOCCO, A. M., BERNSEN, H. & CAIRNCROSS, J. G. (2008). Toxicity from chemoradiotherapy in older patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **89**, 97-103.
- SINGH, S. K., HAWKINS, C., CLARKE, I. D., SQUIRE, J. A., BAYANI, J., HIDE, T., HENKELMAN, R. M., CUSIMANO, M. D. & DIRKS, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401.



## Bibliographie

---

- SINHA ROY, S., MUKHOPADHYAY, S., MUKHERJEE, S. & DAS, S. K. (2008). Breast cancer is associated with an increase in the activity and expression of cholinephosphotransferase in rats. *Life Sci* **83**, 661-5.
- SKULI, N. (2007). Implication des voies de signalisation de l'adhérence cellulaire dans le contrôle de l'hypoxie tumorale des glioblastomes, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- SKULI, N., MONFERRAN, S., DELMAS, C., FAVRE, G., BONNET, J., TOULAS, C. & COHEN-JONATHAN MOYAL, E. (2009). Alpha3/alpha5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res* **69**, 3308-16.
- SMITH, E. L. & SCHUCHMAN, E. H. (2008). The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *Faseb J* **22**, 3419-31.
- SOARES, D. P. & LAW, M. (2009). Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications. *Clin Radiol* **64**, 12-21.
- SOKOL, M., PRZYBYSZEWSKI, W. M. & MATLAS, B. (2004). Investigation of metabolic changes in irradiated rat brain tissue by means of <sup>1</sup>H NMR in vitro relaxation study. *Solid State Nucl Magn Reson* **25**, 53-60.
- SONI, D., KING, J. A., KAYE, A. H. & HOVENS, C. M. (2005). Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge. *J Clin Neurosci* **12**, 1-5.
- SPENCE, A. M., MUZI, M., SWANSON, K. R., O'SULLIVAN, F., ROCKHILL, J. K., RAJENDRAN, J. G., ADAMSEN, T. C., LINK, J. M., SWANSON, P. E., YAGLE, K. J., ROSTOMILY, R. C., SILBERGELD, D. L. & KROHN, K. A. (2008). Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res* **14**, 2623-30.
- SPRATLIN, J. L., SERKOVA, N. J. & ECKHARDT, S. G. (2009). Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res* **15**, 431-40.
- STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDAHN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAEUER, E. & MIRIMANOFF, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987-96.
- STUPP, R., GOLDBRUNNER, R., NEYENS, B. & AL., E. (2007). Phase I/IIa trial of cilengitide (EMD121974) and temozolomide with concomitant radiotherapy, followed by temozolomide and cilengitide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* **25**, 2000.
- SUGIMOTO, H., BANCHIO, C. & VANCE, D. E. (2008). Transcriptional regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog Lipid Res* **47**, 204-20.
- SULLUARDS, M. C., WANG, E., PENG, Q. & MERRILL, A. H., JR. (2003). Metabolomic profiling of sphingolipids in human glioma cell lines by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)* **49**, 789-797.
- SZELIGA, M. & OBARA-MICHLEWSKA, M. (2009). Glutamine in neoplastic cells: focus on the expression and roles of glutaminases. *Neurochem Int* **55**, 71-5.

## Bibliographie

---

TAN, L., XIAO, B. X., ZENG, W. S., LIN, J., ZOU, Z. P., XU, A. M. & LUO, S. Q. (2007). Antitumour effects on human colorectal carcinomas cells by stable silencing of phospholipase C-gamma 1 with lentivirus-delivered siRNA. *Chin Med J (Engl)* **120**, 749-54.

TAN, W., KE, Y. & WU, G. (2008). Preliminary study *in vitro* brain tumor with high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology* **7**, 103-106.

TAZIK, S., JOHNSON, S., LU, D., JOHNSON, C., YOUNG, M. B., STOCKMEIER, C. A. & OU, X. M. (2009). Comparative neuroprotective effects of rasagiline and aminoindan with selegiline on dexamethasone-induced brain cell apoptosis. *Neurotox Res* **15**, 284-90.

THORSEN, F., JIRAK, D., WANG, J., SYKOVA, E., BJERKVIG, R., ENGER, P. O., VAN DER KOGEL, A. & HAJEK, M. (2008). Two distinct tumor phenotypes isolated from glioblastomas show different MRS characteristics. *NMR Biomed* **21**, 830-8.

TREDAN, O., GRANTAB, R. & DUMONTET, C. (2008). [Can tumor hypoxia be turned into a chemotherapeutic advantage?]. *Bull Cancer* **95**, 528-34.

TROUFLARD, S., ROSCHER, A., THOMASSET, B., BARBOTIN, J. N., RAWSTHORNE, S. & PORTAIS, J. C. (2007). In vivo <sup>13</sup>C NMR determines metabolic fluxes and steady state in linseed embryos. *Phytochemistry* **68**, 2341-50.

TSAI, M. H., COOK, J. A., CHANDRAMOULI, G. V., DEGRAFF, W., YAN, H., ZHAO, S., COLEMAN, C. N., MITCHELL, J. B. & CHUANG, E. Y. (2007). Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation. *Cancer Res* **67**, 3845-52.

TUZGEN, S., HANIMOGLU, H., TANRIVERDI, T., KACIRA, T., SANUS, G. Z., ATUKEREN, P., DASHTI, R., GUMUSTAS, K., CANBAZ, B. & KAYNAR, M. Y. (2007). Relationship between DNA damage and total antioxidant capacity in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**, 177-81.

USENIUS, J. P., VAINIO, P., HERNESNIEMI, J. & KAUPPINEN, R. A. (1994). Choline-containing compounds in human astrocytomas studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in vivo and in vitro. *J Neurochem* **63**, 1538-43.

VAN BLITTERSWIJK, W. J. & VERHEIJ, M. (2008). Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des* **14**, 2061-74.

VANCE, J. E. & VANCE, D. E. (2004). Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* **82**, 113-28.

VANPOUILLE, C., LE JEUNE, N., KRYZA, D., CLOTAGATIDE, A., JANIER, M., DUBOIS, F. & PEREK, N. (2009). Influence of multidrug resistance on (18)F-FCH cellular uptake in a glioblastoma model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **36**, 1256-64.

VARLET, P., JOUVET, A., MIQUEL, C., SAINT-PIERRE, G., BEUVON, F. & DAUMAS-DUPORT, C. (2005). [Criteria of diagnosis and grading of oligodendrogliomas or oligo-astrocytomas according to the WHO and Sainte-Anne classifications]. *Neurochirurgie* **51**, 239-46.

VARVERIS, H., PETINELLI, E., STRATAKIS, J. & MAZONAKIS, M. (2008). Phase I study of weekly topotecan combined to concurrent external cranial irradiation in adults with glioblastoma multiforme of the brain. *Oncol Rep* **19**, 447-55.

VEGA, F. M. & RIDLEY, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* **582**, 2093-101.

## Bibliographie

---

- VELLANKI, S. H., GRABRUCKER, A., LIEBAU, S., PROEPPER, C., ERAMO, A., BRAUN, V., BOECKERS, T., DEBATIN, K. M. & FULDA, S. (2009). Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma. *Neoplasia* **11**, 743-52.
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W. & AL., E. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51.
- VIEU, C., TERCE, F., CHEVY, F., ROLLAND, C., BARBARAS, R., CHAP, H., WOLF, C., PERRET, B. & COLLET, X. (2002). Coupled assay of sphingomyelin and ceramide molecular species by gas liquid chromatography. *J Lipid Res* **43**, 510-22.
- VINK, S. R., VAN BLITTERSWIJK, W. J., SCHELLENS, J. H. & VERHEIJ, M. (2007). Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. *Cancer Treat Rev* **33**, 191-202.
- VION-DURY, J. (2002). *Cours de résonance magnétique: spectroscopie et imagerie*. Ellipses, Paris.
- VOSE, S. C., HOLLAND, N. T., ESKENAZI, B. & CASIDA, J. E. (2007). Lysophosphatidylcholine hydrolases of human erythrocytes, lymphocytes, and brain: sensitive targets of conserved specificity for organophosphorus delayed neurotoxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* **224**, 98-104.
- WALKER, M. D., STRIKE, T. A. & SHELINE, G. E. (1979). An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **5**, 1725-31.
- WANG, A. & DENNIS, E. A. (1999). Mammalian lysophospholipases. *Biochim Biophys Acta* **1439**, 1-16.
- WANG, A., JOHNSON, C. A., JONES, Y., ELLISMAN, M. H. & DENNIS, E. A. (2000). Subcellular localization and PKC-dependent regulation of the human lysophospholipase A/acyl-protein thioesterase in WISH cells. *Biochim Biophys Acta* **1484**, 207-14.
- WANG, C. C., LIAO, Y. P., MISCHER, P. S., IWAMOTO, K. S., CACALANO, N. A. & MCBRIDE, W. H. (2006). HDJ-2 as a target for radiosensitization of glioblastoma multiforme cells by the farnesyltransferase inhibitor R115777 and the role of the p53/p21 pathway. *Cancer Res* **66**, 6756-62.
- WELSH, J. W., ELLSWORTH, R. K., KUMAR, R., FJERSTAD, K., MARTINEZ, J., NAGEL, R. B., ESCHBACHER, J. & STEA, B. (2009). Rad51 protein expression and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **74**, 1251-5.
- WENK, M. R. (2005). The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 594-610.
- WERNER, E., CROIXMARIE, V., UMBDENSTOCK, T., EZAN, E., CHAMINADE, P., TABEL, J. C. & JUNOT, C. (2008). Mass spectrometry-based metabolomics: accelerating the characterization of discriminating signals by combining statistical correlations and ultrahigh resolution. *Anal Chem* **80**, 4918-32.
- WISHART, D. A. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *Trends in Analytical Chemistry* **27**, 228-237.
- WONG, M. L., PRAWIRA, A., KAYE, A. H. & HOVENS, C. M. (2009). Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *J Clin Neurosci* **16**, 1119-30.
- YAN, H., PARSONS, D. W., JIN, G., MCLENDON, R., RASHEED, B. A., YUAN, W., KOS, I., BATINIC-HABERLE, I., JONES, S., RIGGINS, G. J., FRIEDMAN, H., FRIEDMAN, A., REARDON, D., HERNDON, J., KINZLER, K. W., VELCULESCU, V. E., VOGELSTEIN, B. & BIGNER, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**, 765-73.

## Bibliographie

---

ZACCHEO, O., DINSDALE, D., MEACOCK, P. A. & GLYNN, P. (2004). Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells. *J Biol Chem* **279**, 24024-33.

ZHENG, M., MORGAN-LAPPE, S. E., YANG, J., BOCKBRADER, K. M., PAMARTHY, D., THOMAS, D., FESIK, S. W. & SUN, Y. (2008). Growth inhibition and radiosensitization of glioblastoma and lung cancer cells by small interfering RNA silencing of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Cancer Res* **68**, 7570-8.

ZHOU, H., MIKI, R., EEVA, M., FIKE, F. M., SELIGSON, D., YANG, L., YOSHIMURA, A., TEITELL, M. A., JAMIESON, C. A. & CACALANO, N. A. (2007). Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* **13**, 2344-53.

ZHUANG, W., QIN, Z. & LIANG, Z. (2009). The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **41**, 341-51.

# *Annexes*

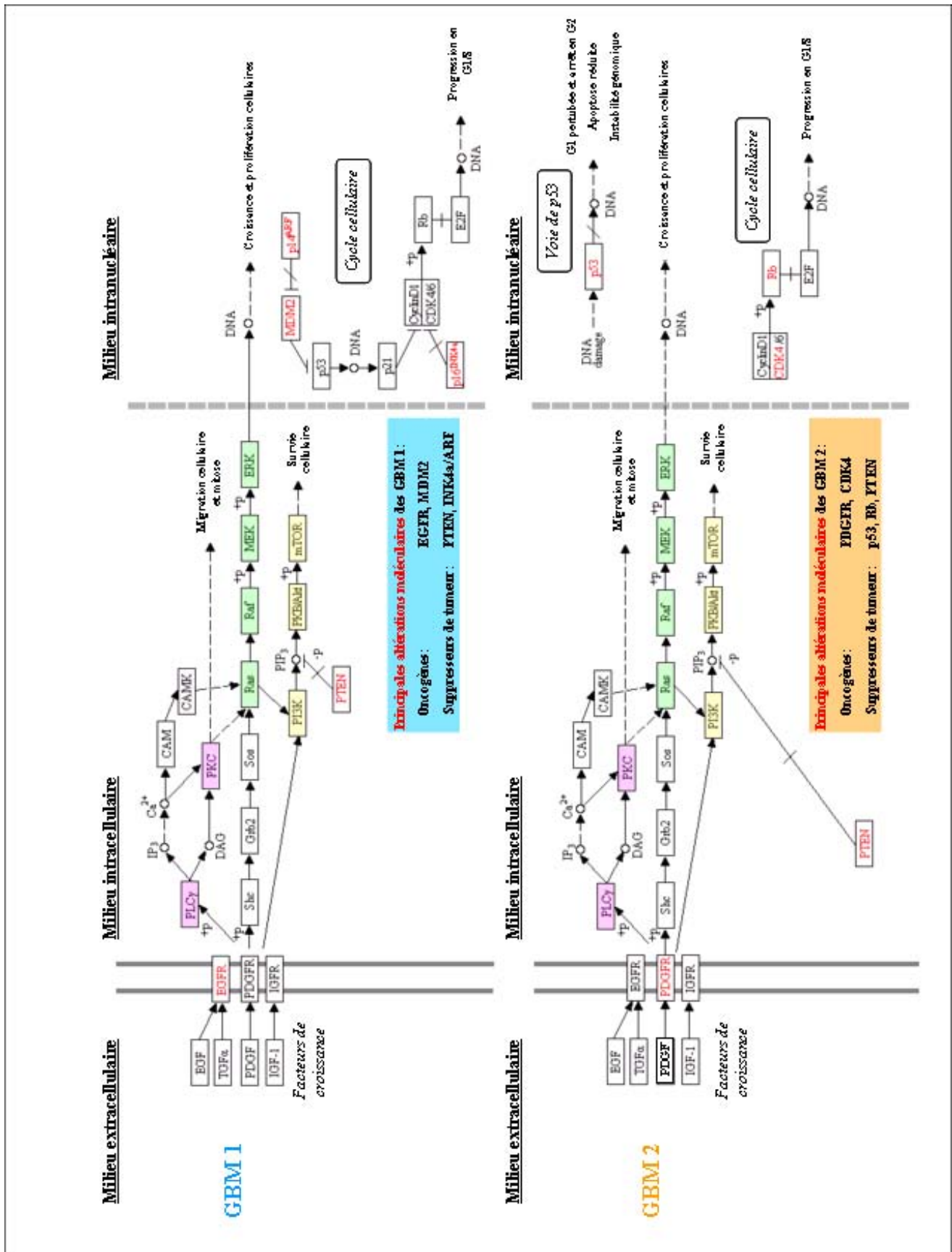
## *Annexes*

Trois annexes sont présentées à la fin de ce manuscrit.

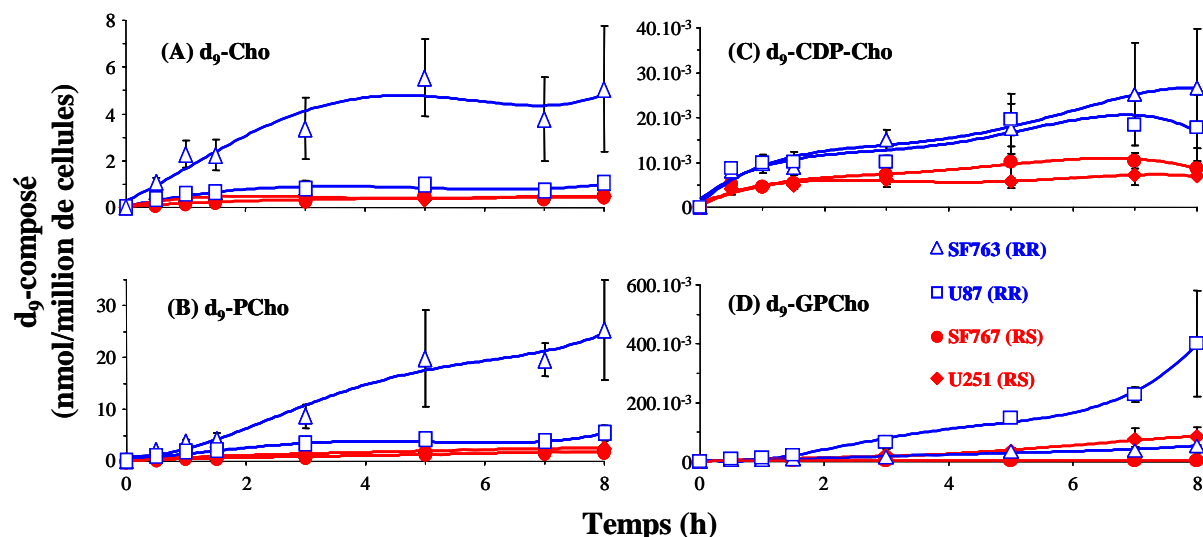
La première annexe (**Annexe 1**), en format paysage, présente les trois principales voies de transduction du signal : la voie PLC- $\gamma$ /PKC (**en rose**), la voie RAS/Raf/MEK/ERK (**en vert**) et PI3K/Akt-PKB/mTOR la voie (**en jaune**), ainsi que les principales altérations moléculaires dans les GBM primaires (GBM 1) et secondaires (GBM 2). Le schéma a été tiré et adapté à partir du site internet suivant : [www.genome.jp/kegg/kegg2.html](http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html).

La deuxième annexe (**Annexe 2**) présente les cinétiques d'incorporation ou de formation des composés hydrosolubles à  $d_9$ -Cho exprimées en pmol/million de cellules, ainsi que les valeurs des concentrations (sous forme d'un tableau) et des *p-values* (tableau croisé) à  $t = 8$  h. Ces résultats ont été obtenus lors de l'étude du métabolisme des PtdCho par marquage à la  $d_9$ -Cho dans le projet RR *vs* RS.

La troisième annexe (**Annexe 3**) illustre les cinétiques de formation des différentes espèces de  $d_9$ -PtdCho étudiées lors de l'étude du métabolisme des PtdCho par marquage à la  $d_9$ -Cho dans le projet RR *vs* RS : (A)  $d_9$ -PtdCho 16:0/14:0 ; (B)  $d_9$ -PtdCho 16:0/16:0 ; (C)  $d_9$ -PtdCho 16:0/16:1, (D)  $d_9$ -PtdCho 16:0/18:1, (E)  $d_9$ -PtdCho 16:0/18:2, (F)  $d_9$ -PtdCho 18:0/18:2, (G)  $d_9$ -PtdCho 16:0/20:4, (H)  $d_9$ -PtdCho 16:0alk/16:0 et (I)  $d_9$ -PtdCho 16:0alk/18:0.



**Annexe 3 : Cinétiques de formation des différentes espèces de d<sub>9</sub>-PtdCho**



**Cinétiques d'incorporation ou de formation des composés hydrosolubles d<sub>9</sub>-Cho (en nmol/million de cellules, régression polynomiale d'ordre 4) : (A) d<sub>9</sub>-Cho ; (B) d<sub>9</sub>-PCho ; (C) d<sub>9</sub>-CDP-Cho et (D) d<sub>9</sub>-GPCho.**

**Tableau représentant les concentrations des composés d<sub>9</sub>-Cho hydrosolubles (en nmol/million de cellules) au bout de 8 h.**

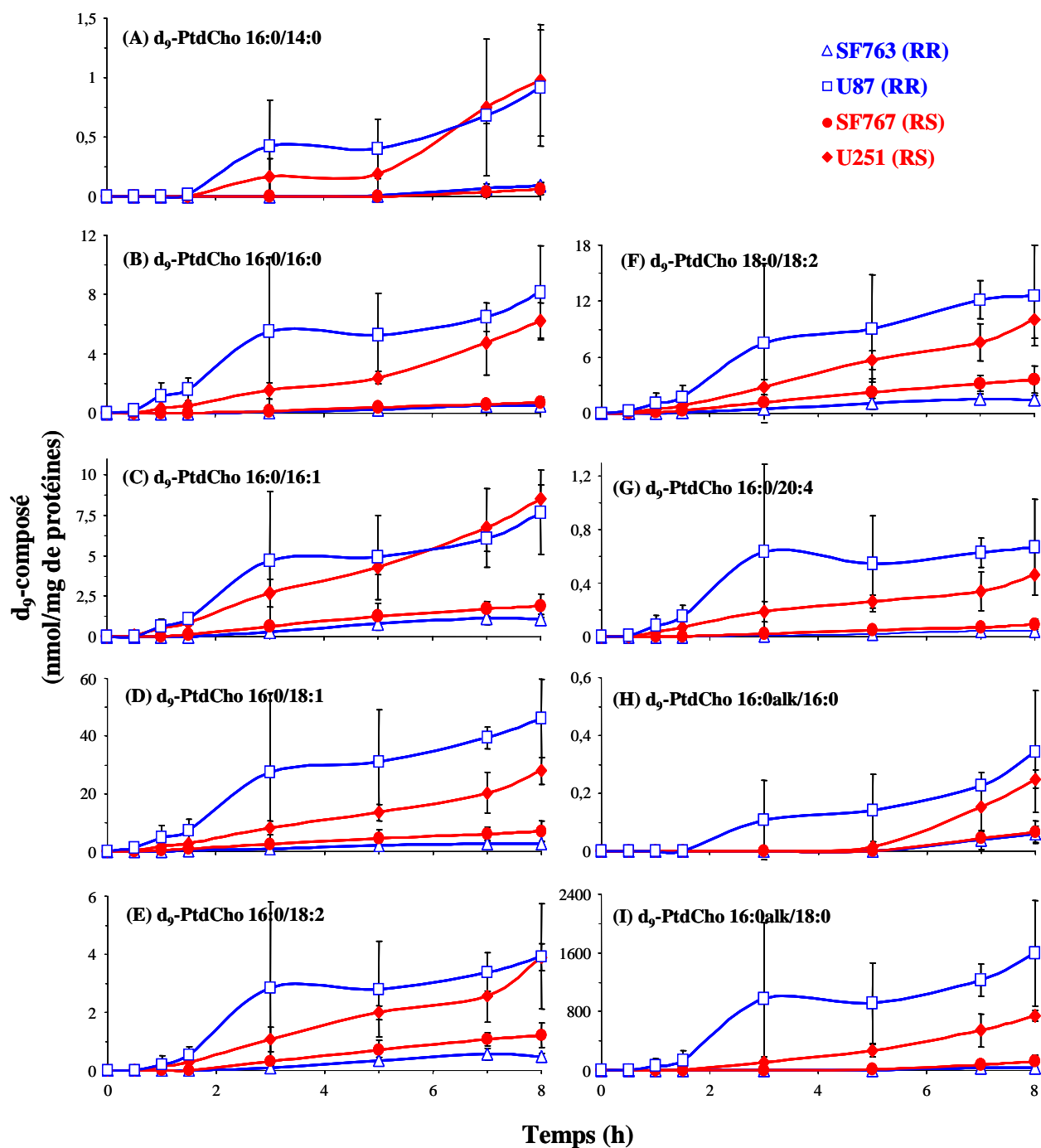
Composés à choline deutérés	Concentration (nmol/million de cellules)			
	SF763 (RR)	U87 (RR)	SF767 (RS)	U251 (RS)
<b>Métabolites</b>				
d <sub>9</sub> -Cho	5,1 ± 2,7	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
d <sub>9</sub> -PCho	25,4 ± 9,6	5,5 ± 1,4	1,9 ± 0,3	2,5 ± 0,3
d <sub>9</sub> -CDP-Cho (x 10 <sup>-3</sup> )	27 ± 13	18 ± 8	9 ± 0	7 ± 1
d <sub>9</sub> -GPCho (x 10 <sup>-3</sup> )	54 ± 24	402 ± 180	4 ± 1	86 ± 30

*NB. Les valeurs données ont été déterminées à partir de trois expériences distinctes (moyenne ± SD).*

**Tableau croisé des composés d<sub>9</sub>-Cho hydrosolubles significativement différents inter-lignées au bout de 8 h (*p-values* sur les valeurs en nmol/million de cellules).**

	SF767 (RS)	SF763 (RR)	U87 (RR)
U251 (RS)		d <sub>9</sub> -GPCho (0,01) d <sub>9</sub> -CDP-Cho (0,01)	d <sub>9</sub> -Cho (0,004) d <sub>9</sub> -PCho (0,02) d <sub>9</sub> -GPCho (0,04)
SF767 (RS)		d <sub>9</sub> -Cho (0,04) d <sub>9</sub> -PCho (0,01) d <sub>9</sub> -GPCho (0,02)	d <sub>9</sub> -Cho (0,004) d <sub>9</sub> -PCho (0,01) d <sub>9</sub> -GPCho (0,02)
SF763 (RR)			d <sub>9</sub> -PCho (0,02) d <sub>9</sub> -GPCho (0,03)





Cinétiques de formation des différentes espèces de d<sub>9</sub>-PtdCho (en nmol/mg de protéines) : (A) d<sub>9</sub>-PtdCho 16:0/14:0 ; (B) d<sub>9</sub>-PtdCho 16:0/16:0 ; (C) d<sub>9</sub>-PtdCho 16:0/16:1, (D) d<sub>9</sub>-PtdCho 16:0/18:1, (E) d<sub>9</sub>-PtdCho 16:0/18:2, (F) d<sub>9</sub>-PtdCho 18:0/18:2, (G) d<sub>9</sub>-PtdCho 16:0/20:4, (H) d<sub>9</sub>-PtdCho 16:0alk/16:0 et (I) d<sub>9</sub>-PtdCho 16:0alk/18:0.

**AUTHOR :** Denis DESOUBZDANNE-DUMONT

**TITLE :** Radioresistance of human glioblastoma cell lines : metabolomics, lipidomics and transcriptomics for biomarkers investigation

**PHD DIRECTOR :** Pr. Myriam MALET-MARTINO

**PLACE & DATE OF PHD VIVA :** Paul Sabatier University, Toulouse, 25-6-2010

---

## ABSTRACT

Glioblastomas (GBM) are the most aggressive human brain tumors. Indeed, patients most often die within the year after the diagnostic. Radiotherapy generally associated to radiosensitizers is currently systematically used to reduce tumor progression. Nevertheless, a radioresistance phenomenon still occurs. An individual treatment is hoped for each patient. For this purpose, a molecular classification of GBM has been created, taking into account biomarkers such as a predictive chemioresistance factor, but not radioresistance one. In this context, we have searched for *in vitro* radioresistance biomarkers in four human GBM cell lines with different radiosensitivity profiles. This corresponds to the first part of the PhD manuscript. Comprehensive and robust analytical methods such as  $^1\text{H}$  NMR metabolomics, lipidomics and transcriptomics have been used. An accumulation of choline compounds has been observed in the two more radioresistant cell lines. An analytical method using deuterated labelling and HILIC-ESI-MS/MS has been developed to study the metabolism of phosphatidylcholines in the four cell lines. In the second part of the PhD project, we have focused on potential *in vitro* biomarkers of radio-induced cell death in radiosensitized human GBM cell lines. For this, NMR  $^1\text{H}$  metabolomics has been chosen. Taurine has been found as a good candidate in a cell line. Lipidomics and FACS analyses have then been used to confirm this result.

---

## KEY-WORDS

Glioblastomas (GBM), human cell lines, radioresistance, biomarkers, NMR  $^1\text{H}$  metabolomics, lipidomics, transcriptomics, choline compounds, taurine

---

**SPECIALITY :** Chemistry-Biology-Health

---

**RESEARCH LAB :** Laboratoire SPCMIB, Paul Sabatier University, UMR 5068 CNRS-UPS, Bâtiment 2R1, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France

**AUTEUR :** Denis DESOUBZDANNE-DUMONT

**TITRE :** Radiorésistance de lignées cellulaires humaines de glioblastomes : recherche de biomarqueurs par métabolomique, lipidomique et transcriptomique

**DIRECTRICE DE THESE :** Pr. Myriam MALET-MARTINO

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** Université Toulouse III – Paul Sabatier, le 25 Juin 2010

---

## RESUME

Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs cérébrales humaines les plus agressives. Les personnes atteintes de cette maladie meurent généralement dans l'année suivant le diagnostic. La radiothérapie, qui est de plus en plus utilisée en présence d'un agent radiosensibilisant, est systématiquement appliquée afin de diminuer la progression tumorale. Néanmoins, elle se heurte au phénomène de radiorésistance. Afin de proposer dans un avenir proche une thérapie adaptée à chaque patient, une classification moléculaire des GBM est en train de naître. Celle-ci tient notamment compte d'un biomarqueur prédictif de chimiorésistance, mais non de radiorésistance. Dans ce contexte, nous avons cherché, dans un premier temps, à identifier *in vitro* de potentiels biomarqueurs de radiorésistance dans quatre lignées cellulaires humaines de GBM de radiosensibilité différente. Pour cela, nous avons eu recours à des méthodes analytiques holistiques et robustes telles que la RMN  $^1\text{H}$  métabolomique, la lipidomique et la transcriptomique. Une accumulation de composés à choline dans les deux lignées les plus radiorésistantes a ainsi été mise en évidence. Une méthode d'analyse du métabolisme des phosphatidylcholines par marquage deutéré et quantification par HILIC-ESI-MS/MS a été mise au point afin de confirmer ces résultats. Dans une seconde partie, nous avons cherché à identifier *in vitro* de potentiels biomarqueurs de mort radio-induite dans des lignées cellulaires humaines de GBM radiosensibilisées. La RMN  $^1\text{H}$  métabolomique a été privilégiée pour cette investigation et complétée par des études lipidomique et de mort cellulaire par cytométrie en flux pour l'un des projets. La taurine a ainsi été identifiée comme potentiel biomarqueur de mort cellulaire.

---

## MOTS-CLES

Glioblastomes (GBM), radiorésistance, biomarqueurs, lignées cellulaires, RMN  $^1\text{H}$  métabolomique, lipidomique, transcriptomique, composés à choline, taurine

---

**DISCIPLINE OU SPECIALITE :** Chimie-Biologie-Santé

---

**UNITE DE RECHERCHE :** Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB), Université Paul Sabatier (UPS), UMR 5068 CNRS-UPS, Bât. 2R1, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France