

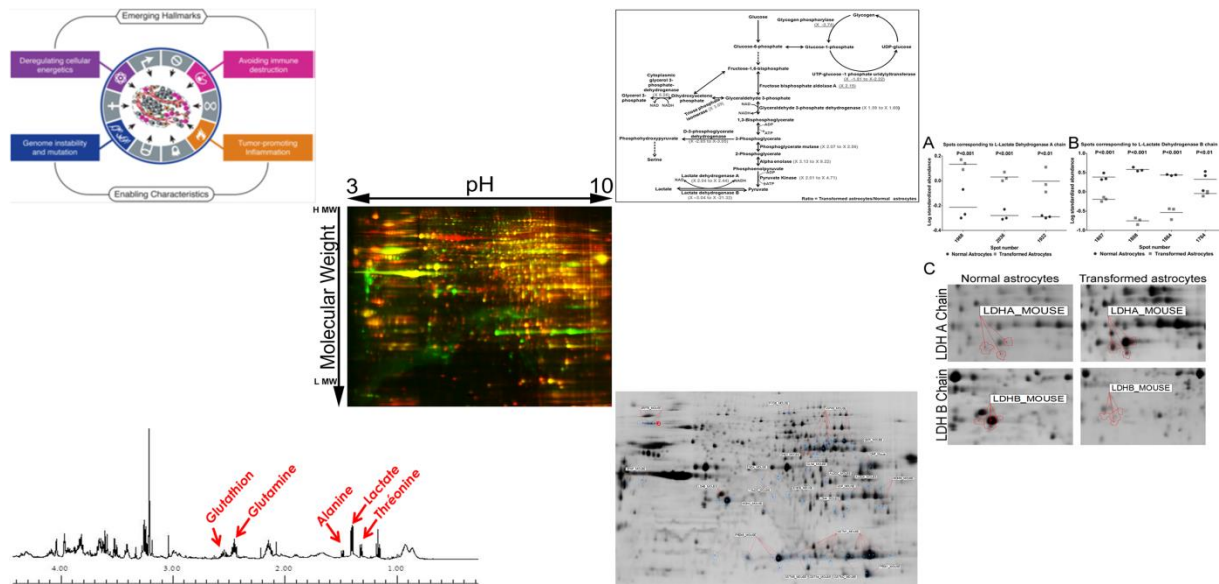


Université de Liège
Faculté de Médecine
GIGA-Neuroscience



Unité de recherche sur les Maladies et les Thérapies du Système Nerveux

Etude protéomique de la reprogrammation métabolique lors de la transformation tumorale des astrocytes



Azeddine BENTAIB

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur : Docteur Pierre LEPRINCE

Année académique 2014-2015

Remerciements

Quelques années ont été nécessaires pour arriver au bout de cette aventure scientifique et humaine. Et le moment est venu pour moi pour remercier de nombreuses personnes pour leur investissement, leur implication et leur soutien sans lesquels ce travail n'aurait pu aboutir.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de juger mon travail.

*Je souhaite remercier **Dr. Pierre Leprince** de m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir permis d'accomplir cette thèse de doctorat et de m'avoir permis de m'exprimer sur ce sujet de recherche. Ses conseils judicieux et les éléments de réflexion qu'il a apportés tout au long de la réalisation de ce projet (de sa conception initiale jusqu'à la rédaction de ce manuscrit) ont permis à ce travail de mûrir convenablement. Je tenais à le remercier pour son soutien, de m'avoir fait confiance et de m'avoir guidé durant ces années.*

*La réalisation de ce travail aurait été plus laborieuse sans l'aide et l'assistance technique de **Sabrina Labruzzo**. Au-delà de son aide pour l'aboutissement de ce projet, son soutien, sa sincérité, sa bonne humeur et son sourire ont été les initiateurs d'une amitié franche et sincère.*

*Un tout grand merci au **Dr. Pascal De Tullio** pour son aide dans la conception expérimentale et la réalisation de toute la partie RMN de ce travail. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour le temps et l'énergie dépensés pour ce projet. J'ai beaucoup apprécié passer du temps dans son laboratoire rempli de bonne humeur et de sympathie. Un merci spécial à Deniz pour sa gentillesse et ses encouragements.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers le **Dr. Marie-Pierre Junier** pour nous avoir fourni si gentiment les cellules à l'origine de ce projet. Je la remercie également pour son intérêt pour notre projet et sa grande implication dans la lecture et la correction du manuscrit de l'article principal de notre étude.*

*Je remercie également le **Dr. Emmanuel Hermans** de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire pour réaliser les mesures de l'activité enzymatique de la glutamine synthétase et d'avoir pris le temps de lire et de commenter le manuscrit de l'article principal de ce*

travail. Je tiens aussi à remercier deux membres de son équipe, **Guilhem Calas** et **Nathalie Desmet**, pour leur aide technique, leurs conseils et surtout leur gentillesse et leur accueil chaleureux.

Un Merci spécial pour **Stéphanie** et **Aneta** qui ont été des collègues de bureau admirables et des amies sincères. Leur bonne humeur, sympathie et enthousiasme créaient une ambiance de travail agréable et chaleureuse.

Alice et **Christelle**, seulement une année de cohabitation mais quelle ANNEE. Vous avez été là lors du rush final et vous avez su rendre appréciables les tâches les plus ennuyeuses. Avec vous, annoter quelques milliers de tubes et les remplir ont été une vraie partie de plaisir (ou presque). Merci pour votre aide et votre bonne humeur.

Un tout grand merci à **Patricia Ernst** (Reine incontestée de la culture cellulaire et de la microdissection) et à **Pierre-Bernard Van Lerberghe** (son digne successeur) pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce projet.

Conscient de ne pas pouvoir les citer nominativement, je souhaite adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous les membres, passés et présents, du GIGA-Neuroscience (PI, techniciens, personnels administratifs, étudiants, stagiaires...) pour leur accueil, leur gentillesse et pour leur dynamisme. Un grand merci à tous.

Je remercie bien évidemment mes parents et toute ma famille (ma tante, mes frères et sœurs : Ahmed, Amine, Fatima et Nabila) pour leur soutien moral et leurs sentiments d'affections et d'amour qui représentent la locomotive de mes efforts. Vos bénédictions et vos prières m'ont toujours accompagnées dans mon parcours et ont constamment illuminées ma voie. J'adresse également mes plus sincères et mes plus chaleureux remerciements à Omi-Lhaja, Tata, Laila, Loubna et Nour-Eddine pour leur soutien infailible et leurs encouragements permanents.

Enfin, je dédie ce travail à mon épouse qui a toujours su trouver les mots pour m'encourager dans les moments difficiles de cette aventure. Sans ton soutien et ta présence, cette aventure n'aurait pas eu le même goût. Simplement et du fond du cœur Merci pour ton Amour et ta présence à mes côtés, Merci de croire en moi et de me pousser à donner le meilleur de moi-même tant sur le plan personnel que sur le plan professionnel. Merci à toi d'exister.

Il m'est impossible de clore cette partie sans faire un clin d'œil à mes deux petits princes, Louay et Firas, qui chacun à sa manière ont encourager leur papa. Bisous à vous deux.

Un grand Merci à tous pour votre contribution dans l'aboutissement de ce travail.

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| ABSTRACT | |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 1 |
| 1. LES CELLULES GLIALES : | 2 |
| 1.1. La microglie : | 2 |
| 1.2. La macroglie : | 2 |
| 1.2.1. Les oligodendrocytes : | 2 |
| 1.2.2. Les astrocytes : | 3 |
| a. Les astrocytes jouent un rôle dans le développement du SNC : | 4 |
| b. Les astrocytes interviennent dans l'homéostasie cérébrale : | 4 |
| c. Les astrocytes contribuent au métabolisme énergétique du SNC : | 4 |
| d. Les astrocytes luttent contre le stress oxydatif dans le cerveau : | 5 |
| e. Les astrocytes modulent l'activité synaptique : | 6 |
| f. Les astrocytes participent à la formation de la barrière hématoencéphalique (BHE) : | 6 |
| g. Les astrocytes et leurs rôles émergents : | 6 |
| 1.2.3. Les maladies astrocytaires : | 7 |
| 2. LES TUMEURS CÉRÉBRALES : | 8 |
| 2.1. Généralités : | 8 |
| 2.2. Les Gliomes : | 8 |
| 2.3. Origine cellulaire des gliomes : | 9 |
| 2.4. Les Cellules Souches Cancéreuses (CSCs) : | 12 |
| 3. LE MODÈLE CELLULAIRE DE LA TRANSFORMATION CANCÉREUSE DES ASTROCYTES MURINS : | 13 |
| 3.1. La première étape : La différenciation des astrocytes normaux en cellules progénitrices/cellules souches : | 14 |
| 3.2. La deuxième étape : La transformation cancéreuse des astrocytes traités au TGF α : | 16 |
| 4. LES ADAPTATIONS BIOLOGIQUES DES CELLULES CANCÉREUSES : LA REPROGRAMMATION MÉTABOLIQUE..... | 19 |
| 4.1. Généralités : | 19 |
| 4.2. Effet Warburg et augmentation de la capacité glycolytique : | 21 |
| 4.3. Diversification des sources de carbones : | 23 |
| 4.3.1. Le lactate comme carburant pour un métabolisme cancéreux efficace : | 23 |
| 4.3.2. La glutaminolyse, un élément crucial de reprogrammation métabolique : | 24 |
| 4.4. Modulation de l'expression de la lactate déshydrogénase : | 25 |
| 4.5. Induction de la voie des pentoses phosphate : | 26 |
| 4.5.1. PPP et prolifération : | 27 |
| 4.5.2. PPP et apoptose : | 28 |
| 4.5.3. PPP et invasion tumorale : | 28 |
| 4.5.4. PPP et résistance aux médicaments : | 29 |
| 4.6. Adaptation du métabolisme lié au stress oxydatif : | 30 |
| 5. OBJECTIFS DE LA THÈSE ET APPROCHES : | 32 |
| 5.1. Approche protéomique : | 34 |
| 5.2. Approche métabolomique : | 35 |
| APPROCHES PROTÉOMIQUES ET MÉTABOLISME CANCÉREUX | 37 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. LA 2D-DIGE, UN OUTIL POUR ÉTUDIER LES CELLULES DE LA LIGNÉE ASTROGLIALE : | 39 |
| 2. LA 2D-DIGE ET LE MÉTABOLISME ASTROCYTAIRE : | 40 |
| 3. LA 2D-DIGE, UN OUTIL DE CHOIX POUR ANALYSER LES GLIOMES : | 41 |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES | 43 |
| 1. CULTURE CELLULAIRE : | 44 |
| 1.1. Les astrocytes normaux : | 44 |
| 1.2. Les astrocytes transformés : | 44 |
| 2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS : | 45 |
| 2.1. Composition du tampon de lyse : | 45 |
| 2.2. Extraction protéique pour la 2D-DIGE : | 45 |
| 3. ANALYSE PROTÉOMIQUE : | 45 |
| 3.1. Préparation des tampons et solutions : | 46 |
| 3.1.1. Tampon de réhydratation : | 46 |
| 3.1.2. Tampon d'équilibration : | 46 |
| 3.2. Marquage protéique aux CyDyes et électrophorèse bidimensionnelle : | 47 |
| 3.3. Analyse des images : | 48 |
| 3.4. Spectrométrie de masse : | 48 |
| 4. WESTERN BLOT (WB) : | 50 |
| 5. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PYRUVATE KINASE : | 52 |
| 6. SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUES DES ISOENZYMES DE LA LDH (ZYMOGRAPHIE) : | 53 |
| 7. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA GLUTAMINE SYNTHÉTASE (GS) : | 53 |
| 8. CONSOMMATION D'OXYGÈNE : | 54 |
| 9. ANALYSE MÉTABOLOMIQUE PAR RMN : | 54 |
| 9.1. Analyse des métabolites présents dans le milieu de culture : | 55 |
| 9.2. Analyse des métabolites intracellulaires : | 55 |
| RÉSULTATS..... | 57 |
| 1. ANALYSE PROTÉOMIQUE COMPARATIVE DES NA ET DES TA : | 58 |
| 2. LA TRANSFORMATION CANCÉREUSE DES ASTROCYTES EST ACCOMPAGNÉE PAR L'AUGMENTATION DE LEUR CAPACITÉ GLYCOLYTIQUE : | 66 |
| 3. CONSÉQUENCES MÉTABOLIQUES DE LA SUREXPRESSION DE PKM 2 DANS LES TA : | 69 |
| 4. MODULATION DES ENZYMES DU CYCLE DE KREBS : | 73 |
| 5. LA TRANSFORMATION CANCÉREUSE DES ASTROCYTES AFFECTE LE MÉTABOLISME DU GLUTAMATE ET DE LA GLUTAMINE : | 74 |
| 6. LES RÉACTIONS ANABOLIQUES ET ANAPLÉROTiques DU CYCLE DE KREBS ET MÉTABOLISME DU GLYCOGÈNE : | 78 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7. LA TRANSFORMATION CANCÉREUSE DES ASTROCYTES AFFECTE LE MÉTABOLISME DES ERO ET LES PROTÉINES LIÉES AU STRESS : | 79 |
| LA 2D-DIGE, UN OUTIL PUISSANT POUR UNE ANALYSE PROTÉOMIQUE COMPARATIVE | 83 |
| <i>INTRODUCTION</i> : | 84 |
| <i>ILLUSTRATIONS DE PUISSANCE ANALYTIQUE DE LA 2D-DIGE</i> : | 84 |
| DIVERSIFICATION DES SOURCES DE CARBONE CHEZ LES ASTROCYTES TRANSFORMÉS : ANALYSE PAR RMN CARBONE | 100 |
| DISCUSSION | 106 |
| PERSPECTIVES | 118 |
| BIBLIOGRAPHIE | 122 |
| BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE | 135 |
| | |
| ANNEXE 1 : BENTAIB et al. 2014, Metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: A proteomic study. J Proteomics. 2014 Oct 23;113C:292-314. | |
| | |
| ANNEXE 2 : BENTAIB et al. 2014, Data in support of metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: A proteomic study. Data in Brief, Volume 2, March 2015, Pages 1–5. | |
| | |
| ANNEXE 3 : SHAFIEI et al. 2014, The role of protein modifications in senescence of freeze-dried Acetobacter senegalensis during storage. Microb Cell Fact. 2014 Feb 19;13(1):26. | |

ABSTRACT

Metabolic reprogramming is one of the main characteristics of cancer cells that adapt their energy metabolism to promote cell survival and tumor proliferation. This reprogramming includes all metabolic, enzymatic, proteic or genetic adaptations, allowing cancer cells to create a favorable microenvironment for their survival and growth. In fact, cancer cells display an aberrant metabolic behavior generating ATP through an inefficient glycolysis pathway even in the presence of adequate oxygen supply. Recent works have shown that the genetic alterations that contribute to cancer development affect a number of oncogenic signaling pathways driving several tumor metabolic modifications that are essential for malignancy. Those changes in metabolic pathways allow cancer cells to facilitate their uptake and release of nutrients that can be transformed into building blocks for nucleotide, protein and lipid synthesis necessary for macromolecule assembly and tumor growth.

We exploited the analytical potential of the 2D-DIGE (two-dimensional differential in-gel electrophoresis) quantitative proteomic analysis to characterize the proteomes of mouse astrocytes that underwent *in vitro* cancerous transformation, and of their normal counterparts. We aimed to identify and characterize the protein signature of those *in vitro* transformed cells in an attempt to understand their neoplastic behavior and the effect of transformation on metabolic processes.

Metabolic reprogramming effects on enzymatic and structural protein expression as well as associated metabolites abundance were quantified. A total of 143 unique proteins were found to be affected by this transformation process. Using enzymatic activity measurements and zymography, we documented and confirmed several changes in abundance and activity of various isoenzymes likely to participate in metabolic reprogramming. We found that after transformation, the cells increase their expression of glycolytic enzymes, thus acquiring the ability to use aerobic glycolysis (Warburg effect). An increased capacity to dispose of reducing equivalents through lactate production was also documented. Major effects on carbohydrates, amino acids and nucleotides metabolic components were also observed. Conversely, the transformed cells reduced their capacity for tricarboxylic acid oxidation, for neurotransmitters (glutamate and GABA) metabolism and their expression of astroglial markers.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D : Electrophorèse bidimensionnelle
2D-DIGE : Two-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis
ACN : Acétonitrile
Aldo A : Fructose-bisphosphate aldolase A
ALS : Amyotrophic Lateral Sclerosis (La sclérose latérale amyotrophique)
ApoE : Apolipoprotéine E
BHE : Barrière hématoencéphalique
BLBP : Brain Lipid-Binding Protein
BO : Bulbe Olfactif
BVA : Biological Variation Analysis
CS : Cellule Souche
CSC : Cellule Souche Cancéreuse
CSN : Cellule Souche Neurale
DHE 3 : Glutamate déshydrogénase
DIA : Differential In-gel Analysis
EDA : Extended Data Analysis
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
Eno A : Alpha émolase
ERO : (=ROS)Reactive Oxygen Species (Espèces Réactives de l'Oxygène)
G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAPDH : Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GD : Gyrus Denté
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GLAST : Glutamate/Aspartate Transporter
GLT-1 : Glutamate Transporter-1
GRP 78 : 78 kDa glucose-regulated-protein
GS : Glutamine synthétase
GSTs : Glutathion S-Transférase
H : Heart
HCCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HK : Hexokinase
HSQC : Heteronuclear Single quantum coherence spectroscopy.
IDH 2 : Isocitrate déshydrogénase mitochondriale
KHL : Keyhole limpet hemocyanin
LDH : Lactate Déshydrogénase
M : Muscle

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation
MBP : Myelin Basic Protein
MDH : Malate déshydrogénase
MDH C : Malate déshydrogénase cytoplasmique
MDH M : Malate déshydrogénase mitochondriale
NA : Normal astrocytes (astrocytes normaux)
NHA : Normal humain astrocytes
OPCs : Oligodendrocytes precursor cells
PBS : Phosphate-buffered saline
PC : Pyruvate carboxylase
PDH : Pyruvate Déshydrogénase
PEP : Phosphoénolpyruvate
PET : Positron Emission Tomography
PFK : Phosphofructokinase
PK : Pyruvate kinase
PKM 1 : Pyruvate kinase de type M1
PKM 2 : Pyruvate kinase de type M2
PLP : Protéolipide Protéine
PPP : Pentose Phosphate Pathway (voie des pentoses phosphates)
PRDXs : Peroxyrédoxines
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SDR : Sensor Dish Reader
SNC : Système Nerveux Central
SOD : Superoxyde dismutase
STAT 3 : Signal Transducers and Activators of Transcription 3
SVF : Sérum de veau foetal
SVZ : Subventricular Zone
TA : Transformed astrocytes (astrocytes transformés)
Taldo : Transaldolase
TBS : Tris buffered saline
TBST : Tris buffered saline with Tween 20
TFA : Acide trifluoroacétique
TGF α : Tumor Growth Factor Alpha
TK : Transkétolase
TMSP : Sodium 3-trimethylsilyl-propionate-2,2,3,3-d4
TOF : Time-Of-Flight
TPI : Triose Phosphate Isomérase
WB : Western blot

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. LES CELLULES GLIALES :

Il existe deux catégories cellulaires principales dans le système nerveux : les cellules nerveuses (neurones) et les cellules gliales (glie). Cette dernière catégorie représente la composante la plus abondante du système nerveux central (SNC). On a longtemps considéré que le rôle de ces cellules non neuronales se limitait à des fonctions de soutien, d'apport nutritifs et de maintien de l'homéostasie du système nerveux [1]. Cependant, des études récentes indiquent que les cellules gliales jouent des rôles plus actifs et plus essentiels dans le développement et le fonctionnement du cerveau [2-7]. De plus, de nombreux travaux indiquent que les cellules souches à l'origine des nouveaux neurones chez l'embryon et l'animal adulte possèdent des caractéristiques de cellules gliales (pour revues [8, 9]).

Dans le SNC, les cellules gliales peuvent être subdivisées en deux grandes familles cellulaires : la microglie et la macroglie.

1.1. La microglie :

Les cellules microgliales peuvent être considérées comme les macrophages du SNC, elles représentent 5 à 20 % des cellules gliales. La microglie joue un rôle primordial dans le développement des réactions inflammatoires cérébrales et sont capables de phagocytose [10]. Classiquement considérées comme quiescentes dans le cerveau sain, le taux de prolifération des cellules microgliales augmente de façon significative lors de diverses lésions cérébrales [11].

1.2. La macroglie :

Les différentes cellules macrogliales se distinguent à la fois en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et de l'expression d'un certain nombre de marqueurs. Les principaux types de macroglie sont les oligodendrocytes et les astrocytes (pour revue [12]).

1.2.1. Les oligodendrocytes :

Les oligodendrocytes sont de petites cellules gliales dotées de prolongements étendus. Les oligodendrocytes présents dans la substance blanche expriment une grande variété de marqueurs spécifiques tels que la protéine basique de la myéline (MBP pour Myelin Basic Protein) et la protéolipide protéine (PLP). Ces cellules forment les gaines de myéline qui entourent leurs enroulements autour des axones du SNC.

Outre leurs fonctions de support et de myélinisation axonal [13], certaines sous-catégories d'oligodendrocytes (les oligodendrocytes glycolytiques) jouent un rôle dans le soutien du métabolisme énergétique des axones [14-16].

Sur le plan pathologique, les oligodendrocytes sont associés à plusieurs maladies dont la plus fréquente est la sclérose en plaques. Les oligodendrocytes sont également impliqués dans certains gliomes. De manière générale, les gliomes n'expriment pas les marqueurs des oligodendrocytes matures comme la MBP ou la PLP [17]. Cependant les oligodendrogliomes expriment souvent des marqueurs spécifiques de cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs pour Oligodendrocytes precursor cells) comme Olig2 et NG 2 [18-21].

1.2.2. Les astrocytes :

Les astrocytes sont des cellules gliales spécialisées qui tirent leur nom de leur forme étoilée. En termes de nombre les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes. Ils possèdent de nombreux prolongements qui entrent en contact aussi bien avec les neurones qu'avec les cellules épendymaires (une sous-population de cellules gliales), les enveloppes méningées, les capillaires sanguins ou encore les synapses. Ces points de contact directs avec plusieurs éléments neuronaux permettent aux astrocytes de jouer plusieurs rôles majeurs dans le SNC (échanges nutritifs, évacuations des déchets métaboliques, homéostasie de l'environnement synaptique...) [22].

Par ailleurs, les astrocytes sont capables de s'activer (devenir réactifs) en réponse à certaines pathologies du SNC comme les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes, lors de certaines maladies neurodégénératives ou encore en réponse au développement et à la croissance d'une tumeur [23]. De fait, cette réactivité peut être considérée comme étant un indicateur pathologique de certaines lésions du SNC. Les astrocytes réactifs participent, entre autres, à la formation de cicatrices gliales et à la régulation de l'inflammation du SNC [24]. Ils participent également au fonctionnement et à la survie neuronale en libérant des facteurs neurotrophiques [25] et antioxydants [26].

Sur le plan moléculaire, la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP pour Glial Fibrillary Acidic Protein) est communément utilisée comme marqueur astrocytaire [27, 28] malgré qu'elle soit moins exprimée dans certaines sous-populations d'astrocytes, en particulier chez les rongeurs. D'autres marqueurs (moins spécifiques que la GFAP) peuvent être utilisés dans la caractérisation moléculaires des astrocytes, il s'agit principalement de la glutamine

synthétase (GS) [29], la pyruvate carboxylase (PC) [30], la protéine S100B [31] ou encore des transporteurs de glutamate comme GLAST (Glutamate/Aspartate Transporter) et GLT-1 (Glutamate Transporter-1) [32, 33].

Sur le plan fonctionnel, les astrocytes participent à plusieurs processus biologiques au niveau du SNC et sont capables de soutenir un nombre important de fonctions neuronales [22].

a. Les astrocytes jouent un rôle dans le développement du SNC :

Dans de nombreuses régions du SNC, la génération des astrocytes, au cours du développement, se produit après la production initiale des neurones. Néanmoins, les astrocytes exercent plusieurs fonctions durant le développement de la substance blanche et de la matière grise. Ainsi, les frontières moléculaires formées par les astrocytes participent à guider la migration des axones en développement et certains neuroblastes [34].

b. Les astrocytes interviennent dans l'homéostasie cérébrale :

L'une des fonctions astrocytaires les mieux établies est la modulation/régulation de l'homéostasie cérébrale. Cette homéostasie implique notamment de nombreux processus métaboliques que les astrocytes assurent en coopération avec les neurones, tels que la fourniture de métabolites énergétiques et des fonctions de recyclage de neurotransmetteurs (Glutamate, GABA, Glycine...) [5, 35, 36]. Les astrocytes régulent également la concentration extracellulaire de plusieurs ions tels que les ions K^+ , Na^+ , Cl^- [37] ou encore les ions H^+ et HCO_3^- qui interviennent dans le maintien du pH [38].

c. Les astrocytes contribuent au métabolisme énergétique du SNC :

De nombreux travaux indiquent que les astrocytes contribuent largement au métabolisme du SNC. En effet, grâce à leurs prolongements qui contactent à la fois les vaisseaux sanguins, les neurones, les synapses, les axones... les astrocytes sont bien positionnés pour absorber le glucose à partir de vaisseaux sanguins afin de fournir les différents éléments neuronaux en métabolites énergétiques.

Par ailleurs, les astrocytes sont considérés comme un site de stockage du glycogène (pour revue sur le métabolisme du glycogène dans les astrocytes [39]). L'utilisation de ce

glycogène astrocytaire soutient l'activité neuronale durant les périodes de haute activité neuronale ou en cas d'hypoglycémie [40, 41]. De plus, les astrocytes sont capables de réagir à l'activation glutamatergique ou à l'augmentation de la concentration extracellulaire des ions K^+ [42, 43] en augmentant leur taux d'utilisation du glucose et en libérant du lactate dans l'espace extracellulaire. Ce lactate sera utilisé par les neurones pour soutenir leurs besoins énergétiques [44, 45].

d. Les astrocytes luttent contre le stress oxydatif dans le cerveau :

L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau du cerveau peut conduire à des effets délétères majeurs au niveau du SNC (oxydation de l'ADN, formation de bases anormales, peroxydation des lipides, nitrosylation et carbamylation des protéines...) et provoquer une dégénérescence cellulaire [46, 47].

En effet, le SNC est intrinsèquement sensible au stress oxydatif. Cette sensibilité est principalement causée par :

- i. Un métabolisme oxydatif très actif, ce qui conduit à un taux relativement élevé des ERO dans le SNC.
- ii. Une faible activité de certaines enzymes clés de la lutte contre le stress oxydatif dans les oligodendrocytes, les neurones et les cellules endothéliales [48-50].
- iii. Une abondance relativement importante des acides gras polyinsaturés facilement oxydable [51].

Pour lutter contre ce stress oxydatif, les astrocytes sont dotées d'un important arsenal enzymatique qui leur procure un grand pouvoir détoxifiant. En effet les astrocytes possèdent plusieurs enzymes à potentiel antioxydant comme les Glutathion S-Transférases (GSTs) [52, 53], les peroxyrédoxines (PRDXs) [54], ou encore la catalase [55] et la superoxyde dismutase (SOD) [56]. La résistance des astrocytes au stress oxydatif passe aussi par l'expression et la production de molécules ayant un potentiel antioxydant comme le glutathion ou par l'exploitation du potentiel antioxydant de certaines molécules comme l'ascorbate. En plus, les astrocytes alimentent les neurones avec du glutathion réduit et participent à la détoxification des ERO extracellulaires, ce qui favorise la survie neuronale [57].

e. Les astrocytes modulent l'activité synaptique :

Plusieurs observations indiquent que les astrocytes jouent un rôle direct dans la transmission synaptique [58]. En effet, les astrocytes sont capables de détecter les neurotransmetteurs libérés au cours d'une intense activité neuronale [59-61] et réagir en modulant l'activité synaptique [59, 61-66] via la libération de substances neuroactives appelées gliotransmetteurs comme le glutamate, les purines (ATP et adénosine), le GABA et la D-sérine [67, 68]. La régulation des synapses par les astrocytes est principalement basée sur des processus dépendants de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} et qui résultent de l'activation de récepteurs tels que les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) [59, 69-72]. Ces observations sont à la base du concept de «synapse tripartite » qui propose que les cellules gliales sont des composants fonctionnels de synapses [73]. En plus de leur rôle dans le fonctionnement des synapses, les astrocytes participent également à la mise en place des synapses au cours du développement et favorisent leur maintien [74]. Ce contrôle de la synaptogénèse passe par la production par les astrocytes de molécules telles que le cholestérol associé à l'apolipoprotéine E (ApoE) [75] et la thrombospondine [76].

f. Les astrocytes participent à la formation de la barrière hématoencéphalique (BHE) :

La BHE est une barrière de diffusion qui empêche l'afflux dans le parenchyme cérébral de nombreuses molécules sur la base notamment de leur polarité, et de leur taille [77, 78]. La BHE est principalement constituée de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, d'une membrane basale et de pieds astrocytaires. De nombreux travaux indiquent que les astrocytes sont responsables de la formation des jonctions serrées qui contrôlent certains aspects de la perméabilité de la BHE [79].

g. Les astrocytes et leurs rôles émergents :

De manière intéressante, des travaux récents ont mis en évidence de nouveaux rôles joués par les astrocytes. Ainsi les astrocytes seraient impliqués dans la modulation de l'homéostasie du sommeil [80], dans la consolidation de la mémoire [81] et dans la régulation de la respiration [82].

1.2.3. Les maladies astrocytaires :

Bien que leur fonctionnement et leur contribution à certains processus pathologiques au niveau du SNC restent encore mal connus, les astrocytes/astrocytes réactifs peuvent être considérés comme des éléments centraux de plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, les changements de fonction/état astrocytaires peuvent avoir des effets majeurs sur la survie neuronale. En plus, les astrocytes/astrocytes réactifs accompagnent plusieurs processus pathologiques et peuvent ainsi constituer des biomarqueurs potentiels pour suivre l'évolution de ces maladies.

Parmi ces maladies, on peut citer la maladie d'Alexander [83, 84], l'encéphalopathie hépatique [85], la maladie d'Alzheimer [86, 87] ou encore la sclérose latérale amyotrophique (ALS pour Amyotrophic Lateral Sclerosis) [88, 89]. Les astrocytes sont également impliqués dans certains troubles métaboliques comme l'Aceruloplasminémie (trouble du métabolisme du fer) [90] ou la maladie de Niemann-Pick de type C (altération du métabolisme des lipides) [91].

Par ailleurs, les astrocytes jouent un rôle majeur dans l'évolution de nombreuses tumeurs primaires du cerveau (Gliomes) et dans leur progression métastatique. En effet, les cellules cancéreuses dans certains gliomes (Astrocytomes/Astroglïomes) montrent des similarités morphologiques avec les astrocytes/astrocytes réactifs et expriment des marqueurs de lignage astrocytaire comme la GFAP, l'Apolipoprotéine E (ApoE) ou encore la protéine YKL-40 [18]. De plus, certaines propriétés des astroglïomes semblent liées à des fonctions astrocytaires. Par exemple, la production de glutamate par certains gliomes leur permet d'augmenter leurs capacités de croissance [92]. De la même manière, un renforcement de l'activité de signalisation liée à STAT 3 (pour Signal Transducers and Activators of Transcription 3) a été constaté dans certains cas d'astroglïomes, ce renforcement permet de réduire l'inflammation et la surveillance immunitaire et d'augmenter la prolifération cellulaire [93]. Ces effets sont en lien direct avec les fonctions de STAT 3 et sa signalisation dans les astrocytes normaux [94].

Sur le plan thérapeutique, plusieurs nouvelles stratégies basées sur la stimulation de certaines fonctions astrocytaires et sur le renforcement de leur capacité à produire des facteurs/molécules bénéfiques pour le fonctionnement du SNC sont en développement pour lutter contre certaines pathologies. Par exemple, certaines stratégies visent à améliorer le

transport du glutamate à l'aide d'antibiotiques ce qui permet de réduire l'excitotoxicité neuronale et d'augmenter la neuroprotection dans des modèles d'ALS [95]. D'autres stratégies, plus innovantes, sont basées sur la greffe de cellules souches ou cellules progénitrices qui donneront naissance à des astrocytes matures sains afin de compenser la déficience astrocytaire dans certaines pathologies [96]. Une autre stratégie de transplantation emploie la greffe d'astrocytes génétiquement modifiés pour produire des molécules spécifiques (facteurs de croissance) dans des endroits spécifiques du SNC agissant ainsi comme des pompes thérapeutiques [97, 98].

2. LES TUMEURS CÉRÉBRALES :

2.1. Généralités :

Les tumeurs cérébrales regroupent l'ensemble des tumeurs, bénignes ou malignes, qui se développent dans le parenchyme cérébral. Ces tumeurs résultent d'un développement anormal et anarchique soit d'un type cellulaire du cerveau lui-même (tumeurs cérébrales primitives), soit d'une cellule métastatique exportée d'un cancer situé dans une autre partie du corps (tumeurs cérébrales métastatiques). Ces dernières sont les plus fréquentes chez l'adulte et dérivent le plus souvent des carcinomes diffusant des lésions cancéreuses pulmonaires, mammaires ou encore rénales.

Les gliomes représentent la forme la plus fréquente des tumeurs cérébrales primitives. Ils semblent être en augmentation régulière depuis les années 1980, pour des raisons probablement environnementales, encore mal cernées.

2.2. Les Gliomes :

Les gliomes font partie des tumeurs cérébrales les plus commune chez l'adulte (pour revue [99]). Sur le plan histologique, les gliomes sont considérés comme étant des tumeurs primitives très hétérogènes (hétérogénéité inter- et intra-tumorale). En effet, les gliomes se caractérisent par une forte variabilité de la morphologie cellulaire et de l'architecture tissulaire. L'hétérogénéité intratumorale des gliomes se manifeste principalement par la coexistence, au sein de la même tumeur, de cellules qui présentent des profils d'expression de gènes radicalement différents entre les différentes populations cellulaires qui constituent la tumeur [100]. Le pronostic de survie lié à ses tumeurs cérébrales reste encore limité.

Ils peuvent être classifiés soit en fonction de leurs caractéristiques histologiques [101] soit en fonction du profil d'expression génétique [102] ou encore en fonction de leur localisation [103].

Sur le plan histologique, les gliomes peuvent être classifiés en fonction de leurs similarités avec les cellules de la lignée gliale. On distingue ainsi les astrocytomes (gliomes présentant des similarités morphologiques avec les astrocytes/astrocytes réactifs et qui expriment des marqueurs astrocytaires comme la GFAP, la protéine YKL ou l'ApoE [18]) et les oligodendrocytomes (gliomes montrant des ressemblances avec les oligodendrocytes et les OPCs et qui expriment des marqueurs d'OPCs tel que Olig2 et NG 2 [19, 20]). On distingue également des gliomes mixtes qui expriment à la fois des composantes astrocytaires et oligodendrocytaires.

L'analyse du profil génétique des gliomes permet de les subdiviser en quatre sous-types : les gliomes classiques, les gliomes mésenchymateux, les gliomes proneuraux et les gliomes neuraux [102, 104].

En termes de localisation, on distingue les gliomes isolés dans le parenchyme cérébral, les gliomes en contact avec les ventricules cérébraux, les gliomes en contact avec le cortex et les gliomes en contact avec les ventricules et le cortex [103].

2.3. Origine cellulaire des gliomes :

Avant d'aborder la question de l'origine cellulaire des gliomes, il est important d'introduire quelques notions sur les cellules souches neurales (CSNs).

Le terme de « cellule souche » (CS) désigne une cellule indifférenciée capable d'engendrer des cellules spécialisées en se différenciant (multipotence), de se multiplier à l'identique (auto-renouveaulement) et de proliférer en culture (prolifération).

In vitro, ces capacités de CS se traduisent pour les CSNs par :

- ✓ Une capacité à produire une neurosphère clonale en réponse à certains facteurs de croissance [105-107] : **Prolifération**
- ✓ Une capacité à se différencier en différents types cellulaires neurales (neurones, astrocytes, oligodendrocytes...) [108, 109] : **Multipotence**

- ✓ Une capacité à produire des colonies secondaires à partir de cellules issues d'une neurosphère dissociée [107] : **Auto-renouveau**

Si l'une de ces trois capacités n'est pas remplie on parle alors de progéniteur (pour une cellule qui présente au moins une de ces capacités) ou de précurseur (s'il s'agit de cellules à potentialité restreinte) [110].

Au cours du développement du cerveau des mammifères, trois phases principales de prolifération en rapport avec la neurogénèse se succèdent afin d'établir la population cellulaire du cerveau. Au cours de ces étapes, les CSNs vont se multiplier et se différencier afin de donner naissance à différentes cellules spécialisées du SNC (neurones et cellules gliales).

La première étape est la phase d'amplification au cours de laquelle les CSNs vont se multiplier de manière symétrique afin d'accroître leur nombre.

La seconde étape est la phase neurogénique. Contrairement à la phase d'amplification, celle-ci est caractérisée par des divisions asymétriques des CSNs ce qui va permettre de générer des progéniteurs/précurseurs neuraux tout en maintenant le pool de CSNs intact (Chaque CSN se divise en une CSN fille et une cellule progénitrice qui a une capacité de prolifération limitée). Ces progéniteurs/précurseurs effectueront un nombre limité de divisions avant leur différenciation finale qui est déjà orientée vers un type cellulaire précis.

La dernière étape est la neurogénèse postnatale, elle se déroule dans les régions neurogènes du cerveau adulte, à savoir la couche sous-granulaire du gyrus denté (GD) de l'hippocampe, la zone sous-ventriculaire (SVZ pour Subventricular Zone) des ventricules latéraux et le bulbe olfactif (BO).

Bien que plusieurs observations cliniques prouvent l'existence d'une relation entre le développement des gliomes et la SVZ [111, 112] contenant des CSNs adultes, l'origine cellulaire des gliomes reste toujours un sujet de débat et on ne sait toujours pas si ces tumeurs se développent à partir de cellules gliales matures, de cellules souches neurales adultes, de progéniteurs gliaux ou encore de cellules gliales matures dédifférenciées [113, 114].

Les théories classiques supposent que les gliomes seraient issus de cellules gliales différenciées [115]. Ces théories sont supportées par les similitudes morphologiques et

immunohistologiques entre les cellules des gliomes et les cellules macrogliales du SNC et suggèrent que les cellules des gliomes dériveraient directement des astrocytes et des oligodendrocytes.

À l'inverse, des hypothèses plus récentes supportent que les gliomes seraient issus de cellules indifférenciées [116]. Ces hypothèses sont confortées par la nature hétérogène de certains gliomes comme les oligoastrocytomes qui affichent à la fois des composantes astrocytaires et oligodendrocytaires suggérant ainsi qu'une cellule progénitrice commune, capable de se différencier en ces deux types cellulaires [117], serait à l'origine de ce type de gliomes. Selon cette hypothèse, les CSNs semblent être de bons candidats pour expliquer l'origine cellulaire des gliomes [111, 112].

Par ailleurs, l'expression forcée d'oncogène, via un système rétroviral, entraîne la formation de gliomes dans divers modèles murins. Cette induction expérimentale de gliomes s'observe avec des CSNs, des progéniteurs gliaux ou des cellules gliales matures telles que les astrocytes, avec cependant une meilleure efficacité pour les CSNs et les progéniteurs gliaux [118-121]. Ces observations permettent de rapprocher les deux hypothèses décrites plus haut qui tentent d'expliquer l'origine cellulaire des gliomes.

Outre ces deux hypothèses, il faut tenir compte de la possible dédifférenciation de cellules matures (comme les astrocytes) ou l'acquisition d'une plus large multipotentialité (comme pour les OPCs) dans la formulation des hypothèses qui tentent d'expliquer l'origine cellulaire des gliomes. D'une manière très intéressante, plusieurs études ont démontrés que sous l'influence de certains facteurs de croissance, les astrocytes normaux peuvent subir une réversion fonctionnelle progressive pour revenir à un état de cellules souches [122-125].

Globalement, on peut conclure que les gliomes résulteraient non seulement de troubles ou de dérèglement de la prolifération et de la survie cellulaire mais également de troubles de la différenciation de cellules matures comme c'est le cas dans d'autres cancers (Fig. 1) [126].

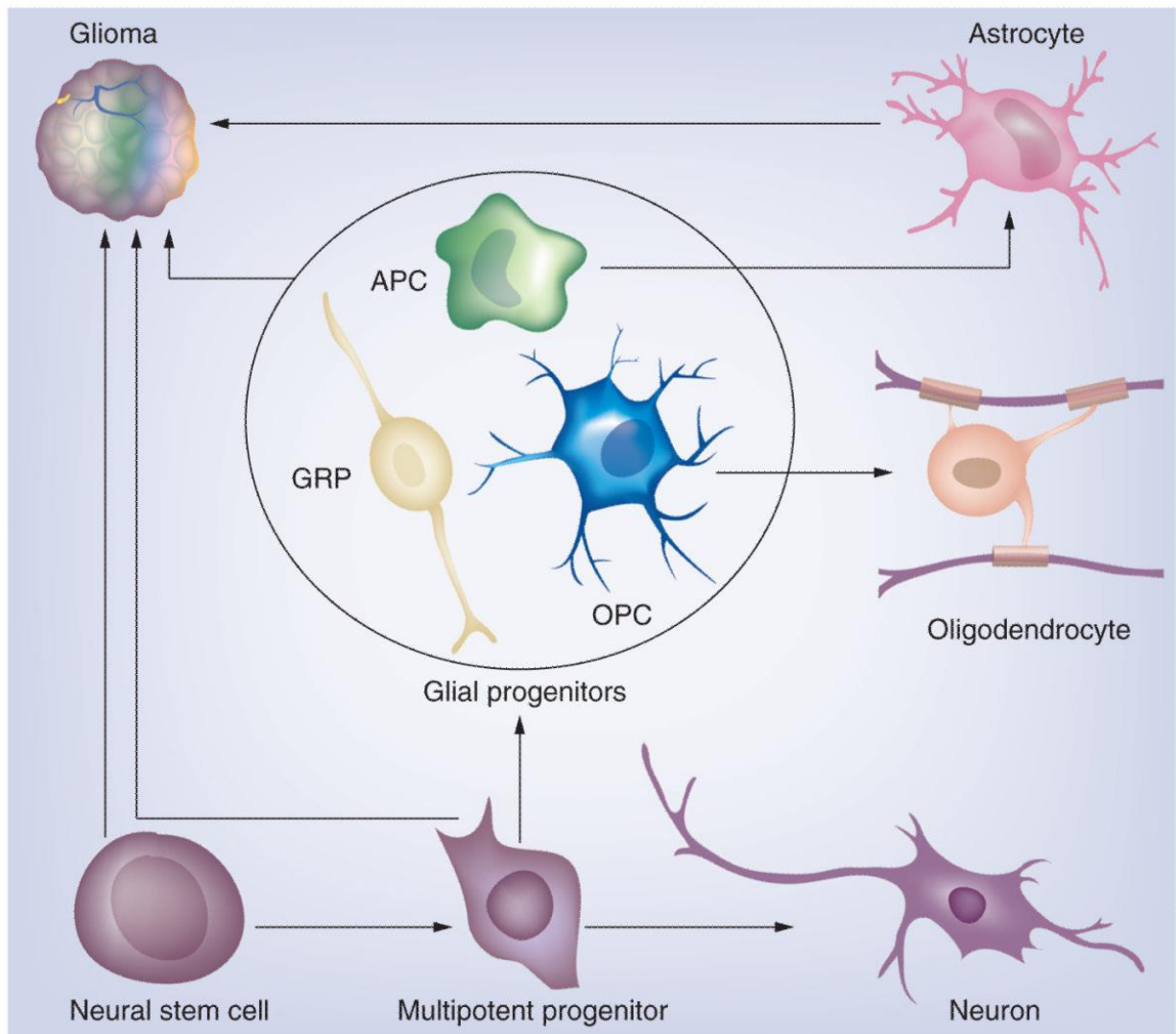


Figure 1 : Le potentiel gliomagénique des différentes lignées neurales.

Les cellules souches neurales et les progéniteurs présents dans la zone sous-ventriculaire cérébrale peuvent donner naissance à des cellules neurales et des progéniteurs gliaux. Ces progéniteurs gliaux sont capables de se différencier en astrocytes ou en oligodendrocytes.

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales hétérogènes qu'on peut subdiviser en des sous-types distincts. Zong et ses collaborateurs [127] proposent que les différents sous-types de gliomes dériveraient de cellules d'origine différente.

APC : Cellule progénitrice d'astrocytes (Astrocytes progenitor cell)

GRP : Progéniteur glial restreint (Glial-restricted progenitor)

OPC: Cellule progénitrice d'oligodendrocytes (Oligodendrocyte progenitor cell).

2.4. Les Cellules Souches Cancéreuses (CSCs) :

La notion de CSCs a été évoquée depuis de nombreuses années par différentes équipes de recherche [128-130]. Cependant, il a fallu attendre les années 2000 pour pouvoir démontrer l'existence de telles cellules dans des tumeurs cérébrales/gliales [131-133]. La notion de CSCs suppose qu'une sous-population distincte de cellules tumorales est capable de générer des tumeurs malignes, de stimuler indéfiniment leur croissance et de participer à la résistance tumorale à différentes thérapies [134].

Dans les tumeurs cérébrales, les CSCs peuvent être définies comme étant des cellules tumorales présentant plusieurs caractéristiques de CSNs normales. En effet elles sont capables d'exprimer des marqueurs de cellules souches (nestine...), de croître sous forme de neurosphères, de s'autorenouveler et se différencier en cellules tumorales exprimant des marqueurs de cellules des lignées gliale (marqueurs astrocytaires, oligodendrogliaux et neuronaux) [135]. Malgré tous les points communs qui existent entre les CSCs et les CSNs, cela n'implique pas forcément que les CSCs dérivent de la transformation tumorale de CSNs normales, car on peut concevoir que les CSCs résulteraient de la dédifférenciation de cellules matures [114].

Les CSCs présentent à la fois une variabilité inter-tumorale qui peut contribuer à une classification moléculaire des gliomes [136] et une variabilité intra-tumorale qui se reflète par la coexistence de différentes populations de CSCs au sein d'une même tumeur [137]. En plus, les CSCs ne représentent qu'une infime fraction de la tumeur ce qui rend leur isolation et caractérisation particulièrement difficiles.

L'utilisation d'un modèle cellulaire, *in vitro*, de CSCs reproduisant les caractéristiques biologique de ces cellules présenterait de nombreux avantages dont principalement le fait de pouvoir disposer d'une population cellulaire d'une homogénéité suffisante pour les analyses et les comparaisons biochimiques et le fait de disposer d'une source infinie de matériel biologique nécessaire pour ces analyses.

3. LE MODÈLE CELLULAIRE DE LA TRANSFORMATION CANCÉREUSE DES ASTROCYTES MURINS :

De plus en plus de preuves montrent que la formation des gliomes impliquerait l'instabilité du phénotype de certaines cellules matures/différenciées (comme les astrocytes), qui sous l'effet d'un certain nombre de facteurs (facteurs génétiques comme la surexpression d'oncogènes par système lentiviral [138], ou des facteurs environnementaux comme l'exposition à certains facteurs de croissance [123, 124, 139]), peuvent subir de profonds changements de leurs principales caractéristiques morphologiques et biologiques (croissance, prolifération ...). Suite à ce processus qui se traduit par leur dédifférenciation, ces cellules deviennent plus sensibles à la transformation cancéreuse.

Un modèle cellulaire de la transformation cancéreuse des astrocytes a été développé par l'équipe du Dr. M.P. Junier [140, 141]. Le plus grand avantage de ce modèle est le fait de

permettre la dédifférenciation des astrocytes en cellules progénitrices/cellules souches en modifiant une seule composante de leur environnement et sans avoir recours à une modification génétique, ce qui représente un grand intérêt pour la médecine régénérative. Les cellules progénitrices/cellules souches ainsi obtenues subiront une pression oncogénique qui achèvera leur transformation cancéreuse et qui leur permettra d'acquérir la capacité d'initier et de générer des tumeurs cérébrales lorsqu'elles sont greffées dans le cerveau de souris immunodéficientes.

Dans ce modèle de transformation cancéreuse des astrocytes normaux, deux étapes sont nécessaires pour obtenir des cellules transformées de type « CSC » à partir de cellules matures/différenciées (astrocytes normaux).

3.1. La première étape : La dédifférenciation des astrocytes normaux en cellules progénitrices/cellules souches :

Dans la plupart des gliomes, on peut constater une dérégulation de la voie de signalisation contrôlée par le facteur de transformation cancéreuse alpha (TGF α pour Tumor Growth Factor Alpha) et son récepteur erbB1 ou EGFR (pour Epidermal growth factor receptor) [142-144].

Le TGF α est un membre de la famille des facteurs de croissance épidermiques (EGF pour Epidermal growth factor), il a été identifié depuis de nombreuses années dans le SNC au sein duquel il joue plusieurs rôles importants (pour revue [145]) .

En effet, plusieurs publications pointent les astrocytes comme étant des cibles privilégiées du TGF α dans le SNC. Le TGF α agit aussi bien sur les caractéristiques mitotiques que sur les caractéristiques prolifératives [146-149] des astrocytes *in vitro*. Il induit également des altérations morphologiques des astrocytes et affecte certaines voies de biosynthèse. Une étude plus récente suggère un rôle gliatrophique du TGF α sur les astrocytes humains et murins [124]. Le TGF α est également impliqué, via son récepteur erbB1, dans l'apoptose. En effet, Wagner et ses collaborateurs ont montré que chez des souris KO pour erbB1 le taux de l'apoptose des astrocytes était augmenté [150].

L'ensemble de ces observations suggèrent que le TGF α participerait aux premiers stades de la transformation cancéreuse des astrocytes via la dérégulation des processus de prolifération et d'apoptose de ces cellules.

D'une manière intéressante, les travaux de Sharif et collaborateurs [140] montrent qu'une exposition prolongée d'astrocytes normaux/matures au TGF α favoriserait leur conversion fonctionnelle progressive en cellules progénitrices neurales puis en cellules souches (Fig.2).

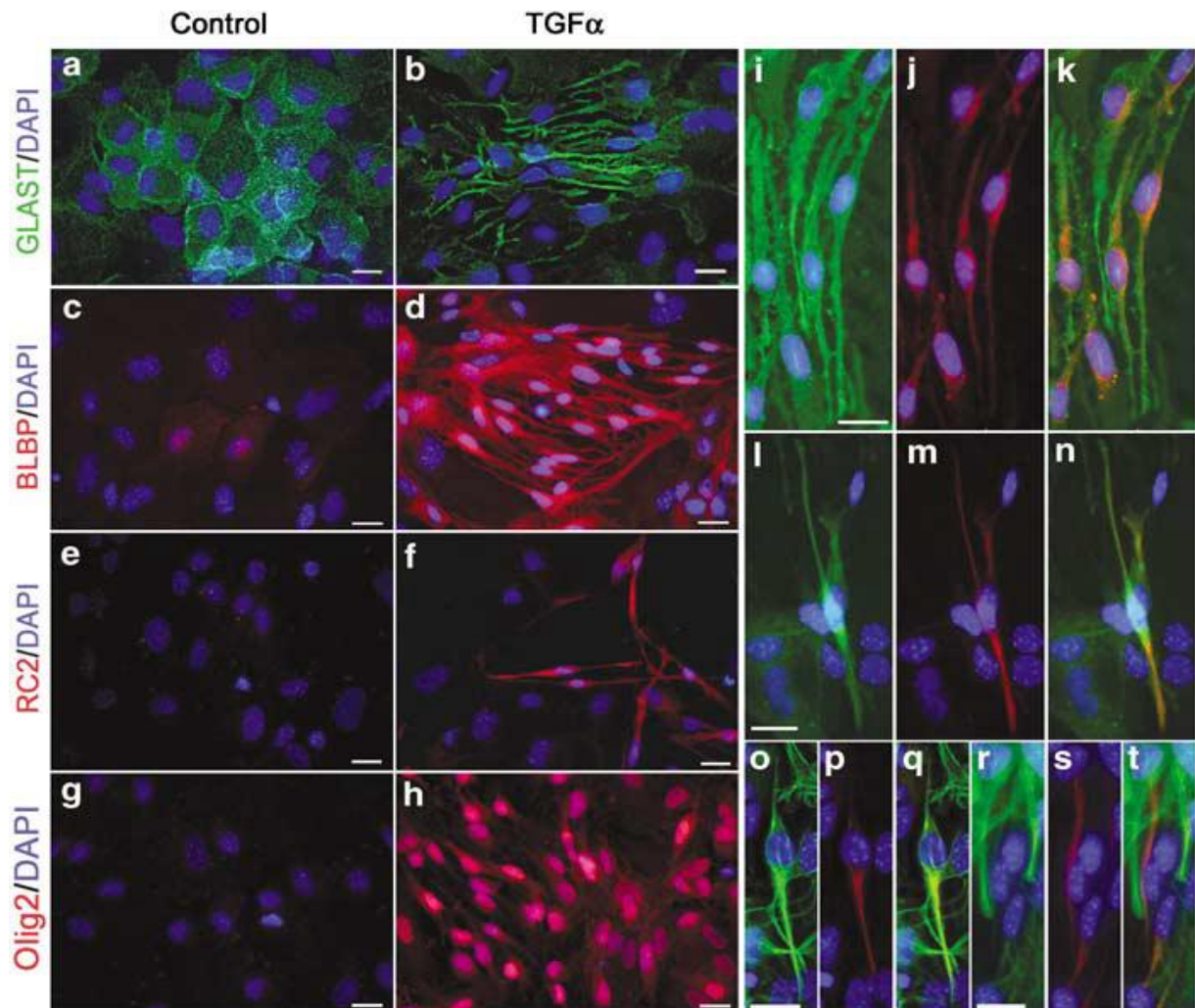


Figure 2 : Les astrocytes traités au TGF α acquièrent un aspect bipolaire et présentent un profil antigénique de cellules de la glie radiaire [140].

(a–f) Marquage immunofluorescent des astrocytes traités pendant 7 jours en l'absence (contrôle) ou en présence de TGF α avec des anticorps dirigés contre GLAST (a,b), BLBP (c,d) et RC2 (e,f). Les noyaux ont été coloré avec du DAPI (Bleu).

(g, h) L'immunodétection de Olig2, un marqueur de progéniteurs neuronaux également exprimés dans les astrocytes immatures, a révélé un signal à peine détectable dans les astrocytes contrôle (g), tandis que les cellules d'aspect bipolaire présentes dans les cultures d'astrocytes traités au TGF α présentaient un fort signal nucléaire après sept jours de culture *in vitro* (h).

(i–n) Un double marquage immunofluorescent a montré que les cellules avec un aspect bipolaire immunoréactives à RC2 (présentes dans les cultures d'astrocytes traités au TGF α) co-exprimaient GLAST (i–k) et BLBP (l–n).

Par ailleurs, les cellules immunoréactives à RC2 (rouge) étaient soit positives à la GFAP (vert) (o–q), soit négative à la GFAP (r–t). Les noyaux ont été coloré avec du DAPI (Bleu).

La barre d'échelle = 20 μ m.

Cette conversion se traduit principalement par :

- i. L'acquisition d'un aspect bipolaire rappelant la forme bipolaire de certaines populations de cellules progénitrices neurales (les cellules gliales radiaires). Cette adaptation morphologique (visible à partir de 2 à 3 jours de culture *in vitro* en présence du TGF α) serait liée à l'activation du récepteur erbB1.
- ii. L'expression par les astrocytes traités au TGF α de marqueurs moléculaires spécifiques des progéniteurs gliaux. Ainsi après quelques jours de traitement au TGF α , l'expression de marqueurs comme GLAST, BLBP (Brain Lipid-Binding Protein), RC2 (une isoforme de la nestine) ou encore Olig2 est augmentée par rapport aux cellules non traitées.
- iii. Cette conversion morphologique est accompagnée d'une conversion fonctionnelle que se traduit par la capacité des astrocytes traités au TGF α de remplir des fonctions de progéniteurs neurales comme le support de la migration neuronale.
- iv. Après plusieurs mois de traitement au TGF α , les astrocytes acquièrent un statut de cellules souches neurales capables, expérimentalement, de répondre aux différents critères définissant une CSN décrits précédemment. En effet, les astrocytes traités au TGF α pendant 10 mois sont capables de se développer en neurosphère, de s'autorenouveler et de produire différents types de cellules neuronales et gliales lorsque les sphères sont transférées dans des milieux propices à la différenciation.

Ainsi et sous l'effet du TGF α les astrocytes matures sont capables d'acquérir de manière séquentielle les caractéristiques morphologiques fonctionnelles de progéniteurs neurales et cellules souches neurales. Les progéniteurs neurales sont plus sensibles aux pressions oncogènes [151] ce qui fait des astrocytes traités au TGF α de nouvelles cibles potentielles à la transformation cancéreuse.

3.2. La deuxième étape : La transformation cancéreuse des astrocytes traités au TGF α :

Afin d'évaluer la prédisposition des astrocytes dédifférenciés en progéniteurs neurales sous l'influence du TGF α à la transformation cancéreuse, Dufour et ses collaborateurs ont fait subir à ces cellules un traitement mutagène par irradiation [141]. Les résultats obtenus

montrent que les astrocytes traités au TGF α sont plus sensibles à la transformation cancéreuse que les astrocytes normaux n'ayant pas subi de traitement au TGF α .

La transformation cancéreuse des astrocytes traités aux TGF α et irradiés se traduit principalement par :

- i. Une immortalisation de ces cellules contrairement aux cellules non irradiées et/ou non traitées.
- ii. Une segmentation nucléaire accompagnée d'une croissance incontrôlée et indépendante de l'adhérence cellulaire (caractéristiques communes de la transformation cancéreuse [152]).
- iii. Des anomalies cytogénétiques ;
- iv. Un grand pouvoir tumorigène lorsqu'elles sont injectées chez des souris Nude (Fig.3).

Ainsi les astrocytes transformées *in vitro* après traitement au TGF α peuvent être considérées comme des « CSCs ».

Dans ce modèle cellulaire, les « CSCs » issues de la transformation des progéniteurs neuraux obtenus après traitement au TGF alpha des astrocytes normaux constituent une source de matériel particulièrement adéquate pour des études biochimiques comparatives.

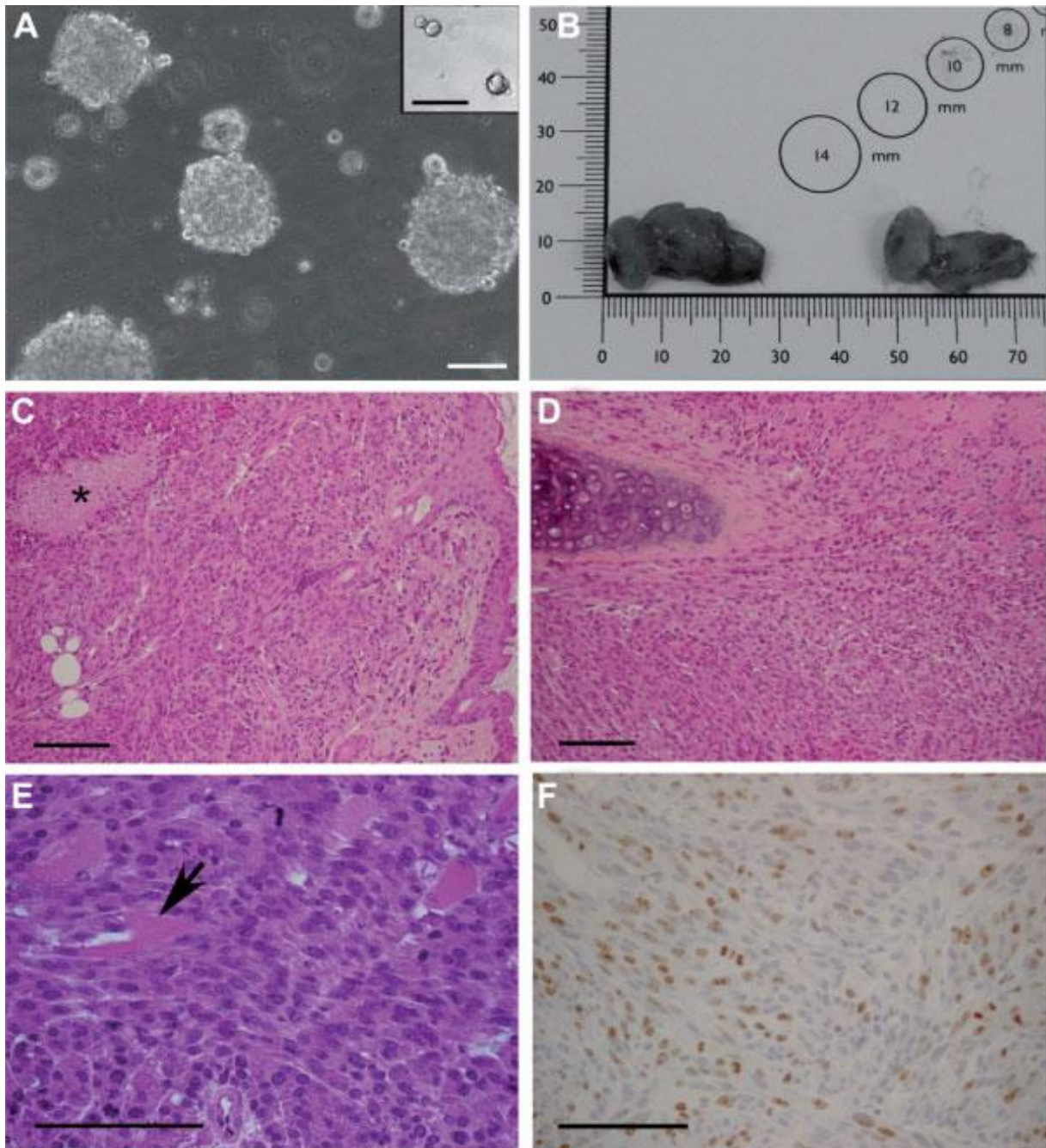


Figure 3 : Des greffons homotopiques ont été obtenus en utilisant des injections stéréotaxiques de cellules traitées au TGF α et irradiées sous forme de sphères flottantes dans le striatum de souris âgées de 6 semaines [141].

(A) Les cultures d'astrocytes traitées au TGF α et irradiées forment de grandes et multiples colonies lorsqu'elles sont cultivées en milieu semi-solide contrairement aux cellules non irradiées qui ne forment que de rares colonies de petite taille (voir insert).

(B-F) : tumeurs sous-cutanées dérivées des astrocytes traités au TGF α et irradiés. (B) : illustration de l'apparence macroscopique des tumeurs sous-cutanées. (C-D) : Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine illustrant la morphologie cellulaire des cellules tumorales et leur effet destructeur sur le derme de l'hôte (C), le cartilage (D) et les muscles (E). L'astérisque en (C) indique une zone de nécrose. La flèche en (E) pointe une fibre musculaire. (F) : les tumeurs contiennent des cellules immunoréactives au Ki67 (un marqueur de la prolifération cellulaire).

La barre d'échelle = 100 μ m.

4. LES ADAPTATIONS BIOLOGIQUES DES CELLULES CANCÉREUSES : LA REPROGRAMMATION MÉTABOLIQUE

4.1. Généralités :

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par de nombreuses caractéristiques histologiques, moléculaires et métaboliques. En effet, la transformation tumorale d'une cellule normale en cellule cancéreuse nécessite l'acquisition, progressive, d'un certain nombre de caractéristiques qui vont permettre la création d'un microenvironnement favorable à la croissance et à la prolifération cancéreuse.

En 2000, Hanahan et al [153] avaient proposé le concept de «Cancer Hallmarks». Ce concept attribue aux cancers et aux cellules cancéreuses six caractéristiques distinctives représentant des altérations essentielles de la physiologie cellulaire (Fig. 4) :

- i. Autosuffisance en signaux de croissance.
- ii. Insensibilité aux signaux anti-croissance.
- iii. Échappement à la mort cellulaire programmée.
- iv. Potentiel de réplication illimité.
- v. Angiogenèse soutenue.
- vi. Invasion tissulaire et métastase.

Chacune de ces nouvelles capacités acquises successivement au cours du développement tumoral et de la transformation cancéreuse constitue une mise en échec des défenses anticancéreuses.

Récemment le principe de « Cancer Hallmarks » a été étendu par ses inventeurs pour inclure l'évasion aux défenses immunitaires et la reprogrammation métabolique (Fig. 5) [154].

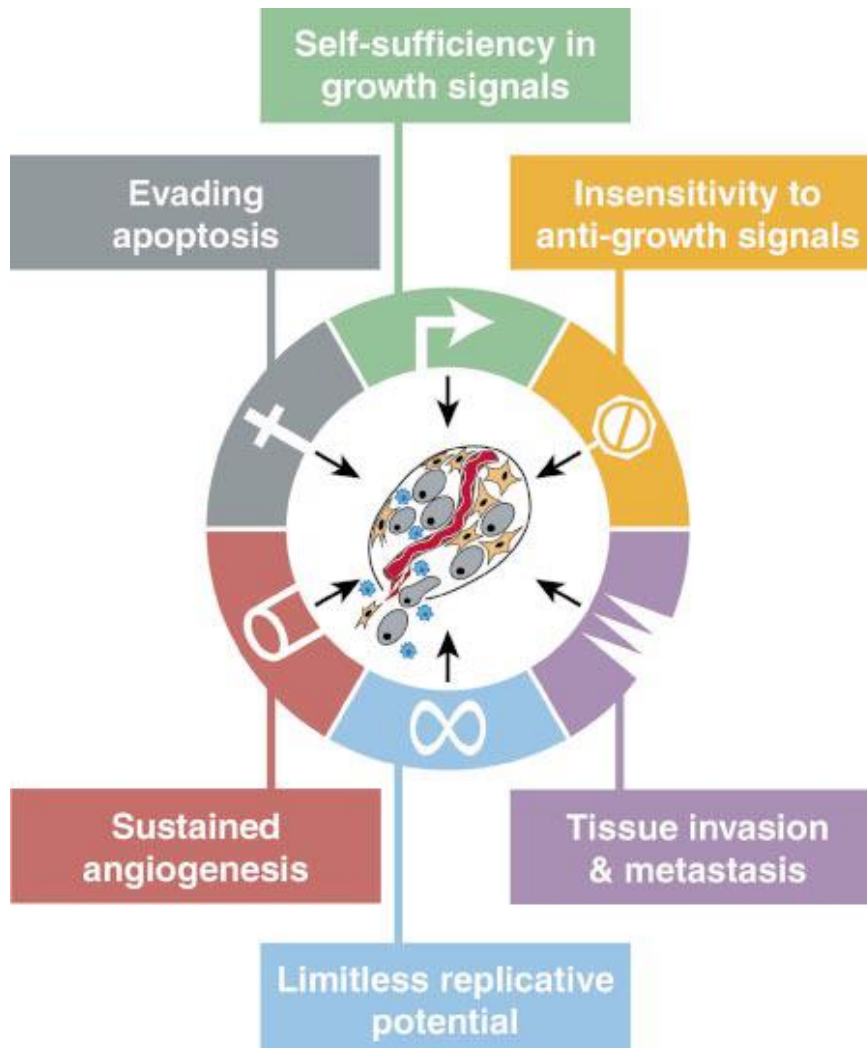


Figure 4 : Les capacités acquises par les cancers selon Hanahan et al [153].

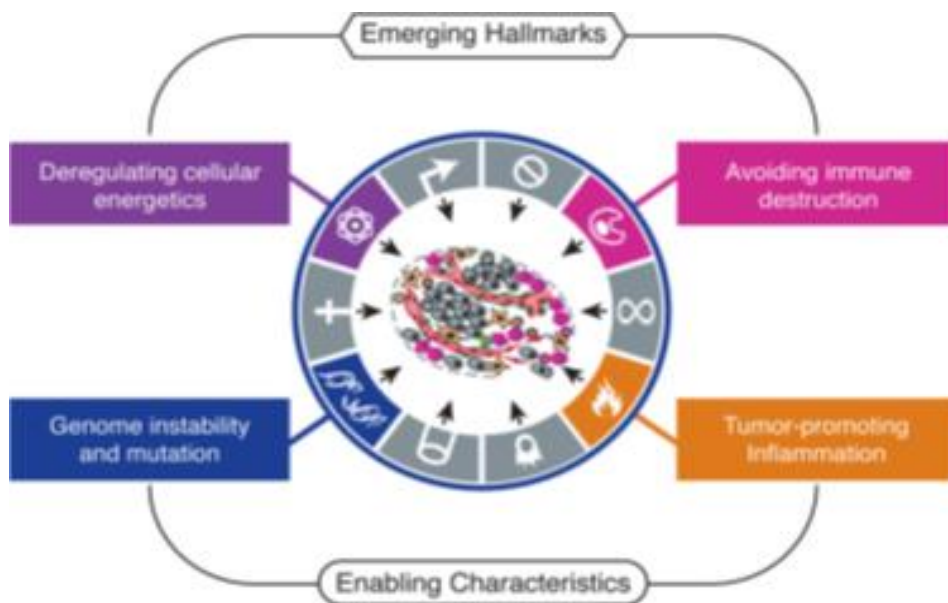


Figure 5 : Les caractéristiques émergentes des cancers [154]
 Les inventeurs du principe du « cancer Hallmarks » l'ont récemment élargi pour y inclure la reprogrammation métabolique et l'évasion aux défenses immunitaires.

La reprogrammation métabolique constitue un moyen pour les cellules cancéreuses de mieux répondre à leurs nouvelles exigences, de stimuler la croissance et la division cellulaire et de promouvoir la synthèse de macromolécules (ADN, ARN, protéines, lipides...) nécessaires pour produire de nouvelles cellules [155]. En effet, la croissance et la prolifération incontrôlées des cellules cancéreuses impliquent non seulement un dérèglement de la prolifération cellulaire mais également des ajustements/adaptations du métabolisme énergétique et de biosynthèse. Bien que le type de reprogrammation adopté par les cellules cancéreuses soit variable et affecte, selon les cas, différentes voies anaboliques et cataboliques, cette reprogrammation métabolique est une caractéristique omniprésente dans les cellules cancéreuses.

Dans cette section, nous allons décrire différents aspects de la reprogrammation métabolique dans le cancer en commençant par l'aspect le plus décrit qui fut introduit par l'initiateur de cette observation phénotypique dans les cancers et en terminant par les hypothèses émergentes de ces dernières années (Pour revue [156]).

4.2. Effet Warburg et augmentation de la capacité glycolytique :

C'est Otto Warburg qui a été le premier à décrire des altérations/anomalies dans le métabolisme des cellules cancéreuses [157, 158]. En effet, il décrivit il y a près de 90 ans la grande capacité glycolytique, même dans des conditions normoxiques, des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales.

Dans des conditions d'aérobic, les cellules normales catabolisent le glucose en pyruvate (grâce aux différentes étapes de la glycolyse). Une petite partie de ce pyruvate sera utilisée pour la synthèse de l'alanine ou du lactate tandis que la majeure partie transitera par la suite vers la mitochondrie où elle sera décarboxylée par la pyruvate déshydrogénase (PDH) pour former l'acétyl-CoA. Ce dernier entre dans le cycle de Krebs et permet la production de plusieurs molécules de NADH et FADH₂ qui fourniront à la chaîne respiratoire mitochondriale les électrons nécessaires pour la production d'énergie. Ce mode de production d'énergie est très efficace et permet à la cellule de produire 36 molécules d'ATP à partir d'une seule molécule de glucose (en très grande partie grâce à la respiration mitochondriale).

Contrairement aux cellules normales, qui ne priorisent la glycolyse que lorsque l'apport en oxygène est insuffisant, les cellules cancéreuses quant à elles utilisent la glycolyse même en présence de concentrations suffisantes en oxygène [159, 160]. C'est pour cette

raison que cette spécificité métabolique des cellules cancéreuses découverte par Warburg est communément appelée « Glycolyse aérobie », ou « Effet Warburg », par opposition à la glycolyse anaérobie réalisée par les cellules saines/normales.

Sur un plan énergétique, la glycolyse aérobie ne permet à la cellule cancéreuse de produire que 2 molécules d'ATP par molécule de glucose catabolisée, ce qui représente 18 fois moins de molécules d'ATP par rapport à la glycolyse anaérobie qui permet de produire 36 ATP par molécule de glucose lorsqu'elle est combinée à la respiration mitochondriale.

Afin de compenser ce déficit énergétique la cellule cancéreuse met en place plusieurs stratégies. L'une de ces stratégies consiste à augmenter la consommation de glucose en régulant à la hausse l'activité de certains transporteurs de glucose [161]. En effet l'augmentation de l'assimilation du glucose constitue une différence majeure qui permet de distinguer les cellules cancéreuses des cellules normales. Cette différence est exploitée en médecine clinique afin de réaliser des PET scans (Positron Emission Tomography) qui permettent de visualiser les tumeurs grâce à l'utilisation de traceurs moléculaires qui ne sont autres que des analogues radioactifs du glucose (tel que le 18F-fluorodeoxyglucose). D'autre part, les tumeurs sont capables d'augmenter l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques comme l'hexokinase (HK), la Phosphofructokinase (PFK), la triose-phosphate isomérase (TPI) ou encore la lactate déshydrogénase (LDH) [155]. Cette coordination entre l'augmentation de l'assimilation du glucose d'une part et la surexpression des enzymes glycolytiques d'autre part, permet aux cellules cancéreuses de contrôler la glycolyse de manière permanente afin de favoriser leur prolifération rapide et leur biosynthèse accélérée.

Par ailleurs et contrairement aux cellules normales qui convertissent la plus grande partie du pyruvate issu de la glycolyse en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs, les cellules cancéreuses vont principalement transformer le pyruvate en lactate grâce à la surexpression de la forme A de la lactate déshydrogénase (LDH A). Cette modulation métabolique confère de nombreux avantages à la tumeur. D'une part la conversion du pyruvate en lactate va permettre aux cellules cancéreuses de régénérer du NAD afin d'accélérer la glycolyse. D'autre part le lactate généré lors de cette réaction sera sécrété dans le microenvironnement tumoral et alimentera le métabolisme d'autres cellules cancéreuses voisines ayant difficilement accès aux nutriments. En plus, la conversion du pyruvate en lactate permet aux cellules cancéreuses de réduire leur EROs, diminuant ainsi leur stress oxydatif et renforçant la survie tumorale [155, 156]. Par ailleurs, l'oxydation du lactate en

pyruvate par la LDH est accompagnée par une forte production d'agents réducteurs qui jouent un rôle dans la lutte contre le stress oxydatif [162] et activent les voies de pro-survie [163].

Outre son rôle énergétique, la glycolyse joue un rôle principal dans le fonctionnement des voies de biosynthèse. En effet les métabolites intermédiaires issus de la glycolyse constituent une source importante de précurseurs nécessaires pour la production des acides aminés et la synthèse des macromolécules. En alimentant ces voies de biosynthèse, la glycolyse joue un rôle actif dans la croissance et la prolifération cellulaire. Par exemple, le glucose-6-phosphate est souvent détourné par la voie des pentoses phosphates (PPP pour Pentose Phosphate Pathway) pour participer à la synthèse des nucléotides et à la génération de NADPH et le dihydroxyacétone phosphate est quant à lui associé à la synthèse des lipides.

Au-delà de leur rôle énergétique et de leurs fonctions métaboliques, les enzymes glycolytiques sont également impliquées dans plusieurs processus cellulaires essentiels pour la survie de la cellule cancéreuse comme les processus d'invasion et de métastase mais également dans la régulation géniques et le remodelage chromatinique [164]. Ainsi le ciblage des enzymes glycolytiques présente un grand intérêt pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

4.3. Diversification des sources de carbones :

En plus de l'augmentation de la capacité glycolytique, la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses se traduit par une multiplication et une diversification des sources de nutriments. Ainsi les cellules cancéreuses sont capables d'utiliser des substrats alternatifs, comme le lactate ou la glutamine, pour alimenter leurs voies de biosynthèse et produire l'énergie et les précurseurs métaboliques nécessaires pour le maintien de leur croissance et leur survie [160, 165].

4.3.1. Le lactate comme carburant pour un métabolisme cancéreux efficace :

D'une manière intéressante, de nombreuses publications scientifiques s'accordent sur le fait que certaines tumeurs se composent de deux sous-populations de cellules cancéreuses qui diffèrent sur les plans énergétiques et métaboliques.

En effet, une première sous-population cellulaire est dépendante de la glycolyse et l'utilise comme voie principale de production d'énergie. Cette sous-population cellulaire se

caractérise par un haut taux de glycolyse accompagnée d'une importante production de lactate (Effet Warburg).

Cependant, une seconde sous-population cellulaire préfère quant à elle importer le lactate produit par la première sous-population et l'utiliser dans son métabolisme oxydatif comme source principale/primaire pour la production d'énergie. On peut parler donc de symbiose entre les cellules cancéreuses qui produisent le lactate et les cellules cancéreuses qui en consomment. Cette notion de symbiose entre les différentes sous-populations de cellules tumorales a permis à Sonveaux et son équipe de distinguer les cellules glycolytiques et les cellules oxydatives/mitochondriales [165].

Ainsi, les cellules tumorales oxydatives dégagent un bilan métabolique positif en utilisant le lactate comme substrat pour leur métabolisme. D'une part, l'utilisation du lactate comme source d'énergie ne nécessite pas un apport initial en ATP comme c'est le cas lors de la glycolyse. D'autre part, la conversion du lactate en pyruvate implique une forte production d'agents réducteurs qui jouent un rôle important dans la lutte contre le stress oxydatif [156] et activent les voies de pro-survie [163].

Par ailleurs, l'accumulation du lactate par les tumeurs humaines est souvent associée à des métastases, des récurrence tumorale et un pronostic défavorable [166-168] ou encore à la stimulation de l'angiogenèse [169].

4.3.2. La glutaminolyse, un élément crucial de reprogrammation métabolique :

En plus de l'augmentation de leurs capacités glycolytiques, certaines tumeurs utilisent également la glutaminolyse pour approvisionner leur métabolisme énergétique et cellulaire.

En effet, l'oxydation de la glutamine présente un double avantage pour les cellules cancéreuses. D'une part, la métabolisation de la glutamine en glutamate puis en α -cétoglutarate permet de réapprovisionner le cycle de Krebs et constitue ainsi une voie anaplérotique. Les métabolites intermédiaires qui dérivent des réactions du cycle de Krebs peuvent servir à alimenter les voies de synthèses des lipides et des acides aminés ou encore intervenir dans la synthèse des nucléotides. D'autre part, la glutaminolyse assure également un rôle dans le métabolisme énergétique. En relançant le cycle de Krebs, la glutaminolyse permet ainsi la formation de NADH et de FADH₂ qui fournissent les électrons nécessaires au

fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale pour lui permettre de générer les molécules d'ATP [159, 170-172]. Ainsi la glutaminolyse semble être un moyen efficace pour les cellules cancéreuses de soutenir leur croissance rapide et leur prolifération accrue.

En 2007, DeBerardinis et ses collaborateurs montrent que des cellules transformées (en l'occurrence des cellules de glioblastome) sont capables d'utiliser la glutamine dans leur métabolisme afin de mieux répondre à leurs nouveaux besoins en termes de synthèse de protéines et de nucléotides [160]. Ces investigations montrent que les cellules transformées présentent un taux élevé de consommation de glutamine qui ne peut être expliqué par la demande en azote (nécessaire pour la synthèse des nucléotides) ou par le maintien du stock des acides aminés non essentiels. Ils concluent que le métabolisme de la glutamine offre aux cellules tumorales une source de carbone qui facilite l'utilisation des intermédiaires métaboliques dérivés du glucose et du cycle de Krebs en tant que précurseurs de biosynthèse.

4.4. Modulation de l'expression de la lactate déshydrogénase :

La LDH est une enzyme cruciale associée à la glycolyse qui permet l'interconversion du lactate et du pyruvate. Chez les mammifères il existe deux gènes qui codent pour 2 sous-unités (chaînes) de la LDH nommées chaîne A et chaîne B. L'association de ces deux chaînes de LDH permet la formation de 5 formes tétramériques (isoenzymes) de la LDH : LDH A₄ (LDH 5/LDH A), LDH A₃B₁ (LDH4) , LDH A₂B₂ (LDH3) , LDH A₁B₃ (LDH2) et la LDH B₄ (LDH1/LDHB) [173]. Sur le plan cinétique, la LDH A (isoenzyme dominante dans le muscle squelettique) favorise la conversion du pyruvate en lactate tandis que la LDH B (isoenzyme majoritaire dans le muscle cardiaque) favorise la conversion du lactate en pyruvate.

Il est connu depuis longtemps que de nombreux cancers humains ont des niveaux de LDH A plus élevés que les tissus normaux [174] ce qui contribue à l'importante production de lactate observée dans de nombreux cancers. Cette modulation de l'expression de la LDH A se fait sous l'influence de certains facteurs de transcription (Ex. Hypoxia-inductible factor 1 [175, 176] ou sous l'action de certains oncogènes (Ex. c-Myc) [177].

Par ailleurs, de nombreuses études montrent que la réduction de l'expression de la LDH A réduit la transformation cellulaire et ralentit la formation tumorale ce qui indique un rôle important de la LDH A dans l'initiation tumorale [178-180].

4.5. Induction de la voie des pentoses phosphate :

Durant de nombreuses années, les seules fonctions attribuées au PPP étaient liées à son rôle dans la lutte contre le stress oxydatif via la production d'agents réducteurs et à son rôle dans la synthèse des nucléotides via sa participation à la production de ribose-phosphate. Cependant, des études récentes suggèrent que le PPP serait impliquée dans de nombreux aspects du métabolisme cancéreux (prolifération, apoptose, invasion, résistance aux médicaments, métastase...) jouant ainsi un rôle central dans la reprogrammation métabolique [156, 181].

Classiquement, le PPP est divisé en deux branches, une branche oxydative et une branche non-oxydative. L'activité de la branche oxydative est généralement plus importante que celle de la branche non-oxydative [182].

Dans la branche oxydative, la conversion du glucose-6-phosphate en pentoses-phosphate est accompagnée par la production de NADPH utilisé lors de la production de glutathion, des réactions de détoxifications et de la synthèse des lipides et d'autres macromolécules (Fig. 6).

La branche non-oxydative du PPP permet la production de fructose-6-phosphate et de glyceraldehyde-3-phosphate qui peuvent être utilisés par la glycolyse et les voies métabolique en aval (Fig. 6). En effet, depuis de nombreuses années, cette branche du PPP était considérée comme une voie anaplérotique pour la branche oxydative et pour la glycolyse. Des études récentes montrent que son rôle s'étend au-delà de sa participation anaplérotique lui attribuant des rôles dans le métabolisme et la prolifération cellulaires [183].

Au vu des rôles régulateurs de la croissance joués par le PPP, il n'est pas surprenant que des changements de son flux métabolique se produisent lors du développement et de la progression tumorale.

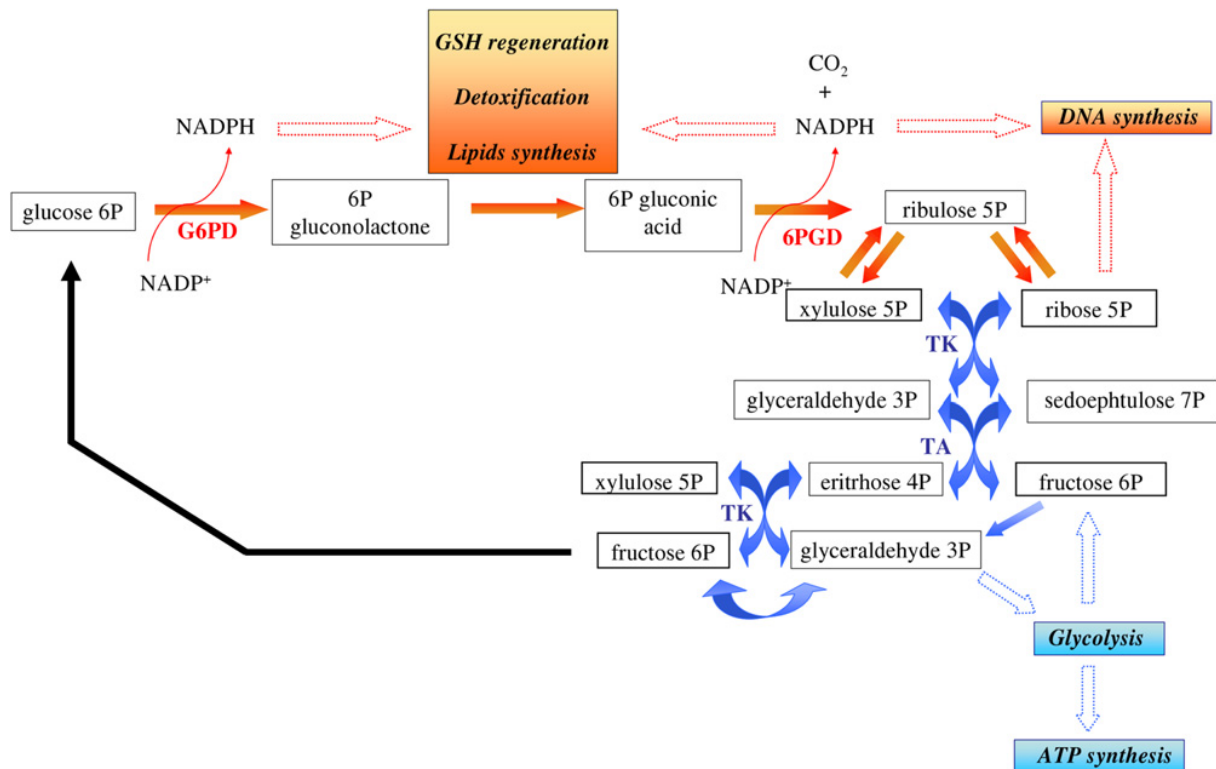


Figure 6 : Représentation schématique de la branche oxydative et non oxydative du PPP [181].

La branche oxydative est illustrée en rouge et la branche non oxydative en bleu.

P : phosphate, G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase, 6PGD : 6-phosphogluconate déshydrogénase, GSH : glutathion réduit, TK : transkétolase; TA : transaldolase.

4.5.1. PPP et prolifération :

Les cellules cancéreuses se caractérisent par une prolifération rapide entraînant un besoin accru en nucléotides et autres métabolites nécessaires à la biosynthèse de macromolécules. Ceux-ci peuvent être fournis par le PPP via la régulation de l'activité enzymatique de certaines enzymes impliquées dans cette voie [172, 181].

Par exemple, une augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est observée dans certains types de cellules cancéreuses en prolifération [184]. Cette enzyme de la branche oxydative du PPP est également connue pour son rôle dans la survie des cellules cancéreuses en produisant du NADPH qui intervient dans la défense contre le stress oxydatif, contre les dommages cytotoxiques induits par la chimiothérapie ainsi que par son rôle dans le renforcement de la biosynthèse [181].

Un autre exemple est celui de la transkétolase (TK), une enzyme majeure de la branche non-oxydative du PPP. Cette enzyme joue un rôle dans le soutien de la prolifération dans certains cancers [185, 186].

4.5.2. PPP et apoptose :

De nombreuses preuves expérimentales indiquent que le taux des ERO et du glutathion participent à la régulation de la mort cellulaire et de l'apoptose [187, 188], ce qui révèle un rôle possible du PPP dans la lutte contre l'apoptose.

Il est communément admis que l'augmentation de l'activité enzymatique de la G6PD joue un rôle anti-apoptotique et favorise la survie des cellules tumorales via l'augmentation de sa capacité à produire des agents réducteurs capables de neutraliser les ERO présents en grande quantité dans ces cellules tumorales.

D'une manière intéressante, le rôle du PPP n'est pas limité à son implication dans la lutte contre le stress oxydatif mais s'étend également à la réparation des dommages à l'ADN. En effet, lors des dommages à l'ADN, la G6PD est rapidement activée pour accélérer le PPP afin de neutraliser les ERO, augmenter la synthèse des déoxynucléotides et permettre une réparation efficace de l'ADN [189, 190]

4.5.3. PPP et invasion tumorale :

D'une manière générale, l'augmentation de l'activité du PPP est associée aux tumeurs métastatiques et invasives.

Dans certaines tumeurs, l'augmentation du flux métabolique du PPP intervient pendant les premiers stades de la cancérogenèse avec très peu de changement dans ce flux au cours des métastases [191, 192]. Ces observations indiquent que les changements d'activité du PPP joueraient un rôle important uniquement dans la transformation cancéreuse initiale dans certains cancers.

Au contraire, d'autres tumeurs montrent une augmentation dans l'activité du PPP au cours des dernières étapes de la transformation cancéreuse. Dans ce cas, le PPP ne semble pas jouer un rôle direct dans l'invasion tumorale mais plutôt dans la protection des cellules métastatiques contre le stress oxydatif lié à leur métabolisme aérobie [193]. Par ailleurs, dans la plupart des cancers métastatiques la TK est remplacée par une isoenzyme de la même famille qui présente des propriétés cinétiques différentes. Ce switch dans l'expression enzymatique de la TK présente de nombreux avantages en terme d'utilisation du glucose, de

génération d'ATP, de synthèse d'acide gras...ce qui permet une meilleure adaptations aux besoins métaboliques des tumeurs métastatiques [194].

D'une manière intéressante, il a été montré que les deux branches du PPP étaient régulées de manière indépendante aussi bien au cours des étapes initiales de la transformation cancéreuse qu'au cours de l'invasion tumorale [191, 192].

4.5.4. PPP et résistance aux médicaments :

Les changements dans l'activité du PPP peuvent affecter la réaction des tumeurs aux différentes formes de thérapies et ce via divers mécanismes.

En effet, l'efficacité de certains traitements anticancéreux est liée à leurs capacités à induire l'apoptose des cellules tumorales. Or, le PPP est impliqué dans la lutte contre l'apoptose induite par le stress oxydatif. Ainsi, le PPP semble jouer un rôle dans la régulation de la mort cellulaire induite par la chimiothérapie et la radiothérapie [181]. Par exemple, l'expression de la G6PD est augmentée dans les cellules ayant subi un rayonnement ionisant responsable d'un important stress oxydatif [195].

D'autres mécanismes qui impliquent l'une ou l'autre fonctionnalité du PPP sont responsables du renforcement de la résistance et de la survie tumorale durant les traitements anticancéreux. Parmi ces mécanismes la participation du PPP dans la réparation des dommages à l'ADN, dans la production du glutathion (élément important pour la lutte contre le stress oxydatif)...

Pour conclure, le PPP semble jouer un rôle clé dans plusieurs aspects du métabolisme tumoral en occupant une place centrale dans la synthèse des acides nucléiques et dans la production d'agents réducteurs (Fig. 7).

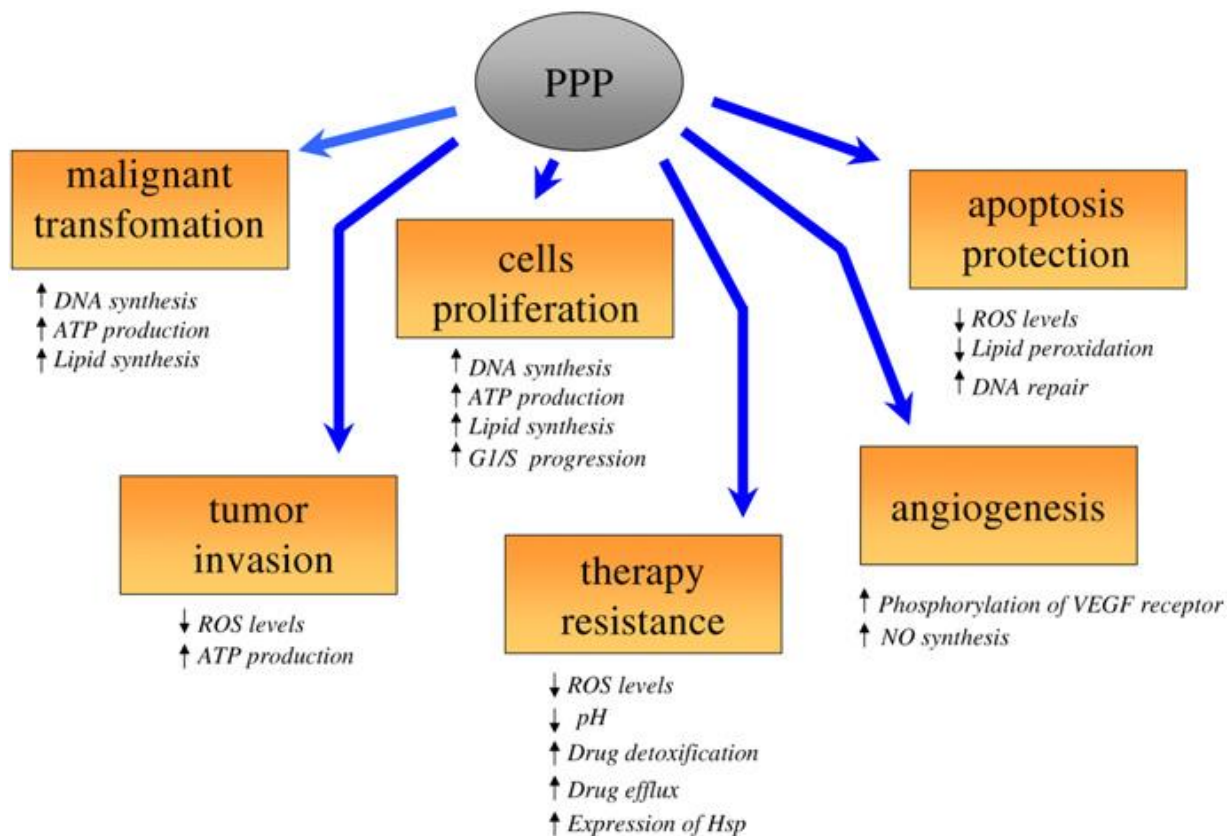


Figure 7 : Les effets de la voie des pentoses phosphate sur le métabolisme tumorale [181].

L'activation de la voie des pentoses phosphate affectent de nombreux aspects du métabolisme tumoral. Par exemple, elle favorise la transformation cancéreuse, augmente l'invasion et la progression tumorales, protège les cellules de l'apoptose, favorise la migration tumorale et les métastase, augmente l'angiogénèse, et altère la réponse aux traitements anticancéreux conventionnels.

VEGF: vascular endothelial growth factor, NO: Oxyde nitrique, Hsp: Heat shock protein.

4.6. Adaptation du métabolisme lié au stress oxydatif :

La reprogrammation métabolique se caractérise également par des perturbations dans les voies de production des ERO ainsi que dans les défenses mise en place pour lutter contre le stress oxydatif.

Classiquement, les ERO sont considérés comme des sous-produits métaboliques capables de causer des dommages cellulaires importants allant jusqu'à provoquer l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire [196]. Cependant, des travaux récents montrent que de faibles niveaux d'ERO auraient des effets bénéfiques sur la cellule en participant au maintien de l'homéostasie cellulaire et en favorisant la survie et la prolifération cellulaire [197, 198].

Comparativement aux cellules normales, les cellules cancéreuses se caractérisent par une importante production d'ERO [199, 200]. Cette augmentation du niveau des ERO a pour

but d'activer certaines voies de signalisation qui vont enclencher de nombreuses adaptations métaboliques des cellules cancéreuses à leur nouveau microenvironnement tumoral favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la survie.

Par ailleurs, cette production massive des ERO constitue un stress pour les cellules cancéreuses qui doivent s'adapter pour échapper aux effets négatifs de cette augmentation et en tirer le meilleur profit métabolique possible. Ainsi, les cellules cancéreuses adaptent et acquièrent des mécanismes afin de lutter contre les potentiels effets toxiques du stress oxydatif dû aux ERO et soutenir les voies de signalisation favorables (Fig. 8). Concrètement, pour lutter contre le stress oxydatif lié aux ERO la cellule cancéreuse va adapter le niveau d'expression de plusieurs enzymes antioxydantes [201, 202].

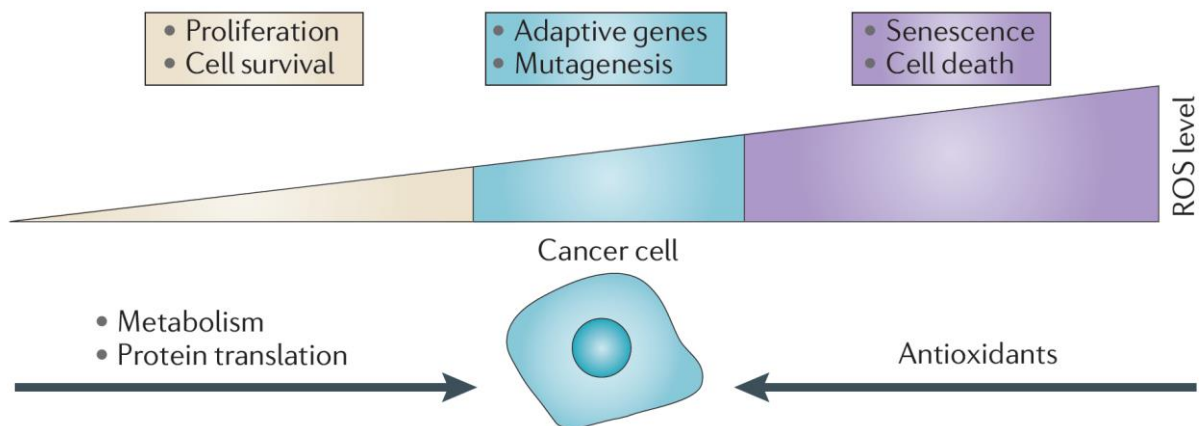


Figure 8 : Relation entre les niveaux des ERO et le cancer [200].

Les effets des espèces réactives à l'oxygène (ERO) sur les cellules dépendent du niveau des ERO auquel les cellules sont soumises. De faibles niveaux d'ERO (illustrés en gris) sont bénéfiques aux cellules notamment en soutenant la prolifération cellulaire et en agissant sur les voies de survie. Cependant, une fois que les ERO atteignent des niveaux élevés (illustrés en violet), ils provoquent un stress oxydatif qui peut conduire à la mort cellulaire.

Afin de contrer les effets néfastes liés au stress oxydatif, les cellules déploient de nombreuses défenses pour empêcher l'accumulation des ERO à des niveaux élevés. En effet, les cellules cancéreuses exercent une régulation stricte du niveau des ROS et des antioxydants de façon à ce que la cellule survive et que les niveaux des ERO soient réduits à des niveaux modérés (illustrés en bleu).

Par exemple, en 2004 Young et ses collaborateurs ont utilisé une approche protéomique (associant une électrophorèse bidimensionnelle et la spectrométrie de masse) pour comparer le protéomes de cellules normales et de cellules transformées caractérisées par un important stress oxydatif [203]. Leurs résultats montrent l'augmentation de l'abondance d'une trentaine de protéines toutes impliquées dans le contrôle de la balance Redox comme la PRDX 3 et la thioredoxine peroxydase dans les cellules transformées. D'autres études

montrent que des tissus cancéreux présentent une augmentation des enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif comme les PRDXs, les SOD, les GSTs ou encore les glutathion peroxydases [204, 205].

Au-delà de leurs rôles dans la lutte contre stress oxydatifs les enzymes antioxydantes contribuent également au maintien de la croissance et la survie des cellules cancéreuse participant ainsi à la progression tumorale [206]

Pour conclure cette section sur la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuse on peut dire que cette reprogrammation regroupe l'ensemble des modulations/adaptations métaboliques, enzymatiques, protéiques ou encore génétiques permettant aux cellules cancéreuses de créer un microenvironnement favorable à leur survie et leur croissance.

5. OBJECTIFS DE LA THÈSE ET APPROCHES :

Notre étude vise à mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre lors de la transformation cancéreuse des astrocytes *in vitro* et à mieux caractériser les voies métaboliques qui causent ou qui résultent de cette transformation. Pour notre projet, nous avons décidé d'utiliser le modèle de transformation astrocytaire décrit dans la section 3 de ce chapitre [140, 141]. Ce modèle cellulaire est particulièrement utile pour expliquer l'origine cellulaire des gliomes. En effet, dans ce modèle les astrocytes transformés *in vitro* (TA pour Transformed astrocytes) dérivent de cellules de type souches neurales qui elles-mêmes sont obtenues par dédifférenciation des astrocytes normaux (NA pour Normal astrocytes). Ainsi ce modèle réconcilie les deux hypothèses principales qui tentent d'expliquer l'origine cellulaire des gliomes à savoir celle qui postule que les gliomes dériveraient de cellules différenciées [115] et celle qui propose que les gliomes sont issus de cellules indifférenciées [112]. En plus, ce modèle cellulaire constitue une source de matériel abondante pour réaliser tout un ensemble d'études comparatives nécessaires pour comprendre les mécanismes cellulaire et moléculaire impliqués dans la transformation astrocytaire.

Nous avons donc décidé de mener une analyse protéomique comparative des NA et des TA pour tenter d'éclaircir les processus qui se déroulent au cours de la transformation des astrocytes.

Ainsi l'objectif principal de notre étude vise à **établir un profil protéomique** de ces deux types cellulaires (NA et TA) ce qui nous permettra **de caractériser les processus cellulaires** qui sont sujets à des modifications/adaptations aux cours de la transformation cancéreuse des astrocytes et du développement tumoral. L'établissement du profil protéomique des NA et des TA servira à **identifier les voies métaboliques et les composants structurels** liés à la transformation qui peuvent constituer des **cibles thérapeutiques** intéressantes pour contrôler la croissance et la prolifération tumorale de certains types de gliomes.

Malgré que les techniques basées sur la 2D-DIGE aient bénéficié de grandes avancées technologiques qui ont largement amélioré leur potentiel analytique (reproductibilité, sensibilité, résolution...), ces techniques présentent toujours certaines limites qui imposent l'utilisation d'autres méthodes d'analyses pour valider les résultats obtenus par 2D-DIGE. Par exemple, au cours d'une séparation par électrophorèse bidimensionnelle on assiste parfois à un phénomène de « co-migration » qui se traduit principalement par la présence au sein du même spot protéique de plusieurs protéines aux caractéristiques proches (pI et poids moléculaire). Ainsi, nous avons décidé de valider nos résultats obtenus par l'analyse en 2D-DIGE en utilisant d'autres techniques plus spécifiques (comme le WB ou l'immunocytochimie...). Dans la même optique, nous avons également décidé de vérifier que les différentiels d'abondance protéique se reflétaient au niveau fonctionnel sur l'activité enzymatique de certaines enzymes affectées par la transformation cancéreuse des astrocytes.

Nous avons également entrepris **d'établir un profil métabolique** comparatif des NA et des TA afin de mieux **caractériser les spécificités métaboliques** des TA et de mettre en évidence les **liens** entre les **adaptations protéomiques/enzymatiques** observées et les conséquences qu'elles peuvent avoir sur **l'abondance des métabolites** qui alimentent le catabolisme et/ou l'anabolisme de ces cellules.

Nous tenterons également de **déterminer le taux d'utilisation de certains métabolites comme source de carbone**. Ainsi nous étudierons l'utilisation du glucose, du lactate ou encore de la glutamine comme substrats métaboliques principaux en utilisant des substrats marqués au **carbone 13** et en suivant leur devenir à l'intérieur de la cellule ainsi que dans le milieu de culture.

5.1. Approche protéomique :

Dans cette étude, nous avons opté pour **une approche protéomique globale** sans a priori basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle (2D). Ainsi nous avons appliqué la technique du 2D-DIGE (Two-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis) couplée à la spectrométrie de masse (MALDI TOF et MALDI TOF TOF) pour sélectionner et identifier les protéines impliquées dans le processus de transformation des astrocytes. En effet, cette dernière décennie a connu une forte progression technologique dans le domaine des analyses protéomiques rendant les stratégies basées sur des techniques associées à l'étude des protéines plus puissantes, plus fiables et plus reproductibles. La 2D-DIGE, introduite en 1997 [207], est l'une des approches protéomiques ayant bénéficié de cette progression technologique faisant de celle-ci un puissant outil pour comprendre et caractériser au niveau moléculaire les adaptations cellulaires aux conditions physiologiques et pathologiques. Ainsi les investigations scientifiques basées sur des approches protéomiques (comme la 2D-DIGE) participent très activement à la compréhension de la pathobiologie de plusieurs tumeurs dont les tumeurs du cerveau, ce qui augmente les possibilités d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou de nouveaux marqueurs de diagnostic [208-211]. De plus, la communauté scientifique s'est accordée pour reconnaître la puissance analytique de la 2D-DIGE comme outil pour déterminer et quantifier les variations de l'abondance protéiques entre 2 échantillons, notamment grâce à l'utilisation d'un standard interne qui permet de simplifier l'analyse, de diminuer la variabilité inter-gels et de rendre possible la normalisation inter-gels.

La 2D-DIGE est une méthodologie basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle d'un mélange de protéines cellulaires qui ont été préalablement marquées avec des molécules fluorescentes puis mélangées pour migrer au sein du même gel.

Après la séparation électrophorétique des échantillons, intervient une analyse statistique rigoureuse pour sélectionner les spots dont l'abondance varie en fonction des conditions expérimentales étudiées. En effet, la détection et la quantification de chaque spot dans chaque échantillon sont réalisées par mesure de l'intensité de la fluorescence émise. Les spots sont ensuite appariés entre les différents gels (matching) et les signaux correspondants sont normalisés par rapport aux signaux obtenus à partir du standard interne présent dans chaque gel. Le standard interne peut être défini comme un échantillon représentatif des entités protéiques de tous les échantillons à analyser. Il est constitué d'un mélange, à part égale, de

tous les échantillons à analyser et est marqué par une molécule fluorescente différente de celle utilisées pour le marquage des échantillons à analyser.

Après normalisation, la moyenne des signaux de chaque spot est calculée pour chacune des conditions expérimentales. Cette moyenne est utilisée pour réaliser des comparaisons binaires entre ces conditions. Un seuil de changement de l'abondance (généralement fixé à un facteur de changement de 1,5) et une valeur p maximale (généralement $<0,05$) sont utilisés pour sélectionner les spots dont l'abondance varie entre les conditions expérimentales.

L'identification des protéines correspondant aux spots sélectionnés passe par un couplage entre la 2D-DIGE et la spectrométrie de masse.

Pour résumer, les approches protéomiques basées sur la 2D-DIGE constituent des méthodologies de choix pour détecter, identifier et quantifier l'abondance des enzymes et des protéines régulatrices impliquées dans diverses conditions métaboliques. Le choix de l'utilisation de ces approches se justifie par :

- ✓ Des procédures d'extraction, de détection et de quantification adaptées pour étudier des protéines cytoplasmiques abondantes comme les protéines impliquées dans de nombreuses voies métaboliques.
- ✓ L'analyse quantitative de mélanges de milliers de protéines intactes, permettant leur répartition et leur visualisation directe selon leur taille et leur point isoélectrique, reflétant leurs modifications post-traductionnelles.
- ✓ La précision du processus de quantification et la puissance des tests statistiques utilisés.
- ✓ La capacité de distinguer différentes isoformes de la même enzyme. Ces isoformes présentent parfois des propriétés enzymatiques distinctes ce qui conduit à des flux métaboliques différents.

5.2. Approche métabolomique :

De nombreuses études établissent un lien étroit entre la transformation cancéreuse et le métabolisme cellulaire [200, 212]. En effet, les métabolites constituent de vrais indicateurs de l'activité enzymatique [213]. Il est ainsi difficile d'établir un mécanisme moléculaire pour

expliquer les changements métaboliques qui surviennent dans les gliomes ou autre cancers en se basant uniquement sur des données d'analyses génétiques et/ou protéiques.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) semble être une technique de choix pour réaliser le profilage métabolique de nombreux échantillons biologiques sains ou pathologiques. Cette technique a été appliquée dans de nombreuses études visant à explorer les flux métaboliques de cellules en culture (comme les astrocytes) [214, 215] ou analyser les altérations métaboliques qui surgissent dans des certaines lignées cellulaires de gliomes humains [216].

Pour notre étude, nous avons décidé de combiner une approche métabolique basé sur la RMN proton et la RMN carbone 13 à notre approche protéomique afin d'améliorer la vue d'ensemble qu'on tente d'obtenir pour identifier les spécificités métaboliques impliquées dans la transformation astrocytaires. Cette deuxième approche nous permettra d'établir le profil métabolique des NA et des TA notamment grâce à l'analyse des métabolites présents dans le milieu de culture des NA et des TA ainsi que l'analyse des métabolites intracellulaires par RMN proton. Une investigation comparative du métabolisme des NA et des TA par RMN carbone 13 viendra compléter cette approche métabolomique et nous permettra de déterminer la contribution de certains métabolites (Glucose, lactate et glutamine) dans le métabolisme des TA par rapport aux NA.

**APPROCHES PROTÉOMIQUES ET
MÉTABOLISME CANCÉREUX**

Aujourd'hui, il est communément admis que les cellules cancéreuses exhibent une forte glycolyse et ce même en présence de concentrations normales d'oxygène. Cette particularité métabolique est à l'origine d'une importante consommation de glucose par les cellules cancéreuses. Cette forte consommation de glucose est exploitée en médecine clinique pour réaliser des imageries métaboliques (PET Scan) des tumeurs [217]. Cette caractéristique métabolique, également connue sous le nom d'effet Warburg, est considérée comme la plus fondamentale des altérations métaboliques qui surviennent au cours de la transformation cancéreuse.

Ces dernières années, les particularités métaboliques ont été réévaluées à la lumière des nouvelles données métaboliques obtenues grâce aux avancées technologiques dans plusieurs domaines notamment ceux de la protéomique et de la métabolomique. Cette réévaluation permet de confirmer et d'élargir le concept original de l'effet Warburg [218, 219].

En effet, plusieurs travaux basés sur des approches protéomiques révèlent une augmentation de l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques dans différents types de cancers (cancer du rein [220], adénocarcinome pancréatique [221]...). Ces observations sont en accord avec les caractéristiques métaboliques de l'effet Warburg. En plus, ces études indiquent une diminution de l'expression de nombreuses enzymes mitochondriales ce qui reflète un « shift » de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse et la production de lactate comme principaux processus de production d'énergie par les cellules cancéreuses.

Par ailleurs, de nombreuses études biochimiques, moléculaires et surtout protéomiques proposent des rôles multiples pour les enzymes glycolytiques dans les cellules cancéreuses et plus particulièrement dans les cellules souches cancéreuses. Ces constatations impliquent une grande complexité fonctionnelle liée aux adaptations métaboliques qui résultent habituellement d'altérations du pattern d'expression protéiques. Ces adaptations peuvent être exploitées dans le diagnostic, le pronostic ou encore servir pour orienter les thérapies cancéreuses.

D'une manière intéressante, les approches protéomiques ont été adoptées pour étudier et analyser le métabolisme cancéreux [203, 222-224]. En effet, de nombreuses études basées sur des approches protéomiques ont mis en lumière des particularités métaboliques spécifiques de certains isotypes de tumoraux.

Par exemple, Lee et ses collègues ont montré que les hépatocarcinomes semblent avoir des mécanismes de régulation de consommation de glucose différents de ceux utilisés par les cholangiocarcinomes même si les deux types de tumeurs exhibent une importante avidité pour le glucose [225]. Leurs résultats montrent que les cholangiocarcinomes expriment fortement le transporteur de glucose 1 (Glut 1), tandis que ce transporteur de glucose est absent de la quasi-totalité des hépatocarcinomes analysés. Par ailleurs, les hépatocarcinomes expriment fortement l'hexokinase 2 tandis que cette enzyme est absente de six cholangiocarcinomes analysés sur sept.

1. LA 2D-DIGE, UN OUTIL POUR ÉTUDIER LES CELLULES DE LA LIGNÉE ASTROGLIALE :

L'étude du métabolisme des cellules de la lignée astrogliale par approche protéomique basée sur le 2D-DIGE a été le sujet de seulement quelques articles scientifiques lors de ces dernières années. Ces études s'intéressent soit directement aux astrocytes et à leur métabolisme, soit aux maladies impliquant des astrocytes comme acteurs principaux ou secondaires.

Parmi ces études, certaines se sont intéressées aux précurseurs neuronaux (capables de se différencier, entre autre, en astrocytes et dotées de capacités d'autorenouveau et de multipotence). Ces cellules représentent un intérêt thérapeutique pour certaines maladies neurologiques. La compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la prolifération et la différenciation de ces progéniteurs constitue une étape primordiale dans l'élaboration des stratégies thérapeutiques impliquant ces cellules.

En 2007, Salim et ses collaborateurs ont comparé le protéome de précurseurs neuronaux à deux stades de différenciation en utilisant une approche protéomique basée sur la 2D-DIGE [226]. Cette étude met en lumière certaines protéines critiques dont l'action pourrait être ciblée pour induire la différenciation des progéniteurs neuronaux ou réguler l'activité du cycle cellulaire dans le cadre de certaines stratégies thérapeutiques. Les résultats qu'ils ont obtenus montrent en effet que les protéines associées à la différenciation des progéniteurs neuronaux étaient principalement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la réplication (Ex. DNA réplication licensing factor MCM7), dans la transcription (ex. elongation factor 1) et dans la synthèse et la dégradation des protéines (Ex. de nombreuses sous unités du protéasome : PSMA5, PSMC2, PSMD2, PSMD7 et PSMD13).

Ainsi, ces changements protéiques qui surviennent lors de la différenciation présentent de nombreux points communs avec les changements protéiques qui contrôlent le cycle cellulaire de certaines cellules cancéreuses et certaines populations cellulaires caractérisées par une prolifération rapide. En plus, les données obtenues mettent en évidence des régulations post-transcriptionnelles et post-translationnelles de certaines protéines.

2. LA 2D-DIGE ET LE MÉTABOLISME ASTROCYTAIRE :

La 2D-DIGE a été également utilisée pour étudier les adaptations du métabolisme astrocytaires suite à certains traitements.

Par exemple, Bindukumar et ses collègues se sont intéressés à l'effet des cannabinoïdes sur des astrocytes humains normaux (NHA pour Normal human astrocytes) [227]. Les auteurs ont traité des NHA avec du delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), principal agent psychoactif de la marijuana, pendant 48 heures. Ils ont étudié ensuite le profil génomique (par analyse de micro-puces) et le profil protéomique (par analyse protéomique basée sur la 2D-DIGE) des NHA traités et non traités.

Grace à l'analyse protéomique en 2D-DIGE, les auteurs ont pu sélectionner 31 spots différentiellement exprimés entre les NHA traités et les NHA non traités. Les protéines correspondantes sont impliquées dans plusieurs processus métaboliques comme la glycolyse (Ex. aldolase A, énoïase 1, pyruvate kinase...), le stress oxydatif (Ex. glutathion peroxydase) ou encore le métabolisme énergétique (Ex. créatine kinase).

Ces observations suggèrent que les cannabinoïdes sont capables d'agir sur de nombreux régulateurs physiologiques de l'activité cérébrale avec pour principale conséquence un effet neuroprotecteur. D'autres travaux soulignent également le rôle des cannabinoïdes dans la neuroprotection [228, 229].

Par ailleurs, d'autres travaux de recherche ont mis en lumière un rôle des cannabinoïdes dans la lutte contre le stress oxydatif [230, 231] et dans la protection des cellules gliales contre l'apoptose [232, 233]. Ces molécules jouent également un rôle anti-tumoral en induisant l'apoptose des cellules gliomateuses via la stimulation de la synthèse des céramides [234, 235].

3. LA 2D-DIGE, UN OUTIL DE CHOIX POUR ANALYSER LES GLIOMES :

L'utilisation de la 2D-DIGE comme outil pour étudier différentes formes de cancers, dont les glioblastomes, est de plus en plus courantes. De telles études ont but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou de nouveaux biomarqueurs de diagnostic ou de pronostic en établissant le profil protéique d'échantillons cancéreux.

Par exemple, en 2011, Collet et ses collègues ont comparé le profil protéique d'échantillons de glioblastomes et d'échantillons de cerveaux sains par 2D-DIGE dans le but de mettre en évidence de nouveaux antigènes tumoraux caractéristiques des glioblastomes [209].

Cette étude a révélé une augmentation de l'expression de 22 protéines entre les échantillons issus de patients atteints de glioblastome et les échantillons issus de patients sains. Les protéines identifiées étaient impliquées dans des voies métaboliques clés et participaient activement au processus tumorigénique. Les deux familles protéiques les plus affectées sont les protéines sanguines et les protéines cytosquelettiques.

Concernant les protéines sanguines, les auteurs ont identifié, entre autres, l'hémoglobine, l'apolipoprotéine A1, la sérum albumine ou encore l'alpha-2 globuline. Toutes ces protéines étaient plus abondantes dans les échantillons issus de patients atteints de glioblastomes. Cette augmentation reflète la grande capacité angiogénétique des gliomes. Ces observations sont en accord avec les résultats d'autres études qui désignent l'hémoglobine, l'apolipoprotéine et l'albumine comme des marqueurs biologiques des tumeurs cérébrales [236, 237].

Quant aux protéines cytosquelettiques, cette étude pointe une augmentation de l'abondance de la vimentine, l'alpha- et la bêta-tubuline, la bêta-actine et la GFAP dans les échantillons issus de patients atteints de glioblastomes. Ces protéines sont reconnues comme marqueurs des glioblastomes (Ex. L'expression de plusieurs isoformes de la tubuline est dérégulée dans plusieurs gliomes [238] et la GFAP semble être un marqueur sérique utile pour le diagnostic de certains gliomes [239]).

Les auteurs de cette étude ont également mis en évidence une altération de l'expression de certaines protéines mitochondriales et du réticulum endoplasmique comme

l'aldéhyde déshydrogénase 1 et la manganèse superoxyde dismutase. Cette dernière a été spécifiquement proposée comme marqueur pronostic de certains types de gliomes [240].

Pour conclure, les auteurs estiment qu'il est intéressant d'analyser le protéome mitochondrial des glioblastomes pour ouvrir de nouvelles voies aux avancées thérapeutiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. CULTURE CELLULAIRE :

1.1. Les astrocytes normaux :

Les cultures d'astrocytes normaux sont préparées à partir de cortex cérébraux de souris C57Bl6/J âgés de 1 à 2 jours en adaptant légèrement le protocole décrit par Sharif et al. en 2007 [140] et Prévot et al. en 2005 [241]. Brièvement, les cortex cérébraux sont dissociés mécaniquement et mis en culture dans un milieu MEM (Gibco, Life technologies, UK) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Lonza, BioWhittaker®, Belgique). Tous les 2 jours, les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS (Phosphate-buffered saline) froid à pH 7,4. Une fois à confluence, les cellules sont agitées toute une nuit à 250 r.p.m, trypsinisées et ensemencées dans des boîtes de 8 cm à une densité de 50.000 cellules/cm². Une fois la confluence atteinte dans les boîtes, les astrocytes sont privés de sérum pendant 48 h et rincés avec du PBS froid avant l'arrêt de la culture. Les cellules ainsi obtenues peuvent être directement utilisées pour la préparation des échantillons ou bien être congelées directement dans les boîtes pour une future utilisation. Les tests immunologiques réalisés pour estimer la pureté des cultures montrent que 91-96% des cellules sont des astrocytes positifs pour la GFAP tandis que seulement 4-9% des cellules sont des cellules microgliales positives au CD11b [140].

1.2. Les astrocytes transformés :

Les astrocytes transformés ont été mis à notre disposition par l'équipe du Docteur M.P. Junier. Ces cellules ont été obtenues à partir des astrocytes traités au TGF α [140] et irradié selon le protocole établi par Dufour et al [141]

Dans notre laboratoire, les astrocytes transformés ont été cultivés dans un milieu de culture composé d'une mixture de DMEM et de F12 (1 :1) (Invitrogen, France) contenant 0,6% de glucose, 2 mM de glutamine, 13 mM de bicarbonate de sodium, 5 mM de HEPES, 5 UI/ml de pénicilline, 5 μ g/ml de streptomycine et 10 μ l/ml du complément B27. Les changements de milieu se font à raison de 1 changement par semaine.

2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS :

2.1. Composition du tampon de lyse :

L'extraction protéique pour les expériences du 2D-DIGE est réalisée dans le tampon de lyse suivant à pH 8,5 :

- ✓ 7 M d'urée (GE Healthcare)
- ✓ 2 M de thiourée (GE Healthcare)
- ✓ 30 mM de Tris pH 8,8 (GE Healthcare)
- ✓ 2% (w/v) d'ASB-14 (Sigma)

2.2. Extraction protéique pour la 2D-DIGE :

Les NA et les TA sont collectés directement dans le tampon de lyse. Les tubes contenant les lysats cellulaires sont ensuite incubés dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes avant d'être centrifugés à 20.000g pour éliminer toutes impuretés et les éléments insolubles. Les surnageants obtenus seront précipités à l'aide du kit 2D Clean-up (GE Healthcare) afin d'éliminer les sels et les contaminants de bas poids moléculaire qui peuvent interférer avec le marquage des protéines aux CyDyes et avec certaines étapes de l'électrophorèse. Les culots issus de la précipitation sont resuspendus dans un volume adéquat de tampon de lyse. Pour un meilleur marquage aux CyDyes le pH des échantillons est ajusté à 8,5 à l'aide d'une solution de NaOH 100 mM.

La concentration protéique est évaluée grâce au kit « RC/DC Protein Assay » (Bio-Rad).

3. ANALYSE PROTÉOMIQUE :

L'analyse protéomique que nous avons réalisée pour comparer le protéome des NA et des TA est basée sur la technique du 2D-DIGE qui consiste à marquer les protéines de chaque échantillon avec des molécules fluorescentes (les CyDyes) et de les séparer en fonction de deux propriétés distinctes : le point isoélectrique (pI) et le poids moléculaire.

Dans un premier temps, les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel contenant un gradient de pH immobilisé (IPG pour Immobilized pH gradient), c'est l'isoélectrofocalisation (IEF). Lors de cette étape les protéines vont migrer dans le gel jusqu'à

une position où la valeur de pH est égale à celle de leur pI, point pour lequel la charge globale de la protéine est nulle.

La deuxième dimension ou SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) permet de séparer les protéines sur un gel de polyacrylamide en fonction de leur taille. Leur vitesse de migration étant inversement proportionnelle à leur taille.

Pour cette analyse protéomique nous avons comparé les protéomes de 4 cultures indépendantes de chaque type cellulaire (NA et TA), chacune constituant un réplicat biologique.

3.1. Préparation des tampons et solutions :

3.1.1. Tampon de réhydratation :

Le tampon de réhydratation sert à conditionner les gels de première dimension pour l'isoélectrofocalisation (IEF). Ceux-ci sont constitués par des languettes en plastique recouvertes, sur une de leur face, par un gel d'acrylamide séché contenant un gradient de pH non linéaire (NL pour Non Linear) s'étendant de pH 3 à pH 11.

La composition du tampon de réhydratation est la suivante :

- ✓ 7 M d'urée (GE Healthcare)
- ✓ 2 M de thiourée (GE Healthcare)
- ✓ 2% (w/v) d'ASB-14 (Sigma)
- ✓ 25 mM de DTT
- ✓ 0,6 % (v/v) d'IPG Buffer (pH 3-10 NL) (GE Healthcare)

3.1.2. Tampon d'équilibration :

Le tampon d'équilibration sert à préparer les strips ayant subi l'IEF à la seconde dimension de l'électrophorèse.

La composition du tampon d'équilibration est la suivante :

- ✓ 30 % (v/v) de glycérol
- ✓ 1,6 % (w/v) de SDS
- ✓ 6 M d'urée

- ✓ 50 mM de tris-HCl à pH 8.8

3.2. Marquage protéique aux CyDyes et électrophorèse bidimensionnelle :

Pour les gels analytiques, 25 µg de chaque réplicat biologique ont été marqués individuellement avec 200 pmoles de CyDyes (Cy3, Cy5, GE Healthcare) et incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante. En parallèle, un échantillon de référence (standard interne) est constitué en mélangeant en quantité égale tous les échantillons protéiques qui font partie de l'analyse. Ce standard interne est marqué à l'aide d'une troisième molécule fluorescente (Cy2) et servira à la normalisation intergels et à l'appariement des spots.

Après 30min, la réaction de marquage est stoppée avec de la lysine 10 mM et on peut procéder alors au « Multiplexing » des échantillons en mélangeant un échantillon protéique marqué au Cy3 avec un échantillon marqué au Cy5 auxquels on additionne 25 µg de standard interne marqué au Cy2. Le volume de chaque mélange d'échantillons est ajusté à 450 µl avec du tampon de réhydratation et mis en contact avec des strips IPG de 24 cm (pH3-10, NL) (GE Healthcare). Ensuite les strips sont placés dans l'unité de focalisation isoélectrique (IPGPhor, GE Healthcare) et on peut alors procéder à l'IEF en appliquant les paramètres suivants :

- ✓ 0 V pendant 8 H
- ✓ 500 V pendant 1H
- ✓ De 500 V 1000 V pendant 3H
- ✓ De 1000 V à 8000 V pendant 3H
- ✓ 8000 V jusqu'à l'accumulation de 70 kWh

Toutes les étapes de l'IEF se déroulent à 20°C avec un courant maximal de 50 mA par strip.

Avant de procéder à la seconde dimension, les strips sont incubés 15 min dans le tampon d'équilibration additionné de 1 % de DTT puis 15 min dans le tampon d'équilibration additionné de 5 % d'iodoacétamide. Les strips sont placés ensuite au-dessus des gels de seconde dimension et on peut alors procéder à l'électrophorèse. Cette séparation se déroule toute la nuit à voltage constant (50 V) et à une température de 30°C.

À la fin de la seconde dimension, les images des gels sont numérisées grâce à un scanner Typhoon 9400 (GE Healthcare). Chaque gel est scanné aux longueurs d'ondes d'émission correspondant à chaque CyDye à savoir 520 nm pour le Cy2, 580 nm pour le Cy3 et 670 nm pour le Cy5. On obtient ainsi trois images du même gel dont 2 correspondent aux deux échantillons à comparer et la troisième correspond au standard interne.

3.3. Analyse des images :

Les images des gels scannés sont analysées à l'aide du logiciel DyCyder 7.0 (GE Healthcare) qui permet, grâce à ses différents modules d'analyses, la détection des spots, l'appariement des gels, le calcul des volumes normalisés et la réalisation des calculs statistiques qui permettent de sélectionner les spots différentiellement exprimés entre les échantillons à comparer (NA et TA).

En effet, le module DIA (Differential In-gel Analysis) permet la co-détection, la soustraction du bruit de fond, la normalisation et la quantification des spots à partir des 3 images du même gel 2D-DIGE. Par ailleurs le module BVA (Biological Variation Analysis) permet quant à lui de réaliser l'appariement des gels entre eux et de réaliser les tests statistiques pour comparer les changements dans l'abondance protéique. L'appariement des gels consiste à appairer les spots des images des standards internes provenant de tous les gels faisant partie de l'analyse à une image de standard interne de référence. En général, cette image de référence correspond au gel le plus représentatif et contient le plus de spots avec une bonne qualité de séparation et de résolution.

Les spots protéiques montrant une variation d'abondance d'au moins 1,5 fois et un t-test statistiquement significatif ($p < 0,05$) ont été sélectionnés et soumis à une identification par spectrométrie de masse.

Un autre module est également disponible pour réaliser des analyses statistiques avancées ou réaliser une classification biologique (EDA : Extended Data Analysis).

3.4. Spectrométrie de masse :

En même temps que les gels analytiques, des électrophorèses préparatives d'aliqots de 200-300 μg de certains échantillons protéiques (marqués soit avec du Cy3 soit avec du Cy5) et 25 μg de standard interne (marqué au Cy2) ont été réalisés. Ces gels sont fixés dans

un bain de méthanol et d'acide acétique. Les images du standard interne des gels préparatifs ont été appariées avec l'image du gel de référence et des listes de « picking » sont générées qui permettront le pilotage automatique de l'excision et la collecte des pièces de gels par le spotpicker (GE Healthcare). Les pièces de gels (contenant les protéines d'intérêt) ainsi excisées subiront ensuite une digestion trypsique en suivant le protocole décrit par Mathy et al. [242] inspiré du protocole de Shevchenko [243]. Brièvement, les pièces de gels sont rincées 3 fois avec une solution 25 mM de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) puis déshydratées dans un bain d'acétonitrile 100 % (ACN) afin d'éliminer l'excès de détergents et tampon. Ensuite les pièces de gels sont réhydratées pendant 1h à 4°C avec 2 μl de trypsine de porc à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Roche) diluée dans du bicarbonate d'ammonium à 25 mM. Cette étape permet une meilleure diffusion de la trypsine dans les pièces de gels et prévient l'autolyse de la trypsine. Finalement, la température est amenée à 37°C pour une digestion overnight.

Une fois la digestion achevée, les peptides sont extraits en ajoutant 5 μl d'une solution contenant 1% d'acide trifluoroacétique (TFA) (v/v) et 30% d'ACN. 2 μl de cet extrait sont déposés sur un plaque MALDI (384-600 MTP Anchorchip MALDI target plate, Brüker Daltonic) dont les puits ont été préalablement traités avec une solution matrice constituée de 30 mg/mL d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) (Sigma) dilué dans l'acétone. Avant de déposer les échantillons sur la plaque MALDI, ces derniers ont été dessalés avec une solution de 10 mM de phosphate d'ammonium.

L'analyse des échantillons se fait grâce à un spectromètre de masse doté d'une source d'ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation), qui permet grâce à des tirs lasers d'ioniser les échantillons et de propulser les ions ainsi formés hors de la plaque, et d'un analyseur de type temps de vol (TOF pour Time-Of-Flight) qui permet de séparer les ions formés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). L'instrument que nous avons utilisé est un UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Brüker Daltonics). Les données obtenues à partir de chaque échantillon sont enregistrées sous forme de spectres. La première étape de l'analyse MALDI consiste à réaliser des spectres de masse appelés empreintes de masse peptidique (PMF pour Peptide mass fingerprint) avec un intervalle d'acquisition de masse de 70 à 4240 m/z. les pics les plus intenses sont ensuite sélectionnés et fragmentés dans une chambre de collision produisant ainsi des fragments dont les masse seront mesurées dans un second analyseur. L'analyse des fragments permet de déterminer la séquence des peptides. Cette seconde analyse est réalisée grâce à un « Lift MS/MS » avec un intervalle d'acquisition

de masse de 40 à 1100 m/z. les spectres obtenus à partir de chaque échantillon ont été traités et analysés à l'aide du logiciel BioTools (Brüker Daltonics) et l'identification des protéines réalisée en interrogeant le moteur de recherche Mascot (www.matrixscience.com). Les paramètres utilisés pour la recherche Mascot sont regroupés dans le tableau suivant :

| | PMF | MSMS |
|----------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Type de recherche | Peptide Mass Fingerprint | MS/MS Ion Search |
| Enzyme | Trypsine | Trypsine |
| Modifications fixes | Carbamidométhylation (Cys) | Carbamidométhylation (Cys) |
| Modifications Variables | Oxydation (Met) | Oxydation (Met) |
| Valeurs de Masse | Monoisotopique | Monoisotopique |
| Tolérance de masse (peptide) | ± 100 ppm | ± 100 ppm |
| Tolérance de masse (Fragment) | X | ± 0,3 Da |
| Etat de charge des peptides | 1+ | X |
| Nombre de clivages partiels autorisés | 1 | 1 |

L'identification des protéines a été réalisée en interrogeant 3 versions de la base de données UniprotKB/SwissProt. Les versions utilisées sont listées ci-après :

- i. La version A correspond à la version 57.1 publiée en Avril 2009 (462764 séquences; 163773385 résidus, taxonomie: Mus musculus).
- ii. La version B correspond à la version 57.7 publiée en Septembre 2009 (497293 séquences; 175274722 résidus, taxonomie: Mus musculus).
- iii. La version C correspond à la version de Mai 2014 (545388 séquences; 193948795 résidus, taxonomie: Mammalia).

4. WESTERN BLOT (WB) :

Pour les analyses par immunodétection (WB), les extraits protéiques sont obtenus par la lyse de cultures de NA et de TA avec un tampon de lyse composé de 20 mM de Tris base, 150 mM de NaCl, 2mM d'EDTA, 0,1 % (v/v) de triton X100 et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Meylan, France).

Brièvement, 25 µg de chaque extrait protéique ont été dilués dans le tampon de chargement (20 % v/v de glycérol; 2 % w/v de SDS; 0.1M de tris pH 6.8 ; 5 % v/v de β-mercaptoéthanol et quelques cristaux de bleu de bromophénol), puis séparés par électrophorèse sur un gel de 12 % d'acrylamide. À la fin de l'électrophorèse les protéines sont

transférées du gel vers une membrane PVDF à faible fluorescence (GE Healthcare) en utilisant un tampon de transfert constitué de 25 mM de tris, 192 mM de glycine et 20 % (v/v) de méthanol. Après le transfert les membranes sont colorées au rouge ponceau et scannées. Les images obtenues sont utilisées pour la normalisation du chargement des puits.

Habituellement, la coloration des membranes au rouge ponceau est appliquée pour contrôler la qualité du transfert. Cependant, des études récentes [244, 245] montrent que contrairement aux méthodes de normalisation basées sur la quantification de protéines ubiquitaires comme l'actine ou la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (dont l'abondance peut être affectée par certaines conditions expérimentales) la coloration au rouge ponceau constitue une approche de normalisation plus objective et plus précise.

Après la coloration, les membranes sont incubées pendant 45 min dans une solution tampon saline tris additionnée de 0,1 % de tween-20 (TBST pour Tris buffered saline with Tween 20) contenant 3 % (w/v) de lait déshydraté afin de saturer les sites de liaisons non spécifiques des membranes. Ensuite, les membranes sont incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Après 3 lavages au TBST les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) ou à la rhodamine Red-X (RRX) pendant 1h à température ambiante. Finalement, les membranes sont séchées 1h à 37°C et scannées grâce au scanner Typhoon 9400. Les images obtenues ont été ensuite analysées à l'aide du logiciel «1D gel analysis ImageQuantTL» (GE Healthcare) qui permet la détection des bandes protéiques et la quantification de leur intensité.

La liste des anticorps primaires utilisés au cours cette étude est reprise dans le tableau suivant :

| Nom | Source | Lot | Réf. | Spécificité | Dilution | MW (kDa) |
|----------|------------------------|----------|------------|------------------------|----------|----------|
| Eno A | abcam | 717671 | ab 49343 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/20.000 | 47 |
| TK (H50) | Santa Cruz | F2508 | sc-67120 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/200 | 78 |
| IDH 2 | Sigma | QC 18171 | SAB2101125 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/500 | 47 |
| DHE 3 | Chemicon International | 51001384 | AB1803 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/100 | 56 |
| GS | Sigma | 060M4768 | G2781 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/10 000 | 45 |
| PCB | Santa Cruz | L1211 | sc-67021 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/100 | 127 |
| MDH C | Santa Cruz | J3008 | sc-49233 | Goat polyclonal Ig G | 1/100 | 36 |
| GSTM 1 | Sigma | QC 12439 | AV41769 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/500 | 26 |
| PRDX 6 | Sigma | QC 22505 | AV48268 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/500 | 25 |
| GRP 78 | Stress Marq | 901 | SPC-107B | Rabbit polyclonal Ig G | 1/1000 | 78 |

Des anticorps spécifiquement dirigés contre la forme M1 ou M2 de la pyruvate kinase (PK) (PKM 1 et PKM 2) ont été produits en immunisant des lapins avec des séquences peptidiques spécifiques de chacune des isoformes. Chaque peptide a été couplé à l'hémocyanine de patelle (KHL pour keyhole limpet hemocyanin) comme protéine porteuse.

Les séquences peptidiques utilisées pour l'immunisation sont les suivantes :

- ✓ Pour PKM 1 : LFEELRRLAPITSDPTEA
- ✓ Pour PKM 2 : RLLFEELVRASSHSTDLME

Les sérums des lapins immunisés ont été utilisés pour détecter l'expression de la PKM 1 et la PKM 2 par WB sur des échantillons de NA et de TA.

5. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PYRUVATE KINASE :

La PK est une enzyme clé de la glycolyse. Elle catalyse le transfert d'un groupement phosphate à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) vers une molécule d'ADP générant ainsi une molécule de pyruvate et une molécule d'ATP ($PEP + ADP \rightarrow \text{pyruvate} + ATP$). La mesure expérimentale de l'activité enzymatique de la PK a été réalisée grâce au suivi de la diminution de l'absorbance à 340 nm qui résulte de la transformation du pyruvate en lactate sous l'action de LDH exogène ($NADH + \text{pyruvate} \rightarrow \text{lactate} + NAD$) [246].

La détermination expérimentale de l'activité de la PK a été réalisée à partir de 9 cultures indépendantes de NA et de TA. Les cellules (NA et TA) ont été récoltées dans une solution de lyse à pH 7,5 composée de 50 mM de triéthanolamine/HCl, 1mM d'EDTA, 2 mM de $MgCl_2$ et 26 mM de mercaptoéthanol. Pour démarrer la réaction, une quantité égale

d'extrait protéique (2,5 µg) a été ajoutée au milieu réactionnel (160 mM de triéthanolamine/HCl, 10 mM de MgCl₂, 80 mM de KCl, 0,17 mM de NADH, 5 mM d'ADP, 0,05 % de triton, 5 mM de PEP et 25 µg/ml de LDH).

Une unité d'activité enzymatique permet la conversion, en une minute à 30°C et à pH 7,5, d'une micromole de PEP en pyruvate.

6. SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUES DES ISOENZYMES DE LA LDH (ZYMOGRAPHIE) :

La zymographie des isoenzymes de la LDH a été adapté à partir du protocole décrit par Van Der Helm [247] et modifié par Malmqvist [248]. Les cellules (NA et TA) ont été récoltées et homogénéisées dans le tampon de lyse composé de 72 mM de Na₂HPO₄, 28 mM de NaH₂PO₄ à pH 7,2. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 10 min à 4°C et les surnageant obtenus ont été utilisés pour l'électrophorèse. Des échantillons issus de muscle squelettique (M) et de cœur (H pour heart) ont été utilisés comme référence afin de confirmer l'identité des isoenzymes de LDH détectées dans les NA et les TA.

Les extraits protéiques de NA, TA, M et H ont été ensuite séparés par électrophorèse non dénaturante sur un gel d'acrylamide (6% d'acrylamide dilué dans le tampon d'électrophorèse (410 mM de Na₂HPO₄ et 90 mM de KH₂PO₄ à pH 7,4)) pendant 2 h à 100 mA. À la fin de l'électrophorèse, le gel a été couvert par un papier filtre imbibé de solution de développement (208 mM de lactate de lithium, 5.6 mM de NAD, 2,4 de bleu nitro-tétrazolium chlorure et 0,33 mM de phénazine méthosulfate) et incubés pendant 30 min à 37°C. La réaction donnera naissance à la formation d'un précipité bleu insoluble qui révèle l'activité des isoenzymes de la LDH. Le zymogramme ainsi obtenu a été scanné à une résolution de 300 dpi et l'image analysée à l'aide du logiciel «1D gel analysis ImageQuantTL » (GE Healthcare) qui permet la quantification de l'intensité des bandes des isoenzymes de la LDH.

7. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA GLUTAMINE SYNTHÉTASE (GS) :

L'activité enzymatique de la GS a été déterminée de manière photométrique en suivant la formation du complexe L- γ-glutamylhydroxamate chlorure ferrique en se basant sur le protocole décrit par Wellner [249] . Brièvement, les NA et les TA ont été récoltés dans une solution de KCl/Cystéine (150/5 mM) puis incubés dans un bain à ultrasons. Les homogénats

ont été incubés 10 min à 37°C puis centrifugés à 14 000 g pendant 20 min à 4°C. Les surnageants résultants ont été utilisés pour la détermination de l'activité enzymatique de la GS. Le mix réactionnel est composé de 100 mM d'imidazole pH 7,2, 50 mM de glutamate de sodium, 10 mM de β -mercaptoéthanol, 20 mM de sodium ATP, 40 mM de $MgCl_2$ et 100 mM d'hydroxylamine pH 7,2.

La réaction est démarrée en ajoutant 75 μ l de mix réactionnel à 50 μ l de surnageant. Après 1h d'incubation à 37°C la réaction a été stoppée en ajoutant 150 μ l d'une solution composée de 370 mM de $FeCl_3$, 670 mM de HCl et 200 mM d'acide trichloracétique. Cette mixture a été ensuite incubée pendant 30 min à 4°C et à l'obscurité. L'absorbance de la mixture finale a été mesurée à 530 nm et une courbe d'étalonnage avec du γ -glutamylhydroxamate a été établie afin de déterminer l'activité GS dans les échantillons. Cette activité est exprimée en mM de γ -glutamylhydroxamate formé par heure et par milligramme de protéines à 37°C.

8. CONSOMMATION D'OXYGÈNE :

Le suivi, en temps réel, de la consommation d'oxygène par les NA et les TA a été réalisé à l'aide d'un lecteur «Sensor Dish Reader» (SDR) (Presens, Precision Sensing GmbH, Germany).

2×10^5 cellules NA et TA ont été cultivées dans des plaques 24 puits dotées de capteurs d'oxygène intégrés. Au bout de 24 h de culture le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture frais et la concentration d'oxygène dans le milieu de culture a été mesurée et enregistrée toutes les 2 minutes pendant 2 h.

9. ANALYSE MÉTABOLOMIQUE PAR RMN :

Les spectres RMN ont été enregistrés à 298 ° K sur un spectromètre « Bruker Avance » fonctionnant à 500,13 MHz pour le proton et équipé d'une sonde cryogénique de type TCI. L'eau deutérée a été utilisée comme contrôle interne. Les données ont été traitées avec le logiciel « Bruker TOSPIN 2.1 ». Les corrections de phase et de ligne de base ont été réalisées manuellement et l'échelle δ a été calibrée en utilisant le TMSP (Sodium 3-trimethylsilyl-propionate-2,2,3,3-d4) comme standard interne. Nous avons analysé les métabolites présent dans le milieu de culture des NA et des TA ainsi que les métabolites intracellulaires.

9.1. Analyse des métabolites présents dans le milieu de culture :

Pour ces expériences, les TA ont été cultivés pendant 48h avec du milieu de culture MEM contenant 10 % de SVF (le même milieu de culture que les NA). À la fin de ces 48h, les TA ont été rincés 2 fois avec du PBS et le milieu de culture remplacé par du milieu sans sérum. Simultanément, des cultures de NA ont également été privées de sérum. Après 24h de privation de sérum, le milieu de culture des NA et des TA est renouvelé avant le début de l'expérience. Les cellules ont été maintenues dans 12 ml de ce milieu durant 24h. Durant ces 24h nous avons collecté 500 µl de milieu à partir de chaque culture et ce à T0, 2, 6, 8,12 et 24h. chaque échantillons est ensuite supplémenté avec 100 µl de tampon phosphate (pH7,4) et 10 µl de TMSP avant de procéder à l'acquisition des spectres RMN.

Les spectres de RMN proton ont été acquis en utilisant une séquence 1D NOESY avec présaturation. Tandis que les spectres 2D ont été acquis en utilisant une séquence COSY avec présaturation.

Le dosage du lactate a été réalisé sur les spectres 2D COSY en utilisant l'intégrale du signal de phtalimide de potassium comme référence et l'intégrale du pic de corrélation de lactate. Une courbe de calibration entre la concentration du lactate et l'intégrale du pic de lactate en 2D Cosy a été établie afin de déterminer la concentration absolue de ce métabolite. La quantification de la glutamine a été réalisée sur les spectres 1D NOESY en intégrant le signal de la glutamine à 2,13 ppm et en utilisant de phtalimide de potassium comme standard interne.

9.2. Analyse des métabolites intracellulaires :

Pour ces expériences, les cellules ont été cultivées en suivant la même procédure que pour les cellules ayant servi pour l'analyse des métabolites présents dans le milieu de culture.

Après les 24h de privation de sérum, les cellules (NA et les TA) ont été lysées dans de l'eau deutérée et homogénéisées grâce à une sonde à ultrasons. Une petite fraction de cet homogénat (10 µl) a été utilisée pour déterminer la concentration protéique de chaque échantillon qui servira à normaliser les signaux obtenus par RMN tandis que l'autre fraction de l'homogénat (± 600 µl) a été utilisée pour l'acquisition des spectres RMN.

600 μ l de chaque extrait cellulaire ont été supplémentés de 100 μ l d'une solution d'acide maléique (35 mM), 100 μ l de tampon phosphate deutéré et 30 μ l de TMSP.

Les spectres de RMN proton ont été acquis en utilisant la séquence CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) avec présaturation. Les quantifications du lactate et de la glutamine ont été réalisées en intégrant le signal à 1,4 ppm pour le lactate et celui à 2,45 ppm pour la glutamine et en utilisant l'acide maléique comme standard interne.

RÉSULTATS

1. ANALYSE PROTÉOMIQUE COMPARATIVE DES NA ET DES TA :

Une image, en deux couleurs, représentative des autres images des gels analytique, illustre à la figure 10 la distribution des protéines dont l'abondance est augmentée chez les TA en rouge et celles dont l'abondance est diminuée chez les TA en vert.

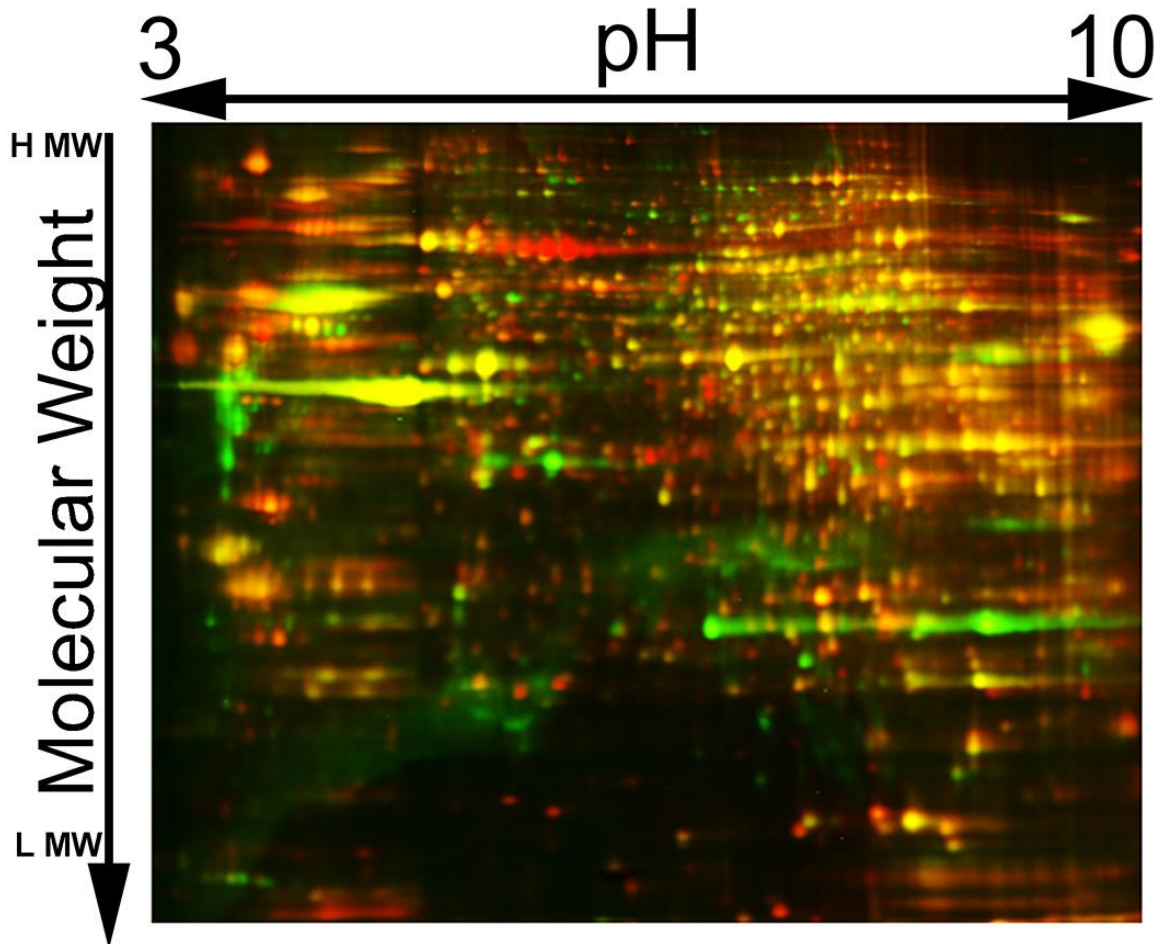


Figure 9 : Image fluorescente combinée d'une séparation bidimensionnelle des astrocytes normaux (NA) (marqués avec du Cy3 et représentés par les spots verts) et les astrocytes transformés (TA) (marqués avec du Cy5 et représentés par les spots rouges).

L'analyse des images grâce au logiciel Decyder nous a permis de sélectionner 277 spots dont le niveau d'expression est significativement changé ($\text{ratio} \geq 1,5$ et $p < 0,05$) entre les NA et les TA. Parmi ces spots, 117 spots sont plus abondants dans les TA que dans les NA tandis que 160 spots sont moins abondants dans les TA comparativement au NA (Fig. 10A).

L'analyse par spectrométrie de masse a permis de déterminer l'identité des protéines présentes dans 235 des 277 spots sélectionnés. Au total, 143 protéines uniques ont été identifiées (Fig. 10B et tableau 1). Un tableau complémentaire listant individuellement

chacun des spots différentiellement abondants entre les TA et les NA et contenant plus de détails sur l'identification des protéines est repris en annexe 2 (tableau A de l'annexe 2).

Tableau 1: liste des protéines dont l'abondance varie d'au moins de 1,5 fois ($p < 0,05$) entre les astrocytes normaux (NA) et les astrocytes transformés (TA). Les protéines ont été classées en fonction des processus biologiques dans lesquels les protéines sont impliquées. Cette classification a été établie sur base des listes de processus proposée par la base de données Uniprot.

Protein ID correspond à l'item « Entry name » dans la base de données UniprotKB/Swissprot.

Pour les protéines présentes dans plus qu'un spot, le nombre des spots correspondant à la même protéine est t indiqué entre parenthèses. Av. Ratio correspond au ratio moyen de l'abondance des spots dans les TA comparativement aux NA.

Les couleurs attribuées aux spots indiquent une surabondance du spot chez les TA lorsque le spot est renseigné en vert (valeurs positives) et une sous abondance chez les TA lorsqu'il est renseigné en rouge (valeur négatives).

| Protein ID | Protein Name | Av. Ratio (TA/NA) | pI | Da |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|-------|--------|
| Transcription, RNA metabolism and transport, nuclear proteins | | | | |
| RM22_MOUSE | 39S ribosomal protein L22; mitochondrial | -1,58 | 10,5 | 24018 |
| CHD1_MOUSE | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 | -5,27 | 7,1 | 197601 |
| ROA1_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | 4,22 | 9,7 | 34289 |
| HNRPF_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | 1,77 | 5,31 | 45730 |
| HNRH1_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (2) | 2,74 to 3,61 | 5,89 | 49454 |
| HNRPK_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (2) | 2,08 to 3,21 | 5,39 | 51230 |
| H12_MOUSE | Histone H1.2 | -4,23 | 11,5 | 21254 |
| H14_MOUSE | Histone H1.4 | 2,35 | 11,1 | 21846 |
| H2A1F_MOUSE | Histone H2A type 1-F (2) | 3,17 to 6,8 | 11,05 | 14162 |
| HXC11_MOUSE | Homeobox protein Hox-C11 | -1,85 | 9,5 | 34144 |
| NOP56_MOUSE | Nucleolar protein 56 | 19,4 | 9,22 | 64880 |
| PCIF1_MOUSE | Phosphorylated CTD-interacting factor 1 | -1,83 | 8,5 | 81423 |
| ST18_MOUSE | Suppression of tumorigenicity protein 18 | -1,67 | 6 | 116275 |
| UACA_MOUSE | Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats | 1,76 | 6,8 | 16969 |
| Protein synthesis, metabolism, processing, degradation | | | | |
| PSD12_MOUSE | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 | -1,72 | 6,71 | 53243 |
| RSSA_MOUSE | 40S ribosomal protein SA | -9,02 | 4,8 | 32931 |
| ARF4_MOUSE | ADP-ribosylation factor 4 | 1,95 | 6,81 | 20397 |
| SYDC_MOUSE | Aspartyl-tRNA synthetase; cytoplasmic (2) | -1,71 to -3,33 | 6,07 | 57537 |
| EF1A1_MOUSE | Elongation factor 1-alpha 1 | 1,58 | 9,1 | 50114 |
| EF1D_MOUSE | Elongation factor 1-delta | 2,72 | 4,91 | 31293 |
| EIF3I_MOUSE | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I | 3,3 | 5,38 | 36837 |
| SYG_MOUSE | Glycyl-tRNA synthetase | 3,55 | 6,24 | 8224 |
| LARP6_MOUSE | La-related protein 6 | -4,12 | 8,7 | 55067 |
| LGMN_MOUSE | Legumain | 2,49 | 5,72 | 34818 |
| DDAH1_MOUSE | N(G); N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 | -2,24 | 5,64 | 31760 |
| TRUB2_MOUSE | Probable tRNA pseudouridine synthase 2 | -4,94 | 9,7 | 37069 |
| PSA1_MOUSE | Proteasome subunit alpha type-1 | 2,41 | 6 | 29547 |
| PSA7_MOUSE | Proteasome subunit alpha type-7 | 1,72 | 8,59 | 28009 |
| PSB10_MOUSE | Proteasome subunit beta type-10 | -2,26 | 6,4 | 29330 |
| PSB3_MOUSE | Proteasome subunit beta type-3 | 2,29 | 6,15 | 22965 |
| SPB6_MOUSE | Serpin B6 | -2,34 | 5,53 | 42913 |
| SNX2_MOUSE | Sorting nexin-2 | 1,93 | 5,04 | 58549 |
| TCPQ_MOUSE | T-complex protein 1 subunit theta | 1,5 | 5,44 | 60088 |
| TPPC4_MOUSE | Trafficking protein particle complex subunit 4 | -1,57 | 5,83 | 24484 |
| Stress response | | | | |
| GRP78_MOUSE | 78 kDa glucose-regulated protein (6) | 3,07 to 6,25 | 5,07 | 72492 |
| AHSA1_MOUSE | Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 | -2,17 | 5,41 | 38321 |
| CATA_MOUSE | Catalase | -2,92 | 8,5 | 60013 |
| ERO1A_MOUSE | ERO1-like protein alpha | 3,49 | 6,12 | 54905 |
| GSTA4_MOUSE | Glutathione S-transferase A4 | -7,64 | 6,57 | 25547 |
| GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 (15) | -2,3 to -31,31 | 7,71 | 26067 |
| GSTM2_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 2 | -5,73 | 6,9 | 25871 |
| GSTM5_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 5 | -2,09 | 6,82 | 27016 |
| HSP7C_MOUSE | Heat shock cognate 71 kDa protein | 2,28 | 5,37 | 71055 |
| LGUL_MOUSE | Lactoylglutathione lyase | -2,56 | 5,24 | 29967 |
| PRDX1_MOUSE | Peroxiredoxin-1 (2) | -1,62 to -1,81 | 8,26 | 22390 |
| PRDX6_MOUSE | Peroxiredoxin-6 (6) | -2,57 to -18,96 | 5,71 | 24969 |
| PDI A3_MOUSE | Protein disulfide-isomerase A3 (2) | 2,74 to 3,53 | 5,88 | 57099 |
| PDI A6_MOUSE | Protein disulfide-isomerase A6 | 2,66 | 5 | 48469 |
| Cytoskeleton | | | | |

| | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------|--------|
| ACTB_MOUSE | Actin; cytoplasmic 1 | 3,09 | 5,29 | 42052 |
| ACTB_MOUSE | Actin; cytoplasmic 1 (13) | -2,36 to -5,18 | 5,29 | 42052 |
| ARPC2_MOUSE | Actin-related protein 2 to 3 complex subunit 2 | -4,45 | 7 | 34450 |
| ARP3_MOUSE | Actin-related protein 3 | 2,99 | 5,61 | 47783 |
| CAP1_MOUSE | Adenylyl cyclase-associated protein 1 | -2,08 | 7,16 | 51885 |
| ACTY_MOUSE | Beta-centractin | 2,01 | 5,98 | 42369 |
| DYH17_MOUSE | Dynein heavy chain 17; axonemal | -2,04 | 5,4 | 514983 |
| EZRI_MOUSE | Ezrin (3) | -3,52 to -6,16 | 5,83 | 69478 |
| FSCN1_MOUSE | Fascin | 2,24 | 6,44 | 55215 |
| FSCN1_MOUSE | Fascin | -3,07 | 6,44 | 55215 |
| GELS_MOUSE | Gelsolin | -2,24 | 5,8 | 86287 |
| GFAP_MOUSE | Glial fibrillary acidic protein (2) | -2,23 to -6,66 | 5,27 | 49927 |
| LMNA_MOUSE | Lamin-A/C | 2,73 | 6,37 | 65446 |
| LMNB1_MOUSE | Lamin-B1 | 2,51 | 5,11 | 66973 |
| MAP9_MOUSE | Microtubule-associated protein 9 | -3,3 | 7,8 | 73580 |
| MOES_MOUSE | Moesin (2) | -2,61 to -3,99 | 6,22 | 67839 |
| SEP11_MOUSE | Septin-11 (2) | -1,51 to -3,3 | 6,24 | 50005 |
| SEPT2_MOUSE | Septin-2 | 1,96 | 6,1 | 41727 |
| SEPT7_MOUSE | Septin-7 | -2,42 | 8,73 | 50550 |
| TCPE_MOUSE | T-complex protein 1 subunit epsilon | 1,93 | 5,72 | 60042 |
| TPM1_MOUSE | Tropomyosin alpha-1 chain (2) | -8,01 to -8,04 | 4,5 | 32718 |
| TBB2A_MOUSE | Tubulin beta-2A chain | 3,17 | 4,78 | 49907 |
| TBB2C_MOUSE | Tubulin beta-2C chain | 2,57 | 4,78 | 50095 |
| VIME_MOUSE | Vimentin | 3,25 to 6,91 | 5,06 | 53510 |
| VIME_MOUSE | Vimentin (6) | -1,92 to -12,12 | 4,9 | 53712 |
| MIO_MOUSE | WD repeat-containing protein mio | 3,18 | 6,27 | 99913 |
| Carbohydrate metabolism (Glycolysis and TCA cycle) and transport | | | | |
| ALD2_MOUSE | Aldose reductase-related protein 2 | 12,25 | 5,97 | 36440 |
| ENOA_MOUSE | Alpha-enolase (3) | 3,31 to 9,22 | 6,37 | 47453 |
| ENOB_MOUSE | Beta-enolase | 3,68 | 6,73 | 47337 |
| ALDOA_MOUSE | Fructose-bisphosphate aldolase A | 2,15 | 8,31 | 39787 |
| ALDOC_MOUSE | Fructose-bisphosphate aldolase C | -2,35 | 6,8 | 39796 |
| G6PI_MOUSE | Glucose-6-phosphate isomerase | -3 | 8,18 | 62767 |
| G3P_MOUSE | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (3) | 1,56 to 1,69 | 8,45 | 36072 |
| G3P_MOUSE | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | -1,61 | 9,2 | 36072 |
| GPDA_MOUSE | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]; cytoplasmic | 5,28 | 6,75 | 38176 |
| PYGB_MOUSE | Glycogen phosphorylase; brain form | -3,74 | 3,28 | 97353 |
| PYGM_MOUSE | Glycogen phosphorylase; muscle form | -1,93 | 6,7 | 97681 |
| LDHA_MOUSE | L-lactate dehydrogenase A chain (3) | 2,04 to 2,44 | 7,62 | 36817 |
| LDHB_MOUSE | L-lactate dehydrogenase B chain (4) | -3,04 to -21,32 | 5,7 | 36834 |
| MDHM_MOUSE | Malate dehydrogenase; mitochondrial (3) | 1,98 to 2,58 | 8,93 | 36045 |
| PGAM1_MOUSE | Phosphoglycerate mutase 1 (2) | 2,07 to 2,56 | 6,67 | 28928 |
| KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 (7) | 2,01 to 3,16 | 7,18 | 58378 |
| KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (3) | 2,78 to 4,71 | 7,18 | 58378 |
| KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 | -1,57 | 7,18 | 58378 |
| TALDO_MOUSE | Transaldolase | 3,82 | 6,57 | 37534 |
| TPIS_MOUSE | Triosephosphate isomerase | 3,09 | 6,9 | 27038 |
| UGPA_MOUSE | UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (2) | -1,81 to -2,22 | 7,18 | 57115 |
| Energy metabolism | | | | |
| ADK_MOUSE | Adenosine kinase | -3,91 | 5,8 | 40466 |
| KAD2_MOUSE | Adenylate kinase 2; mitochondrial | 1,63 | 6,96 | 26737 |
| ATPA_MOUSE | ATP synthase subunit alpha; mitochondrial | 2,2 | 8,28 | 55310 |
| ATPA_MOUSE | ATP synthase subunit alpha; mitochondrial | -0,254 | 9,7 | 59830 |
| ATPB_MOUSE | ATP synthase subunit beta; mitochondrial | 2,46 | 5,19 | 56265 |
| KCRB_MOUSE | Creatine kinase B-type | 4,48 | 5,4 | 42971 |
| KCRB_MOUSE | Creatine kinase B-type (3) | -2,32 to -2,96 | 5,4 | 42971 |
| ODO2_MOUSE | Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex; mitochondrial | 2,4 | 6,41 | 32145 |
| ODO2_MOUSE | Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex; mitochondrial | -1,99 | 9,9 | 49306 |
| IDHP_Mouse | Isocitrate dehydrogenase [NADP]; mitochondrial (2) | -1,72 to -8,92 | 8,88 | 51330 |
| SUCB2_MOUSE | Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta; mitochondrial | -3,1 | 6,58 | 47096 |
| Lipid metabolism and transport | | | | |
| HCD2_MOUSE | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 | -4,28 | 9,4 | 27516 |
| ACOT1_MOUSE | Acyl-coenzyme A thioesterase 1 | -2,68 | 6,1 | 46335 |
| INSI2_MOUSE | Insulin-induced gene 2 protein | -1,78 | 9,6 | 25298 |
| ACOX1_MOUSE | Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (2) | 1,84 to 2,4 | 8,64 | 74986 |
| Amino acid metabolism | | | | |
| GABT_MOUSE | 4-aminobutyrate aminotransferase; mitochondrial | -4,36 | 8,35 | 57100 |
| SERA_MOUSE | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase | -2,85 to -3,05 | 6,1 | 57347 |
| DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial (2) | 1,63 to 1,78 | 8,05 | 61640 |
| DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial (4) | -1,99 to -4,09 | 8,05 | 61640 |
| GLNA_MOUSE | Glutamine synthetase | -1,98 | 6,7 | 42834 |
| OAT_MOUSE | Ornithine aminotransferase; mitochondrial (2) | -1,17 to -2,24 | 6,19 | 48723 |
| Nucleic acid | | | | |
| BPNT1_MOUSE | 3'(2'); 5'-bisphosphate nucleotidase 1 | 1,92 | 5,54 | 33517 |

| | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------|------|--------|
| NDKB_MOUSE | Nucleoside diphosphate kinase B | 2,52 | 6,97 | 17466 |
| KCY_MOUSE | UMP-CMP kinase | 1,79 | 5,68 | 22165 |
| Signal transduction | | | | |
| 1433T_MOUSE | 14-3-3 protein theta | 2,06 | 4,69 | 28046 |
| 1433Z_MOUSE | 14-3-3 protein zeta/delta | 2,21 | 4,73 | 27925 |
| ANXA2_MOUSE | Annexin A2 | -1,51 | 7,55 | 38937 |
| ANXA3_MOUSE | Annexin A3 (2) | -3,72 to -8,98 | 5,33 | 36520 |
| ANXA5_MOUSE | Annexin A5 (4) | 2,57 to 4,58 | 4,83 | 35787 |
| GBB1_MOUSE | Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 | -2,3 | 5,6 | 38151 |
| GNAO_MOUSE | Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha | -2,56 | 5,34 | 40629 |
| GDIB_MOUSE | Rab GDP dissociation inhibitor beta | -2,09 | 5,9 | 51018 |
| RAB5A_MOUSE | Ras-related protein Rab-5A | 1,84 | 8,32 | 23599 |
| RAB5C_MOUSE | Ras-related protein Rab-5C | -6,24 | 8,64 | 23626 |
| PP2BA_MOUSE | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform | 3,33 | 5,58 | 58644 |
| Cell cycle/ Cell death | | | | |
| CDKL5_MOUSE | Cyclin-dependent kinase-like 5 | 3,08 | 9,6 | 105498 |
| Miscellaneous | | | | |
| FTHFD_MOUSE | 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase | -5,15 | 5,64 | 99502 |
| RT31_MOUSE | 28S ribosomal protein S31; mitochondrial | 2,63 | 6,71 | 37966 |
| CALU_MOUSE | Calumenin | 4,86 | 4,49 | 37155 |
| DPYL2_MOUSE | Dihydropyrimidinase-related protein 2 (2) | -1,66 to -6,92 | 5,95 | 62638 |
| DPYL3_MOUSE | Dihydropyrimidinase-related protein 3 | -2,46 | 6 | 62296 |
| HYEP_MOUSE | Epoxide hydrolase 1 | -3,42 | 8,74 | 52713 |
| FRIH_MOUSE | Ferritin heavy chain | 4,11 | 5,33 | 21224 |
| PGRC2_MOUSE | Membrane-associated progesterone receptor component 2 | 3,89 | 4,9 | 23434 |
| PUR6_MOUSE | Multifunctional protein ADE2 | -1,87 | 6,94 | 47781 |
| PLST_MOUSE | Plastin-3 | 2,27 | 5,42 | 72210 |
| F115A_MOUSE | Protein FAM115A | -2,24 | 6,6 | 103696 |
| ALBU_BOVIN | Serum albumin | 2,47 to 39,46 | 5,53 | 68693 |
| TAGL2_MOUSE | Transgelin-2 | 2,62 | 8,44 | 22250 |
| DCUP_MOUSE | Uroporphyrinogen decarboxylase | 3,1 | 6,21 | 40951 |

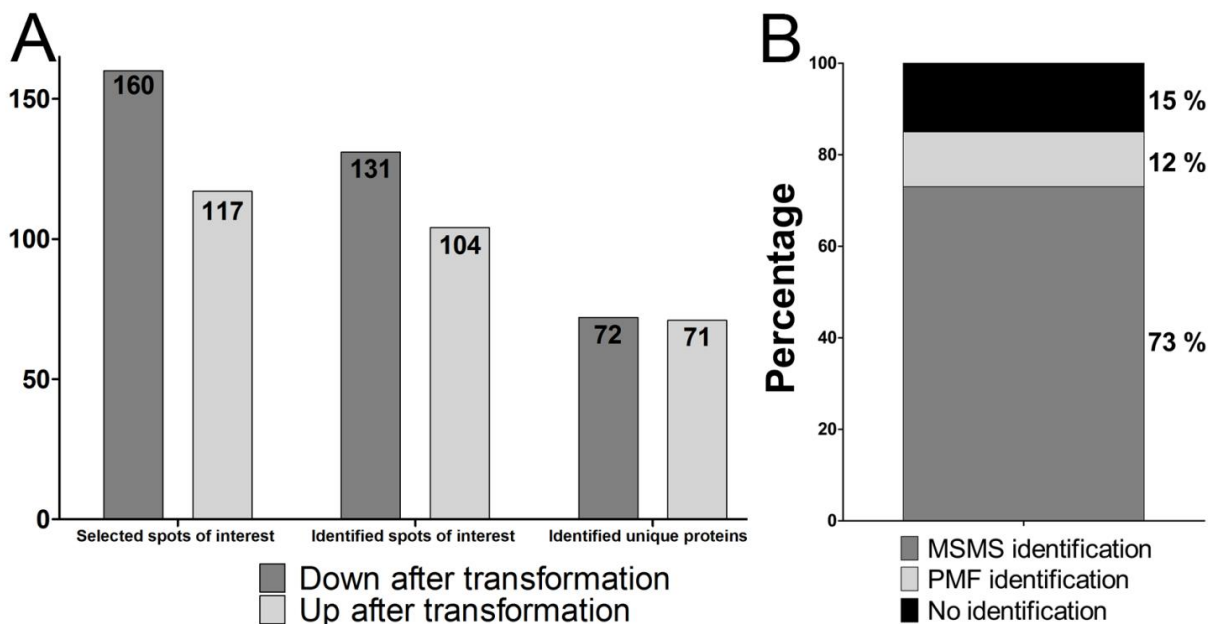


Figure 10 :

A) Représentation graphique des résultats de l'analyse 2D-DIGE des protéomes des NA et des TA.

B) Pourcentage d'identification des protéines par spectrométrie de masse.

La classification des protéines identifiées à l'aide du logiciel « Ingenuity Pathway Analysis » (IPA) révèle que plusieurs voies métaboliques sont concernées par la transformation cancéreuse des astrocytes (Fig. 11).

Il s'agit principalement d'enzymes impliquées dans :

- ✓ Le métabolisme du glucose (glycolyse, gluconéogenèse, fermentation lactique),
- ✓ Le métabolisme du glycogène (dégradation et biosynthèse du glycogène),
- ✓ Le métabolisme des acides aminés comme le glutamate, la glutamine, l'arginine, l'aspartate, l'alanine, la proline ou encore la sérine,
- ✓ Le métabolisme des nucléotides (purine et pyrimidine)
- ✓ La production d'énergie (cycle de Krebs et synthèse de phosphocréatine)
- ✓ La réponse au stress oxydatif (des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion ou dans la voie des PPP).

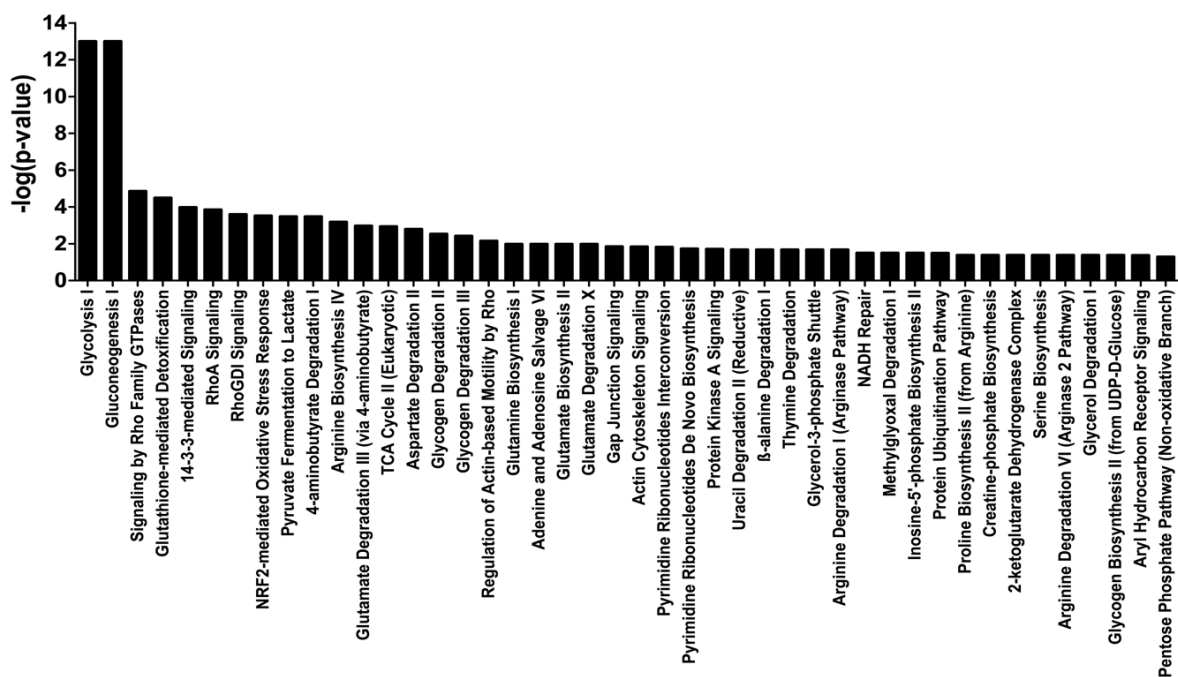


Figure 11 : Répartition des protéines identifiées et présentant un différentiel d'abondance entre les NA et les TA en fonction des voies canoniques dans lesquelles ces protéines sont impliquées. Classification basée sur une analyse Ingenuity.

D'une manière intéressante, nous observons une augmentation de l'abondance de plusieurs enzymes impliquées dans la glycolyse (ex. éno­lase, aldolase, triose phosphate isomérase, PK, GAPDH...) (Fig. 12A) et dans le PPP (ex. transaldolase) suite à la transformation cancéreuse des astrocytes. Au contraire, nous observons une diminution de l'abondance de plusieurs enzymes impliquées dans le cycle de Krebs ainsi que de certaines fonctions astrocytaires (Fig. 12B) suite à la transformation des astrocytes. Nous constatons

également une diminution de certaines protéines de structure (Fig. 13) dans les TA comparativement aux NA.

La figure 14 permet de mieux illustrer les changements protéiques qui se produisent au cours de la transformation cancéreuse des astrocytes.

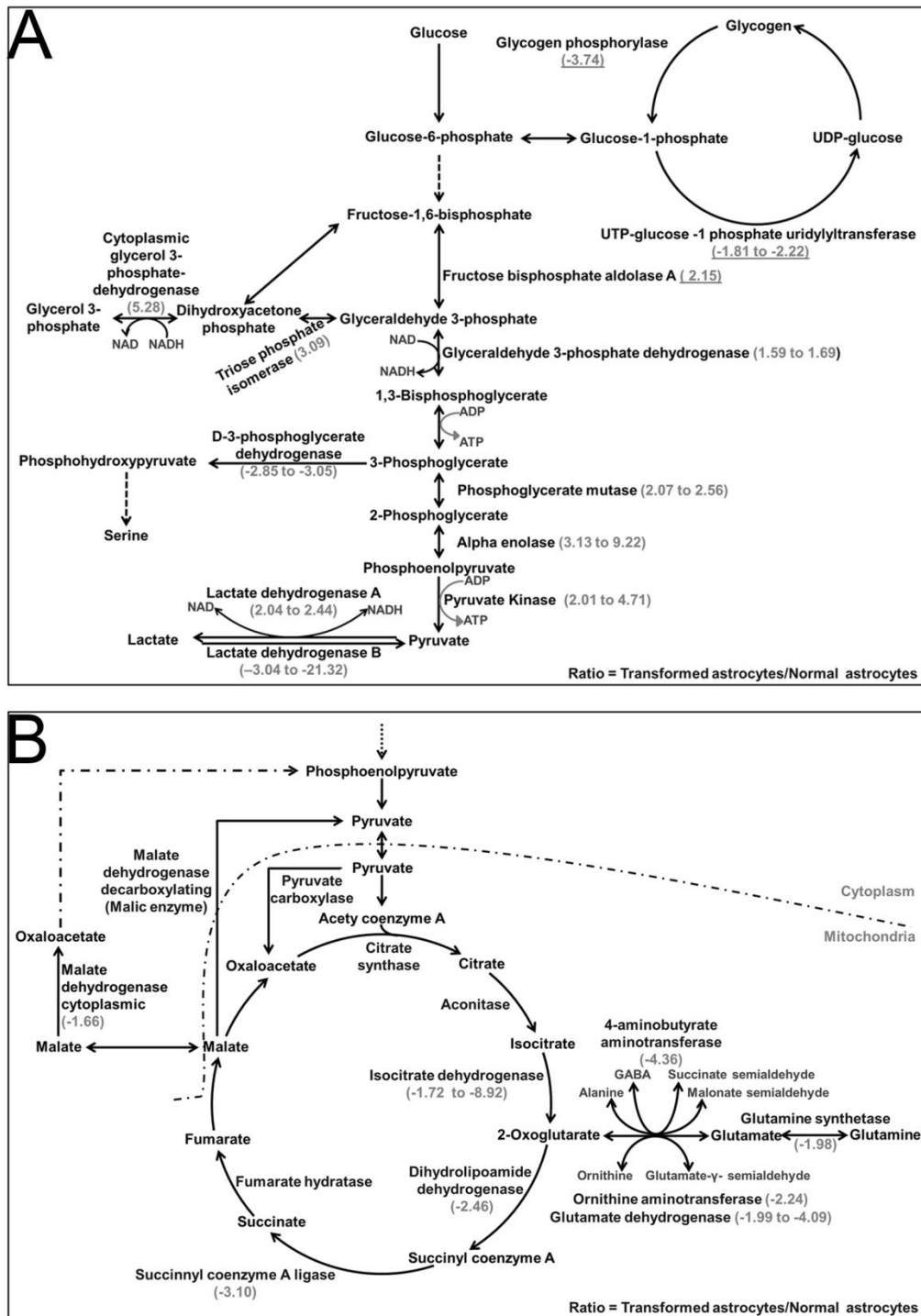


Figure 12 : Métabolisme des carbohydrates et du glutamate dans les NA et les TA. Sur cette illustration sont indiqués les noms des enzymes identifiées et leur ratio d'abondance. (A) Glycolyse et métabolisme du glycogène ; (B) Cycle de Krebs et métabolisme du glutamate. Les enzymes non associées à un ratio d'abondance n'ont pas été identifiées dans notre analyse.

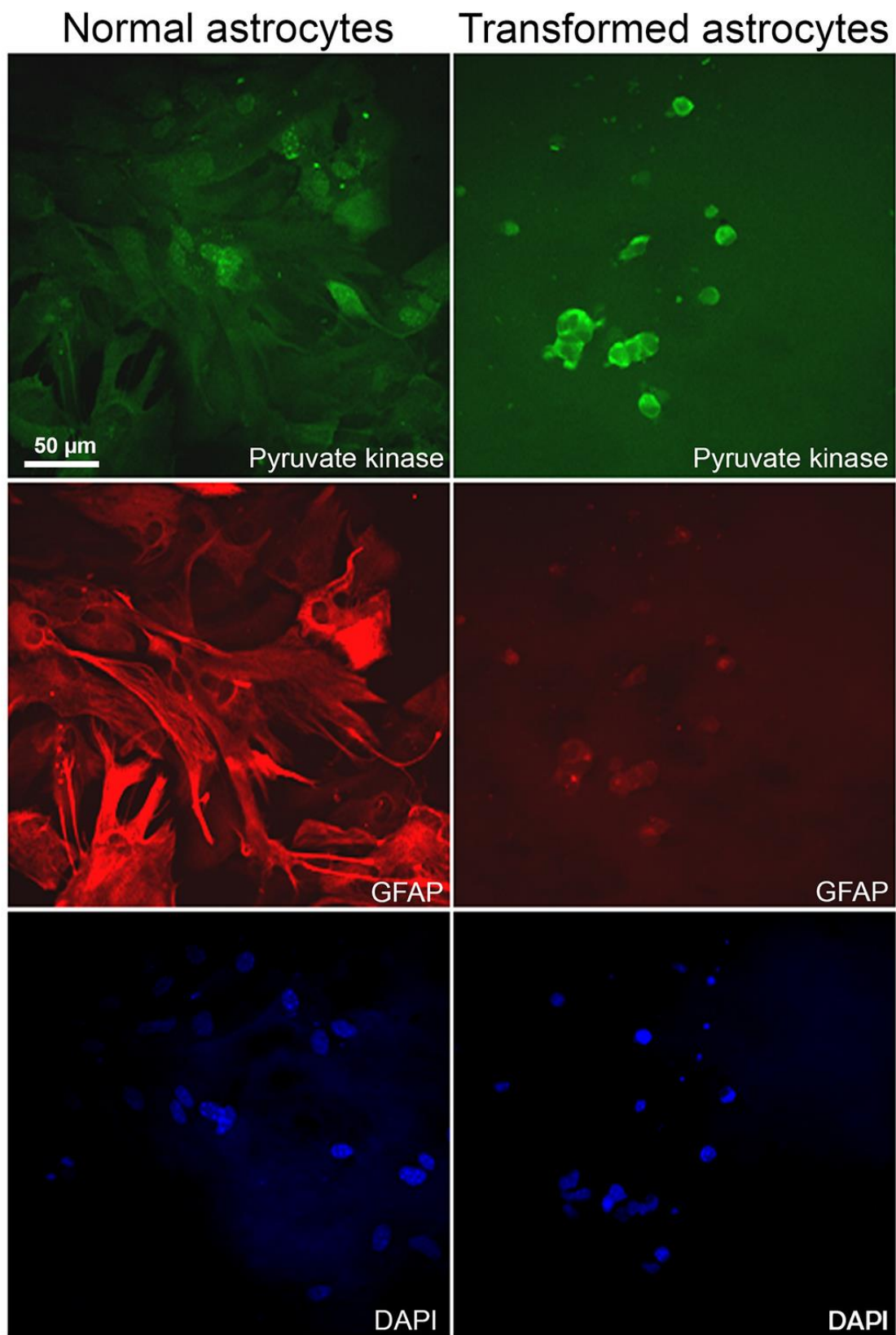


Figure 13 : Immunomarquage de la pyruvate kinase et de la GFAP chez les NA et les TA. Les cellules ont été marquées avec des anticorps dirigés contre la PK (vert) et contre la GFAP (rouge). Les noyaux ont été colorés avec du DAPI (Bleu). La barre d'échelle représente 50 μ m.

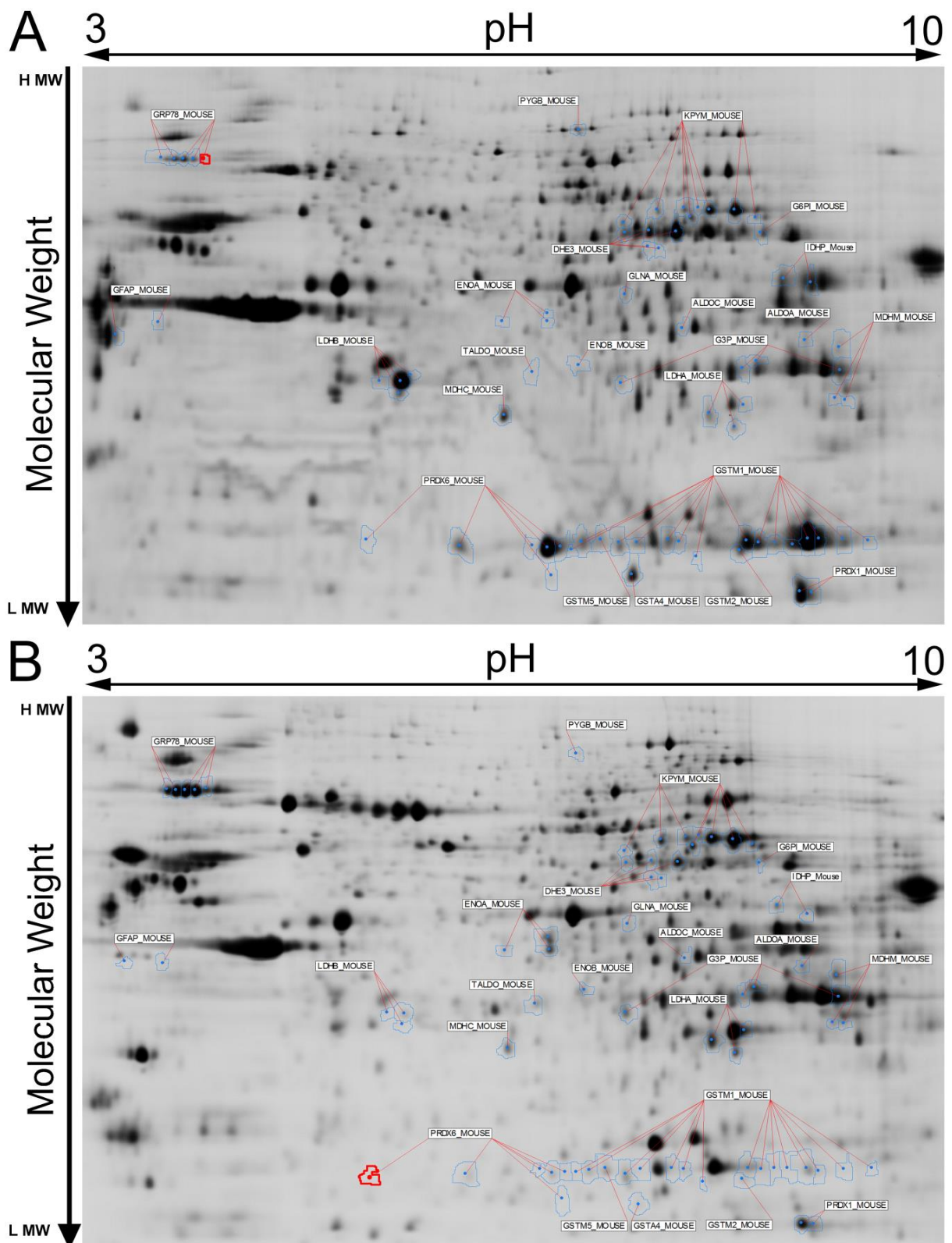


Figure 14 : Images de gels illustrant la position et l'identité protéique des spots avec un important différentiel d'abondance entre les deux types cellulaires. (A), NA ; (B), TA. Voir le tableau 1 et annexe 2 pour l'identité des protéines.

2. LA TRANSFORMATION CANCÉREUSE DES ASTROCYTES EST ACCOMPAGNÉE PAR L'AUGMENTATION DE LEUR CAPACITÉ GLYCOLYTIQUE :

Notre analyse 2D-DIGE montre que par rapport aux NA, les TA présentent un niveau d'abondance plus élevé pour 7 enzymes impliquées dans la glycolyse (Fig. 12A).

Ainsi nous constatons une augmentation de l'abondance de la Fructose-bisphosphate aldolase A (x2,15), la Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (de x1,59 à x1,69), la Phosphoglycerate mutase 1 (de x2,07 à x2,56), l'Alpha émolase (de x3,13 à x9,22), la Pyruvate kinase isoenzyme M2 (de x2,01 à x3,16). Nous avons également constaté une augmentation de l'abondance de la chaîne A de LDH (de x2,04 à x2,44) et une diminution de la chaîne B (de x-,3.04 à x-21,32) de cette même enzyme.

Certaines de ses observations ont été confirmées par d'autres techniques quantitatives comme le WB ou la mesure de l'activité enzymatique.

Ainsi nous avons quantifié le niveau d'expression de l'alpha émolase (ENO A) dans les NA et TA par WB et nos résultats montrent que, par rapport aux NA, les TA expriment plus fortement l'ENO A (Fig. 15).

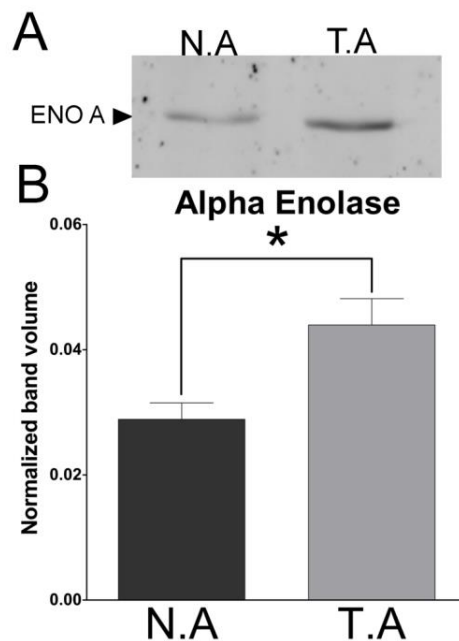


Figure 15: (A) Analyse par WB de l'expression de l'Alpha émolase (ENO A) dans des extraits protéiques de NA et de TA. (B), les intensités des bandes de ENO A ont été normalisées par rapport aux intensités du rouge ponceau. L'expression protéique de ENO A était plus importante dans les TA ($0,044 \pm 0,004$; $n=4$) que dans les NA ($0,029 \pm 0,0026$; $n=4$) avec une valeur $p = 0,023$. Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM.

Nous nous sommes également intéressés à l'expression protéique de PKM 1 et PKM 2 ainsi qu'à l'activité enzymatique globale des PK. Ces deux isoformes de la PK sont générées par épissage alternatif du même messager et leurs séquences protéiques ne diffèrent que par 21 acides aminés ce qui rend la distinction entre les deux isoformes par spectrométrie de masse assez difficile. Malgré cette faible différence de séquence entre PKM 1 et PKM 2 nous avons identifié 7 spots comme étant de la PKM 2 (spot 908, 932, 945,956, 957, 985 et 993). Cependant, l'identité de 4 spots reste indéterminée (spot 1767, 1795,1844 et 1010). Ces spots ont été référencés comme étant PKM 1/2.

Ainsi nous avons décidé de vérifier l'expression des isoformes M 1 et M 2 de la PK dans les NA et les TA par WB quantitatif en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre l'une ou l'autre isoforme. Les résultats obtenus montrent que les deux isoformes, PKM 1 et PKM 2, sont plus abondantes dans les TA par rapport aux NA (Fig. 16 A-B).

Nous avons également mesuré l'activité enzymatique globale des PK dans les extraits protéiques de NA et de TA et nous avons constaté un doublement de l'activité pyruvate kinase dans les TA comparativement aux NA.

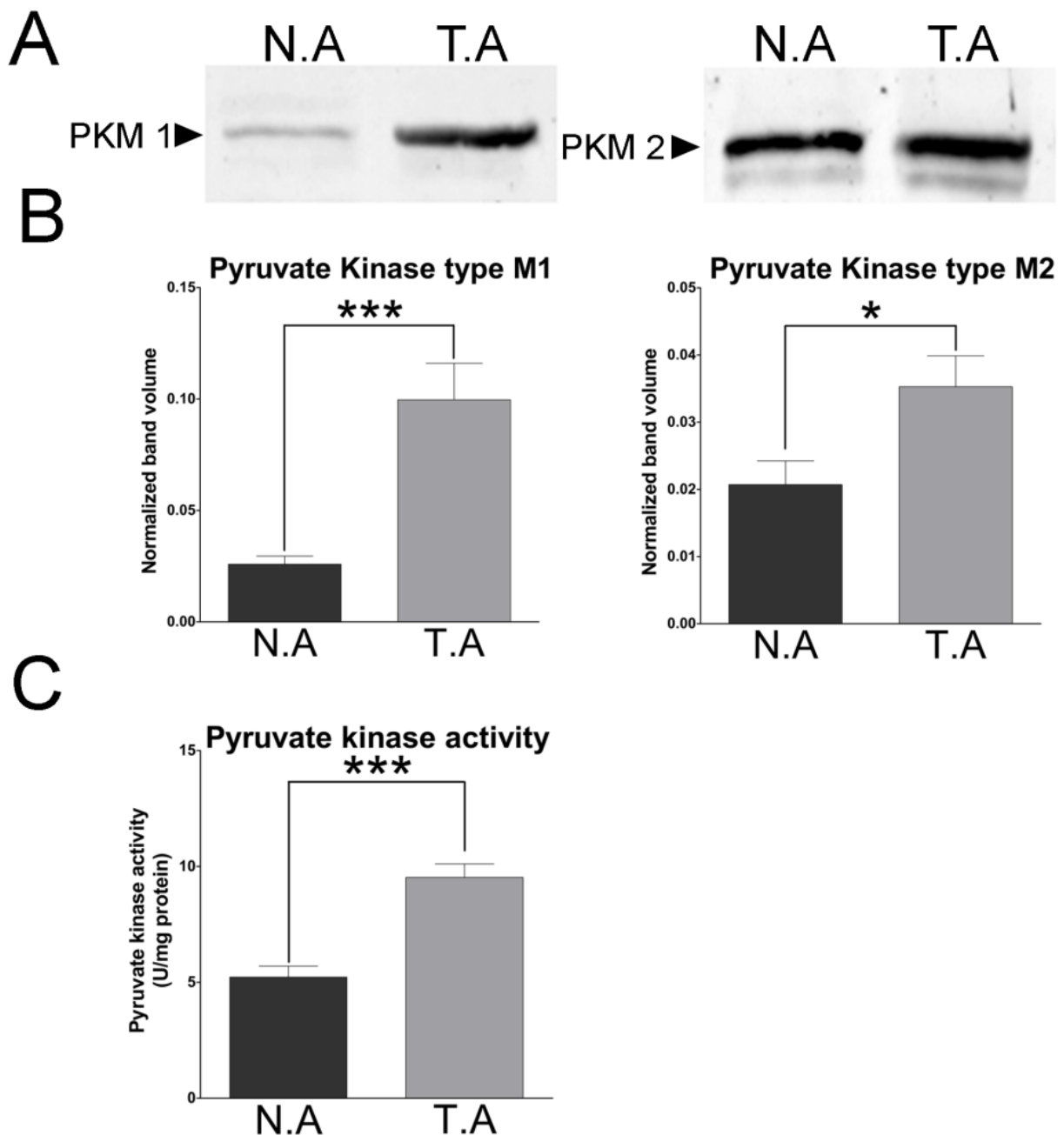


Figure 16 : Quantification de l'expression protéique des isoformes M1 et M2 de la pyruvate kinase et détermination de l'activité enzymatique PK dans les NA et les TA. (A) Analyse par WB de l'expression de PKM1 et PKM2 dans des extraits protéiques de NA et de TA. (B) Les intensités des bandes de PKM1 et PKM2 ont été normalisées par rapport aux intensités du rouge ponceau. Une augmentation significative de l'expression des 2 isoformes de la PK a été observée dans les TA. Dans les TA l'intensité de la bande de PKM1 était de $0,099 \pm 0,016$ tandis que dans les NA elle n'était que de $0,026 \pm 0,003$ avec une valeur $p = 0,0005$ et $n = 9$. Pour la PKM2, dans les TA l'intensité de la bande était de $0,035 \pm 0,0045$ alors que dans les NA l'intensité était seulement de $0,020 \pm 0,003$ avec une valeur $p = 0,02$ et $n = 9$. Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM. (C) Les TA présentent une activité enzymatique deux fois supérieure ($9,5 \pm 0,57$ unité enzymatique par mg de protéine, $n=9$) à celle des NA ($5,2 \pm 0,47$ unité enzymatique par mg de protéine, $n=9$) avec une valeur $p < 0,0001$. Une unité d'activité enzymatique permet la conversion de 1 micromole de PEP en pyruvate par min à 30°C et à pH 7,5.

3. CONSÉQUENCES MÉTABOLIQUES DE LA SUREXPRESSIION DE PKM 2 DANS LES TA :

Contrairement aux autres membres de la famille des PK (L, R et M 1) caractérisés par une structure quaternaire en tétramère, PKM 2 est capable de produire, en plus de la forme tétramérique, une forme dimérique [250-253]. Les propriétés cinétique de ces deux conformations de PKM 2 sont très distinctes et engendrent des bilans énergétiques et métaboliques différents.

La forme tétramérique est caractérisée par une forte affinité pour son substrat, le PEP, et permet la production de pyruvate à partir de glucose. Quant à la forme dimérique de la PKM 2, elle présente une faible affinité au PEP et elle est inactive dans des conditions physiologiques de concentrations en PEP, ce qui permet un ralentissement de la glycolyse en aval de la PK et une accumulation des intermédiaires métaboliques produit en amont de la réaction de la PK. Ces intermédiaires métaboliques accumulés serviront de précurseurs pour alimenter certains processus anabolique comme la voie des PPP favorisant ainsi la prolifération cellulaire [253-258].

Ainsi en fonction de la forme de PKM 2 exprimée majoritairement à un stade de la progression tumorale ou par une fraction des cellules présentes dans une masse tumorale ou une culture de cellules, différentes adaptations métaboliques, non-mutuellement exclusives dans un système dynamique peuvent être observées.

Lorsque la forme tétramérique de PKM 2 est prépondérante, du lactate sera produit à partir du pyruvate, ainsi qu'une molécule de NAD^+ qui sera utilisée pour la réaction catalysée par la glyceraldéhyde 3P déshydrogénase [255]. En effet, les tumeurs et les cellules cancéreuses doivent disposer de niveaux suffisants de NAD^+ oxydé afin de pouvoir maintenir un taux élevé de glycolyse même dans des conditions de faible concentration en oxygène. Par ailleurs, afin de régénérer ce stock de NAD^+ , il existe aussi des navettes qui permettent l'échange d'équivalents de réduction entre le cytoplasme et la mitochondrie.

Principalement, la navette « malate/aspartate » fonctionne grâce à l'activité de la malate déshydrogénase (MDH) catalysant une réaction d'oxydoréduction entre le couple malate/oxaloacétate et le coenzyme NAD^+/NADH .

Une deuxième navette qui permet l'entrée dans les mitochondries du pouvoir réducteur porté par le NADH cytoplasmique est la navette « glycérol 3-phosphate/dihydroxyacétone ». Cette navette catalyse la réduction du dihydroxyacétone phosphate en glycérol 3-phosphate sous l'action de la glycérol 3-phosphate déshydrogénase cytoplasmique. Le glycérol 3-phosphate formé au cours de cette réaction transitera par la suite vers la mitochondrie où il sera oxydé en dihydroxyacétone phosphate par la glycérol 3-phosphate déshydrogénase mitochondriale dont le coenzyme est le FAD. Ainsi à chaque NAD réduit dans le cytoplasme correspond une molécule de FAD réduit formée dans la mitochondrie. .

A ce sujet les résultats de l'analyse protéomique indiquent une faible abondance de la forme cytoplasmique de la MDH (MDH C) dans les TA. Cette diminution d'expression a été confirmée par WB (Fig. 21B). Au contraire, notre analyse montre une augmentation de l'abondance de la glycérol 3-phosphate déshydrogénase cytoplasmique. Ces observations suggèrent que les TA recycleraient une partie des équivalents redox via la navette « glycérol 3-phosphate/dihydroxyacétone ».

La LDH catalyse la dernière étape de la glycolyse permettant ainsi l'interconversion du pyruvate et du lactate. Nos résultats de 2D-DIGE montrent que les TA expriment majoritairement la chaîne A de la LDH tandis que les NA expriment principalement la chaîne B (Fig. 17A, C et D). Ces observations suggèrent un important switch dans l'expression des isoformes de la LDH suite à la transformation cancéreuse des astrocytes.

Afin de caractériser le pattern d'expression des différentes formes de LDH (constituées par la combinaison des chaînes A et B pour former des tétramères) dans les NA et les TA, nous avons analysé les échantillons protéiques des deux types cellulaires par zymographie.

Conformément aux résultats de notre analyse protéomique, nous constatons que (Fig. 17B) :

- ✓ les TA expriment majoritairement la LDH 5 (LDH A₄) et la LDH 4 (LDH A₃B₁). Ils présentent également une faible expression de la LDH3 (LDH A₂B₂) et un niveau non détectable des isoenzymes LDH 2 et LDH1 (LDH A₁B₃ et LDH B₄).

- ✓ Les NA expriment de manière équivalente les 5 isoenzymes de la LDH (LDH1, 2, 3, 4 et 5).

Les conséquences de cette modulation de l'expression des isoenzymes de la LDH ont été évaluées par RMN en mesurant les concentrations du lactate intracellulaire et du lactate sécrété dans le milieu de culture. Les mesures montrent que la concentration du lactate intracellulaire était réduite de moitié dans les TA par rapport aux NA (Fig. 17E) tandis que la concentration du lactate sécrété doublait au bout de 12 h de culture dans le milieu de culture des TA comparativement aux NA (Fig. 17F). Ces résultats suggèrent une augmentation du transport de ce métabolite par les TA.

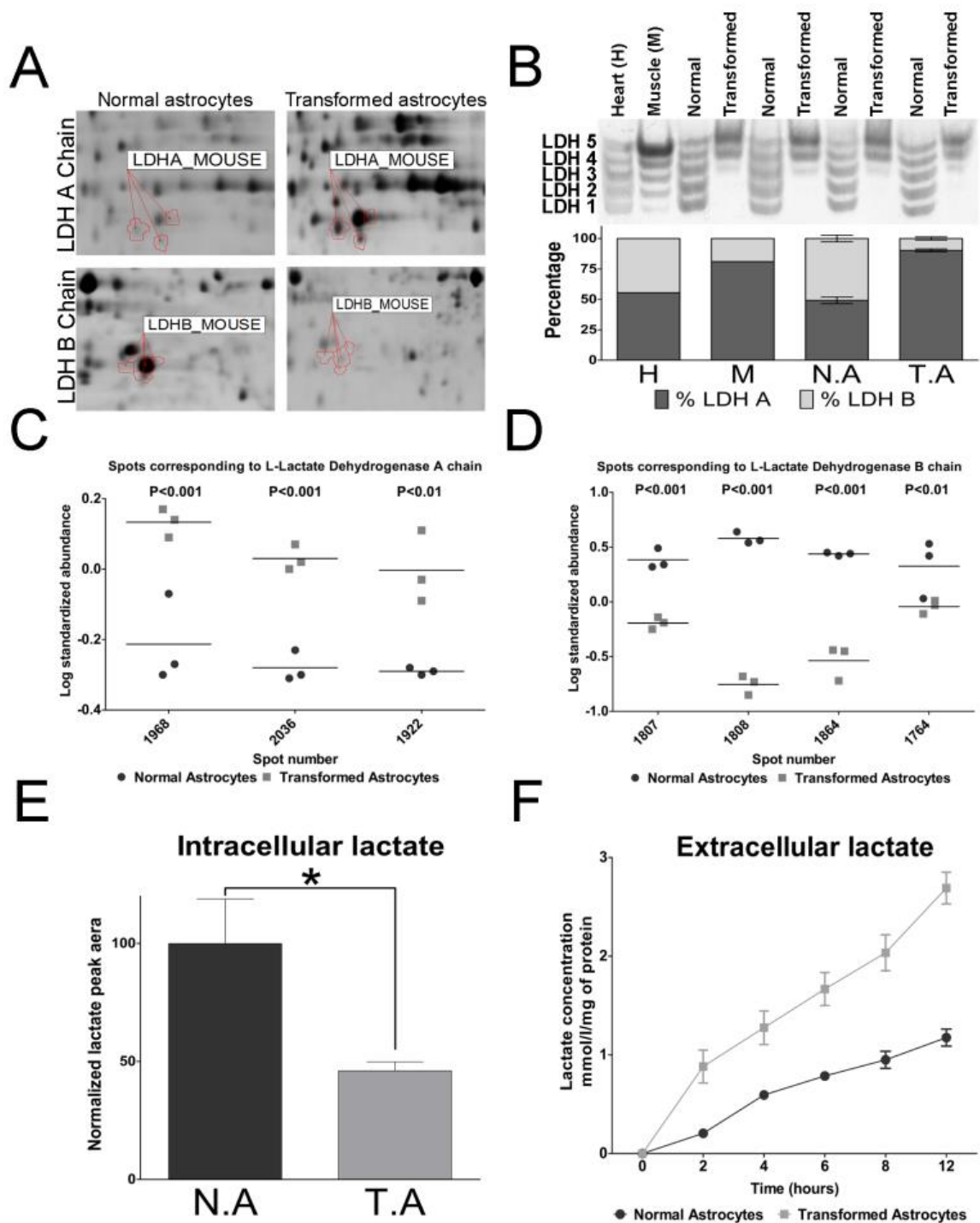


Figure 17 : Analyse de l'expression des isoenzymes de la lactate déshydrogénase (LDH 1 à 5) et chaînes qui les composent (chaîne A et chaîne B). (A) Extrait d'une image de gels 2D montrant les zones contenant les spots correspondant à chaîne A et la chaîne B de la LDH dans les NA et les TA. (B) Analyse par zymographie du pattern d'expression des différents isoenzymes de la LDH dans les NA et les TA. Des extraits du cœur (H pour heart) et du muscle ont été utilisés comme référence. La quantification de l'expression des chaînes A et B dans toutes les bandes isoenzymatiques de chaque échantillon montre que les NA expriment de manière équivalente les chaîne A et B de la LDH, tandis que dans les TA la composition des chaînes de LDH est largement dominée par la chaîne A qui représente 90% de la somme globale des chaînes A et B. (C) et (D) Quantification des spots correspondant à la LDH et représentés sur la Fig. (A). (E) et (F) Détermination par RMN 2D COSY des changements dans l'abondance/concentration du lactate intracellulaire (E) et extracellulaire (F) chez les NA et les TA. Les valeurs en (E) représentent la moyenne de l'aire normalisée du pic \pm SEM ; NA = $100 \pm 18,89$, $n = 5$; TA = $46,05 \pm 3,799$, $n = 4$; valeur $p = 0,0417$.

Lorsque la forme dimérique de la PKM 2 est prépondérante, l'accumulation de métabolites produits par les différentes étapes de la glycolyse alimente plusieurs voies de synthèse telles que la voie des pentoses phosphate. Ainsi l'analyse 2D-DIGE révèle une nette augmentation de l'abondance d'une enzyme clé du PPP, la transaldolase (TALDO). Son abondance est augmentée de 4 fois dans les TA par rapport aux NA (ratio TA/NA : 3,82 et T-test : 0,0018) (Fig. 18A). L'abondance d'une autre enzyme centrale du PPP est augmentée dans les TA par rapport aux NA. Il s'agit de la transkétolase dont le niveau d'expression protéique a été déterminé par WB (Fig. 18B).

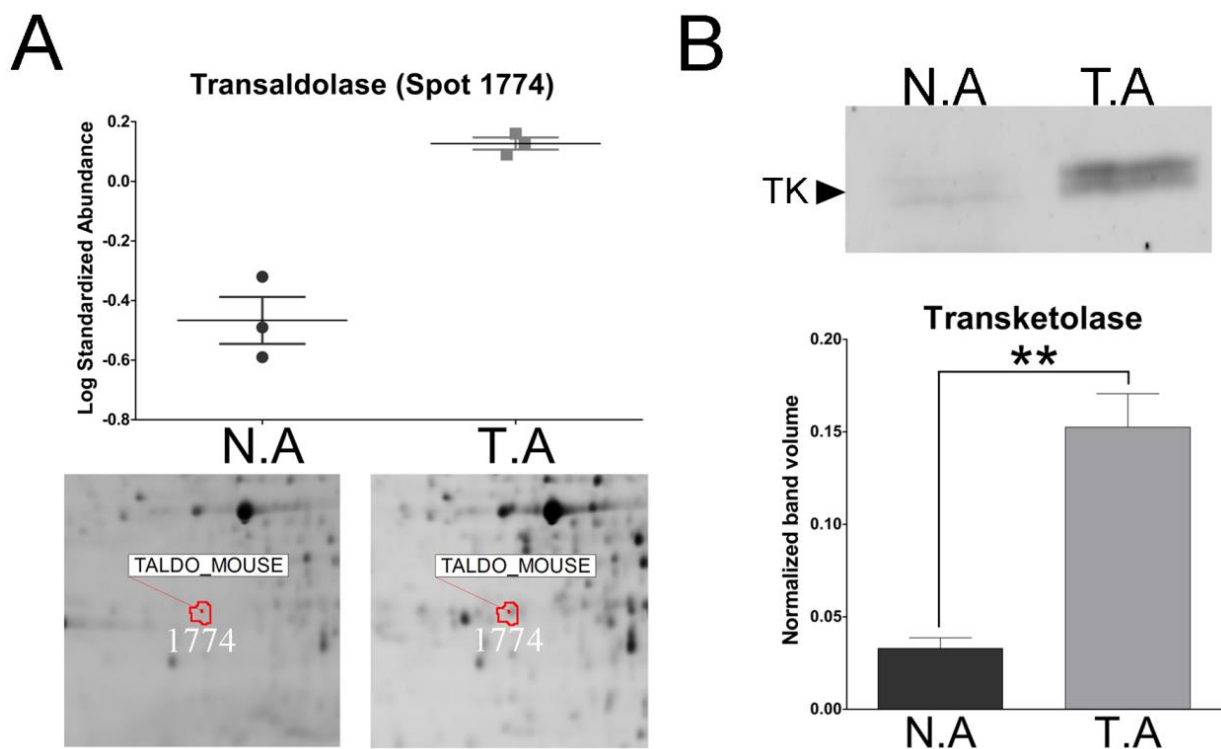


Figure 18 : Quantification par 2D-DIGE ou par WB de l'expression/abondance de deux enzymes de la branche non oxydative de la voie des pentoses phosphate. (A) Extrait d'une image de gels 2D montrant la zone contenant le spot 1774 correspondant à la transaldolase (TALDO) dont le niveau d'abondance est plus important dans les TA (ratio TA/NA = 3,8, test $t = 0,0018$). (B) Analyse quantitative par WB du niveau d'expression de la transkétolase. TA ($0,152 \pm 0,018$, $n = 3$), NA ($0,033 \pm 0,0057$; $n = 3$) avec une valeur $p = 0,003$. Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM.

4. MODULATION DES ENZYMES DU CYCLE DE KREBS :

D'une manière générale, la plupart des enzymes mitochondriales identifiées étaient moins abondantes dans les TA que les NA (Fig. 12B). Par exemple, l'isocitrate déshydrogénase mitochondriale (IDH 2) est moins abondante dans les TA (Ratio TA/NA : -1,78 et -8,92 avec un T-test de 0,0069 et 0,00064 respectivement). L'expression de cette

enzyme, responsable de la conversion de l'isocitrate en 2-oxoglurate, a été vérifiée par WB et les résultats obtenus confirment la diminution d'abondance observée par 2D-DIGE (Fig. 19).

Par ailleurs, nous avons constaté que les TA consommaient deux fois moins d'oxygène que les NA (Fig. 19B). En effet, nous avons mesuré le taux de consommation d'oxygène par les NA et les TA à l'aide de plaques 24 puits dotées de senseurs d'oxygène pré-calibrés. La mesure du taux d'oxygène dans les puits a été réalisée à l'aide d'un Sensor Dish Reader grâce aux senseurs présents dans chaque puit. Le signal émis est proportionnel au taux d'oxygène dans le milieu de culture. Avant le début de l'enregistrement, les plaques ont été scellées hermétiquement et des mesures ont été enregistrées toutes les 2 minutes. Les enregistrements obtenus montrent que les TA ont une consommation moyenne d'oxygène de 0,014% par min tandis que les NA présentent une consommation de 0,03% d'oxygène par min.

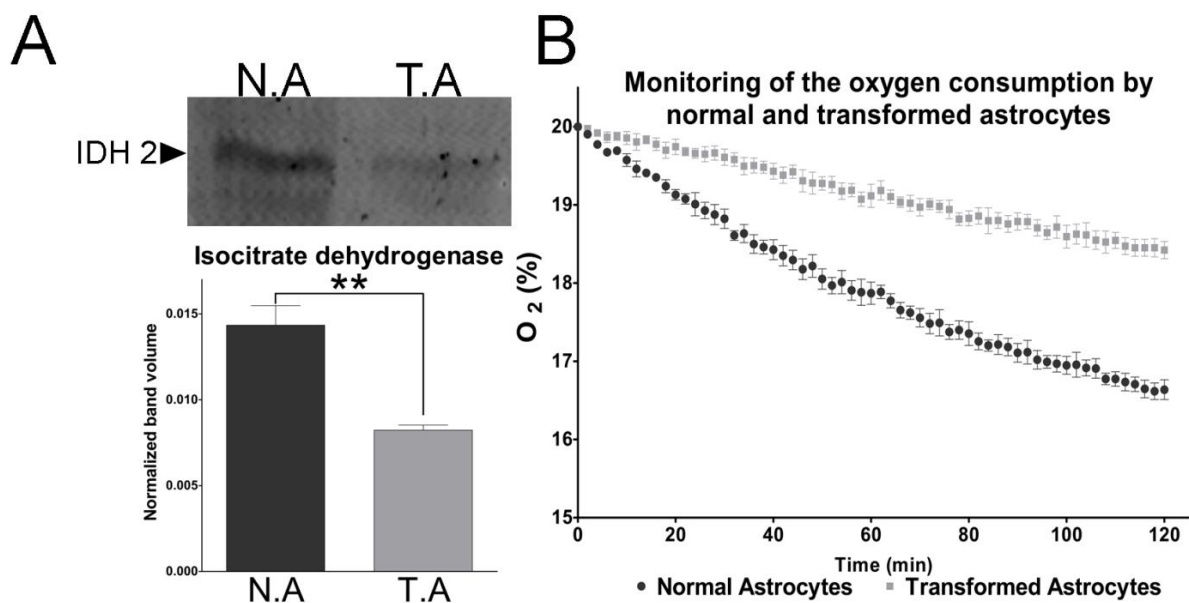
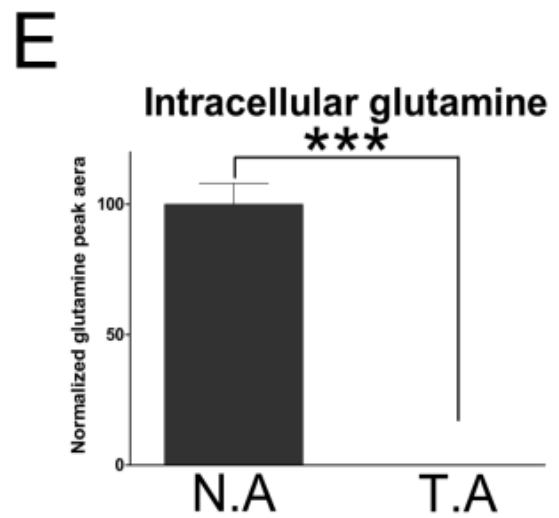
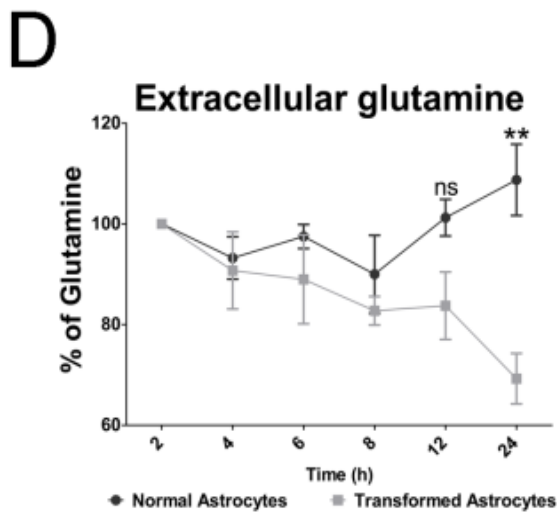
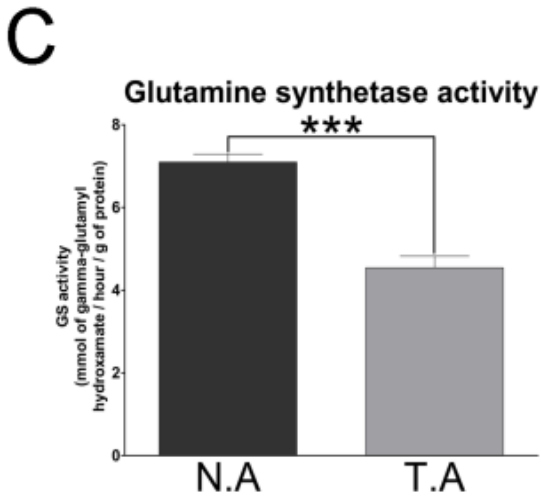
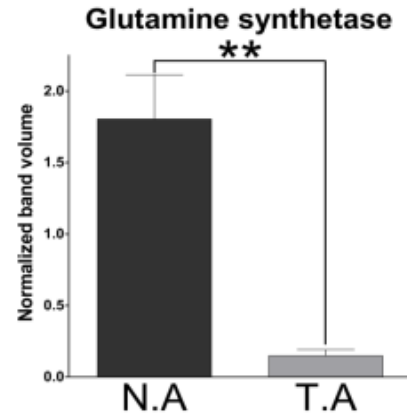
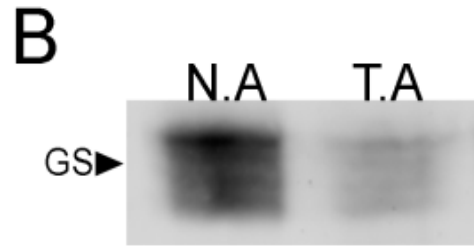
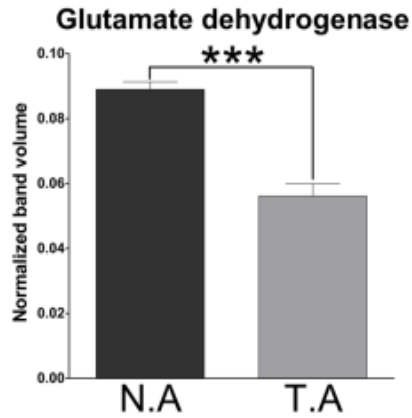
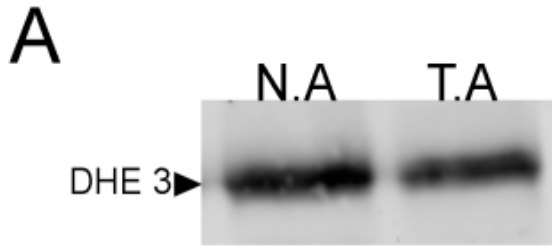


Figure 19 : Les astrocytes transformés montrent une faible abondance de l'isocitrate déshydrogénase mitochondriale (IDH 2) ainsi qu'une plus lente respiration par rapport aux astrocytes normaux. (A) Analyse quantitative par WB du niveau d'expression de l'IDH 2. TA ($0,0082 \pm 0,0002$; $n = 3$), NA ($0,014 \pm 0,001$; $n = 3$) avec une valeur $p = 0,006$. Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM. (B) Détermination du taux de consommation de l'oxygène par les NA et les TA. Les TA consomment l'oxygène deux fois moins vite que les NA.

5. LA TRANSFORMATION CANCÉREUSE DES ASTROCYTES AFFECTE LE MÉTABOLISME DU GLUTAMATE ET DE LA GLUTAMINE :

Notre analyse protéomique a également révélé un changement dans l'abondance de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme du glutamate et de la glutamine.

En effet, nous observons une diminution de l'abondance de 3 enzymes impliquées dans la conversion du glutamate en 2-oxoglutarate. Il s'agit de la 4-aminobutyrate-aminotransférase, l'ornithine aminotransférase et la glutamate déshydrogénase (DHE 3) (Fig. 12B). Les changements d'expression de la DHE 3 ont été vérifiés par WB et les résultats obtenus confirment la diminution de l'abondance de cette enzyme dans les TA (Fig. 20A).



Par ailleurs, un spot correspondant à la GS montre une diminution de l'abondance de cette enzyme dans les TA (ratio TA/NA = 1,98 et $p = 0,0026$). Cette observation a été confirmée par WB dirigé contre la GS qui montre une forte diminution du niveau d'expression de la GS dans les TA (environ 12 fois moins) (Fig. 20B). Les conséquences d'une telle diminution du niveau d'expression protéique de la GS ont été déterminées par des mesures d'activité enzymatique sur des extraits de NA et TA. Ainsi nous avons mesuré une activité moyenne de $7,09 \pm 0,19$ U.A de GS pour les NA et seulement $4,54 \pm 0,28$ U.A de GS pour les TA (Fig. 20C).

Afin de mieux explorer les conséquences métaboliques de la modulation de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de la glutamine nous avons décidé de suivre l'évolution de la concentration de la glutamine dans les milieux de culture des NA et des TA et de mesurer la quantité de ce métabolite à l'intérieur des cellules par RMN. Dans le milieu de culture des TA, et par rapport à la concentration initiale, nous avons constaté une diminution de 24 % de la concentration de la glutamine. Au contraire, la concentration de la glutamine dans le milieu de culture des NA reste stable avec une légère tendance vers l'augmentation (Fig. 20D). La quantification du taux intracellulaire de la glutamine indique, que contrairement aux NA, les TA présentaient un taux de glutamine inférieur au seuil de détection (Fig. 20F).

Figure 20 : Métabolisme de la glutamine chez les NA et les TA. (A) Analyse quantitative par WB du niveau d'expression de la glutamate déshydrogénase (DHE 3). L'abondance de la DHE 3 était une fois et demi plus faible dans les TA ($0,056 \pm 0,003$; $n = 4$) par rapport aux NA ($0,09 \pm 0,002$; $n = 4$) avec une valeur $p = 0,0003$. Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM. (B) Analyse quantitative par WB du niveau d'expression de la glutamine synthétase (GS). Comparativement aux NA ($1,81 \pm 0,31$), les TA montrent une forte diminution de l'abondance de la GS ($0,149 \pm 0,04$); $n=3$ et la valeur $p = 0,006$). Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM. (C) La détermination de l'activité enzymatique de la GS montre une diminution de cette activité chez les TA ($4,54 \pm 0,28$ U.A) par rapport aux NA ($7,09 \pm 0,19$ U.A); $n = 4$ et la valeur $p = 0,0003$. Une unité d'activité enzymatique (U.A) représente la quantité, en mmoles, de γ -glutamyl hydroxamate produit par heure par mg de protéines. (D) Quantification par RMN des changements de concentration de la glutamine extracellulaire dans le milieu de culture des NA et des TA. Après 24 h de culture, le taux de la glutamine dans le milieu de culture des NA était de $108,8 \% \pm 7,087$ et de $69,25 \% \pm 5,023$ pour les TA ($n = 4$ et la valeur $p = 0,0039$). Les pourcentages sont exprimés par rapport à la concentration initiale de la glutamine dans le milieu de culture et qui correspond à 100 %. (E) Quantification par RMN des changements de concentration de la glutamine intracellulaire chez les NA et les TA. NA: $100 \pm 7,98$, $n = 5$; TA: indétectable, $n = 4$ et valeur $p < 0,0001$.

6. LES RÉACTIONS ANABOLIQUES ET ANAPLÉROTiques DU CYCLE DE KREBS ET MÉTABOLISME DU GLYCOGÈNE :

Le cycle de Krebs constitue un carrefour métabolique central vers lequel convergent la plupart des voies métaboliques et duquel partent de nombreuses voies anaboliques. En effet, le cycle de Krebs participe activement à différents processus de biosynthèse en fournissant les précurseurs métaboliques nécessaires pour cette biosynthèse. Parmi les voies qui utilisent les précurseurs du cycle de Krebs on peut citer les voies de biosynthèse de certains acides aminés (glutamate, glutamine ...), la néoglucogenèse ou encore la synthèse des lipides.

Afin d'assurer le fonctionnement à régime constant du cycle de Krebs, les intermédiaires métaboliques dérivés pour alimenter les voies de biosynthèse doivent être remplacés. Les réactions responsables de ce réapprovisionnement sont qualifiées de réactions anaplérotiques.

Notre analyse protéomique a révélé une faible abondance de plusieurs enzymes impliquées dans les réactions anaboliques et anaplérotiques dans les TA. En plus de la diminution de l'abondance de la DHE 3 (Fig. 20A) nous avons également constaté une baisse de l'abondance de la forme cytoplasmique de la MDH (Fig. 12B et Fig. 21 B). Par contre, 3 spots correspondant à la forme mitochondriale de la MDH présentent une plus importante abondance dans les TA que dans les NA (Spot 1662 (TA/NA ratio = 2,5 et $p = 0,00064$), spot 1885 (TA/NA ratio = 2,58 et $p = 0,011$) et le spot 1889 (TA/NA ratio = 1,98 et $p = 0,0005$).

Nous nous sommes également intéressés à l'expression de la pyruvate carboxylase (PC). Cette enzyme intervient à la fois dans le processus de la gluconéogenèse et dans les voies anaplérotiques en reconstituant le stock d'oxaloacétate. L'expression protéique de la PC a été étudiée par WB et les résultats obtenus montrent une forte diminution de l'abondance de de cette enzyme dans les TA comparativement aux NA (Fig. 21A).

Par ailleurs, la transformation cancéreuse des astrocytes est également responsable de la diminution de l'abondance de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène (Fig. 12A). C'est le cas de la glucose-6-phosphate isomérase (ratio TA/NA = -3 et $p = 0,014$) et l'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase (ratio TA/NA = -2,22 et $p = 0,0094$). Ces deux enzymes jouent un rôle important dans les étapes initiales de la synthèse du glycogène.

Nous avons également constaté une diminution de l'abondance de la glycogène phosphorylase (ratio TA/NA = -3,74 et $p = 0,024$) dans les TA. Cette enzyme est impliquée dans la dégradation du glycogène.

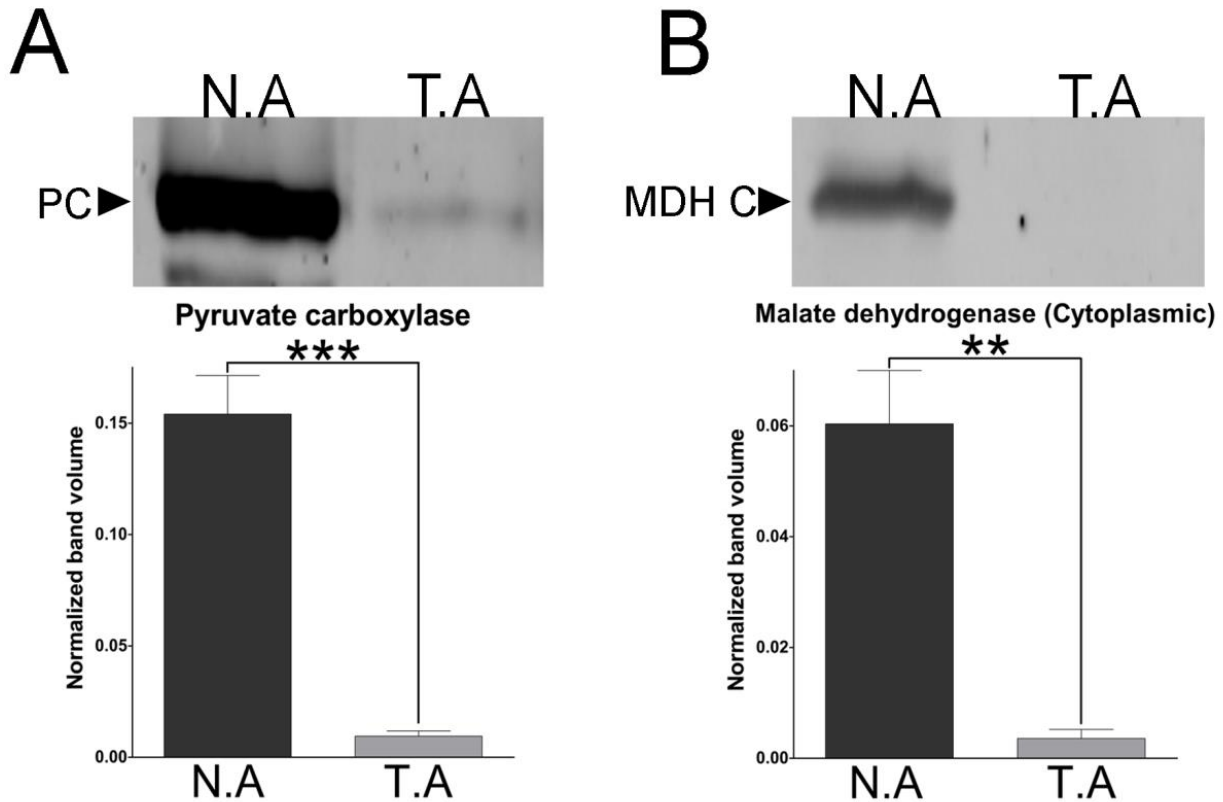


Figure 21 : Les astrocytes transformés présentent une faible abondance des enzymes impliquées dans les réactions anaboliques et anaplérotiques. (A) Analyse quantitative par WB du niveau d'expression de la forme cérébrale de la pyruvate carboxylase (PCB) l'abondance de la PCB est 16 fois plus faible chez les TA ($0,009 \pm 0,002$; $n = 4$) que chez les NA ($0,15 \pm 0,002$; $n = 4$) (valeur $p = 0,008$). (B) Analyse quantitative par WB du niveau d'expression de la malate déshydrogénase cytoplasmique (MDH C). L'abondance relative de la MDH C est 20 fois plus faible chez les TA ($0,0035 \pm 0,0016$, $n = 4$) que chez les NA ($0,06 \pm 0,009$; $n = 4$) (valeur $p = 0,015$). Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM.

7. LA TRANSFORMATION CANCÉREUSE DES ASTROCYTES AFFECTE LE MÉTABOLISME DES ERO ET LES PROTÉINES LIÉES AU STRESS :

De nombreuses enzymes impliquées dans la conversion des ERO ou dans les réactions de conjugaison liées au glutathion ont été identifiées comme moins abondantes après la transformation cancéreuse des astrocytes. Au total, 26 spots correspondant à des enzymes de la famille des PRDX et à la famille des GST étaient moins abondants dans les TA que dans les NA (voir tableau ci-dessous). Parmi ces enzymes, nous avons identifié deux membres de la famille des PRDXs (PRDX 1 et PRDX 6), trois membres de la famille des GST Ms (GST M1, GST M2 et GST M5) et un membre de la famille des GST A (GST A4).

| Spot ID | Protein ID | Protein Name | Ratio (TA/NA) | p-value |
|---------|-------------|-------------------------------|---------------|----------|
| 2718 | PRDX1_MOUSE | Peroxiredoxin-1 | -1,81 | 0,0011 |
| 2734 | PRDX1_MOUSE | Peroxiredoxin-1 | -1,62 | 0,011 |
| 2490 | PRDX6_MOUSE | Peroxiredoxin-6 | -5,8 | 0,024 |
| 2524 | PRDX6_MOUSE | Peroxiredoxin-6 | -3,57 | 0,0055 |
| 2528 | PRDX6_MOUSE | Peroxiredoxin-6 | -9,9 | 0,0048 |
| 2537 | PRDX6_MOUSE | Peroxiredoxin-6 | -14,4 | 0,00015 |
| 2538 | PRDX6_MOUSE | Peroxiredoxin-6 | -18,96 | 6,70E-06 |
| 2644 | PRDX6_MOUSE | Peroxiredoxin-6 | -2,57 | 0,0096 |
| 2499 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -5,5 | 0,0056 |
| 2503 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -3,88 | 0,0034 |
| 2505 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -28,57 | 0,0011 |
| 2506 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -31,31 | 0,00099 |
| 2510 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -5,21 | 8,00E-05 |
| 2512 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -17,82 | 0,0021 |
| 2515 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -3,44 | 0,0011 |
| 2517 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -7,79 | 0,00052 |
| 2522 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -2,31 | 0,0069 |
| 2523 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -13,36 | 0,0004 |
| 2525 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -8,94 | 0,004 |
| 2526 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -14,03 | 3,10E-05 |
| 2534 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -15,51 | 0,00032 |
| 2536 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -2,3 | 0,00082 |
| 2563 | GSTM1_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 1 | -5,02 | 0,009 |
| 2543 | GSTM2_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 2 | -5,73 | 0,00025 |
| 2633 | GSTA4_MOUSE | Glutathion S-transférase A4 | -7,64 | 0,0012 |
| 2502 | GSTM5_MOUSE | Glutathion S-transférase Mu 5 | -2,09 | 0,0013 |

Les niveaux d'expression de la GSTM1 et la PRDX6 ont été vérifié par des WB quantitatifs et les résultats obtenus confirment la diminution d'abondance de ces enzymes dans les TA (Fig.22 A et B).

La lactoylglutathion-lyase, une enzyme impliquée dans la détoxification du méthylglyoxal (un sous-produit de la glycolyse qui dérive du glycéraldéhyde-3-phosphate et du dihydroxyacétone phosphate par clivage non enzymatique du groupement phosphate) via le système glyoxalase a été identifiée comme étant moins abondante dans les TA que dans les NA (Ratio TA/NA = -2,56 et p= 0,0084).

Cependant, malgré la forte diminution de l'abondance des enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif et qui font intervenir le glutathion, nous n'avons détecté aucune

variation dans la concentration intracellulaire du glutathion, mesurée par RMN, entre nos deux types cellulaires (Fig. 22C).

Par ailleurs nous avons constaté que la transformation cancéreuse des astrocytes était responsable de l'augmentation de l'abondance de certaines enzymes impliquées dans la réponse au stress. C'est le cas de la 78 kDa glucose-regulated-protein (GRP 78) identifiée dans 6 spots dont l'abondance relative augmente dans les TA (Ratio TA/NA allant de 3,07 à 6,25). L'expression de cette protéine chaperon est souvent dérégulée dans les gliomes et participe à la croissance tumorale et à la résistance à l'apoptose [259]. L'analyse par WB de l'expression de la GRP 78 dans les NA et les TA a montré une augmentation de son expression protéique dans les TA par rapport aux NA (Fig. 22D).

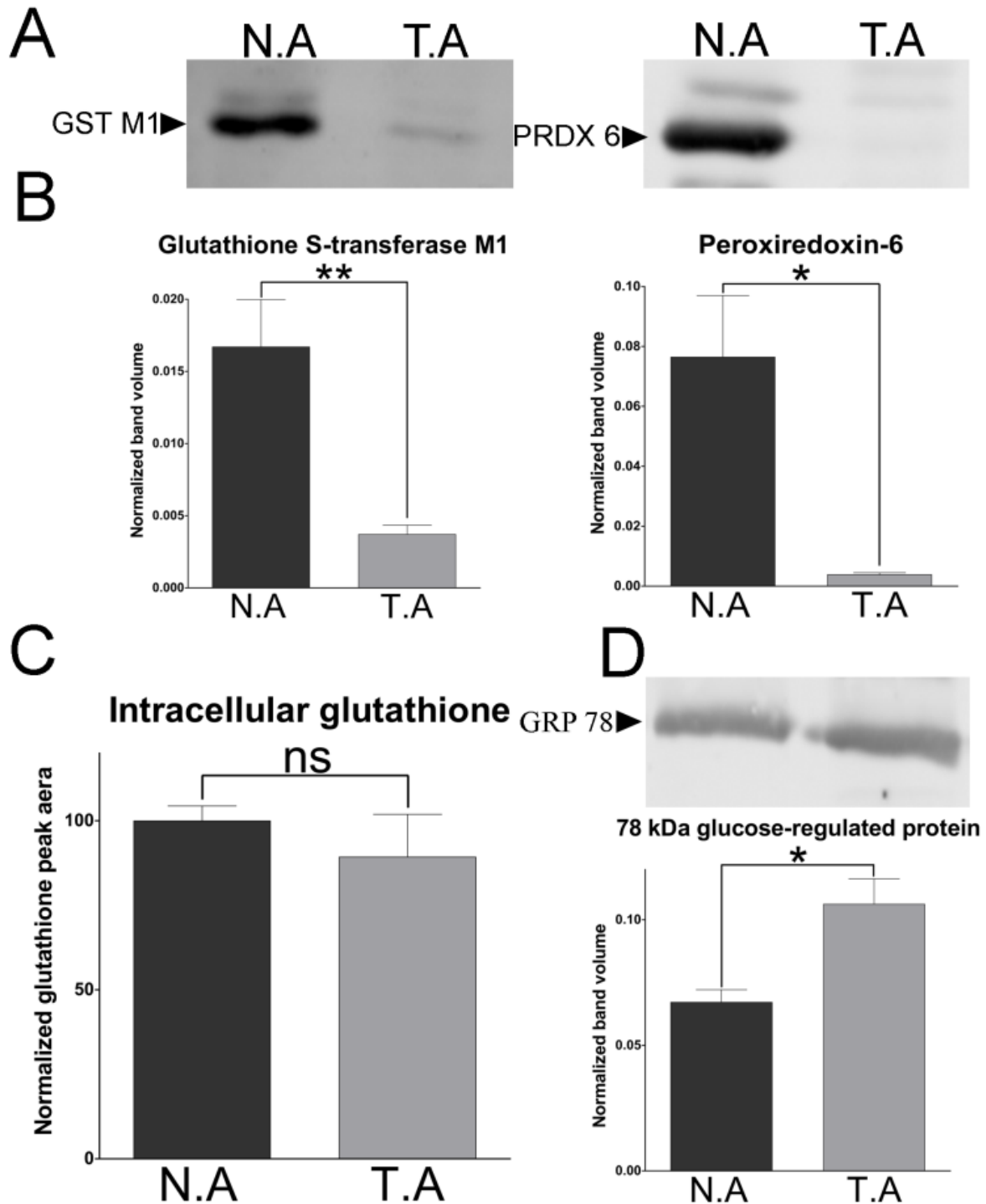


Figure 22 : Analyse quantitative par WB du niveau d'expression de la glutathion S-transférase M1 (GST M1) (A), de la peroxyrédoxine 6 (PRDX 6) (B) et de la 78 kDa glucose-regulated protein (GRP 78) (D). (A) La GST M1 est 5 fois moins abondante chez les TA ($0,0037 \pm 0,0006$, $n = 4$) que chez les NA ($0,017 \pm 0,003$; $n = 4$) avec une valeur $p = 0,008$. (B) La PRDX 6 est 20 fois moins abondante chez les TA ($0,0038 \pm 0,0006$, $n = 4$) que chez les NA ($0,076 \pm 0,002$; $n = 4$) avec une valeur $p = 0,012$. Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM. (C) Quantification par RMN des changements de la concentration intracellulaire du glutathione chez les NA et les TA. NA : $100 \pm 4,375$, $n = 5$; TA : $89,28 \pm 12,63$, $n = 4$; p value = $0,407$. (D) l'abondance de la GRP 78 est augmentée chez les TA ($0,1062 \pm 0,01$; $n = 4$) par rapport aux NA ($0,06713 \pm 0,005$; $n = 4$) avec une valeur $p = 0,01$. Les valeurs représentent la moyenne des volumes normalisés \pm SEM.

**LA 2D-DIGE, UN OUTIL PUISSANT POUR UNE ANALYSE
PROTÉOMIQUE COMPARATIVE**

INTRODUCTION :

Le plus souvent, les adaptations métaboliques reflètent des changements dans l'état de développement et de maturation d'un tissu ou d'un organisme, une adaptation à des variations de l'état homéostatique ou encore des altérations métaboliques liées à un état pathologique. L'étude de ces adaptations métaboliques repose généralement sur la mesure et l'analyse des taux/concentrations des intermédiaires métaboliques affectés par ces adaptations, ou sur la détermination des activités des enzymes impliquées dans ces adaptations ou encore sur l'estimation de l'expression des gènes ou des biomarqueurs connus pour leurs rôles dans un tel processus.

Le développement récent de nouvelles méthodes d'analyse protéomique apporte de nouvelles approches alternatives pour l'identification et la mesure de l'expression d'un grand nombre de protéines dans les cellules, des tissus ou des organismes entiers. Ces approches présentent l'avantage de ne pas reposer sur des hypothèses préconçues. En effet, elles constituent des approches globales sans a priori capables d'exploiter simultanément un grand nombre d'aspects et processus biologiques pour élucider l'origine des adaptations métaboliques.

Ces méthodes d'analyse protéomique sont particulièrement efficaces pour l'étude des protéines solubles et abondantes telles que celles impliquées dans les voies métaboliques de nombreux systèmes biologiques. Elles constituent de nouveaux outils puissants pour l'analyse, à grande échelle, du métabolisme cellulaire et de ses caractéristiques changeantes.

Dans ce chapitre nous tenterons d'illustrer la puissance analytique de la 2D-DIGE au travers de plusieurs exemples concrets tirés de notre analyse comparative des protéomes d'astrocytes normaux et d'astrocytes transformés. Ces exemples illustreront la capacité de cette technique à déceler des modifications post-traductionnelles de certaines protéines, à différencier des isoformes possédant une grande homologie de séquence protéique et à détecter des changements d'expression de sous-unités d'une même enzyme.

ILLUSTRATIONS DE PUISSANCE ANALYTIQUE DE LA 2D-DIGE :

Contrairement aux approches classiques, la 2D-DIGE est une approche comparative globale sans a priori qui permet d'avoir une vue d'ensemble des modifications protéomiques qui accompagnent certains processus biologiques normaux ou pathologiques. Dans cette

section, nous tenterons de mettre en lumière la puissance analytique de la 2D-DIGE et le rôle que cette technique occupe dans l'établissement d'un profil protéique global utile pour comprendre les mécanismes qui régissent la transformation cancéreuse des astrocytes. Pour ce faire, nous allons utiliser des extraits de gels 2D pour illustrer les différentes adaptations protéiques liées à la reprogrammation métabolique des astrocytes suite à leur transformation cancéreuse *in vitro*.

Comme nous l'avions précédemment décrit, la reprogrammation métabolique regroupe l'ensemble des adaptations génétiques, protéiques ou enzymatiques qui permettent de mieux répondre aux nouveaux besoins énergétiques des cellules tumorales et de supporter les voies de biosynthèse favorisant ainsi la survie et la prolifération.

La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses se traduit principalement par :

A. Une augmentation de leur capacité glycolytique qui se manifeste par une augmentation de l'expression/abondance des enzymes impliquées dans la glycolyse. Cet aspect de la reprogrammation métabolique figure parmi les adaptations protéiques que nous avons identifiées en comparant les protéomes des NA et TA (Tableau 1 et Fig. 11). En effet, notre analyse 2D-DIGE montre que les TA présentent une plus forte abondance de plusieurs enzymes de la glycolyse. Par exemple, l'abondance relative des spots correspondant à l'alpha émolase (ENO A) est augmentée dans les TA (Fig. 23A). Cette variation d'abondance est directement perceptible sur les images de gels 2D qui montrent que l'intensité des 3 spots correspondant à l'ENO A est plus forte sur les images de gels obtenus à partir des échantillons TA (Fig. 23B et C).

La PKM 2 représente un autre exemple, intéressant, pour illustrer l'augmentation de la capacité glycolytique des TA. Cette enzyme clé de la glycolyse a été identifiée dans 7 spots, tous plus abondants dans les échantillons TA que les NA (Fig. 24A). Cette augmentation est visuellement appréciable sur les images de gels 2D sur lesquelles on constate une plus forte intensité des spots PKM 2 dans les échantillons TA que dans les échantillons NA (Fig. 24B et C).

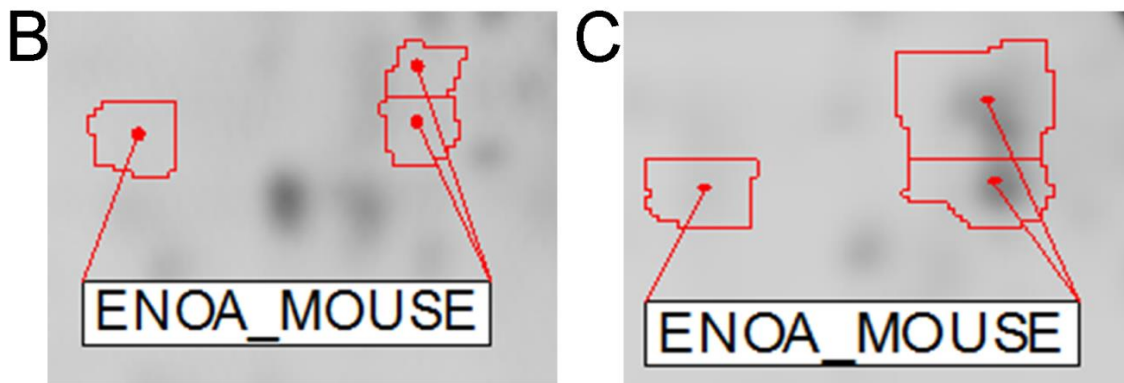
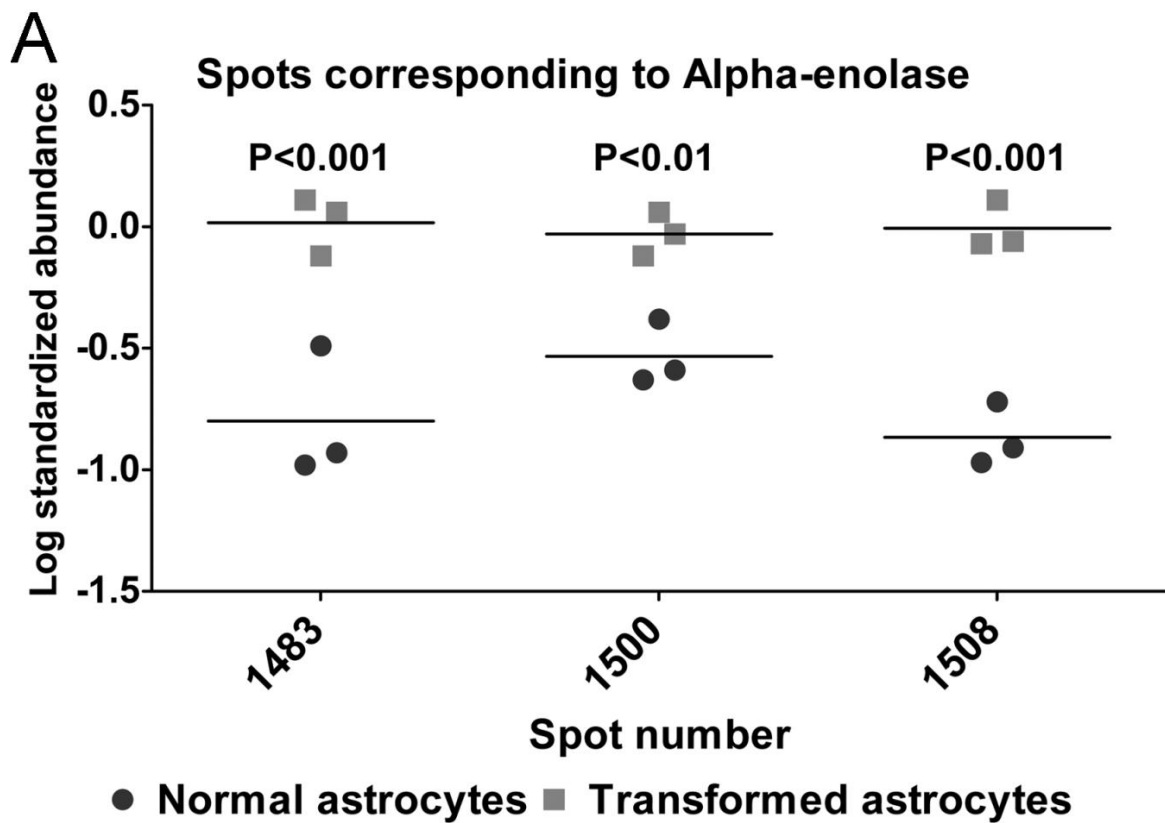


Figure 23 : Changements de l'abondance relative de l'alpha émolase (ENO A) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée de trois spots correspondant à l'ENO A et qui sont plus abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Distribution sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à l'ENO A chez les NA (B) et les TA (C).

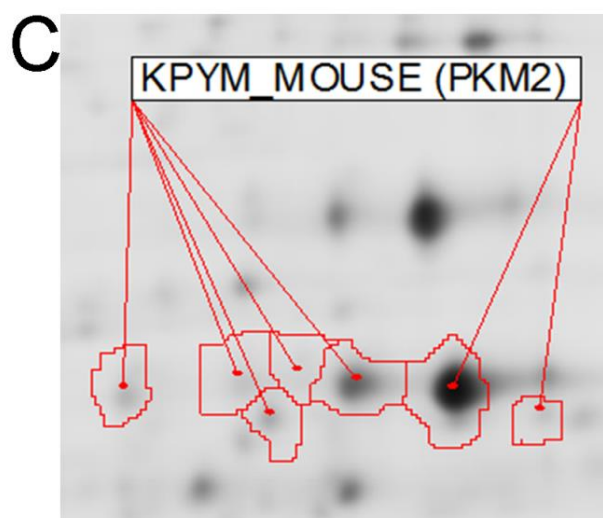
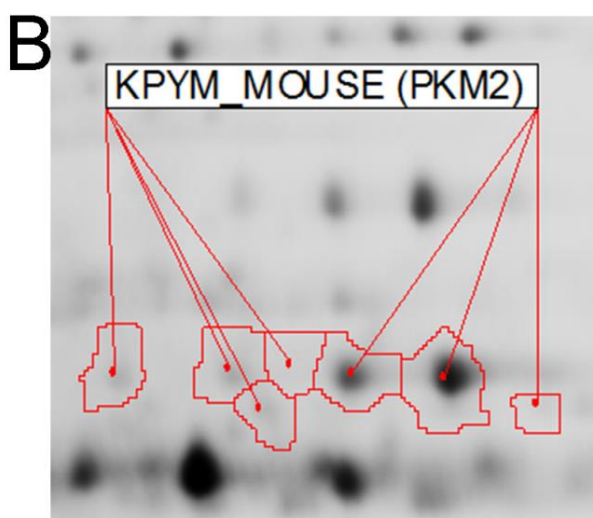
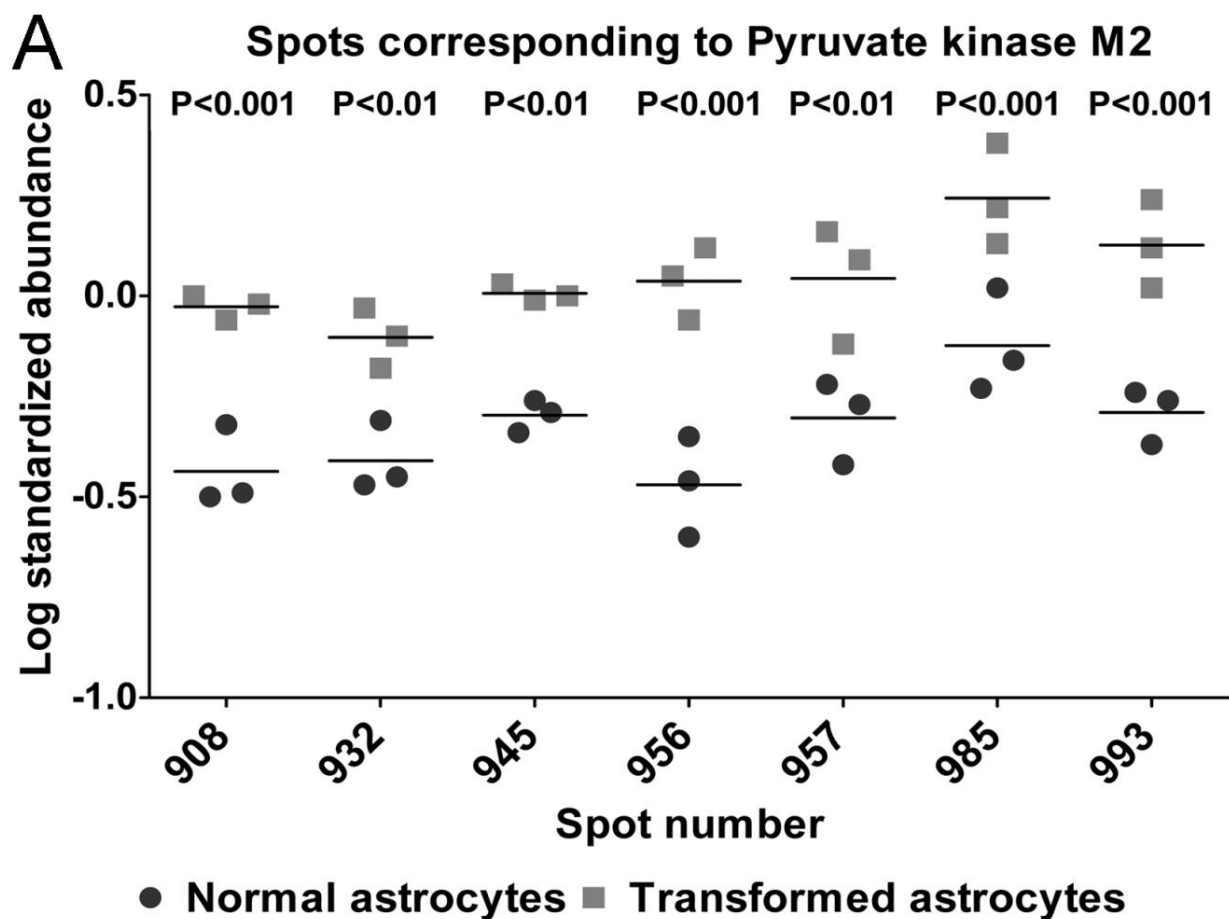


Figure 24 : Changements de l'abondance relative de la pyruvate kinase de type M2 (PKM 2) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée des sept spots correspondant à PKM 2 et qui sont plus abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Distribution sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à PKM 2 chez les NA (B) et les TA (C).

B. Une altération du cycle Krebs qui se traduit essentiellement par une diminution de l'expression/abondance des enzymes qui contrôlent les différentes étapes du cycle. Cette caractéristique de la reprogrammation métabolique est également retrouvée dans les TA qui expriment faiblement de nombreuses enzymes mitochondriales (Tableau 1). L'IDH 2 figure parmi les enzymes mitochondriales affectées par la transformation cancéreuse des astrocytes. Cette enzyme était moins abondante dans les TA que dans les NA (Fig. 25A). Cette diminution de l'abondance est apparente sur les intensités des spots identifiés comme IDH 2 (Fig. 25 B et C).

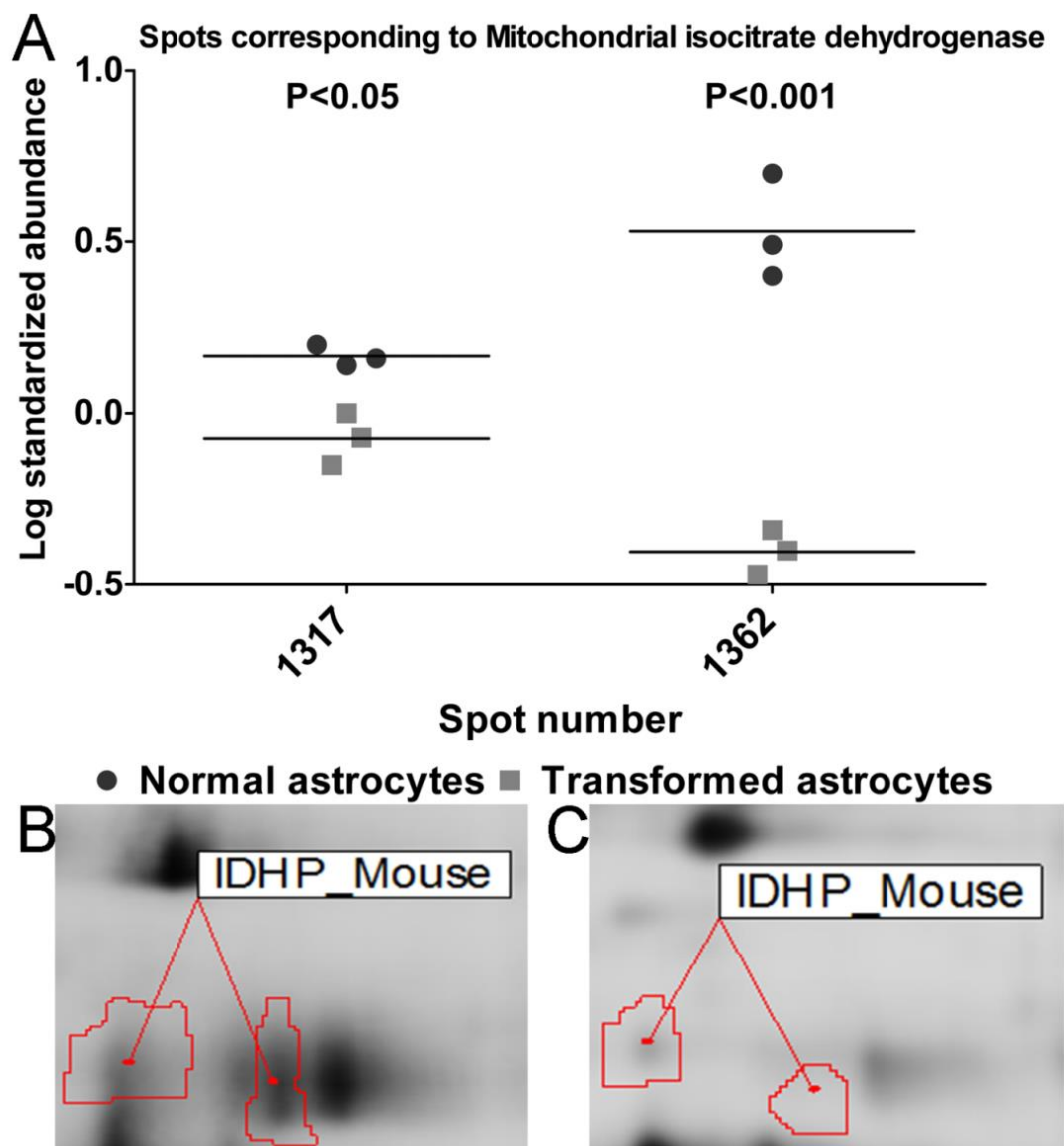


Figure 25 : Changements de l'abondance relative de l'isocitrate déshydrogénase mitochondriale (IDPH) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée des deux spots correspondant à l'IDPH et qui sont moins abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Distribution sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à l'IDPH chez les NA (B) et les TA (C).

C. Une activation du PPP qui permet aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose, de soutenir la prolifération, de favoriser l'invasion tumorale et d'augmenter la résistance aux traitements médicamenteux. Une augmentation de l'abondance relative de la transaldolase (TALDO), une enzyme clé du PPP, a été détectée dans les TA comparativement aux NA (Fig. 26A). L'intensité du spot correspondant à la TALDO est visuellement plus importante dans les images de gels TA que dans celles des NA (Fig. 26B et C).

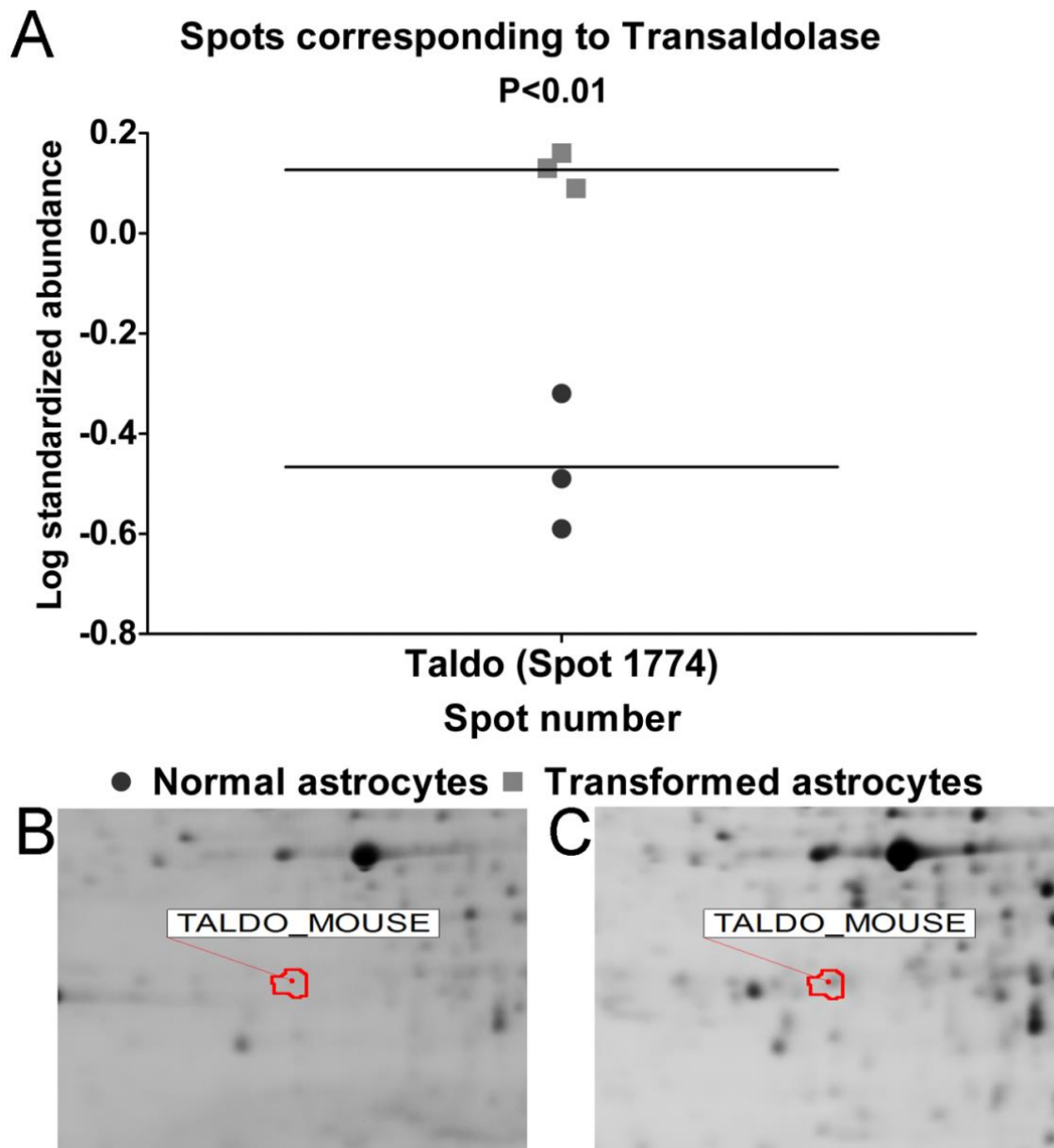


Figure 26 : Changement de l'abondance relative de la transaldolase (TALDO) chez les NA et les TA.

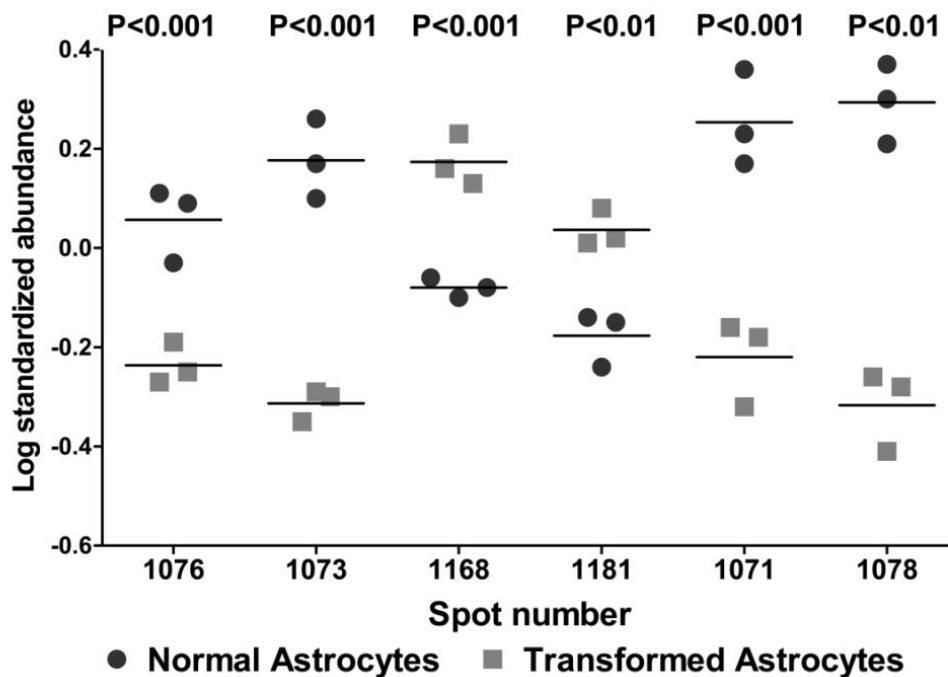
(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée du spot correspondant à la TALDO et qui est plus abondant chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Localisation sur un gel bidimensionnel du spot correspondant à la TALDO chez les NA (B) et les TA (C).

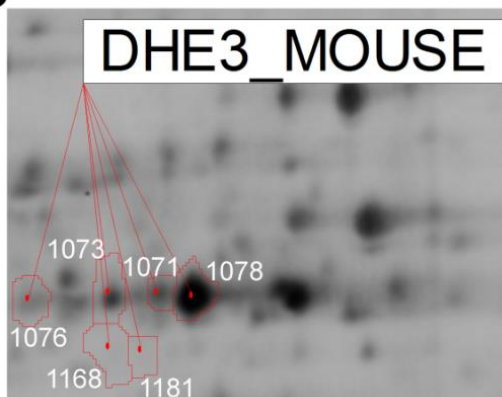
D. Une modulation des voies anaboliques et anaplérotiques. Dans les TA, cette modulation se traduit principalement par une diminution de l'abondance relative de la DHE 3 (Fig. 27A) et de la MDH C (Fig. 28A). La diminution de l'intensité des spots correspondant à ces deux enzymes dans les TA est perceptible sur les images de gels 2D (Fig. 27 B et C et Fig. 28B et C).

A

Spots corresponding to Glutamate dehydrogenase 1



B



C

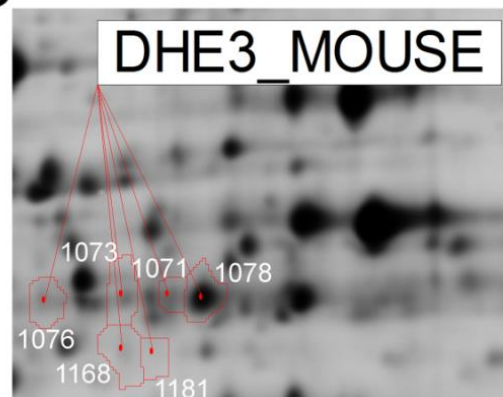


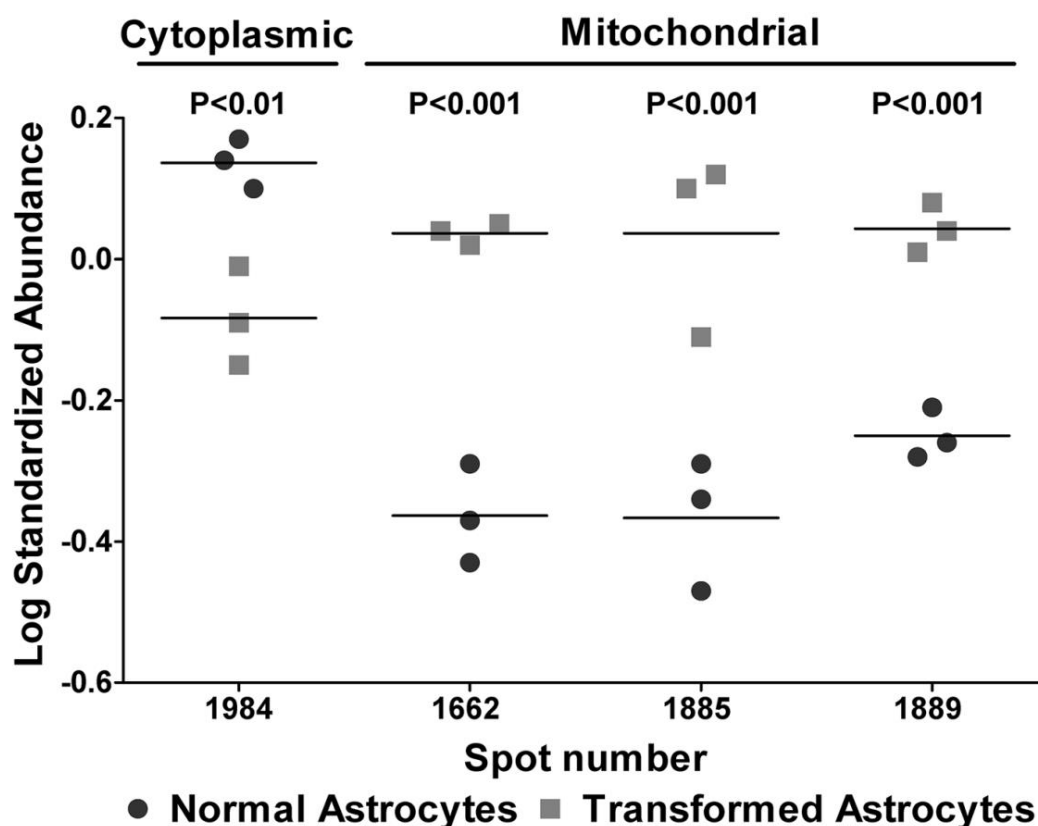
Figure 27 : Changements de l'abondance relative de la glutamate déshydrogénase 1 (DHE3) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée des 6 spots correspondant à la DHE3 dont 2 spots (1168 et 1181) sont plus abondants chez les TA que chez les NA et 4 spots (1076, 073, 1071, et 1078) sont moins abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Localisation sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à la DHE 3 chez les NA (B) et les TA (C).

A

Spots corresponding to Malate dehydrogenase



B



C

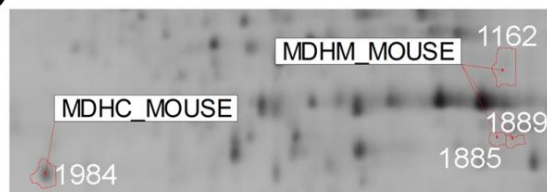


Figure 28: Changements de l'abondance relative des isoenzymes cytoplasmique et mitochondriale de la malate déshydrogénase (respectivement MDH C et MDH M) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée de 4 spots correspondant aux deux isoenzymes de la MDH montrant que le spot correspondant à la forme cytoplasmique (spot 1984) est moins abondant chez les TA que chez les NA tandis que les 3 spots correspondant à la forme mitochondriale (spot 116, 1885 et 1889) sont plus abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Localisation sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à la MDH C et MDH M chez les NA (B) et les TA (C).

E. Une régulation de l'expression des isoenzymes de la LDH. Cette régulation se révèle par une augmentation de l'expression des isoenzymes riches en chaîne A de la LDH (LDH 5 également appelée LDH A) au détriment des isoenzymes riches en chaîne B (LDH 1 également appelée LDH B).

La comparaison des protéomes des NA et des TA par 2D-DIGE montre que les TA expriment principalement la chaîne A de la LDH et très peu la chaîne B. Au contraire, les NA expriment essentiellement la chaîne B de la LDH (Fig. 29 A et B). Ces constats sont facilement appréciables sur les images de gels 2D qui montrent que les 3 spots représentant la chaîne A de LDH étaient plus intenses dans les échantillons de TA (Fig. 29C) tandis que les 4 spots identifiés comme étant la chaîne B de la LDH étaient moins intenses dans les échantillons TA (Fig. 29C).

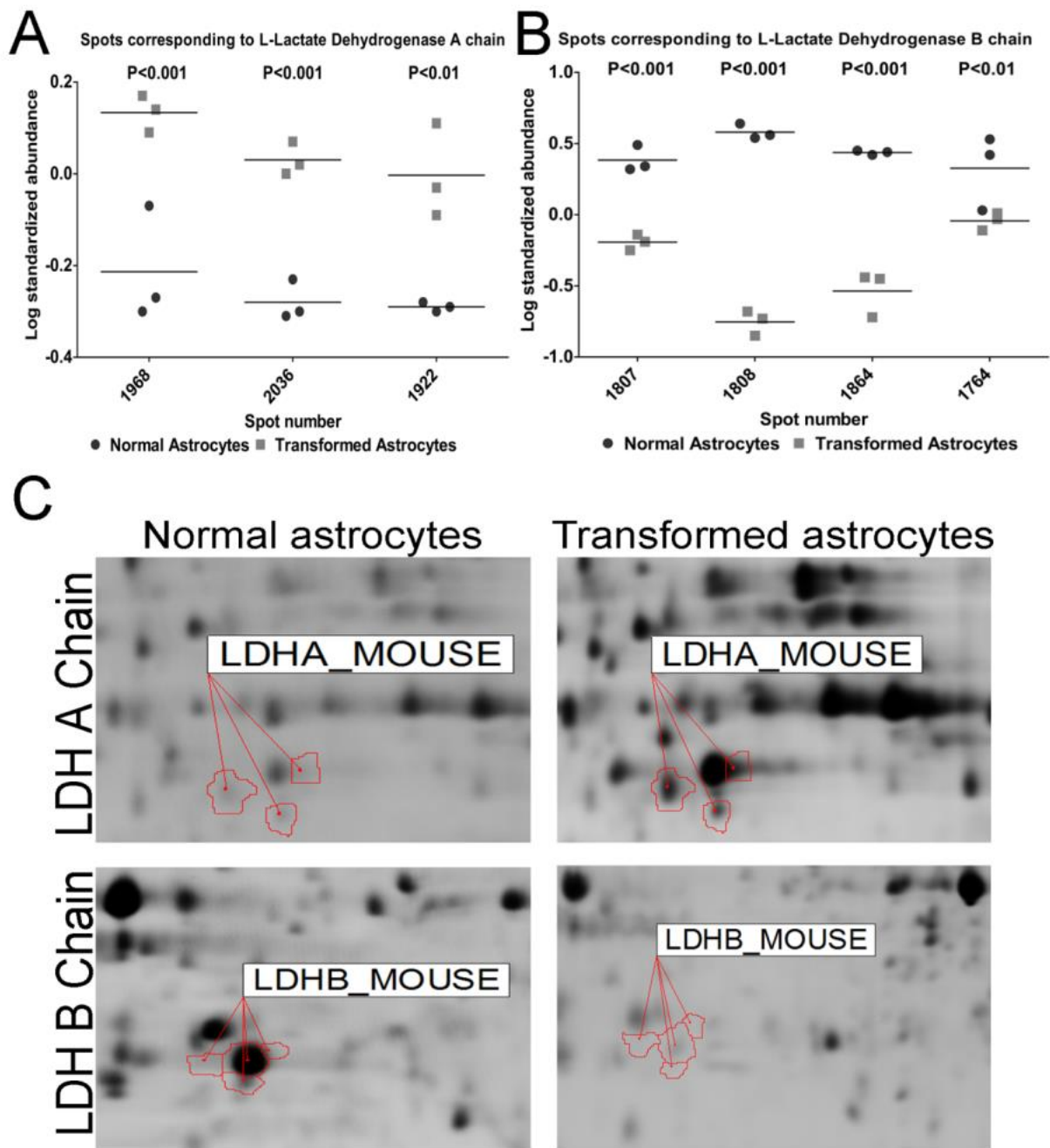


Figure 29 : Changements de l'abondance relative de la chaîne A et de la chaîne B de la lactate déshydrogénase (LDH A et LDH B respectivement) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée de 3 spots correspondant à la LDH A et qui sont plus abondants chez TA comparativement aux NA.

(B) Représentation graphique de l'abondance standardisée de 4 spots correspondant à la LDH B et qui sont moins abondants chez TA comparativement aux NA.

(C) Localisation sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à la LDH A et à la LDH B chez les NA et les TA.

F. Une adaptation du métabolisme lié au stress oxydatif. En effet, notre analyse révèle des changements de plusieurs protéines impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif (Tableau 1).

Ainsi 2 spots correspondant à la PRDX 1 et 6 spots correspondant à la PRDX 6 montrent une faible abondance relative dans les TA comparativement aux NA (Fig. 30 A et 31A respectivement). Cette diminution d'abondance est perceptible sur les zones de gels 2D contenant les spots correspondant à ces protéines (Fig. 30B et C et Fig. 31B et C respectivement).

Par ailleurs, nous avons également noté une réduction de l'abondance de plusieurs spots représentant des protéines de la famille des GST (1 spot pour la GST M2, 1 spot pour la GST M5, 1 spot pour la GST A4 et 15 spots pour la GST M1) (Fig. 32A et 33A). Les intensités de ces spots étaient plus faibles visuellement dans les images de gels des TA que celle des NA (Fig. 32B et C et Fig. 33B et C).

Une protéine impliquée dans la réponse au stress a été identifiée dans notre analyse 2D-DIGE. Il s'agit de la GRP 78 dont l'abondance relative était plus élevée dans les TA que dans les NA (Fig. 34A). Les spots correspondant à cette protéine étaient tous plus intenses sur les images de gels obtenus à partir des échantillons TA (Fig. 34B et C).

Ainsi et d'une manière intéressante, notre analyse 2D-DIGE nous a permis de mettre en lumière de nombreuses facettes de la reprogrammation métabolique des astrocytes suite à leur transformation cancéreuse *in vitro*. Les résultats que nous avons obtenus révèlent la complexité des processus qui régissent la reprogrammation métabolique et mettent en avant la puissance analytique de la 2D-DIGE.

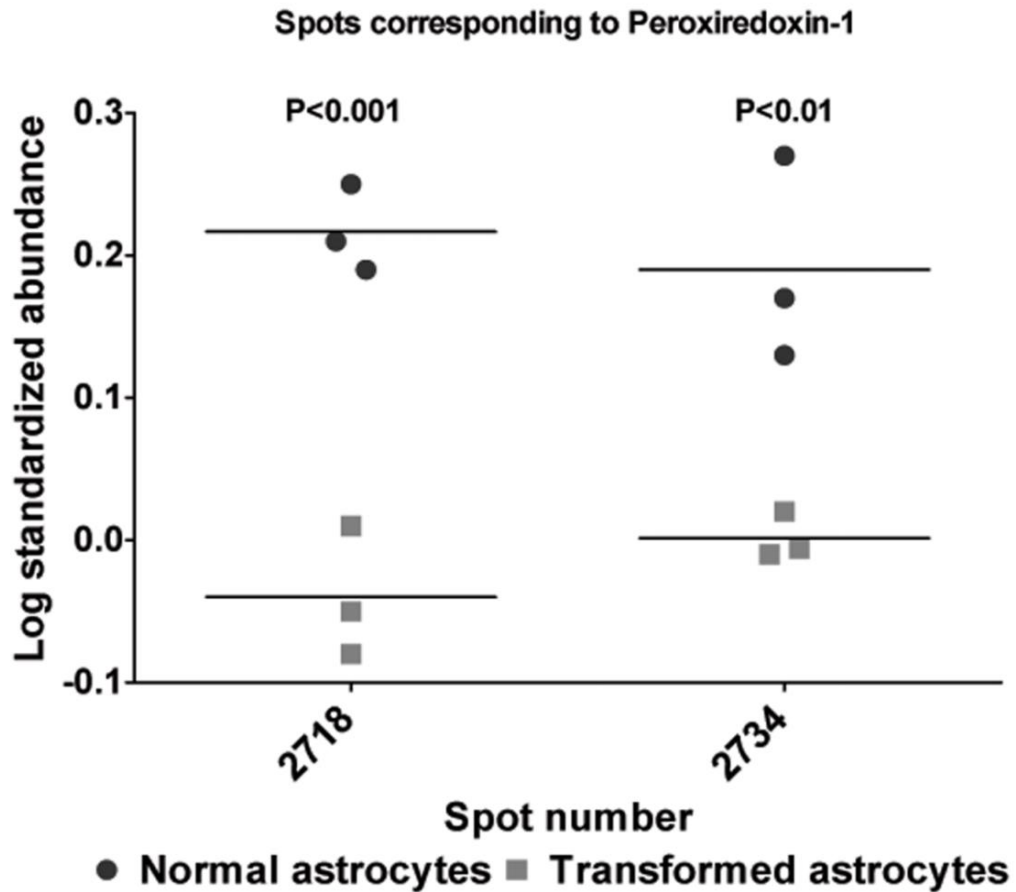
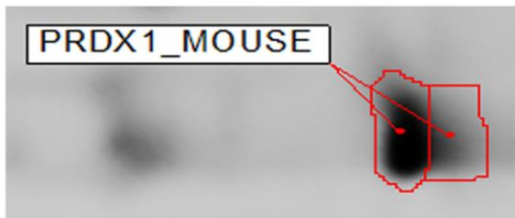
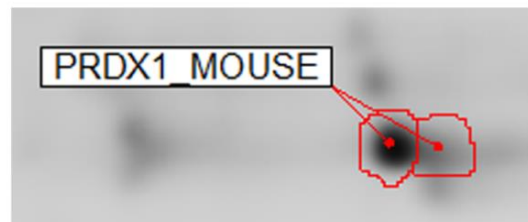
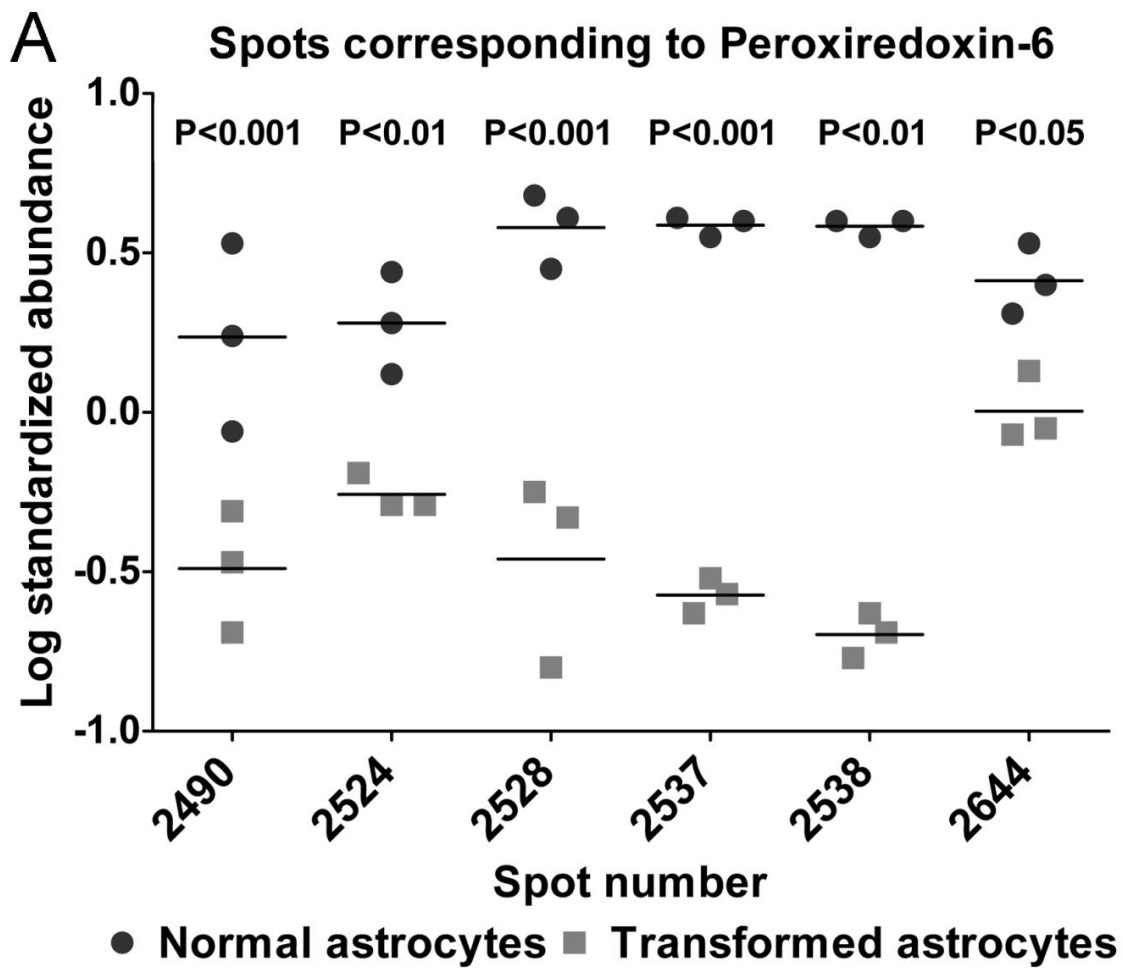
A**B****C**

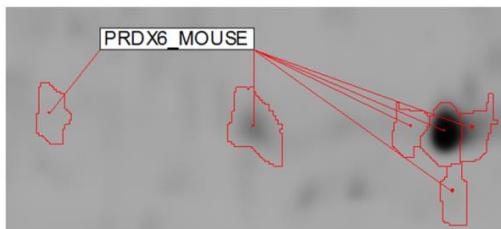
Figure 30 : Changements de l'abondance relative de la peroxyrédoxine 1 (PRDX 1) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée des spots correspondant à la PRDX 1 et qui sont moins abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Localisation sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à la PRDX 1 chez les NA (B) et les TA (C).



B



C

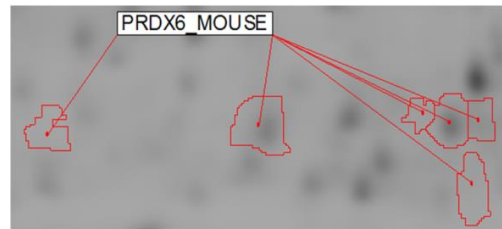


Figure 31 : Changements de l'abondance relative de la peroxyrédoxine 6 (PRDX 6) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée des spots correspondant à la PRDX 6 et qui sont moins abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Localisation sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à la PRDX 6 chez les NA (B) et les TA (C).

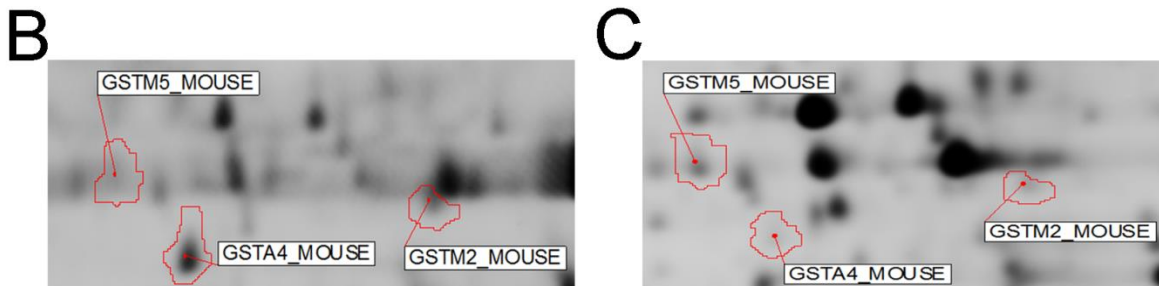
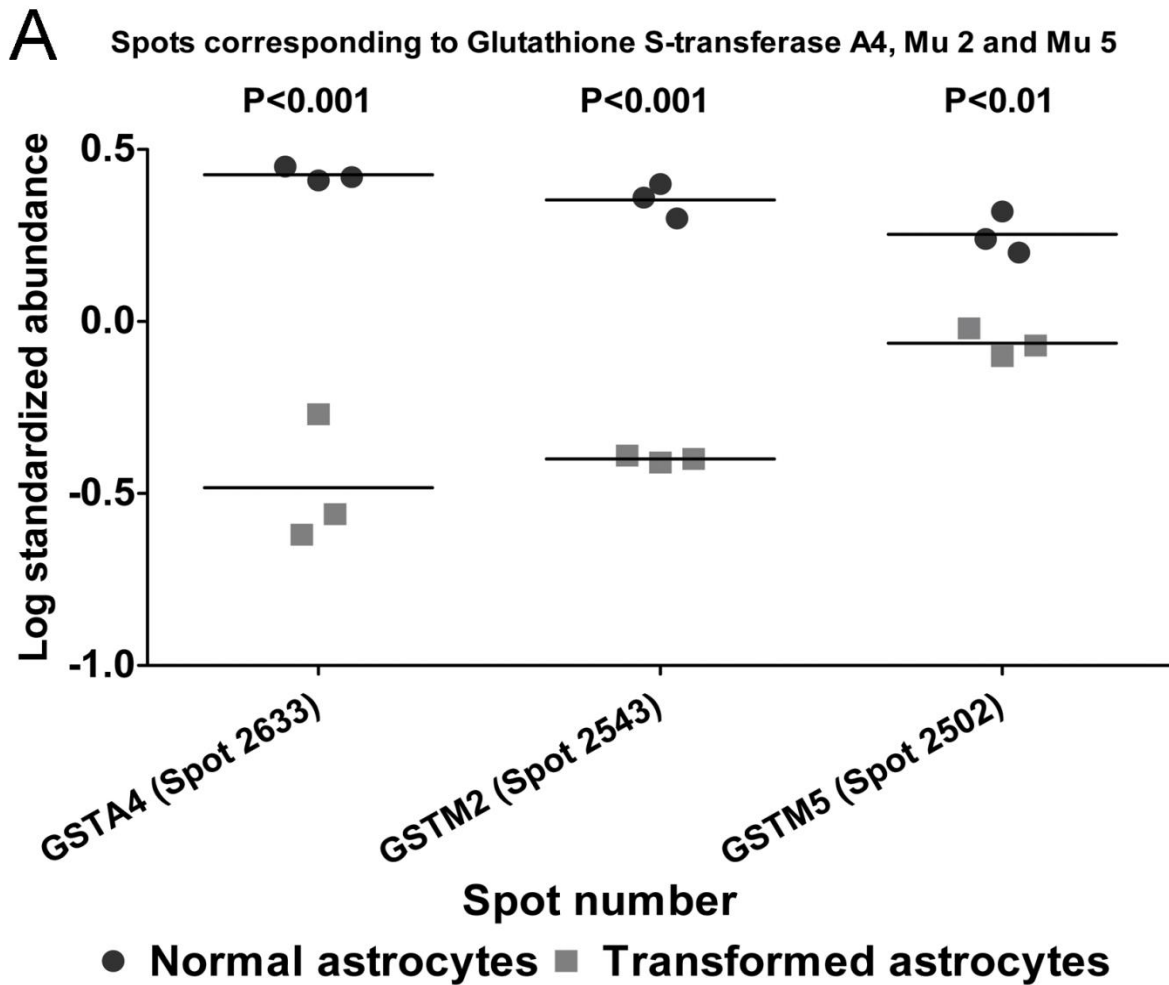


Figure 32 : Changements de l'abondance relative de la peroxyrédoxine 6 (PRDX 6) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée des spots correspondant à la PRDX 6 et qui sont moins abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Localisation sur un gel bidimensionnel des spots correspondant à la PRDX 6 chez les NA (B) et les TA (C).

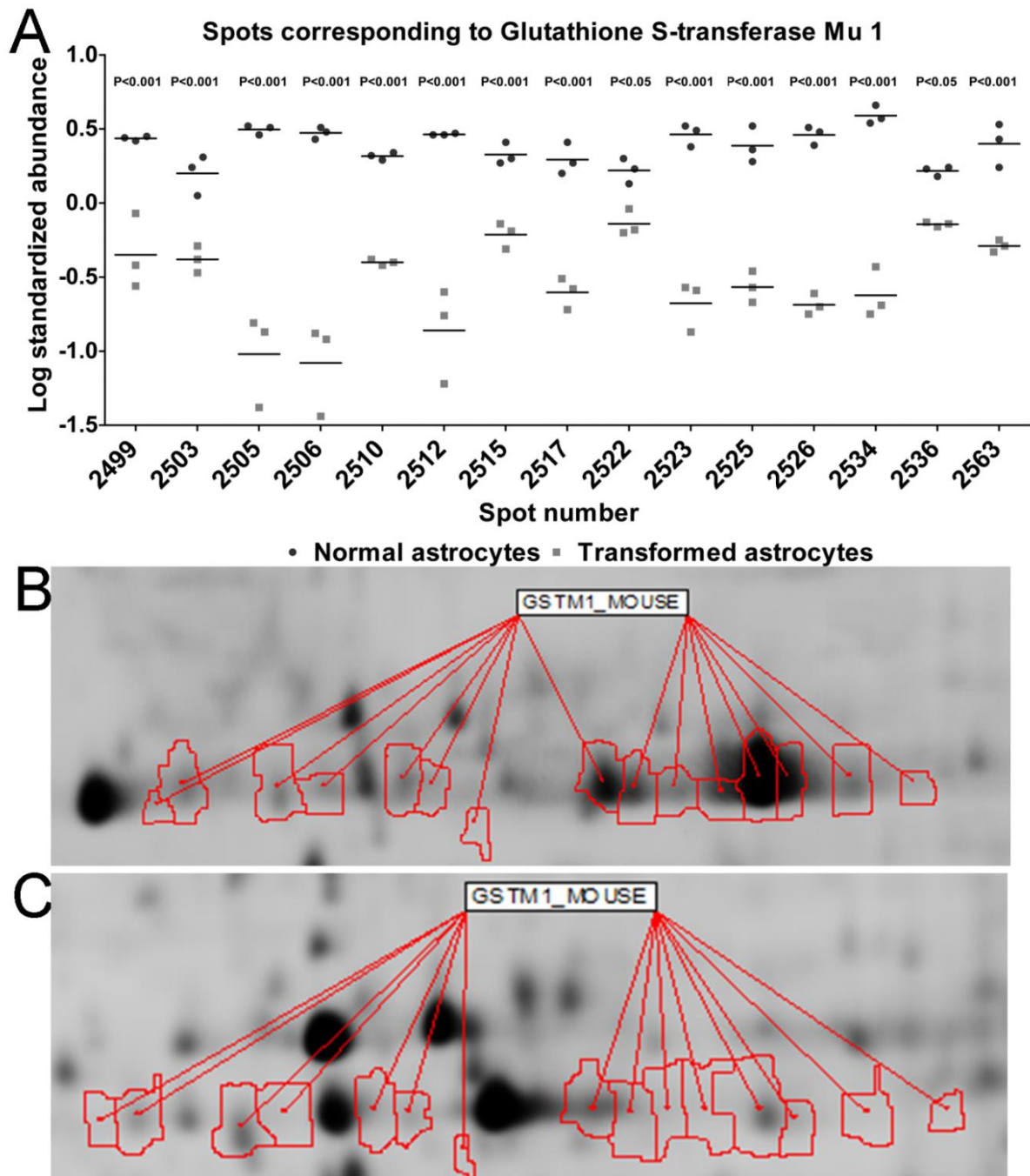


Figure 33 : Changements de l'abondance relative de la glutathion S-transférase M1 (GST M1) chez les NA et les TA.

(A) Représentation graphique de l'abondance standardisée des 15 spots correspondant à la GST M1 et qui sont, tous, moins abondants chez les TA par rapport aux NA.

(B, C) Localisation sur un gel bidimensionnel des 15 spots correspondant à la GST M1 chez les NA (B) et les TA (C).

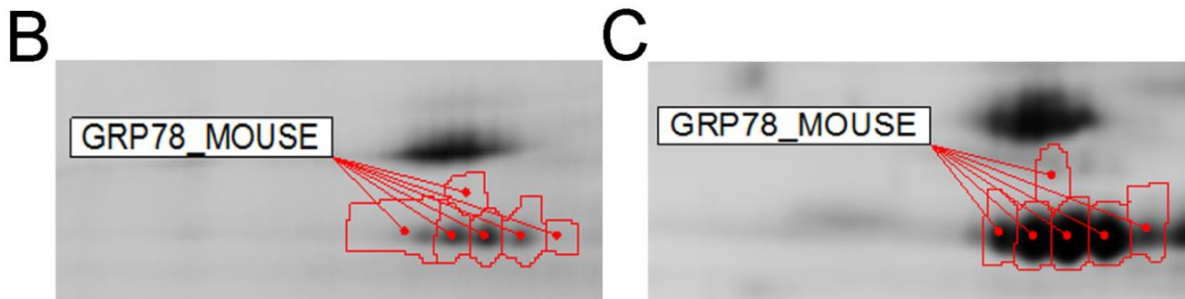
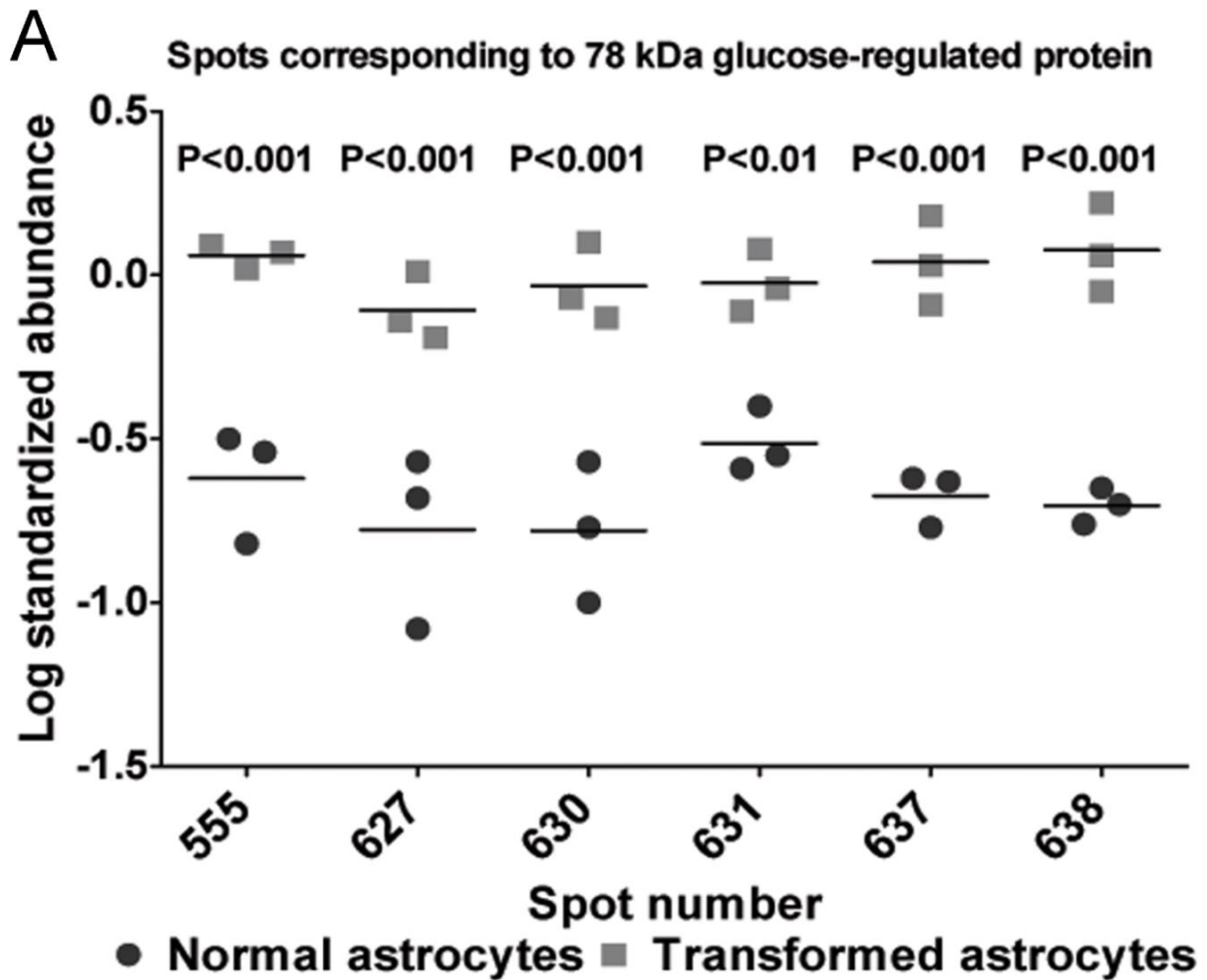


Figure 34 : Changements de l'abondance relative de la 78 kDa glucose-regulated protein (GRP 78) chez les NA et les TA.
 (A) Représentation graphique de l'abondance standardisée des 6 spots correspondant à la GRP 78 et qui sont plus abondants chez les TA par rapport aux NA.
 (B, C) Localisation sur un gel bidimensionnel des 6 spots correspondant à la GRP 78 chez les NA (B) et les TA (C).

DIVERSIFICATION DES SOURCES DE CARBONE

CHEZ LES ASTROCYTES TRANSFORMÉS :

ANALYSE PAR RMN CARBONE

Le métabolisme des cellules cancéreuses se caractérise par la diversification des sources de nutriments utilisées pour alimenter les voies de biosynthèse, produire de l'énergie, et assurer la disponibilité des précurseurs métaboliques nécessaires pour leur croissance et leur survie. Cette spécificité de la reprogrammation métabolique qui accompagne la transformation cancéreuse des cellules se traduit principalement par la capacité des cellules cancéreuses à utiliser des substrats alternatifs au glucose comme le lactate ou la glutamine comme carburant pour leur métabolisme.

Afin de mieux comprendre cet aspect de la reprogrammation métabolique des astrocytes transformés *in vitro*, nous avons réalisé une analyse par RMN carbone 13 (RMN ^{13}C) basée sur l'identification et la quantification de métabolites marqués au carbone 13 (^{13}C). Cette analyse visait à confirmer si, comparativement aux NA, les TA étaient capables d'incorporer et de métaboliser le lactate et/ou la glutamine présents dans le milieu de culture et à suivre leur devenir métabolique.

L'objectif principal de cette approche était de caractériser les flux métaboliques liés à la métabolisation du glucose et/ou de la glutamine et/ou du lactate par les NA et les TA. Cette caractérisation passe principalement par :

- ✓ La détermination du taux de consommation individuelle de chaque métabolite (glucose, lactate ou glutamine) comme seul substrat ou en présence d'autres substrats ce qui permettrait en plus de déterminer le choix métabolique des cellules pour l'utilisation de l'un ou l'autre substrat pour alimenter de manière préférentielle leur métabolisme énergétique.
- ✓ Le suivi des métabolites intracellulaires qui seraient issus de la métabolisation de ces substrats ce qui permettrait de mettre en lumière les voies métaboliques affectées par cette diversification des sources de nutriments qui accompagnerait la reprogrammation métabolique des astrocytes transformés *in vitro*.

Au total, 12 combinaisons de ces trois métabolites ont été utilisées pour répondre à nos questions et obtenir une vue d'ensemble sur les liens qui existeraient entre la reprogrammation métabolique et la transformation cancéreuse des astrocytes.

Le schéma expérimental que nous avons choisi d'appliquer pour cette analyse consiste à cultiver les cellules (NA et TA) dans un milieu de culture dépourvu de glucose, de glutamine et de lactate et dans lequel nous introduisons une quantité connue d'un substrat marqué au ^{13}C associé ou non à d'autres métabolites non marqués.

Pour chaque type cellulaire, l'analyse portera sur :

- Des fractions de milieu de culture ponctionnées à différents temps de la culture (0, 15, 45, 60, 120 et 240 min) ce qui nous permettra de déterminer le taux d'utilisation des métabolites présents dans le milieu de culture et d'identifier les métabolites secrétés dans le milieu extracellulaire et fabriqués à partir du métabolite marqué au ^{13}C utilisé.
- Des extraits cellulaires pour analyser les métabolites intracellulaires qui dérivent du métabolite marqué au ^{13}C utilisé.

Pour l'analyse des flux métaboliques liés à la métabolisation du glucose nous avons cultivé les NA et les TA en présence de :

- ✓ Glucose marqué au ^{13}C seul
- ✓ Glucose marqué au ^{13}C associé à la glutamine non marquée
- ✓ Glucose marqué au ^{13}C associé au lactate non marqué
- ✓ Glucose marqué au ^{13}C associé à la glutamine et au lactate non marqués

Pour l'analyse des flux métaboliques liés à la métabolisation du lactate nous avons cultivé les NA et les TA en présence de :

- ✓ Lactate marqué au ^{13}C seul
- ✓ Lactate marqué au ^{13}C associé au glucose non marqué
- ✓ Lactate marqué au ^{13}C associé la glutamine non marquée
- ✓ Lactate marqué au ^{13}C associé au glucose et à la glutamine non marqués

Pour l'analyse des flux métaboliques liés à la métabolisation de la glutamine nous avons cultivé les NA et les TA en présence de :

- ✓ Glutamine marquée au ^{13}C seule
- ✓ Glutamine marquée au ^{13}C associée au glucose non marqué

- ✓ Glutamine marquée au ^{13}C associée au lactate non marquée
- ✓ Glutamine marquée au ^{13}C associée au glucose et au lactate non marqués

Cette analyse représente plus de 750 échantillons à analyser correspondant à autant de spectre à acquérir et à analyser. Sachant que l'acquisition d'un spectre ^{13}C classique nécessite en moyenne 12 heures et que le nombre d'échantillons à traiter est très important, nous avons décidé d'utiliser une méthode d'acquisition plus simplifiée appelée HSQC (Heteronuclear Single quantum coherence spectroscopy) qui permet de réduire le temps d'acquisition des spectres jusqu'à 1h15min par spectre. Cette méthodologie permet d'obtenir des spectres RMN en deux dimensions qualifiés de spectres hétéronucléaires car ils permettent la corrélation entre 2 atomes différents (dans notre cas, le proton et le carbone). D'une manière générale, la dimension horizontale d'un spectre HSQC représente le proton tandis que la dimension verticale représente le carbone. La corrélation entre les deux dimensions d'un spectre HSQC permet d'identifier facilement les molécules présentes dans un mélange complexe (extrait cellulaire, milieux de culture...) et de quantifier le volume des taches de corrélation correspondant à ces molécules et qui représentent l'intersection entre les deux dimensions.

Les résultats préliminaires obtenus à partir de ces expériences montrent que les 2 types cellulaires sont capables d'utiliser le lactate comme substrat initial pour alimenter leur métabolisme et ce indépendamment de la présence du glucose et/ou la glutamine comme substrats complémentaires. Nos résultats montrent également que les 2 types cellulaires sont capables de produire du lactate marqué au ^{13}C à partir du glucose ^{13}C présent dans le milieu de culture. Ces résultats ne donnent que des indications non validées statistiquement sur le métabolisme du glucose et du lactate dans les NA et TA. Des analyses plus poussées doivent encore être faites pour confirmer les tendances que nous venons de décrire dans ce paragraphe (Fig.35 et 36).

L'analyse des flux métaboliques liés à la glutamine n'a, malheureusement, pas débouché sur les résultats escomptés. En effet, les spectres obtenus étaient très complexes et difficilement interprétables principalement à cause de la multiplicité des signaux correspondant à la glutamine marquée au ^{13}C et aux métabolites qui en dérivent. Cette multiplicité des signaux était due à l'utilisation d'une forme de glutamine marquée au ^{13}C sur toutes les molécules de carbone.

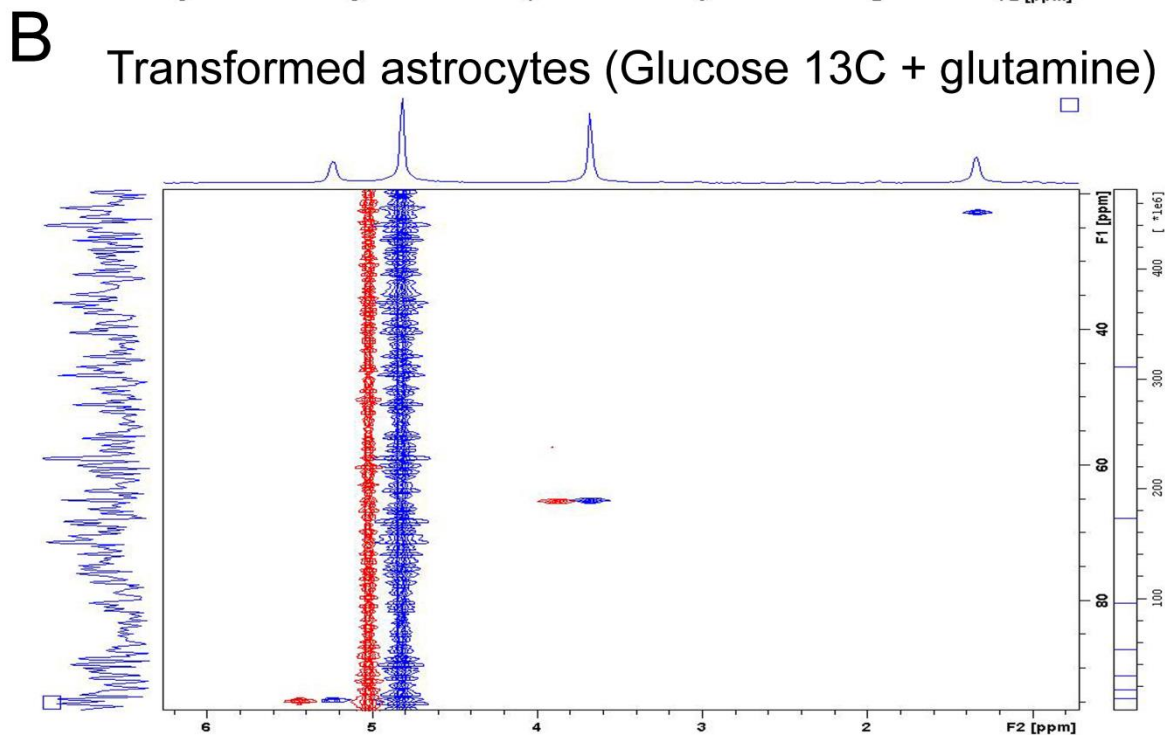
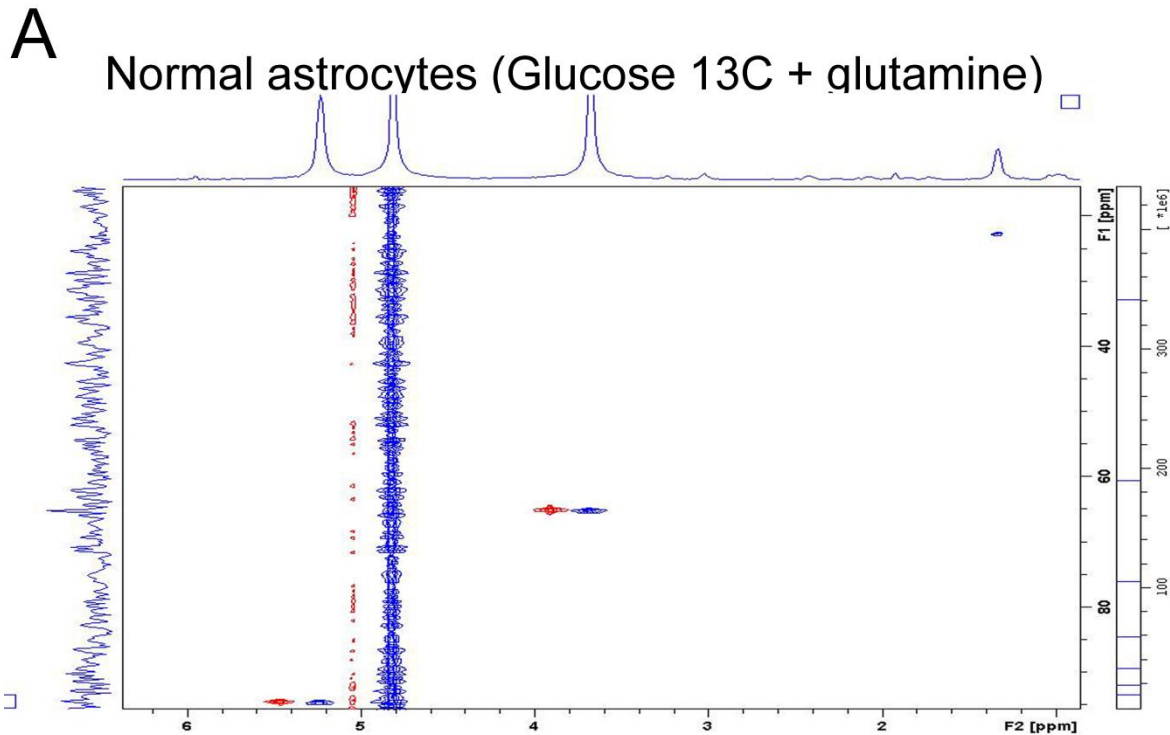
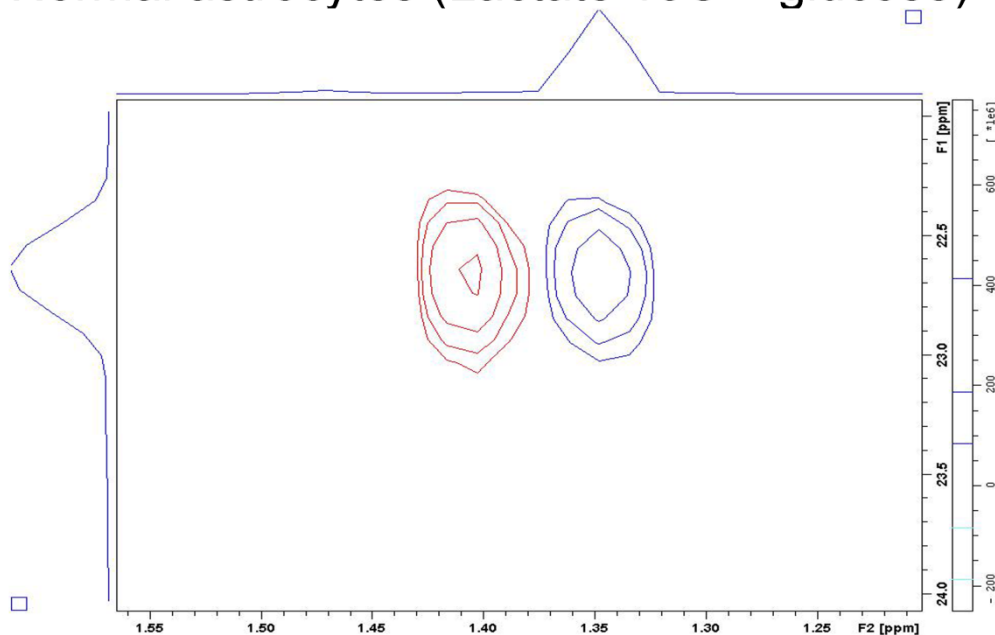


Figure 35 : Spectres HSQC obtenus à partir des milieux de culture des NA (A) et des TA (B) prélevés à 0 min (visualisé en rouge) et à 240 min (visualisé en bleu). Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture contenant du glucose ^{13}C . Les taches de corrélation correspondant au glucose ^{13}C se situent en bas à gauche du spectre et celles correspondant au lactate ^{13}C se situent en haut à droite du spectre. Pour les 2 types cellulaires, nous avons constaté une diminution de la quantité de glucose ^{13}C présente dans le milieu de culture. Ainsi, à 0 min le volume des taches de corrélation du glucose ^{13}C était de 0,81 pour les NA et les TA tandis qu'à 240 min le volume des taches de corrélation était seulement de 0,58 pour les NA et de 0,4 pour les TA. Pour le lactate ^{13}C aucune tache de corrélation n'est détectée à 0 min, tandis qu'à 240 min le volume de la tache de corrélation correspondant au lactate ^{13}C était de 0,24 pour les NA et 0,53 pour les TA.

A Normal astrocytes (Lactate ^{13}C + glucose)



B Transformed astrocytes (Lactate ^{13}C + glucose)

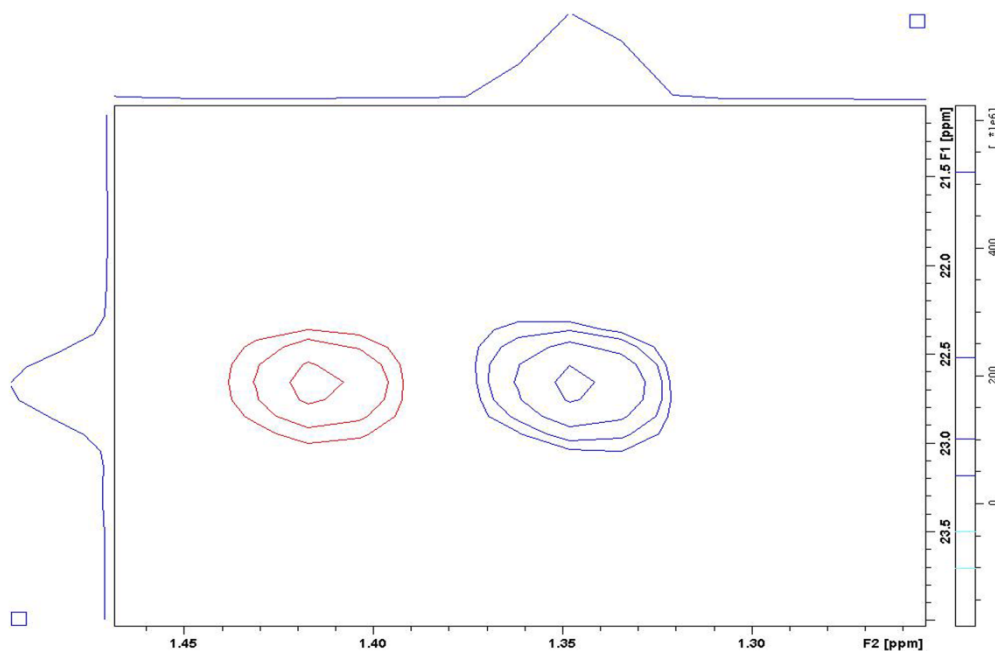


Figure 36 : Spectres HSQC obtenus à partir des milieux de culture des NA (A) et des TA (B) prélevés à 0 min (visualisé en rouge) et à 240 min (visualisé en bleu) montrant les zones contenant les taches de corrélation correspondant au lactate. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture contenant du lactate ^{13}C et du glucose non marqué. Pour les 2 types cellulaires nous avons constaté une diminution de la quantité de lactate ^{13}C présente dans le milieu de culture et ce malgré la présence de quantités équivalentes de glucose non marqué. Ainsi, à 0 min le volume des taches de corrélation du lactate ^{13}C était de 4,9 pour les NA et les TA tandis qu'à 240 min le volume des taches de corrélation était seulement de 4,5 pour les NA et de 3,84 pour les TA.

DISCUSSION

Les altérations métaboliques qui surviennent au cours de la transformation cancéreuse sont supposées jouer des rôles clés dans le maintien de la survie et dans la prolifération des cellules cancéreuses.

Les travaux de recherche menés au cours de mon doctorat avaient pour principal objectif la caractérisation de la signature protéique et métabolique des astrocytes transformés *in vitro* par rapport aux astrocytes normaux. Cette caractérisation s'est principalement appuyée sur une approche protéomique globale basée sur une analyse en 2D-DIGE couplée à la spectrométrie de masse. Cette approche est particulièrement adaptée pour identifier et caractériser, simultanément, différentes isoformes enzymatiques et de nombreuses protéines structurales. Ainsi on peut estimer que l'approche protéomique que nous avons choisie pour établir le profil protéique des TA par rapport aux MA constitue un outil efficace pour la caractérisation des différents aspects de la reprogrammation métabolique qui accompagne le processus de transformation cancéreuse.

Outre la mise en évidence de la reprogrammation métabolique des TA par 2D-DIGE, nous avons détaillé et validé par différentes mesures fonctionnelles certains des changements majeurs qui accompagnent ce phénomène. Ces validations nous ont permis d'établir une corrélation entre la détermination de l'abondance de certaines enzymes et le profil métabolique des TA.

Mis à part les changements métaboliques qui seront discutés en détails ci-dessous, notre étude a révélée d'autres changements, non métaboliques, qui accompagnent classiquement la transformation cancéreuse. Parmi ces changements, nous avons détecté une réduction de l'abondance de plusieurs composants du cytosquelette (actine, protéines associées à l'actine, ezrine, moesine...) dont une protéine cytosquelettique spécifique des astrocytes (GFAP) dans les TA.

L'ezrine et la moesine font partie de la famille ERM (Ezrin, Radixine, Moesine). Cette famille protéique joue un rôle important dans la connexion entre les microfilaments du cytosquelette et la membrane plasmique. Ces protéines participent à la structuration du cortex cellulaire et jouent un rôle important dans l'organisation des domaines membranaires en interagissant avec les protéines transmembranaires (pour revue [260]). Cependant, le rôle de la famille ERM dans les gliomes reste toujours mal établi. Par exemple, certaines études mettent en avant une réduction de l'expression de l'ezrine dans certaines catégories de

gliomes [210] tandis que d'autres études décrivent une augmentation de l'expression de la moesine dans les cellules transformées [261].

D'autres part, la GFAP est le composant principal des filaments intermédiaires chez les astrocytes (pour revue [28]). La réduction ou la perte de l'expression de la GFAP a été proposée comme une étape importante dans la progression des tumeurs gliales, en particulier dans les gliomes de haut grade [262-266]. En plus la réduction de l'abondance de la GFAP pourrait être liée à la prolifération. En effet, plusieurs études montrent qu'au sein d'une même tumeur, les cellules négatives à la GFAP proliféraient plus rapidement que les cellules positives à la GFAP [267, 268]. En se basant sur ces observations, on peut supposer que la forte réduction de l'abondance de la GFAP que nous avons constatée dans les TA pourrait être considérée comme un signe de dédifférenciation et de forte prolifération de ces cellules.

Par ailleurs, la classification des protéines différenciellement abondantes entre les NA et les TA montre que, dans les TA, ces changements protéiques se traduisent principalement par :

- ✓ Une augmentation de l'abondance des protéines impliquées dans le métabolisme des carbohydrates (en particulier les enzymes de la glycolyse), le métabolisme des acides aminés et des acides nucléiques ainsi que des protéines impliquées dans le métabolisme et la modification protéique.
- ✓ Une diminution de l'abondance de plusieurs protéines impliquées dans le cycle de Krebs ou encore jouant un rôle dans la lutte contre le stress oxydatif.

Certains des changements protéiques que nous avons observés dans les TA évoquent les adaptations métaboliques qui caractérisent la glycolyse aérobie communément appelée « Effet Warburg » [157, 158]. Nos résultats montrent en effet que par rapport aux NA, les TA exhibent une plus forte abondance de la plupart des enzymes impliquées dans la glycolyse.

Au premier abord, ce constat laisse suggérer que les TA possèdent une plus grande capacité à utiliser le glucose comme carburant pour leur métabolisme. Cependant, les conséquences de cette augmentation de l'abondance des enzymes glycolytiques sont plus complexes que la simple augmentation de la consommation du glucose notamment à cause de la multitude des rôles non-métaboliques attribués aux enzymes de la glycolyse. Par exemple, une étude de 2003 pointe le rôle possible de la LDH et de la GAPDH dans la régulation de la

transcription [269]. D'autres études suggèrent que l'énolase pourrait être exprimée à la surface cellulaire où elle agirait comme récepteur pour le plasminogène contribuant ainsi à la migration cellulaire et aux métastases cancéreuses [164, 270]. Par ailleurs et indépendamment de son rôle dans la glycolyse, la PKM 2 pourrait jouer un rôle dans la mort cellulaire programmée [271] ou encore dans la transactivation de la bêta-caténine suite à sa translocation dans le noyau sous l'action de l'EGFR jouant ainsi un rôle dans la prolifération cellulaire et dans la tumorigenèse [272]. Comme on vient de l'illustrer par ces quelques exemples, les enzymes impliquées dans la glycolyse jouent de nombreux rôles non-métaboliques et bien que ces rôles soient importants dans l'accomplissement de certaines fonctions astrocytaires nous ne discuterons que les implications purement métaboliques de ces enzymes dans la transformation cancéreuse des astrocytes.

Parmi les protéines différentiellement abondantes entre les NA et les TA, nous avons constaté une augmentation de l'abondance relative de PKM 1 et PKM 2 dans les TA.

Dans les tissus ou les cellules, la PK est représentée par plusieurs isoenzymes en fonction du statut métabolique de ceux-ci [273]. Quatre isoenzymes de PK ont été décrites jusqu'à ce jour :

- ✓ La PK de type L caractéristique des tissus à haut taux de gluconéogenèse comme le foie ou le rein par exemple.
- ✓ La PK de type R présente dans les érythrocytes.
- ✓ La PK de type M1 exprimée par les tissus à haut turnover énergétique comme le muscle ou le cerveau.
- ✓ La PK de type M2 qu'on peut retrouver dans le poumon ou dans les cellules ayant un taux important de synthèse d'acide nucléique tel que les cellules embryonnaires, les cellules souches adultes et les cellules tumorales.

Les PK de type M1 et M2 sont deux produits différents issus de l'épissage alternatif d'un même ARNm et qui ne diffèrent entre eux que par 21 acides aminés localisés dans un fragment de 45 acides aminés [274].

Pendant de nombreuses années, les chercheurs ont désigné PKM 2 comme la seule isoforme de PKM exprimée par les cellules cancéreuses [255]. En 2008, les travaux de recherche de Christofk et ses collaborateurs montraient que l'expression de la PKM 2 était

indispensable pour la glycolyse aérobie [257]. Cependant, une étude plus récente montre que le changement d'expression des isoformes de la PK en faveur de PKM 2 qui survient dans les cellules cancéreuses n'était pas nécessairement associé au développement tumoral [275]. Les auteurs de ce travail concluent que PKM 2 ne serait pas spécifique des cellules en prolifération ou des cellules cancéreuses et suggèrent que l'augmentation de l'activité glycolytique observée dans les cellules cancéreuses serait liée à la surexpression globales des deux isoformes de la PKM [275]. Ces conclusions sont en accord avec nos observations en WB qui montrent que par rapport aux NA, les TA présentaient une plus forte abondance des deux isoformes de la PKM. Cette augmentation de l'abondance de PKM 1 et de PKM 2 dans les TA a eu comme conséquence une augmentation de l'activité enzymatique globale de PK. Cette augmentation de l'activité PK dans les TA ne peut être attribuée à l'une ou l'autre isoformes de PKM dans la mesure où nous ne disposons pas d'estimations de l'abondance relative de chacune de ces isoformes dans nos échantillons NA et TA.

Le changement de l'abondance de PKM 1 et PKM 2 que nous observons chez les TA pourraient également avoir des effets non métaboliques sur les TA notamment en influençant des processus essentiels pour la prolifération cellulaire comme la synthèse des nucléotides. En effet, Lunt et al. [276] ont démontré que suite à la perte de l'expression de PKM 2 des cellules primaires, non transformées et non immortalisées, induisait un arrêt de la prolifération et une expression de PKM 1. Les auteurs suggèrent que cet arrêt de prolifération serait lié à une altération de la capacité des cellules à produire des nucléotides et à synthétiser de l'ADN suite à l'induction de l'expression de PKM 1 et non suite à la perte d'expression de PKM 2.

Par ailleurs, il est admis, que comparativement à la PKM 1, la PKM 2 présente une activité enzymatique intrinsèque plus faible [277]. Cependant, Bluemlein et ses collaborateurs suggèrent qu'une forte concentration de PKM 2 pourrait être tout à fait responsable d'une grande partie de l'activité enzymatiques PKM dans les tissus normaux et dans les cancers [275]. En plus la PKM 2 peut exister sous 2 conformations multimériques (une forme dimérique inactive et une forme tétramérique active) qui génèrent des bilans énergétiques différents [250-253]. Ainsi la surabondance de PKM 2 que nous constatons dans les TA pourrait avoir des conséquences métaboliques importantes pour les besoins énergétiques des TA.

En effet, la forme tétramérique de la PKM 2 est caractérisée par une forte affinité à son substrat, le PEP, et permet la production de pyruvate et par là de lactate à partir de glucose tandis que la forme dimérique est considérée comme inactive. L'activité enzymatique de la forme tétramérique de la PKM 2 seule ou associée à l'activité enzymatique de PKM 1 (quand les 2 isoformes sont co-exprimées) nécessite que le NADH généré lors de l'étape catalysée par la GAPDH soit oxydé en NAD^+ pour permettre à la glycolyse de fonctionner de manière continue. Dans des conditions d'aérobie, le fonctionnement de ce système dépend des réactions enzymatiques impliquées dans la navette « malate/aspartate » [278] et dans la navette « glycérol 3-phosphate/dihydroxyacétone » [255]. Cependant, en conditions d'anaérobie le fonctionnement de ce système dépend de l'activité de la LDH qui consomme le NADH lors de la formation de lactate. Notre analyse 2D-DIGE montre que la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (impliquée dans la navette « glycérol 3-phosphate/dihydroxyacétone ») ainsi que la LDH étaient plus abondantes dans les TA que dans les NA ce qui laisse suggérer que les capacités glycolytiques des TA seraient supérieures à celles des NA et ce indépendamment de leur statut aérobie. Ainsi la forte production de lactate que nous avons détectée dans le milieu de culture des TA serait une preuve que la PKM 2 exprimée par les TA le serait dans une mesure importante sous sa forme tétramérique enzymatiquement active.

En plus, l'augmentation de la sécrétion du lactate dans le milieu de culture des TA semble concordante avec le ralentissement du cycle de Krebs que nous avons constaté chez les TA et qui se manifeste par la réduction de l'abondance de plusieurs enzymes impliquées dans ce cycle.

Par ailleurs, l'augmentation de la sécrétion du lactate par les TA est favorisée par le switch d'expression en faveur des isoformes de la LDH riches en chaîne A qu'on retrouve en surabondance dans les TA. Ce switch d'expression de la LDH est connu pour son implication dans la production du lactate à partir du pyruvate [279]. En effet, la surabondance de la chaîne A de la LDH par rapport à la chaîne B favorise la formation des tétramères LDH 5 (LDH A₄) et LDH 4 (LDH A₃B₁) composés principalement de chaîne A. Par ailleurs, une corrélation positive a été établie entre l'expression de la LDH 5 et le grade/la malignité de certains astrocytomes [280]. Ce constat et nos observations concernant l'expression de la LDH dans les TA sont compatibles avec le comportement agressif/malin des TA qui sont capables de former des gliomes de haut grade lorsqu'ils sont greffés chez des souris Nude [141].

La forme dimérique de PKM 2 présente une faible affinité au PEP et est inactive à des concentrations physiologiques de PEP. Cette inactivité est responsable du ralentissement de la glycolyse, de la diminution de la production de pyruvate et de l'accumulation des métabolites intermédiaires produits en amont de la réaction catalysée par la PK ce qui permet d'alimenter les processus anaboliques [253, 254, 256, 257]. Dans les TA, ce possible ralentissement de la glycolyse et l'accumulation des métabolites intermédiaires qui découleraient de la présence de la forme dimérique de la PKM 2 seraient accompagnés par une augmentation de l'abondance de la transaldolase et la transkétolase, deux enzymes centrales du PPP, ce qui se traduirait par une augmentation de l'activité de la PPP. Cette augmentation de l'abondance des principales enzymes du PPP permettrait aux TA de synthétiser du ribose 5-phosphate et de l'érythrose 4-phosphate nécessaires pour la synthèse des nucléotides, des acides nucléiques ou encore pour la synthèse des acides aminés aromatiques. Cette régulation des enzymes du PPP qui se manifeste de manière concomitante avec une présence plus importante de la forme dimérique de PKM 2 jouerait un rôle important dans la prolifération cellulaire des TA.

En plus de son rôle dans la synthèse et la production des nucléotides, le PPP joue également un rôle important dans la détoxification et la lutte contre les radicaux libres [281-283]. En effet, le NADPH produit via la phase oxydative du PPP est utilisé par les réactions de biosynthèse réductrice impliquées dans la prévention des dommages liés au stress oxydatif [189, 284, 285].

Ainsi, on peut suggérer que l'augmentation de l'abondance de la PKM 2 dans les TA pourrait jouer un rôle dans le soutien des processus anaboliques ce qui confère à ces cellules un avantage métabolique sélectif tout en leur permettant de maintenir une défense antioxydative favorable à leur survie dans des conditions de stress oxydatif intense caractéristiques de nombreuses cellules cancéreuses [286].

Les cellules, et en particulier les cellules cancéreuses, développent généralement de nombreuses stratégies pour lutter contre le stress oxydatif. La diminution de l'activité du cycle de Krebs et de la respiration mitochondriale figurent parmi ces stratégies que les cellules cancéreuses mettent en place pour contrôler leur balance redox, échapper à l'apoptose et maintenir leur croissance [163, 287]. D'une manière cohérente avec ces observations, nous avons constaté une réduction de la consommation d'oxygène ainsi qu'une diminution de l'abondance de nombreuses enzymes mitochondriales par les TA. Ces adaptations

permettraient aux TA de générer moins d'ERO et de consacrer plus de ressources métaboliques pour soutenir la prolifération.

D'un autre côté, les enzymes qui participent à la neutralisation des radicaux libres comme les peroxyrédoxines représentent une autre ligne de défense contre le stress oxydatif. Ces enzymes agissent essentiellement en régulant la concentration intracellulaire des peroxydes qui induisent les dommages oxydatifs [288-290] et en intervenant dans la transduction de nombreux signaux dans les cellules de mammifères [291, 292]. L'augmentation de l'expression des peroxyrédoxines a été constatée dans de nombreux cancers [293-299] y compris dans certains gliomes [300]. D'une manière interpellante et contrairement aux données de la littérature qu'on vient de présenter, nous avons constaté une forte baisse de l'abondance relative de la PRDX 1 et de la PRDX 6 dans les TA comparativement aux NA. D'une manière intéressante, une étude récente rapporte que certains astrocytomes diffus présentaient des niveaux indétectables de PRDX 1 et PRDX 6 et que les tumeurs astrocytaires immunohistologiquement positives à PRDX 1 et 6 exhibaient une prolifération plus lente que les tumeurs négatives à la PRDX 1 et 6 [301]. Ainsi on pourrait associer la diminution de l'abondance de la PRDX1 et la PRDX 6 que nous avons constatée dans les TA avec leur forte prolifération cellulaire décrite en 2009 par Dufour [141]. Ces constats suggèrent que le rôle de la PRDX 1 et la PRDX 6 dans les cellules transformées s'étendrait au-delà de leur implication dans la lutte contre le stress oxydatif.

Par ailleurs, notre analyse a révélé que, par rapport aux NA, les TA exhibent une plus faible abondance de la GST M 1, 2, 5 et la GST A4. Les membres de la famille GST catalysent la conjugaison du glutathion avec une grande variété de molécules endogènes impliquées dans le stress oxydatif mais également avec de nombreuses molécules électrophiles exogènes (par exemple des agents carcinogènes, des agents chimiothérapeutiques ou encore les métabolites qui en dérivent ...) [302-304]. Nos observations sont en accord avec plusieurs données qui indiquent une faible expression/abondance des GST M et des GST A dans certains gliomes humains [305] et dans certaines lignées cellulaires d'astrocytomes [303]. En se basant sur ces données, on peut conclure que la détoxification contrôlée par les GST ne serait pas indispensable pour les tumeurs cérébrales aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. D'une manière intéressante, nous avons constaté que les NA et les TA présentaient des niveaux équivalents de glutathion intracellulaire ce qui pourrait s'expliquer par l'importance d'autres rôles joués par le

glutathion dans une multitude de processus cellulaires comme la prolifération cellulaire, la synthèse des protéines ou de l'ADN ou encore dans la régulation de nombreux processus métaboliques contrôlant la croissance des cellules cancéreuses et les métastases [306].

Un autre aspect intéressant de la reprogrammation métabolique des TA est la perte partielle voire totale de certaines protéines/fonctions spécifiques des astrocytes. En effet, nos résultats montrent que les TA expriment plus faiblement la PC, la GS, la GFAP ainsi que certaines enzymes impliquées dans la dégradation et le métabolisme du glycogène.

La PC est considérée comme un marqueur spécifique des astrocytes [30]. Cette enzyme mitochondriale catalyse la conversion du pyruvate en oxaloacétate et joue un rôle important comme enzyme anaplérotique en permettant l'enrichissement du cycle de Krebs en métabolites intermédiaires nécessaires à la synthèse des lipides et des acides nucléiques. Dans les astrocytes, la PC intervient également dans la voie de synthèse du glutamate et de la glutamine [307]. Par ailleurs il a été établi que la PC était requise pour la croissance des cellules tumorales déficientes en glutaminase et qui ne peuvent donc pas s'appuyer sur la glutamine pour alimenter leur métabolisme anaplérotique [308]. Sur base de ses observations, on peut ainsi suggérer que le métabolisme des TA dépendrait en partie de l'utilisation de la glutamine tant comme source de carbone pour la biosynthèse de macromolécules que comme substrat alternatif pour alimenter leur métabolisme énergétique. En effet l'addiction à la glutamine exhibée par les cellules tumorales est un phénomène connu depuis plusieurs décennies [309]. Cette spécificité métabolique des cellules cancéreuses pourrait être influencée par l'action de certains oncogènes comme c-Myc [310, 311] et constituerait une cible intéressante pour la caractérisation par imagerie des tumeurs glutaminolytiques [312]. En plus, l'hypothèse selon laquelle les TA seraient accros à la glutamine est renforcée par le fait que nos résultats prouvent que la concentration de la glutamine extracellulaire diminuait avec le temps dans le milieu de culture des TA.

Par ailleurs, les TA exhibent à la fois une faible abondance protéique ainsi qu'une faible activité enzymatique de la GS. La GS est une enzyme astrocytaire qui joue un rôle dans le métabolisme de l'ammonium et dans le recyclage et l'inactivation du glutamate. Des études récentes suspectent la diminution de l'expression de la GS, observée dans certains gliomes, d'être responsable des crises d'épilepsie qui accompagnent ces gliomes notamment à cause de l'accumulation du glutamate dans l'espace extracellulaire [313]. En plus, d'autres études ont établi une corrélation négative entre le niveau d'expression de la GS et le degré de malignité

histologique de certaines tumeurs cérébrales [314]. Ainsi la diminution de l'abondance et de l'activité enzymatique de la GS dans les TA pourraient être considérée comme un témoin de la malignité de ces cellules.

Le métabolisme du glycogène semble être une autre fonction astrocytaire réduite suite à la transformation cancéreuse des astrocytes. En effet, il est généralement admis que le glycogène cérébral est uniquement localisé dans les astrocytes [315]. En effet, ceux-ci expriment toute la machinerie enzymatique requise pour la synthèse et la dégradation du glycogène. Parmi ces enzymes figure la glycogène phosphorylase qui catalyse une étape clé dans la dégradation du glycogène et qui mène à la production du glucose-1-phosphate. Nos observations concernant le métabolisme du glycogène dans les TA (cultivées dans des conditions normoxiques) sont en contradiction avec des travaux récents qui désignent le métabolisme du glycogène comme un élément de la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses [316, 317]. Ces études indiquent une augmentation de la capacité des cellules cancéreuses à utiliser le glycogène ce qui leur permet de mieux soutenir la prolifération cellulaire et ce même dans des conditions hypoxiques [318, 319].

Afin de compléter notre caractérisation protéomique de la transformation cancéreuse des astrocytes, nous avons également réalisé des mesures de métabolites chez les NA et les TA par RMN. Ainsi, nous avons suivi l'évolution de certains métabolites intracellulaires et présents dans le milieu de culture des NA et des TA. Les résultats que nous avons obtenus ont permis d'éclaircir certaines zones d'ombres concernant le métabolisme des TA et de conforter certaines des hypothèses formulées sur base de notre analyse 2D-DIGE.

Ainsi, en analysant les métabolites présents dans le milieu de culture des NA et des TA par RMN, nous avons observé une diminution significative de l'abondance de la glutamine dans le milieu des TA tandis que les NA maintiennent une concentration stable de la glutamine extracellulaire. Ce constat permet une meilleure compréhension du comportement cancéreux des TA notamment au vu des rôles joués par la glutamine dans la survie cellulaire mais également dans la croissance et la prolifération. En effet, la glutamine est à la fois source de carbone et d'azote et est essentielle pour de nombreux processus de biosynthèse en particulier la synthèse des purines et pyrimidines qui participent à la prolifération cellulaire [320]. La glutamine joue également un rôle essentiel dans la synthèse du citrate nécessaire à la synthèse de lipides [321] et du glutathion [322]. Par ailleurs des études montrent que dans certaines lignées cellulaires cancéreuses, la glutamine alimente une

importante fraction des réactions anaplérotiques et ce même en présence d'autres métabolites comme le glucose [160].

Cependant, et d'une manière assez contradictoire, la diminution du taux de la glutamine dans le milieu de culture des TA n'est pas corrélée avec une augmentation des capacités enzymatiques des TA pour utiliser efficacement la glutamine comme précurseur anaplérotique. En effet, nos résultats ont mis en lumière une diminution de l'abondance relative de certaines enzymes impliquées dans les réactions anaplérotiques associées à la métabolisation de la glutamine, par exemple la Glutamate déshydrogénase.

Pour conclure, grâce à l'utilisation d'une approche protéomique globale basée sur la 2D-DIGE, nous avons pu mettre en évidence un grand nombre de spécificités métaboliques caractérisant le processus de transformation cancéreuse des astrocytes *in vitro*. Ces spécificités métaboliques constituent un ensemble d'adaptations protéiques/enzymatiques susceptibles de favoriser la survie, la croissance et la prolifération des astrocytes transformés. En effet, et excepté pour quelques enzymes que nous n'avons pas détectées lors de notre analyse initiale et que nous avons mesurées par d'autres approches, la comparaison des protéomes des NA et des TA par 2D-DIGE nous a permis de récolter un grand nombre d'informations pertinentes quant à l'abondance de la plupart des enzymes impliquées dans les voies métaboliques affectées au cours de la reprogrammation métabolique qui accompagne le processus de transformation cancéreuse des astrocytes. Ces informations nous ont permis d'avoir une vue d'ensemble du comportement métabolique des astrocytes en réponse à leur transformation. Nos observations par 2D-DIGE sont confortées par des mesures fonctionnelles (détermination de l'activité enzymatique de certaines enzymes affectées par la transformation cancéreuse des astrocytes, le suivi de la consommation d'oxygène, l'analyse des effets de ces changements sur l'abondance/concentration des métabolites intra et extra-cellulaires...) ou par WB, ce qui donne plus de poids à leurs interprétations et aux hypothèses formulées.

Ainsi, notre approche semble être facilement transposable/applicable pour étudier et caractériser les changements protéiques qui peuvent accompagner la réponse des astrocytes tumoraux à différents types de traitement visant à contrer ou à corriger les conséquences de la transformation cancéreuse de ces cellules. Cette approche pourrait également être utilisée pour caractériser les changements protéiques qui accompagnent d'autres processus

biologiques responsables d'adaptations phénotypiques cellulaires dans d'autres conditions pathologiques.

PERSPECTIVES

Une série de questions doivent encore être abordées afin de compléter la mise au point de ce modèle d'analyse protéomique/métabolomique qui vise à caractériser la reprogrammation métabolique qui survient suite à la transformation cancéreuse des astrocytes.

Des mesures fonctionnelles de croissance et de survie cellulaire, ainsi que des flux métaboliques, une caractérisation des modifications essentielles des voies de signalisation intracellulaires, ainsi que l'estimation des modifications oxydatives des protéines permettraient en effet de détailler et de confirmer la relation entre le profil protéomique et la reprogrammation métabolique de ces cellules.

Pour répondre aux mieux à ces questions, il faudrait :

1. Analyser plus en profondeur les spectres RMN ^{13}C afin de mieux évaluer les nouvelles capacités métaboliques des TA basées sur la diversification des sources de carbones. Ainsi, il sera possible de mesurer la contribution respective du glucose et de la glutamine à la synthèse des précurseurs des acides aminés (alanine, aspartate), des lipides (citrate) et des acides nucléiques (ribose, glycine). En particulier, cette approche permettra de confirmer quels sont les effets des changements de la capacité enzymatique de la glutaminase dans les cellules transformées.
2. Vérifier par qPCR et WB l'identité des isoformes de glutaminase contenues dans les NA et les TA. En effet, une étude récente prouve que des astrocytes humains et des astrocytes de rat exprimaient deux isoformes de glutamine dont l'expression est modulée spatialement dans les cellules [323]. Ensuite nous analyserons la réalité des modifications d'expression des glutaminases dans les cellules transformées.

La combinaison de ces résultats et des résultats de la RMN ^{13}C devrait nous renseigner, de manière précise, sur la contribution de la glutamine dans le métabolisme anaplerotiques des TA.

3. Évaluer l'effet de plusieurs conditions d'hypoxie sur la survie et la croissance cellulaire des TA par rapport aux NA. En effet, nos résultats indiquent une capacité accrue d'utilisation du glucose et de sa transformation en lactate, ainsi qu'une capacité diminuée du cycle des acides tricarboxyliques dans les TA. Ceci suggère que ces cellules pourraient survivre, voire continuer à croître en conditions hypoxiques en présence de glucose. Ainsi, nous réaliserions des

mesures de croissance (comptage cellulaire automatique) et de survie (exclusion du bleu trypan) des cellules maintenues en présence de concentrations normales en oxygène ou en présence de faibles concentrations en oxygène (1%).

4. Réaliser des mesures de croissance et des tests de survie en présence ou en l'absence de concentrations normales de glucose, de lactate ou de glutamine.
5. Caractériser les modifications des voies de signalisation affectées par la transformation cancéreuse des astrocytes. Les mutations primaires et les régulations d'expression génique responsables de la transformation de cette lignée astrocytaire devraient être recherchées par analyse par WB de l'expression de marqueurs des voies de signalisation majeures fréquemment impliquées dans la transformation gliomateuse. Seraient ainsi testés, l'EGFR, le PDGFR, Akt, EBP, ERK, STAT, p53, PTEN, INK4/ARF, HIF-1 α . De cette manière, nous tenterons de relier nos observations avec des modifications génomiques connues dans d'autres cas de tumeurs.

6. Etudier et identifier les protéines modifiées par le stress oxydatif. Alors que les cellules tumorales sont connues pour croître dans des conditions de dysfonctions mitochondriales et de métabolisme élevé où les radicaux libres sont produits en quantités importantes, il est surprenant que nous ayons observé chez les astrocytes transformés une diminution de l'abondance d'un nombre d'enzymes du métabolisme des ERO (2 peroxydases et 4 glutathion S-transférases différentes). La concentration en glutathion total n'étant pas modifiée, se pose alors la question de l'état redox de ces cellules et de l'existence d'éventuels dommages oxydatifs à leurs composants. Nous réaliserons des mesures colorimétriques du rapport glutathion réduit/oxydé. Nous réaliserons aussi la détection et l'identification des protéines qui sont préférentiellement oxydées dans les cellules transformées. A cette fin la carbamylation qui est une des modifications les plus fréquentes suite à l'oxydation des protéines sera détectée par analyse protéomique après WB d'échantillons cellulaires séparés par électrophorèse bidimensionnelle. Dans notre laboratoire, nous avons déjà mis au point et appliqué cette approche pour analyser d'autres échantillons [324]. Les protéines ainsi repérées seront séquencées par Maldi-TOF MS/MS. Il sera ainsi possible d'évaluer l'état de

stress oxydatif de ces cellules, de préciser certaines cibles protéiques touchées par ce stress et d'identifier de possibles adaptations en réponse à celui-ci.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.M. Jessell, *Principles of neural science*, ed. E.R. Kandel. 1985, New York: New York : McGraw-Hill.
2. Allen, N.J. and B.A. Barres, *Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity*. *Curr Opin Neurobiol*, 2005. **15**(5): p. 542-8.
3. Doetsch, F., *The glial identity of neural stem cells*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(11): p. 1127-34.
4. Haydon, P.G., *GLIA: listening and talking to the synapse*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(3): p. 185-93.
5. Seifert, G., K. Schilling, and C. Steinhauser, *Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(3): p. 194-206.
6. Yang, Y., et al., *Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 15194-9.
7. Araque, A. and G. Perea, *Glial modulation of synaptic transmission in culture*. *Glia*, 2004. **47**(3): p. 241-8.
8. Kempermann, G., *Seven principles in the regulation of adult neurogenesis*. *Eur J Neurosci*, 2011. **33**(6): p. 1018-24.
9. Morrens, J., W. Van Den Broeck, and G. Kempermann, *Glial cells in adult neurogenesis*. *Glia*, 2012. **60**(2): p. 159-74.
10. Yang, I., et al., *The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology*. *J Clin Neurosci*, 2010. **17**(1): p. 6-10.
11. Taylor, R.A. and L.H. Sansing, *Microglial Responses after Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 746068.
12. Rowitch, D.H. and A.R. Kriegstein, *Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification*. *Nature*, 2010. **468**(7321): p. 214-22.
13. Griffiths, I., et al., *Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin*. *Science*, 1998. **280**(5369): p. 1610-3.
14. Lee, Y., et al., *Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration*. *Nature*, 2012. **487**(7408): p. 443-8.
15. Funfschilling, U., et al., *Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity*. *Nature*, 2012. **485**(7399): p. 517-21.
16. Saab, A.S., I.D. Tzvetanova, and K.A. Nave, *The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism*. *Curr Opin Neurobiol*, 2013. **23**(6): p. 1065-72.
17. Sung, C.C., et al., *Glycolipids and myelin proteins in human oligodendrogliomas*. *Glycoconj J*, 1996. **13**(3): p. 433-43.
18. Rousseau, A., et al., *Expression of oligodendroglial and astrocytic lineage markers in diffuse gliomas: use of YKL-40, ApoE, ASCL1, and NKX2-2*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. **65**(12): p. 1149-56.
19. Shoshan, Y., et al., *Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(18): p. 10361-6.
20. Riemenschneider, M.J., T.H. Koy, and G. Reifenberger, *Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas*. *Acta Neuropathol*, 2004. **107**(3): p. 277-82.
21. Persson, A.I., et al., *Non-stem cell origin for oligodendroglioma*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(6): p. 669-82.
22. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(1): p. 7-35.
23. Pekny, M. and M. Nilsson, *Astrocyte activation and reactive gliosis*. *Glia*, 2005. **50**(4): p. 427-34.
24. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. *Trends Neurosci*, 2009. **32**(12): p. 638-47.
25. Thoenen, H. and M. Sendtner, *Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches*. *Nat Neurosci*, 2002. **5 Suppl**: p. 1046-50.
26. Lindenau, J., et al., *Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration*. *Glia*, 1998. **24**(2): p. 252-6.
27. Bignami, A., et al., *Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence*. *Brain Res*, 1972. **43**(2): p. 429-35.
28. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. *Neurochem Res*, 2000. **25**(9-10): p. 1439-51.

29. Norenberg, M.D., *Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system*. J Histochem Cytochem, 1979. **27**(3): p. 756-62.
30. Shank, R.P., et al., *Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools*. Brain Res, 1985. **329**(1-2): p. 364-7.
31. Goncalves, C.A., M.C. Leite, and P. Nardin, *Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury*. Clin Biochem, 2008. **41**(10-11): p. 755-63.
32. Shibata, T., et al., *Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord*. J Neurosci, 1997. **17**(23): p. 9212-9.
33. Perego, C., et al., *The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures*. J Neurochem, 2000. **75**(3): p. 1076-84.
34. Powell, E.M. and H.M. Geller, *Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension*. Glia, 1999. **26**(1): p. 73-83.
35. Sattler, R. and J.D. Rothstein, *Regulation and dysregulation of glutamate transporters*. Handb Exp Pharmacol, 2006(175): p. 277-303.
36. Allaman, I., M. Belanger, and P.J. Magistretti, *Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse*. Trends Neurosci, 2011. **34**(2): p. 76-87.
37. Simard, M. and M. Nedergaard, *The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 877-96.
38. Chesler, M., *Regulation and modulation of pH in the brain*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1183-221.
39. Diemel, G.A. and N.F. Cruz, *Contributions of glycogen to astrocytic energetics during brain activation*. Metab Brain Dis, 2015. **30**(1): p. 281-98.
40. Brown, A.M. and B.R. Ransom, *Astrocyte glycogen and brain energy metabolism*. Glia, 2007. **55**(12): p. 1263-71.
41. Suh, S.W., et al., *Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide)*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(1): p. 45-50.
42. Pellerin, L. and P.J. Magistretti, *Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10625-9.
43. Gegelashvili, M., et al., *Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FXRD2/gamma subunit of Na, K-ATPase in human fetal astrocytes*. Neurochem Int, 2007. **50**(7-8): p. 916-20.
44. Magistretti, P.J., *Neuron-glia metabolic coupling and plasticity*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 12): p. 2304-11.
45. Tsacopoulos, M. and P.J. Magistretti, *Metabolic coupling between glia and neurons*. J Neurosci, 1996. **16**(3): p. 877-85.
46. Halliwell, B., *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J Neurochem, 1992. **59**(5): p. 1609-23.
47. Fridovich, I., *Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?* Ann N Y Acad Sci, 1999. **893**: p. 13-8.
48. Dringen, R., J.M. Gutterer, and J. Hirrlinger, *Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. Eur J Biochem, 2000. **267**(16): p. 4912-6.
49. Peuchen, S., et al., *Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system*. Prog Neurobiol, 1997. **52**(4): p. 261-81.
50. Smith, K.J., R. Kapoor, and P.A. Felts, *Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species*. Brain Pathol, 1999. **9**(1): p. 69-92.
51. Spector, A.A., *Essentiality of fatty acids*. Lipids, 1999. **34 Suppl**: p. S1-3.
52. Cammer, W., et al., *Differential localization of glutathione-S-transferase Yp and Yb subunits in oligodendrocytes and astrocytes of rat brain*. J Neurochem, 1989. **52**(3): p. 876-83.
53. Huang, J. and M.A. Philbert, *Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells*. Brain Res, 1995. **680**(1-2): p. 16-22.
54. Sarafian, T.A., et al., *Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types*. J Neurosci Res, 1999. **56**(2): p. 206-12.

55. Khoo, N.K., et al., *Differential activation of catalase expression and activity by PPAR agonists: implications for astrocyte protection in anti-glioma therapy*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 70-9.
56. Pentreath, V.W. and N.D. Slamon, *Astrocyte phenotype and prevention against oxidative damage in neurotoxicity*. Hum Exp Toxicol, 2000. **19**(11): p. 641-9.
57. Dringen, R., *Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration*. Eur J Biochem, 2000. **267**(16): p. 4903.
58. Panatier, A., et al., *Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses*. Cell, 2011. **146**(5): p. 785-98.
59. Fellin, T., et al., *Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors*. Neuron, 2004. **43**(5): p. 729-43.
60. Latour, I., et al., *Differential mechanisms of Ca²⁺ responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus*. Hippocampus, 2001. **11**(2): p. 132-45.
61. Pasti, L., et al., *Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ*. J Neurosci, 1997. **17**(20): p. 7817-30.
62. Henneberger, C., et al., *Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 232-6.
63. Panatier, A., et al., *Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory*. Cell, 2006. **125**(4): p. 775-84.
64. Pascual, O., et al., *Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks*. Science, 2005. **310**(5745): p. 113-6.
65. Serrano, A., et al., *GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression*. J Neurosci, 2006. **26**(20): p. 5370-82.
66. Perea, G. and A. Araque, *Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes*. J Neurosci, 2005. **25**(9): p. 2192-203.
67. Halassa, M.M., T. Fellin, and P.G. Haydon, *The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease*. Trends Mol Med, 2007. **13**(2): p. 54-63.
68. Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque, *Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information*. Trends Neurosci, 2009. **32**(8): p. 421-31.
69. Cai, Z., G.P. Schools, and H.K. Kimelberg, *Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression*. Glia, 2000. **29**(1): p. 70-80.
70. D'Ascenzo, M., et al., *mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1995-2000.
71. Honsek, S.D., et al., *Astrocyte calcium signals at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses correlate with the number of activated synapses but not with synaptic strength*. Hippocampus, 2012. **22**(1): p. 29-42.
72. Porter, J.T. and K.D. McCarthy, *Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals*. J Neurosci, 1996. **16**(16): p. 5073-81.
73. Araque, A., et al., *Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner*. Trends Neurosci, 1999. **22**(5): p. 208-15.
74. Slezak, M. and F.W. Pfrieger, *New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis*. Trends Neurosci, 2003. **26**(10): p. 531-5.
75. Mauch, D.H., et al., *CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1354-7.
76. Christopherson, K.S., et al., *Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis*. Cell, 2005. **120**(3): p. 421-33.
77. Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard, *The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications*. Neurobiol Dis, 2004. **16**(1): p. 1-13.
78. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(1): p. 41-53.
79. Janzer, R.C. and M.C. Raff, *Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells*. Nature, 1987. **325**(6101): p. 253-7.
80. Halassa, M.M., et al., *Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss*. Neuron, 2009. **61**(2): p. 213-9.
81. Gibbs, M.E., D. Hutchinson, and L. Hertz, *Astrocytic involvement in learning and memory consolidation*. Neurosci Biobehav Rev, 2008. **32**(5): p. 927-44.
82. Gourine, A.V., et al., *Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP*. Science, 2010. **329**(5991): p. 571-5.

83. Quinlan, R.A., et al., *GFAP and its role in Alexander disease*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(10): p. 2077-87.
84. Mignot, C., et al., *Alexander disease: putative mechanisms of an astrocytic encephalopathy*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(3): p. 369-85.
85. Haussinger, D. and F. Schliess, *Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy*. *Gut*, 2008. **57**(8): p. 1156-65.
86. Nagele, R.G., et al., *Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2004. **25**(5): p. 663-74.
87. Rodriguez-Arellano, J.J., et al., *Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease*. *Neuroscience*, 2015.
88. Staats, K.A. and L. Van Den Bosch, *Astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis: direct effects on motor neuron survival*. *J Biol Phys*, 2009. **35**(4): p. 337-46.
89. Van Den Bosch, L. and W. Robberecht, *Crosstalk between astrocytes and motor neurons: what is the message?* *Exp Neurol*, 2008. **211**(1): p. 1-6.
90. Rouault, T.A., *Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases*. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **14**(8): p. 551-64.
91. Patel, S.C., et al., *Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann- Pick type C disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1657-62.
92. Sontheimer, H., *A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors*. *J Neurochem*, 2008. **105**(2): p. 287-95.
93. Brantley, E.C., et al., *Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(15): p. 4694-704.
94. Herrmann, J.E., et al., *STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury*. *J Neurosci*, 2008. **28**(28): p. 7231-43.
95. Rothstein, J.D., et al., *Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression*. *Nature*, 2005. **433**(7021): p. 73-7.
96. Lepore, A.C., et al., *Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease*. *Nat Neurosci*, 2008. **11**(11): p. 1294-301.
97. Behrstock, S., et al., *Lesion-induced increase in survival and migration of human neural progenitor cells releasing GDNF*. *Cell Transplant*, 2008. **17**(7): p. 753-62.
98. Suzuki, M., et al., *GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS*. *PLoS One*, 2007. **2**(8): p. e689.
99. Guerrero-Cazares, H., et al., *Stem cells in gliomas*. *Handb Clin Neurol*, 2012. **104**: p. 63-73.
100. Stieber, D., et al., *Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumorigenic potential and variable stem cell-associated phenotypes*. *Acta Neuropathol*, 2014. **127**(2): p. 203-19.
101. Thurnher, M.M., *2007 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system*. *Cancer Imaging*, 2009. **9 Spec No A**: p. S1-3.
102. de Tayrac, M. and J. Mosser, *[Classification of glioblastoma and genome profiling]*. *Neurochirurgie*, 2010. **56**(6): p. 464-6.
103. Lim, D.A., et al., *Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype*. *Neuro Oncol*, 2007. **9**(4): p. 424-9.
104. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 98-110.
105. Bonaguidi, M.A., et al., *Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus*. *J Neurosci*, 2008. **28**(37): p. 9194-204.
106. Vescovi, A.L. and E.Y. Snyder, *Establishment and properties of neural stem cell clones: plasticity in vitro and in vivo*. *Brain Pathol*, 1999. **9**(3): p. 569-98.
107. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. *Science*, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
108. Palmer, T.D., J. Takahashi, and F.H. Gage, *The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells*. *Mol Cell Neurosci*, 1997. **8**(6): p. 389-404.
109. Gage, F.H., J. Ray, and L.J. Fisher, *Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS*. *Annu Rev Neurosci*, 1995. **18**: p. 159-92.

110. Seaberg, R.M., S.R. Smukler, and D. van der Kooy, *Intrinsic differences distinguish transiently neurogenic progenitors from neural stem cells in the early postnatal brain*. *Dev Biol*, 2005. **278**(1): p. 71-85.
111. Quinones-Hinojosa, A. and K. Chaichana, *The human subventricular zone: a source of new cells and a potential source of brain tumors*. *Exp Neurol*, 2007. **205**(2): p. 313-24.
112. Sanai, N., A. Alvarez-Buylla, and M.S. Berger, *Neural stem cells and the origin of gliomas*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(8): p. 811-22.
113. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. *Genes Dev*, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
114. Stiles, C.D. and D.H. Rowitch, *Glioma stem cells: a midterm exam*. *Neuron*, 2008. **58**(6): p. 832-46.
115. Kleihues, P., et al., *Histopathology, classification, and grading of gliomas*. *Glia*, 1995. **15**(3): p. 211-21.
116. Sanai, N., et al., *Comment on "Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension"*. *Science*, 2007. **318**(5849): p. 393; author reply 393.
117. Kraus, J.A., et al., *Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1995. **54**(1): p. 91-5.
118. Shih, A.H. and E.C. Holland, *Developmental neurobiology and the origin of brain tumors*. *J Neurooncol*, 2004. **70**(2): p. 125-36.
119. Holland, E.C., et al., *Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice*. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 55-7.
120. Holland, E.C., et al., *Astrocytes give rise to oligodendrogliomas and astrocytomas after gene transfer of polyoma virus middle T antigen in vivo*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(3): p. 1031-7.
121. Lassman, A.B., et al., *Overexpression of c-MYC promotes an undifferentiated phenotype in cultured astrocytes and allows elevated Ras and Akt signaling to induce gliomas from GFAP-expressing cells in mice*. *Neuron Glia Biol*, 2004. **1**(2): p. 157-63.
122. Figiel, M., et al., *Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors*. *Exp Neurol*, 2003. **183**(1): p. 124-35.
123. Liu, B. and A.H. Neufeld, *Activation of epidermal growth factor receptors directs astrocytes to organize in a network surrounding axons in the developing rat optic nerve*. *Dev Biol*, 2004. **273**(2): p. 297-307.
124. Sharif, A., et al., *Transforming growth factor alpha acts as a gliatrophin for mouse and human astrocytes*. *Oncogene*, 2006. **25**(29): p. 4076-85.
125. Zhou, R., X. Wu, and O. Skalli, *TGF-alpha induces a stationary, radial-glia like phenotype in cultured astrocytes*. *Brain Res Bull*, 2001. **56**(1): p. 37-42.
126. Harris, H., *Tumour suppression: putting on the brakes*. *Nature*, 2004. **427**(6971): p. 201.
127. Zong, H., R.G. Verhaak, and P. Canoll, *The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012. **12**(4): p. 383-94.
128. Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch, *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay*. *J Natl Cancer Inst*, 1971. **46**(2): p. 411-22.
129. Hamburger, A. and S.E. Salmon, *Primary bioassay of human myeloma stem cells*. *J Clin Invest*, 1977. **60**(4): p. 846-54.
130. Hamburger, A.W. and S.E. Salmon, *Primary bioassay of human tumor stem cells*. *Science*, 1977. **197**(4302): p. 461-3.
131. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
132. Hemmati, H.D., et al., *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 15178-83.
133. Ignatova, T.N., et al., *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro*. *Glia*, 2002. **39**(3): p. 193-206.
134. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
135. Singh, S.K., et al., *Cancer stem cells in nervous system tumors*. *Oncogene*, 2004. **23**(43): p. 7267-73.
136. Beier, D., et al., *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles*. *Cancer Res*, 2007. **67**(9): p. 4010-5.
137. Chen, R., et al., *A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(4): p. 362-75.

138. Friedmann-Morvinski, D., et al., *Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice*. Science, 2012. **338**(6110): p. 1080-4.
139. Miller, S., et al., *Exposure of astrocytes to thrombin reduces levels of the metabotropic glutamate receptor mGluR5*. J Neurochem, 1996. **67**(4): p. 1435-47.
140. Sharif, A., et al., *Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells*. Oncogene, 2007. **26**(19): p. 2695-706.
141. Dufour, C., et al., *Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation*. Stem Cells, 2009. **27**(10): p. 2373-82.
142. Libermann, T.A., et al., *Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors*. Cancer Res, 1984. **44**(2): p. 753-60.
143. Bredel, M., et al., *Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(7): p. 1786-92.
144. von Bossanyi, P., et al., *Correlation of TGF-alpha and EGF-receptor expression with proliferative activity in human astrocytic gliomas*. Pathol Res Pract, 1998. **194**(3): p. 141-7.
145. Junier, M.P., *What role(s) for TGFalpha in the central nervous system?* Prog Neurobiol, 2000. **62**(5): p. 443-73.
146. Rabchevsky, A.G., et al., *A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis*. J Neurosci, 1998. **18**(24): p. 10541-52.
147. Craig, C.G., et al., *In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain*. J Neurosci, 1996. **16**(8): p. 2649-58.
148. Leutz, A. and M. Schachner, *Epidermal growth factor stimulates DNA-synthesis of astrocytes in primary cerebellar cultures*. Cell Tissue Res, 1981. **220**(2): p. 393-404.
149. Simpson, D.L., et al., *Epidermal growth factor binding and mitogenic activity on purified populations of cells from the central nervous system*. J Neurosci Res, 1982. **8**(2-3): p. 453-62.
150. Wagner, B., et al., *Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes*. EMBO J, 2006. **25**(4): p. 752-62.
151. Dai, C. and E.C. Holland, *Astrocyte differentiation states and glioma formation*. Cancer J, 2003. **9**(2): p. 72-81.
152. Cooper, G.M., S. Okenquist, and L. Silverman, *Transforming activity of DNA of chemically transformed and normal cells*. Nature, 1980. **284**(5755): p. 418-21.
153. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
154. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
155. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
156. Phan, L.M., S.C. Yeung, and M.H. Lee, *Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies*. Cancer Biol Med, 2014. **11**(1): p. 1-19.
157. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The Metabolism of Tumors in the Body*. J Gen Physiol, 1927. **8**(6): p. 519-30.
158. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
159. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
160. DeBerardinis, R.J., et al., *Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19345-50.
161. Macheda, M.L., S. Rogers, and J.D. Best, *Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer*. J Cell Physiol, 2005. **202**(3): p. 654-62.
162. Lee, Y.J., et al., *Mechanisms of pyruvate inhibition of oxidant-induced apoptosis in human endothelial cells*. Microvasc Res, 2003. **66**(2): p. 91-101.
163. Pelicano, H., et al., *Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 913-23.
164. Kim, J.W. and C.V. Dang, *Multifaceted roles of glycolytic enzymes*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(3): p. 142-50.
165. Sonveaux, P., et al., *Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(12): p. 3930-42.
166. Walenta, S., et al., *High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers*. Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 916-21.
167. Walenta, S., et al., *Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis*. Am J Pathol, 1997. **150**(2): p. 409-15.

168. Brizel, D.M., et al., *Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **51**(2): p. 349-53.
169. Porporato, P.E., et al., *Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice*. Angiogenesis, 2012. **15**(4): p. 581-92.
170. DeBerardinis, R.J. and T. Cheng, *Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer*. Oncogene, 2010. **29**(3): p. 313-24.
171. Dang, C.V., *Glutaminolysis: supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells?* Cell Cycle, 2010. **9**(19): p. 3884-6.
172. Deberardinis, R.J., et al., *Brick by brick: metabolism and tumor cell growth*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 54-61.
173. Markert, C.L., J.B. Shaklee, and G.S. Whitt, *Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation*. Science, 1975. **189**(4197): p. 102-14.
174. Goldman, R.D., N.O. Kaplan, and T.C. Hall, *Lactic Dehydrogenase in Human Neoplastic Tissues*. Cancer Res, 1964. **24**: p. 389-99.
175. O'Rourke, J.F., et al., *Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1*. Eur J Biochem, 1996. **241**(2): p. 403-10.
176. Semenza, G.L., et al., *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1994. **269**(38): p. 23757-63.
177. Shim, H., et al., *c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6658-63.
178. Fantin, V.R., J. St-Pierre, and P. Leder, *Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance*. Cancer Cell, 2006. **9**(6): p. 425-34.
179. Xie, H., et al., *LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(3): p. 626-35.
180. Le, A., et al., *Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 2037-42.
181. Riganti, C., et al., *The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(3): p. 421-36.
182. Cabezas, H., R.R. Raposo, and E. Melendez-Hevia, *Activity and metabolic roles of the pentose phosphate cycle in several rat tissues*. Mol Cell Biochem, 1999. **201**(1-2): p. 57-63.
183. Wittig, R. and J.F. Coy, *The role of glucose metabolism and glucose-associated signalling in cancer*. Perspect Medicin Chem, 2008. **1**: p. 64-82.
184. Jonas, S.K., et al., *Increased activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in purified cell suspensions and single cells from the uterine cervix in cervical intraepithelial neoplasia*. Br J Cancer, 1992. **66**(1): p. 185-91.
185. Hartmannsberger, D., et al., *Transketolase-like protein 1 confers resistance to serum withdrawal in vitro*. Cancer Lett, 2011. **300**(1): p. 20-9.
186. Vizan, P., et al., *Modulation of pentose phosphate pathway during cell cycle progression in human colon adenocarcinoma cell line HT29*. Int J Cancer, 2009. **124**(12): p. 2789-96.
187. Tian, W.N., et al., *Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. C1121-31.
188. Banki, K., et al., *Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32994-3001.
189. Cosentino, C., D. Grieco, and V. Costanzo, *ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair*. EMBO J, 2011. **30**(3): p. 546-55.
190. Efferth, T., U. Fabry, and R. Osieka, *DNA damage and apoptosis in mononuclear cells from glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient patients (G6PD Aachen variant) after UV irradiation*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(3): p. 340-2.
191. Richardson, A.D., et al., *Central carbon metabolism in the progression of mammary carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **110**(2): p. 297-307.
192. Lu, X., et al., *Metabolomic changes accompanying transformation and acquisition of metastatic potential in a syngeneic mouse mammary tumor model*. J Biol Chem, 2010. **285**(13): p. 9317-21.
193. Chen, E.I., et al., *Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1472-86.
194. Coy, J.F., et al., *Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer*. Clin Lab, 2005. **51**(5-6): p. 257-73.

195. Tuttle, S., et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase and the oxidative pentose phosphate cycle protect cells against apoptosis induced by low doses of ionizing radiation*. *Radiat Res*, 2000. **153**(6): p. 781-7.
196. Glasauer, A. and N.S. Chandel, *Targeting antioxidants for cancer therapy*. *Biochem Pharmacol*, 2014.
197. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(2): p. 248-53.
198. Finkel, T., *Signal transduction by mitochondrial oxidants*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(7): p. 4434-40.
199. Szatrowski, T.P. and C.F. Nathan, *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. *Cancer Res*, 1991. **51**(3): p. 794-8.
200. Cairns, R.A., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Regulation of cancer cell metabolism*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(2): p. 85-95.
201. Gorrini, C., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2013. **12**(12): p. 931-47.
202. Schafer, Z.T., et al., *Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment*. *Nature*, 2009. **461**(7260): p. 109-13.
203. Young, T.W., et al., *Activation of antioxidant pathways in ras-mediated oncogenic transformation of human surface ovarian epithelial cells revealed by functional proteomics and mass spectrometry*. *Cancer Res*, 2004. **64**(13): p. 4577-84.
204. Saydam, N., et al., *Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues*. *Cancer Lett*, 1997. **119**(1): p. 13-9.
205. Hu, Y., et al., *Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(47): p. 39485-92.
206. Sayin, V.I., et al., *Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(221): p. 221ra15.
207. Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(11): p. 2071-7.
208. Kumar, D.M., et al., *Proteomic identification of haptoglobin alpha2 as a glioblastoma serum biomarker: implications in cancer cell migration and tumor growth*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(11): p. 5557-67.
209. Collet, B., et al., *Differential analysis of glioblastoma multiforme proteome by a 2D-DIGE approach*. *Proteome Sci*, 2011. **9**(1): p. 16.
210. Grzendowski, M., et al., *Differential proteome analysis of human gliomas stratified for loss of heterozygosity on chromosomal arms 1p and 19q*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(3): p. 243-56.
211. Gimenez, M., et al., *Proteomic analysis of low- to high-grade astrocytomas reveals an alteration of the expression level of raf kinase inhibitor protein and nucleophosmin*. *Proteomics*, 2010. **10**(15): p. 2812-21.
212. Marelli-Berg, F.M., H. Fu, and C. Mauro, *Molecular mechanisms of metabolic reprogramming in proliferating cells: implications for T-cell-mediated immunity*. *Immunology*, 2012. **136**(4): p. 363-9.
213. Griffin, J.L. and J.P. Shockcor, *Metabolic profiles of cancer cells*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(7): p. 551-61.
214. Teixeira, A.P., et al., *Combining metabolic flux analysis tools and 13C NMR to estimate intracellular fluxes of cultured astrocytes*. *Neurochem Int*, 2008. **52**(3): p. 478-86.
215. Hertz, L., *Astrocytic energy metabolism and glutamate formation--relevance for 13C-NMR spectroscopy and importance of cytosolic/mitochondrial trafficking*. *Magn Reson Imaging*, 2011. **29**(10): p. 1319-29.
216. Shao, W., et al., *Malignancy-associated metabolic profiling of human glioma cell lines using 1H NMR spectroscopy*. *Mol Cancer*, 2014. **13**: p. 197.
217. Miles, K.A. and R.E. Williams, *Warburg revisited: imaging tumour blood flow and metabolism*. *Cancer Imaging*, 2008. **8**: p. 81-6.
218. Scatena, R., et al., *Revisiting the Warburg effect in cancer cells with proteomics. The emergence of new approaches to diagnosis, prognosis and therapy*. *Proteomics Clin Appl*, 2010. **4**(2): p. 143-58.
219. Feron, O., *Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells*. *Radiother Oncol*, 2009. **92**(3): p. 329-33.
220. Perroud, B., et al., *Grade-dependent proteomics characterization of kidney cancer*. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(5): p. 971-85.

221. Zhou, W., et al., *Proteomic analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma cells reveals metabolic alterations*. J Proteome Res, 2011. **10**(4): p. 1944-52.
222. Unwin, R.D., et al., *The potential for proteomic definition of stem cell populations*. Exp Hematol, 2003. **31**(12): p. 1147-59.
223. Perroud, B., et al., *Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 64.
224. Denkert, C., et al., *Metabolite profiling of human colon carcinoma--deregulation of TCA cycle and amino acid turnover*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 72.
225. Lee, J.D., et al., *Different glucose uptake and glycolytic mechanisms between hepatocellular carcinoma and intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma with increased (18)F-FDG uptake*. J Nucl Med, 2005. **46**(10): p. 1753-9.
226. Salim, K., et al., *Identification of proteomic changes during differentiation of adult mouse subventricular zone progenitor cells*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(1): p. 143-65.
227. Bindukumar, B., et al., *Genomic and proteomic analysis of the effects of cannabinoids on normal human astrocytes*. Brain Res, 2008. **1191**: p. 1-11.
228. Mechoulam, R., D. Panikashvili, and E. Shohami, *Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications*. Trends Mol Med, 2002. **8**(2): p. 58-61.
229. Baker, D. and G. Pryce, *The therapeutic potential of cannabis in multiple sclerosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2003. **12**(4): p. 561-7.
230. Marsicano, G., et al., *Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1*. J Neurochem, 2002. **80**(3): p. 448-56.
231. Hampson, A.J., et al., *Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8268-73.
232. Molina-Holgado, E., et al., *Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling*. J Neurosci, 2002. **22**(22): p. 9742-53.
233. Gomez Del Pulgar, T., et al., *Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36527-33.
234. Gomez del Pulgar, T., et al., *De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis*. Biochem J, 2002. **363**(Pt 1): p. 183-8.
235. Galve-Roperh, I., et al., *Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 313-9.
236. Khalil, A.A., *Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling*. Cancer Sci, 2007. **98**(2): p. 201-13.
237. Hiratsuka, M., et al., *Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(3): p. 558-66.
238. Leandro-Garcia, L.J., et al., *Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(4): p. 214-23.
239. Jung, C.S., et al., *Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme*. Brain, 2007. **130**(Pt 12): p. 3336-41.
240. Park, C.K., et al., *Tissue expression of manganese superoxide dismutase is a candidate prognostic marker for glioblastoma*. Oncology, 2009. **77**(3-4): p. 178-81.
241. Prevot, V., et al., *erbB-1 and erbB-4 receptors act in concert to facilitate female sexual development and mature reproductive function*. Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 1465-72.
242. Mathy, G., et al., *Proteomic and functional characterization of a Chlamydomonas reinhardtii mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1*. J Proteome Res, 2010. **9**(6): p. 2825-38.
243. Shevchenko, A., et al., *A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(3): p. 893-6.
244. Aldridge, G.M., et al., *The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting*. J Neurosci Methods, 2008. **172**(2): p. 250-4.
245. Romero-Calvo, I., et al., *Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots*. Anal Biochem, 2010. **401**(2): p. 318-20.
246. Board, M., S. Humm, and E.A. Newsholme, *Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells*. Biochem J, 1990. **265**(2): p. 503-9.

247. van der, H.H., *A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isoenzymes in serum*. Clin Chim Acta, 1962. **7**: p. 124-8.
248. Malmqvist, U., A. Arner, and B. Uvelius, *Lactate dehydrogenase activity and isoform distribution in normal and hypertrophic smooth muscle tissue from the rat*. Pflugers Arch, 1991. **419**(3-4): p. 230-4.
249. Wellner, V.P. and A. Meister, *Binding of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate by glutamine synthetase*. Biochemistry, 1966. **5**(3): p. 872-9.
250. Eigenbrodt, E., et al., *Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells*. Crit Rev Oncog, 1992. **3**(1-2): p. 91-115.
251. Eigenbrodt, E.G., H., *Glycolysis—one of the keys to cancer?* Trends in Pharmacological Sciences, 1980. **1**(2): p. 240-245
252. Mazurek, S., A. Michel, and E. Eigenbrodt, *Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 4941-52.
253. Mazurek, S., et al., *Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex*. Biochem J, 2001. **356**(Pt 1): p. 247-56.
254. Boros, L.G., et al., *Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: is cancer a disease of cellular glucose metabolism?* Med Hypotheses, 1998. **50**(1): p. 55-9.
255. Mazurek, S., et al., *Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(4): p. 300-8.
256. Miccheli, A., et al., *Metabolic profiling by ¹³C-NMR spectroscopy: [1,2-¹³C₂]glucose reveals a heterogeneous metabolism in human leukemia T cells*. Biochimie, 2006. **88**(5): p. 437-48.
257. Christofk, H.R., et al., *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 230-3.
258. Mazurek, S., *Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(7): p. 969-80.
259. Lee, H.K., et al., *GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis*. Neuro Oncol, 2008. **10**(3): p. 236-43.
260. Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher, *Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 276-87.
261. Zhu, X., et al., *Moesin is a glioma progression marker that induces proliferation and Wnt/beta-catenin pathway activation via interaction with CD44*. Cancer Res, 2013. **73**(3): p. 1142-55.
262. Tascos, N.A., J. Parr, and N.K. Gonatas, *Immunocytochemical study of the glial fibrillary acidic protein in human neoplasms of the central nervous system*. Hum Pathol, 1982. **13**(5): p. 454-8.
263. Velasco, M.E., et al., *Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms*. Cancer, 1980. **45**(3): p. 484-94.
264. Jacque, C.M., et al., *GFA and S 100 protein levels as an index for malignancy in human gliomas and neurinomas*. J Natl Cancer Inst, 1979. **62**(3): p. 479-83.
265. Jacque, C.M., et al., *Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors*. J Neurol Sci, 1978. **35**(1): p. 147-55.
266. van der Meulen, J.D., H.J. Houthoff, and E.J. Ebels, *Glial fibrillary acidic protein in human gliomas*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1978. **4**(3): p. 177-90.
267. Hara, A., et al., *Proliferative assessment of GFAP-positive and GFAP-negative glioma cells by nucleolar organizer region staining*. Surg Neurol, 1991. **36**(3): p. 190-4.
268. Kajiwara, K., et al., *Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and nucleolar organizer regions (NORs) in human gliomas*. Brain Res, 1992. **572**(1-2): p. 314-8.
269. Zheng, L., R.G. Roeder, and Y. Luo, *S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component*. Cell, 2003. **114**(2): p. 255-66.
270. Dudani, A.K., et al., *Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells*. Thromb Res, 1993. **69**(2): p. 185-96.
271. Stetak, A., et al., *Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1602-8.
272. Yang, W., et al., *Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation*. Nature, 2011. **480**(7375): p. 118-22.
273. Hall, E.R. and G.L. Cottam, *Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties*. Int J Biochem, 1978. **9**(11): p. 785-93.

274. Noguchi, T., H. Inoue, and T. Tanaka, *The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing*. J Biol Chem, 1986. **261**(29): p. 13807-12.
275. Bluemlein, K., et al., *No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis*. Oncotarget, 2011. **2**(5): p. 393-400.
276. Lunt, S.Y., et al., *Pyruvate kinase isoform expression alters nucleotide synthesis to impact cell proliferation*. Mol Cell, 2015. **57**(1): p. 95-107.
277. Vander Heiden, M.G., et al., *Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells*. Science, 2010. **329**(5998): p. 1492-9.
278. McKenna, M.C., et al., *Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(4): p. 399-407.
279. Ross, J.M., et al., *High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(46): p. 20087-92.
280. Rabow, L. and K. Kristensson, *Changes in lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in patients with tumours of the central nervous system.* Acta Neurochir (Wien), 1977. **36**(1-2): p. 71-81.
281. Kondoh, H., et al., *Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization*. Histol Histopathol, 2007. **22**(1): p. 85-90.
282. Weinberg, F. and N.S. Chandel, *Mitochondrial metabolism and cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1177**: p. 66-73.
283. Sosa, V., et al., *Oxidative stress and cancer: An overview*. Ageing Res Rev, 2013. **12**(1): p. 376-90.
284. Kondoh, H., et al., *Glycolytic enzymes can modulate cellular life span*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 177-85.
285. Vaughn, A.E. and M. Deshmukh, *Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1477-83.
286. Anastasiou, D., et al., *Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses*. Science, 2011. **334**(6060): p. 1278-83.
287. Porporato, P.E., et al., *A mitochondrial switch promotes tumor metastasis*. Cell Rep, 2014. **8**(3): p. 754-66.
288. Datta, K., et al., *p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(2): p. 148-57.
289. Linden, A., et al., *Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells*. Toxicol In Vitro, 2008. **22**(5): p. 1371-6.
290. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense*. Eur J Biochem, 1993. **215**(2): p. 213-9.
291. Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus, *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*. Science, 2003. **300**(5619): p. 650-3.
292. Wood, Z.A., et al., *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(1): p. 32-40.
293. Yanagawa, T., et al., *Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors*. Cancer Lett, 1999. **145**(1-2): p. 127-32.
294. Yanagawa, T., et al., *Peroxiredoxin I expression in oral cancer: a potential new tumor marker*. Cancer Lett, 2000. **156**(1): p. 27-35.
295. Chang, J.W., et al., *Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(2): p. 507-12.
296. Noh, D.Y., et al., *Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer*. Anticancer Res, 2001. **21**(3B): p. 2085-90.
297. Kinnula, V.L., et al., *Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma*. J Pathol, 2002. **196**(3): p. 316-23.
298. Kinnula, V.L., P. Paakko, and Y. Soini, *Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung*. FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 1-6.
299. Kim, H.J., et al., *Preferential elevation of Prx I and Trx expression in lung cancer cells following hypoxia and in human lung cancer tissues*. Cell Biol Toxicol, 2003. **19**(5): p. 285-98.
300. Odreman, F., et al., *Proteomic studies on low- and high-grade human brain astrocytomas*. J Proteome Res, 2005. **4**(3): p. 698-708.
301. Jarvela, S., et al., *Specific expression profile and prognostic significance of peroxiredoxins in grade II-IV astrocytic brain tumors*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 104.
302. Evans, C.G., et al., *Glutathione and related enzymes in rat brain tumor cell resistance to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and nitrogen mustard*. Cancer Res, 1987. **47**(10): p. 2525-30.

303. Ali-Osman, F., D.E. Stein, and A. Renwick, *Glutathione content and glutathione-S-transferase expression in 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant human malignant astrocytoma cell lines*. *Cancer Res*, 1990. **50**(21): p. 6976-80.
304. Hara, A., et al., *Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase placental type (GST-pi), a detoxifying enzyme, in normal arachnoid villi and meningiomas*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1990. **417**(6): p. 493-6.
305. Usarek, E., et al., *[Expression of glutathione S-transferase isoenzymes in human gliomas]*. *Pol Merkur Lekarski*, 2005. **18**(108): p. 676-9.
306. Traverso, N., et al., *Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 972913.
307. Gamberino, W.C., et al., *Role of pyruvate carboxylase in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes*. *J Neurochem*, 1997. **69**(6): p. 2312-25.
308. Cheng, T., et al., *Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(21): p. 8674-9.
309. Kvamme, E. and G. Svenneby, *Effect of anaerobiosis and addition of keto acids on glutamine utilization by Ehrlich ascites-tumor cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1960. **42**: p. 187-8.
310. Wise, D.R., et al., *Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(48): p. 18782-7.
311. Dang, C.V., A. Le, and P. Gao, *MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(21): p. 6479-83.
312. Qu, W., et al., *Preparation and characterization of L-[5-11C]-glutamine for metabolic imaging of tumors*. *J Nucl Med*, 2012. **53**(1): p. 98-105.
313. Rosati, A., et al., *Epilepsy in glioblastoma multiforme: correlation with glutamine synthetase levels*. *J Neurooncol*, 2009. **93**(3): p. 319-24.
314. Akimoto, J., *[Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in normal human brain and intracranial tumors]*. *No To Shinkei*, 1993. **45**(4): p. 362-8.
315. Cataldo, A.M. and R.D. Broadwell, *Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes*. *J Neurocytol*, 1986. **15**(4): p. 511-24.
316. Brahim-Horn, M.C., G. Bellot, and J. Pouyssegur, *Hypoxia and energetic tumour metabolism*. *Curr Opin Genet Dev*, 2011. **21**(1): p. 67-72.
317. Pelletier, J., et al., *Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival*. *Front Oncol*, 2012. **2**: p. 18.
318. Atkins, R.J., et al., *Regulation of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3beta) by the Akt pathway in gliomas*. *J Clin Neurosci*, 2012. **19**(11): p. 1558-63.
319. Favaro, E., et al., *Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells*. *Cell Metab*, 2012. **16**(6): p. 751-64.
320. Boza, J.J., et al., *Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells*. *Eur J Nutr*, 2000. **39**(1): p. 38-46.
321. Lieth, E., et al., *Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis*. *J Neurochem*, 2001. **76**(6): p. 1712-23.
322. Babu, R., et al., *Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes*. *J Pediatr Surg*, 2001. **36**(2): p. 282-6.
323. Cardona, C., et al., *Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes*. *Glia*, 2015. **63**(3): p. 365-82.
324. Shafiei, R., et al., *The role of protein modifications in senescence of freeze-dried Acetobacter senegalensis during storage*. *Microb Cell Fact*, 2014. **13**(1): p. 26.

BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

1. **Bentaib A**, De Tullio P, Chneiweiss H, Hermans E, Junier MP, Leprince P.

Metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: A proteomic study. *J Proteomics*. 2014 Oct 23;113C:292-314. doi: 10.1016/j.jprot.2014.09.019.

2. Shafiei R, Zarmehrkhoshid R, **Bentaib A**, Babanezhad M, Leprince P, Delvigne F, Thonart P.

The role of protein modifications in senescence of freeze-dried *Acetobacter senegalensis* during storage. *Microb Cell Fact*. 2014 Feb 19;13(1):26. doi: 10.1186/1475-2859-13-26.

3. Blandin G, Marchand S, Charton K, Danièle N, Gicquel E, Boucheteil JB, **Bentaib A**, Barrault L, Stockholm D, Bartoli M, Richard I.

A human skeletal muscle interactome centered on proteins involved in muscular dystrophies: LGMD interactome. *Skelet Muscle*. 2013 Feb 15;3(1):3. doi: 10.1186/2044-5040-3-3.

4. Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, **Bentaib A**, Miyake K, Guerchet N, Fougérousse F, McNeil P, Richard I.

Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet*. 2010 May 15;19(10):1897-907. doi: 10.1093/hmg/ddq065. 20154340.

Annexe 1

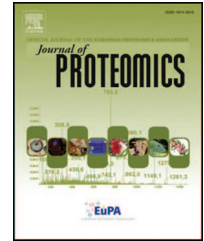
Bentaib A, De Tullio P, Chneiweiss H, Hermans E, Junier MP,
Leprince P.

Metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: A
proteomic study.

J Proteomics. 2014 Oct 23;113C:292-314.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: A proteomic study



Azeddine Bentaib^a, Pascal De Tullio^b, Hervé Chneiweiss^{c,1}, Emmanuel Hermans^d, Marie-Pierre Junier^{c,1}, Pierre Leprince^{a,*}

^aGIGA-Neuroscience, University of Liège, Liège, Belgium

^bPharmaceutical chemistry, Department of Pharmacy, University of Liège, Liège, Belgium

^cGlial Plasticity and Cerebral Tumors, UMR8246 CNRS/U1130 Inserm/UMCR18, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

^dInstitute of Neurosciences, Group of Neuropharmacology, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2014

Accepted 22 September 2014

Keywords:

2D-DIGE

Cancerous transformation

Warburg effect

Glycolysis

Glia

Glioblastoma

ABSTRACT

Metabolic reprogramming is thought to play a key role in sustaining the survival and proliferation of cancer cells. These changes facilitate for example the uptake and release of nutrients required for nucleotide, protein and lipid synthesis necessary for macromolecule assembly and tumor growth. We applied a 2D-DIGE (two-dimensional differential in-gel electrophoresis) quantitative proteomic analysis to characterize the proteomes of mouse astrocytes that underwent *in vitro* cancerous transformation, and of their normal counterparts. Metabolic reprogramming effects on enzymatic and structural protein expression as well as associated metabolites abundance were quantified. Using enzymatic activity measurements and zymography, we documented and confirmed several changes in abundance and activity of various isoenzymes likely to participate in metabolic reprogramming. We found that after transformation, the cells increase their expression of glycolytic enzymes, thus augmenting their ability to use aerobic glycolysis (Warburg effect). An increased capacity to dispose of reducing equivalents through lactate production was also documented. Major effects on carbohydrates, amino acids and nucleotides metabolic enzymes were also observed. Conversely, the transformed cells reduced their enzymatic capacity for reactions of tricarboxylic acid oxidation, for neurotransmitter (glutamate) metabolism, for oxidative stress defense and their expression of astroglial markers.

Biological significance

The use of a global approach based on a 2D DIGE analysis allows obtaining a comprehensive view of the metabolic reprogramming undergone by astrocytes upon cancerous transformation. Indeed, except for a few enzymes such as pyruvate carboxylase and glutaminase that were not detected in our initial analysis, pertinent information on the abundance of most enzymes belonging to pathways relevant to metabolic reprogramming was directly obtained. In this *in vitro* model, transformation causes major losses of astrocyte-specific proteins and functions and the acquisition of metabolic adaptations that favor intermediate metabolites production for increased macromolecule biosynthesis. Thus our approach

* Corresponding author at: Giga-Neuroscience, University of Liège. CHU B36, 1 Av de l'hôpital, B4000 Liège, Belgium.

E-mail address: pleprince@ulg.ac.be (P. Leprince).

¹ These two authors contributed equally to this work.

appears to be readily applicable for the investigation of changes in protein abundance that determine various transformed cell phenotypes. It could similarly be applied to the evaluation of the effects of treatments aimed at correcting the consequences of cell transformation.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Major metabolic changes occur in cancer cells. The resulting metabolic reprogramming promotes the synthesis of macromolecules and favors cell survival and tumor proliferation (for reviews see [1,2]). The most frequently described aspect of cancer metabolic reprogramming is the “Warburg effect” also known as aerobic glycolysis [3–5]. This metabolic landmark of tumors is primarily reflected by an increase in glycolytic activity to levels that fulfill the energy needs of cancer cells while maintaining the production of intermediate metabolites required for support of macromolecule biosynthesis. The metabolic reprogramming of cancer cells also often involves an increase in the uptake and metabolization of glutamine that allows the replenishment of tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) intermediate metabolites in mitochondria, thus promoting anaplerosis [6]. It also includes a range of enzymatic, proteinic or genetic adaptations that further allow cancer cells to generate a favorable microenvironment for their survival and growth [7–10].

Some of these metabolic peculiarities are not exclusive of cancer cells. The Warburg effect is notably also encountered in normal cells proliferating rapidly [1] as well as in subtypes of quiescent normal cells, such as astrocytes [11]. Of note, astrocytes are one of the brain cell types that can give birth to high-grade gliomas, the most common form of primary brain tumors in adults, and the most aggressive one (for a review see [12,13]).

Like glioma cells, normal astrocytes, even in the presence of a normal oxygen concentration, heavily rely on glycolysis for energy production and eventually release lactate, either from glucose obtained from the vasculature or from internal stores of glycogen [11]. Those stores can be mobilized by various neuroactive signals reflecting neuronal activity [14]. Furthermore, astrocytes actively pump the neurotransmitter glutamate around excitatory synapses and convert this signal of neuronal activity into accelerated glycolysis, producing lactate that is released as fuel for energy production by neurons [15]. In this context, another important metabolic activity of astrocytes is the recycling of glutamate, either by conversion into glutamine through the activity of glutamine synthetase (GS), an enzyme exclusively present in astrocytes [16], or by oxidation via the TCA cycle.

Thus the physiological behavior of astrocytes relies on metabolic specificities similar to glioma cells, namely aerobic glycolysis and a capacity for glutamate/glutamine interconversion. However, the extent of these metabolic adaptations differs between astrocytes and glioma. For example, a recently described method of FRET-based measurement of lactate levels in single cells allowed to calculate a “Warburg effect” ratio between the basal rate of lactate production in the presence of oxygen and the rate of lactate accumulation following inhibition of mitochondrial respiration with azide,

the latter reflecting mitochondrial OXPHOS activity [17]. This “Warburg effect” ratio was almost 60-fold higher for a glioma cell line than for primary astrocytes, suggesting a more intense glycolytic activity in the transformed cells and a true defect into mitochondrial function that brings about an extensive metabolic reprogramming. The extent to which metabolic adaptations modify major cell functions is thus an important parameter to evaluate malignancy and characterize different types of cancer and cell lineage in tumors. Although understanding the molecular basis of cancer metabolic reprogramming is an area of intense research, we lack a comprehensive picture of the modifications in metabolic enzymes occurring upon cancerous transformation.

We therefore characterized in a comparative manner the proteomes of astrocytes and of their transformed counterparts using 2D-DIGE analysis [18], coupled with mass spectrometry (MALDI TOF MS/MS). We took advantage of previously described high-grade glioma-initiating cells that were derived from normal astrocytes (NA) of the mouse cortex. Astrocyte transformation was achieved with gamma-irradiation following a de-differentiation step driven by sustained activation of the EGFR signaling pathway [19]. The cells display all canonical features of cancerous transformation, immortalization, uncontrolled growth, cytogenetic alterations, and give rise to high-grade gliomas when injected into nude mice. In culture, they constitute a homogenous population of transformed astrocytes (TA) particularly suited for quantitative biochemical comparison with their normal counterparts, represented by primary cultures of astrocytes. This approach allowed to establish, for the first time, a comprehensive picture of the modifications in nature and relative abundance of many enzymatic species that occur when astrocytes are subjected to tumoral transformation, and to deduce their functional consequences on the cell metabolism.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture preparation

Cultures of mouse normal astrocytes were prepared from cortices of 1–2-day-old C57Bl6/J mice according to protocols described by Sharif in 2007 [20] and Prévôt in 2005 [21] with slight adaptations. Briefly, cultures were established in MEM medium (Gibco, Life-technologies, UK) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Lonza, BioWhittaker®, Belgium). Medium was changed every 2 days following washes with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). When confluence was reached, cultures were shaken overnight (250 r.p.m.), trypsinized and seeded in 8 cm dishes at a density of 50,000 cell/cm². When confluence was reached again, the cells were maintained in serum-free MEM medium for 48 h, rinsed twice in PBS, and either extracted for protein sample preparation or

frozen until further use. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes accounted for 91–96% of the cells in the NA cultures, the remaining 4–9% of cells being CD11b receptor-immunoreactive microglia [20].

The transformed astrocytes are obtained from normal mouse astrocytes that had undergone a treatment with TGF α allowing them to dedifferentiate into “neural progenitor-like cells” followed by gamma irradiation causing their *in vitro* transformation [19]. Transformed astrocytes are cultured in medium composed of a mixture of DMEM and F12 medium (Invitrogen, France), containing 0.6% glucose, 2 mM glutamine, 13 mM sodium bicarbonate, 5 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer, 5 IU/ml penicillin and 5 μ g/ml streptomycin, and the B27 complement (Gibco, ref 12587-010). This medium was renewed once a week. Due to the selection process and growth conditions, all the cells generated from the irradiated cultures were transformed astrocytes.

2.2. Sample preparation for comparative proteomic studies

NA and TA were collected in lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 30 mM Tris, pH 8.5 (all from GE Healthcare) and 2% (w/v) ASB-14 (Sigma)) and sonicated for 10 min. After removal of the insoluble material by centrifugation (20.000 \times g), each sample was precipitated using the 2D Clean-up kit (GE Healthcare) in order to remove salts and low molecular weight contaminants that interfere with CyDye-labeling and protein electrophoresis. Protein pellets were resuspended in adequate volume of lysis buffer and the pH was adjusted to 8.5 with 100 mM NaOH for efficient CyDye labeling.

Protein concentration was evaluated with the RC/DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories).

2.3. 2D-DIGE

2D-DIGE Comparative proteomic analysis was performed using a set of 4 independent cultures in each experimental condition (NA and TA).

For analytical gels, 25 μ g of each biological replicate were labeled separately with 200 pmol of CyDye (Cy3, Cy5; GE Healthcare) with dye-swapping to minimize dye-specific labeling effect, vortexed, and incubated 30 min in the dark. At the same time, a pool of equal amounts of proteins from all the biological replicates was labeled with Cy2 for use as an internal standard. After 30 min in the dark, the reaction was stopped with 10 mM lysine. Multiplexing was achieved by pooling 25 μ g of Cy3- and Cy5-labeled samples together with 25 μ g of Cy2-labeled internal standard, used for matching and normalization between gels, and the volume of the combined labeled samples was adjusted to 450 μ l with standard rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% w/v ASB 14, 25 mM DTT, and 0.6% v/v pH 3–10 NL IPG buffer (GE Healthcare)). The mixed CyDye-labeled samples were used to rehydrate 24 cm IPG strips (pH 3–10 NL, GE Healthcare) for 12 h at 20 °C. Isoelectric focusing (IEF) was carried out at 500 V for 1 h, followed by two successive 3 h gradients (1st gradient, 500–1000 V, 2nd gradient 1000–8000 V), and constant setting at 8000 V for 70 kWh at 20 °C. The maximum current setting was 50 mA per strip in an IPGphor isoelectric focusing unit (GE Healthcare).

Prior to second dimension separation, the IPG strips were incubated 15 min at room temperature (RT) in equilibration buffer (30% glycerol (v/v), 1.6% SDS (w/v), 6 M urea, 50 mM tris-HCl pH 8.8) containing 1% DTT and then for 15 min in the same solution containing, 5% iodoacetamide. They were then sealed with 0.5% agarose in SDS running buffer, and placed on top of 12.5% w/v polyacrylamide gels. The second dimension electrophoresis was performed overnight at 30 °C in an Ettan Dalt-6 system (GE Healthcare) at a 50 V constant voltage. Each gel was finally scanned with the Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare) at the emission wavelengths corresponding to each CyDye, namely 520 nm (Cy2), 580 nm (Cy3) and 670 nm (Cy5).

2.4. Image analysis

Images (n = 4 for each experimental condition) were analyzed with the DeCyder 7.0 software (GE Healthcare) according to the manufacturer's instruction. In brief, co-detection and quantification of the three CyDye-labeled forms of each spot was performed using the Differential In-gel Analysis (DIA) module, allowing the calculation of ratios between samples and internal standard abundances for each spot. Matching of spots across all gels and correction of inter-gel variability through normalization of the Cy2 internal standard spot maps present in each gel was realized by the Biological Variance Analysis (BVA) module. Protein spots that showed a statistically significant Student's t-test ($p < 0.05$) for an average spot abundance change of at least 1.5 were subjected to identification by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.

2.5. In-Gel digestion and mass spectrometry (MS) analysis

Preparative gels that contained 200–300 μ g of either NA or TA protein samples and 25 μ g of the internal standard were run in parallel and matched to the analytical gels master image to generate picking lists of differentially expressed spots used to drive automated gel plug collection by the Ettan Spotpicker (GE Healthcare). The proteins in gel pieces were subsequently in gel digested as described by Mathy and colleagues [22], according to Shevchenko and colleagues protocol [23]. The gel pieces were sequentially washed 3 times with 25 mM NH_4HCO_3 and 100% acetonitrile (ACN) to remove excess of detergent and buffer. After the last dehydration in ACN, piece of gels were rehydrated for 1 h at 4 °C with 2 μ l of 5 μ g/mL trypsin proteomic grade solution (Roche) diluted in 25 mM NH_4HCO_3 in order to ensure sufficient trypsin diffusion and to prevent autocatalysis. Finally the temperature was increased to 37 °C for an overnight digestion.

Peptides were extracted by adding 5 μ l of a 1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v) / 30% ACN (v/v) solution and vortexing for 30 min. 2 μ l of the resulting extract were deposited on a 384–600 MTP Anchorchip MALDI target plate (Brüker Daltonic) previously spotted with a 30 mg/mL (w/v) of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix solution (Sigma) diluted in acetone. After drop drying, each spot was desalted with cold 10 mM ammonium phosphate solution. Samples were analyzed with an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Brüker Daltonics) by MS fingerprint (spectra acquisition mass range: 70–4240 m/z). Peaks with the highest intensities

obtained in TOF-MS mode were subsequently analyzed by LIFT MS/MS (mass range 40–1100). Proteins identifications were carried out with the biotools software (Brüker) using the Mascot search engine. The generated peak lists were used for mascot searching (www.matrixscience.com) using the following parameters for both PMF and MS/MS experiments: trypsin digestion, Cystein carbamidomethylation and Methionine oxidation as fixed and variable modifications respectively; mass values determined in monoisotopic mode with unrestricted peptide mass and ± 100 ppm mass tolerance; one authorized missed cleavage. For PMF experiments, the peptide charge state was set as +1 and the mass range was 70–4240 m/z. For MS/MS experiments, the fragment mass tolerance was ± 0.3 Da and the mass range was 0–1100 m/z. The protein identifications were considered to be confident when the protein score of the hit exceeded the threshold significance score of 55 for PMF and 27 for MS/MS ($p < 0.05$). Searching was done against three version of UniprotKB/SwissProt database. Database A corresponds to version 57.1 (462,764 sequences; 163,773,385 residues, taxonomy: *Mus musculus*) released on April 2009, database B corresponds to version 57.7 (497,293 sequences; 175,274,722 residues, taxonomy: *Mus musculus*) released on September 2009, database C corresponds to version 2014_05 (545,388 sequences; 193,948,795 residues, taxonomy: Mammalia) released on May 2014.

2.6. Western blot (WB)

Proteins were extracted from NA and TA with lysis buffer (tris base 20 mM, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and 0.1% Triton-X 100 with a cocktail of protease inhibitors (Roche, Meylan, France). Twenty-five μg of proteins were diluted in electrophoresis loading buffer (glycerol 20% v/v; SDS 2%; tris 0.1 M pH 6.8; 5% v/v β -mercaptoethanol; bromophenol blue), separated by electrophoresis on 12% polyacrylamide gels and transferred to a low fluorescence PVDF membrane (GE Healthcare) using 25 mM tris, 192 mM glycine and 20% (v/v) methanol as blotting buffer.

Ponceau S reversible protein staining, usually applied as quality control of membrane transfer, was used to normalize for sample loading and transfer. Normalization through Ponceau S staining of total proteins allows an unbiased quantitative approach as compared to the high abundance “housekeeping” proteins method, using quantification of β -actin and/or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) whose abundance might also be altered by the experimental conditions [24,25]. After transfer, Ponceau S red-stained membranes (0.2% in 5% acetic acid, 5 min incubation) were scanned using an Image-Scanner (GE Healthcare, Belgium).

The membranes were saturated with tris-buffered saline (TBS) with 0.1% Tween-20 (TBST) containing 3% non-fat dry milk and incubated overnight at 4 °C with antibodies against the protein of interest. They were then washed several times with TBST and incubated in fluorescein isothiocyanate (FITC) or Rhodamine Red-X (RRX)-conjugated anti-goat or anti-rabbit antibodies (Jackson, 1: 2500) for 1 h at room temperature. After several washes in TBST, the membrane was washed in TBS without Tween and left to dry in the dark for 1 h. Images were obtained by scanning the membrane with the Typhoon 9400 laser-scanner.

The antibodies used in this study are listed in Table 1.

The pyruvate kinase (PK) antibodies were produced in rabbits immunized with peptides specific sequence for PK type M1 (PKM 1) or PK type M2 (PKM 2) isoform of PK. For PKM 1 isoform the following sequence was used for immunization: LFEELRRRLAPITSDPTEA and for PKM 2 the sequence used was: RLLFEELVRASSHSTDLME. Each peptide was coupled to key-hole limpet hemocyanin (KLH) carrier. Rabbit sera were used to detected PKM 1 and PKM 2 in WB of NA and TA samples.

2.7. Enzymatic assay of PK

The activity of PK was measured using a lactate dehydrogenase (LDH)-coupled assay system that follows the decrease in absorbance at 340 nm resulting from the oxidation of NADH when LDH transforms pyruvate to lactate, this pyruvate being obtained from phosphoenolpyruvate (PEP) under the action of PK [26]. The enzymatic assays were carried out on independent cultures which were grown, extracted and assayed at different times. NA and TA ($n = 9$) were harvested in medium containing: triethanolamine/HCl (50 mM), EDTA (1 mM), MgCl_2 (2 mM) and mercaptoethanol (26 mM). The pH of the medium was adjusted to 7.5. To start the reaction, an equal amount of protein extract (2.5 μg) was added to 1 ml of reaction mixture (160 mM triethanolamine/HCl, 10 mM MgCl_2 , 80 mM KCl, 0.17 mM NADH, 5 mM ADP, 0.05% triton, 5 mM PEP, and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lactate dehydrogenase). One unit of activity converts one micromole of PEP to pyruvate per min at 30 °C and pH 7.5.

Table 1 – List of antibodies used in this study.

| Name | Source | Lot | Ref | Specificity | Dilution | Mw (kDa) |
|----------|------------------------|-----------|------------|------------------------|----------|----------|
| Eno A | abcam | 717671 | ab 49343 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/20.000 | 47 |
| TK (H50) | Santa Cruz | F2508 | sc-67120 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/200 | 78 |
| IDH 2 | Sigma | QC 18171 | SAB2101125 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/500 | 47 |
| DHE 3 | Chemicon International | 51001384 | AB1803 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/100 | 56 |
| GS | Sigma | 060 M4768 | G2781 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/10 000 | 45 |
| PCB | Santa Cruz | L1211 | sc-67021 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/100 | 127 |
| MDH C | Santa Cruz | J3008 | sc-49233 | Goat polyclonal Ig G | 1/100 | 36 |
| GSTM 1 | Sigma | QC 12439 | AV41769 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/500 | 26 |
| PRDX 6 | Sigma | QC 22505 | AV48268 | Rabbit polyclonal Ig G | 1/500 | 25 |
| GRP 78 | Stress Marq | 901 | SPC-107B | Rabbit polyclonal Ig G | 1/1000 | 78 |

2.8. LDH isoenzymes zymography

Electrophoresis of LDH isoenzymes was adapted from the protocol described by Van Der Helm [27] and modified by Malmqvist [28]. NA and TA were scraped and homogenized in lysis buffer containing Na_2HPO_4 (72 mM), NaH_2PO_4 (28 mM) at pH 7.2. The samples were then centrifuged at $12.000\times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatants were then used for electrophoresis and LDH activity assay. Muscle (M) and heart (H) homogenates were used as reference to confirm the identity of the isoenzymes detected in NA and TA. LDH isoenzymes present in protein extracts were separated by electrophoresis on non-denaturing acrylamide gel (6% acrylamide diluted in electrophoresis buffer containing 410 mM Na_2HPO_4 and 90 mM KH_2PO_4 at pH 7.4). Equal amounts of protein were loaded in each lane and separated for about 2 h at 100 mA. At the end of electrophoresis the gel was covered by a filter paper soaked with a developer solution (lithium lactate (208 mM), NAD (5.6 mM), p-nitro blue tetrazolium chloride (2.4 mM) and phenazine methosulfate (0.33 mM)), incubated for 30 min at 37 °C and scanned at 300 dpi. The images were analyzed using 1D gel analysis ImageQuantTL software (GE Healthcare) to quantify the LDH isoenzymes bands intensity.

2.9. Glutamine synthetase enzymatic assay

The enzymatic activity of GS was determined photometrically following formation of L- γ -glutamylhydroxamate ferric chloride complex. This enzymatic assay is adapted from [29]. NA and TA were scraped and sonicated in KCl/cysteine solution (150/5 mM). The homogenates were incubated 10 min at 37 °C and centrifuged at $14.000\times g$ for 20 min at 4 °C. The supernatants obtained were used for GS activity determination. The reaction mixture contains 100 mM imidazole pH 7.2, 50 mM sodium L-glutamate, 10 mM β -mercaptoethanol, 20 mM sodium ATP, 40 mM MgCl_2 and 100 mM hydroxylamine pH 7.2. The reaction was started by addition of 75 μl of the reaction mixture to 50 μl of each sample supernatant. After one hour of incubation at 37 °C the reaction was stopped with 150 μl of 370 mM FeCl_3 / 670 mM HCl / 200 mM trichloroacetic acid. This mixture was then incubated for 30 min in the dark at 4 °C. The absorbance of the final mixture was read at 530 nm. All absorbances were within the linear range of a γ -glutamylhydroxamate standard curve. Protein concentration was determined with a dye-binding assay (DC Protein Assay, BioRad) using bovine serum albumin as a standard. For each sample, determinations were performed in triplicate. GS activity was expressed in mM of γ -glutamylhydroxamate formed per h per milligram of proteins at 37 °C.

2.10. Oxygen consumption

An equal amount of NA and TA (2×10^5 cells) were maintained in sealed 24 wells OxoDish in a Sensor Dish Reader (Presens, Precision Sensing GmbH, Germany). The cells were allowed to adhere for 24 h, after which the culture media was replaced by fresh medium. Measurements were continuously performed by the Sensor Dish Reader every 2 minutes for 2 h.

2.11. NMR measurements

The NMR spectra were recorded at 298 °K on a Bruker Avance spectrometer operating at 500.13 MHz for proton and equipped with a TCI cryoprobe. Deuterated water was used as the internal lock. The data have been processed with Bruker TOSPIN 2.1 software with standard parameter set. Phase and baseline correction were performed manually over the entire range of the spectra and the δ scale was calibrated to 0 ppm using the internal standard TMSP.

2.11.1. Culture media

For this experiment TA were grown for 48 h with MEM containing 10% FCS (the same medium as NA). At the end of these 48 h, the cells were rinsed twice with PBS and the culture medium was replaced with serum-free medium. Simultaneously, cultures of NA are also deprived of serum. After 24 h of deprivation, the culture medium is renewed before the start of the experiment. The cells were then maintained in this new medium for 24 h. During these 24 h, we collected 500 μl of medium from each culture at T0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h. These culture media served for NMR spectra acquisition. At the end of the experiment, the cells were harvested in lysis buffer and the total protein amount of each culture was determined by protein assay. This protein amount was used to normalize the signals obtained by NMR.

Five-hundred μl of collected culture media were supplemented with 100 μl of deuterated phosphate buffer (pH 7.4), 100 μl of a 35 mM solution of potassium phtalimide and 10 μl of TMSP. The solution was distributed into 5-mm tubes for NMR measurement. 1H NMR spectra were acquired using a 1D NOESY sequence with presaturation. The Noesyprsat experiment used a RD-90°-t1-90°-tm-90°-acquire sequence with a relaxation delay of 4 s, a mixing time t_m of 10 ms and a fixed t1 delay of 4 μs . Water suppression pulse was placed during the relaxation delay (RD). The number of transient is 64 (64 K data points) and a number of 4 dummy scans is chosen. Acquisition time is fixed to 3.2769001 s.

2D COSY spectra were acquired using a gradient-enhanced COSY sequence with presaturation. Water suppression pulse was placed during the RD. The number of transient is 8 (4 k data points in F2 and 300 in F1).

Lactate dosage was done on the 2D COSY spectra using the integral of the potassium phtalimide signal as reference and the integral of the correlation peak of lactate. A calibration curve between lactate concentration and lactate integral in the 2D COSY spectroscopy was established in order to determine the absolute concentration of this metabolite. Glutamine quantification was achieved on the 1D NOESY spectra by a classical integration of the glutamine signal at 2.13 ppm using potassium phtalimide as internal standard.

2.11.2. Cells extracts

For this experiment the cells were prepared following the procedure described for the NMR measurements for culture medium with the exception of lysis procedure. Cells were lysed in the deuterated water and a fraction (10 μl) of the lysate was used to determine the total protein amount and the other fraction (600 μl) was used for the acquisition of NMR spectra. 600 μl of collected cells extracts were supplemented

with 100 μ l of a 35 mM solution of maleic acid, 100 μ l of deuterated phosphate buffer to fix the pH value and 30 μ l of TMSF (Sodium 3-trimethylsilyl-propionate-2,2,3,3-d₄). The solution was distributed into 5-mm tubes for NMR measurement. 1H NMR spectra were acquired using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sequence with presaturation. The CPMG experiment used a RD-90°-(t-180°-t)n-acquire sequence with a RD of 4 s, a spin echo delay (t) of 300 μ s and the number of loops (n) equal to 128. Water suppression pulse was placed during the RD. The number of transient is 512. Acquisition time is fixed to 3.1982555 s and a number of 4 dummy scans are chosen. The zero (chemical shift) was adjusted using TMPS. Lactate and glutamine quantifications were achieved by the integration of the glutamine signal at 2.45 ppm and of the lactate signal at 1.4 ppm using maleic acid as internal standard

3. Results

3.1. Comparative proteomic analysis of normal and transformed astrocytes

A representative image in two colors of an analytical gel loaded with total protein extracts obtained from cultures of NA and TA is shown in Fig. 1 in [30]. Proteins whose abundance is higher or lower in TA as compared to NA appear in red and green, respectively. Two-hundred and seventy-seven spots corresponding to proteins with significantly different abundances (fold change ≥ 1.5 ; $p < 0.05$) were selected for further analysis. Among these spots, 117 spots were over-abundant and 160 were under-abundant in TA (Fig. 2 in [30]). Analysis by MALDI-TOF/TOF allowed the identification of 143 unique proteins from 235 of the 277 differentially expressed spots (Table 2 and Table 1 in [30]).

The classification of those identified proteins using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software highlighted several metabolic pathways significantly affected after the transformation of astrocytes (Fig. 1). In particular, significant changes in key enzymes abundance occurred in canonical pathways encompassing various aspects of glucose (glycolysis, gluconeogenesis, fermentation to lactate) and glycogen (glycogen degradation and biosynthesis) metabolism, of amino acid (glutamate, glutamine, arginine, aspartate, alanine, proline, serine) and nucleotide (purine, pyrimidine) metabolism, of energy production (TCA cycle, creatine-phosphate) and of cell reaction to oxidative stress (glutathione, pentose phosphate). Many enzymes of glycolysis (e.g. enolase, aldolase, triose phosphate isomerase, PK, GAPDH...) and the pentose phosphate pathways (PPP) (e.g. transaldolase) showed higher expression upon astrocytic transformation (Fig. 2). Conversely a decrease in the abundance of enzymes of the TCA cycle as well as several proteins involved in specific astrocytic functions (such as glycogen synthesis, ROS scavenging, glutamate and glutamine metabolism, Fig. 2) or of protein playing structural roles in the cytoskeleton (Fig. 3 in [30]) were observed. Those differential profiles are documented below.

3.2. Astrocyte transformation is accompanied with up-regulated glycolysis

TA exhibited higher levels of seven enzymes involved in glycolysis (Fig. 3A). Changes observed using 2D-DIGE were validated through quantitative WB analysis of a subset of glycolysis enzymes (Figs. 4B–C, 5, 6 and Figs. 4–7 in [30]). In addition, proteomic analysis revealed a differential regulation of the isoforms of GAPDH, and fructose-bis-P aldolase. Of the 4 GAPDH isoforms identified, 3 are more abundant

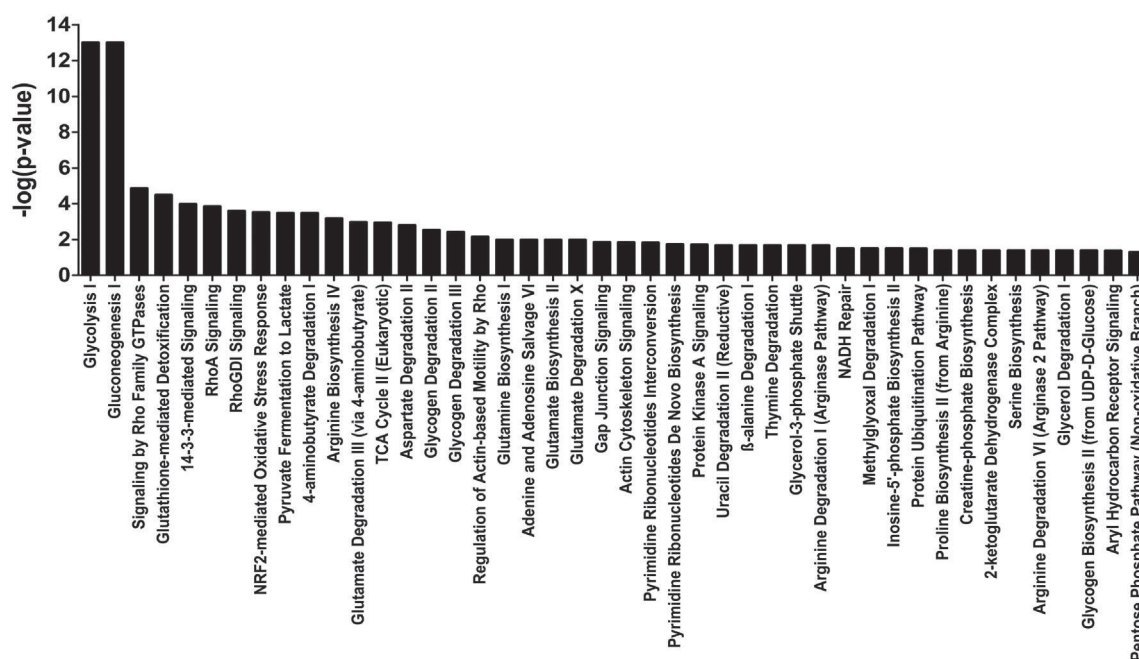


Fig. 1 – Distribution into canonical pathways (based on Ingenuity Pathways Analysis) of identified proteins that are differentially expressed between NA and TA.

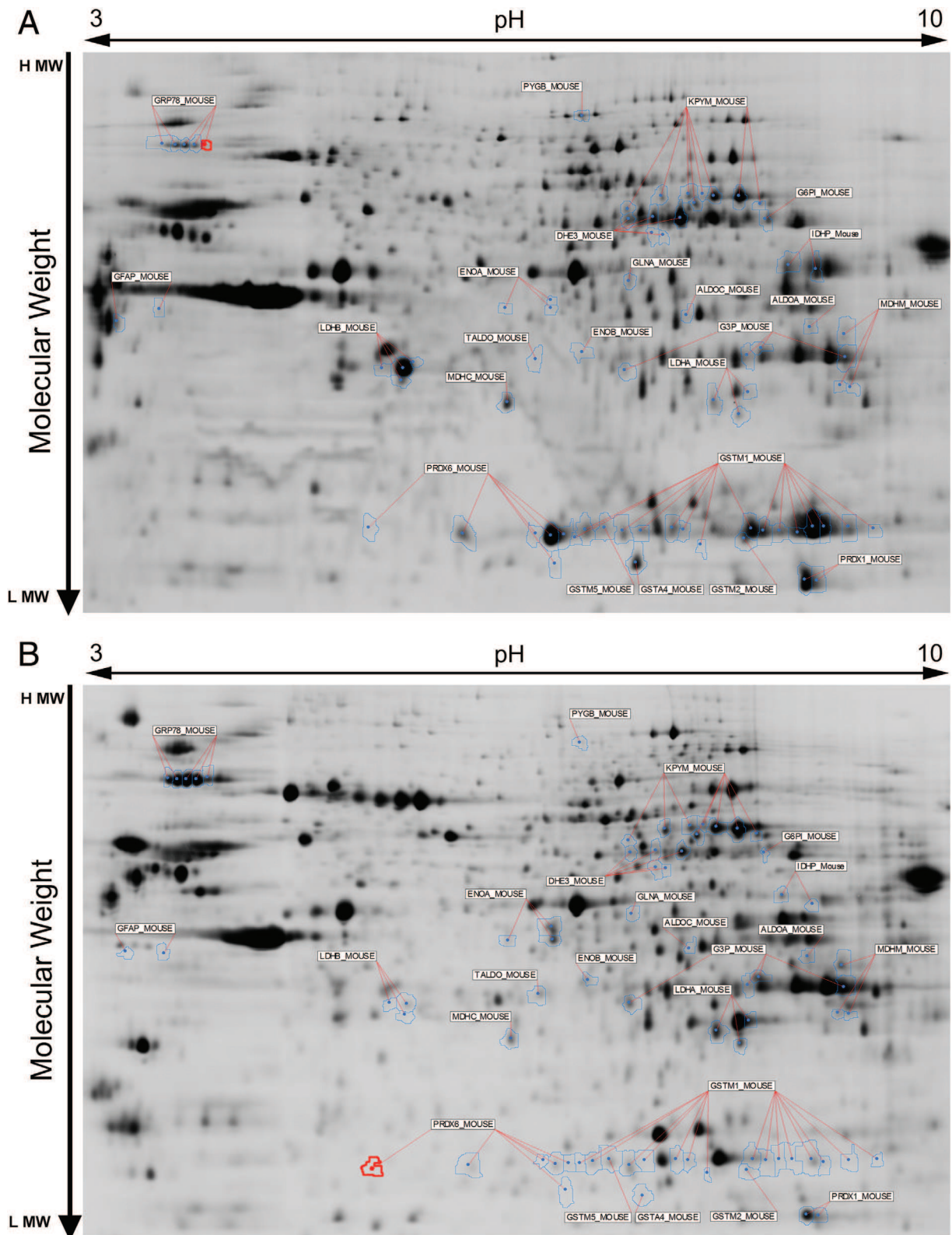


Fig. 2 – Gel images illustrating the positions of the spots with high difference in abundance between the two cell types and their protein identification. (A), NA; (B), TA.

and 1 is less abundant in TA (Fig. 7 in [30]). Likewise fructose-bis-P aldolase A (ALDO A) isoform was more abundant while its C isoform was less abundant.

Alpha enolase (ENO A) is the penultimate enzyme of the glycolysis pathway, ensuring the production of PEP from 2-phosphoglycerate (Fig. 3A). Three spots corresponding to

Table 2 – List of identified proteins whose abundance differs by at least 1.5-fold ($p < 0.05$, student t-test) between normal astrocytes (NA) and transformed astrocytes (TA). Proteins have been classified into biological processes as defined in the Uniprot Database Keywords list. Spot ID is the unique identifier of each protein spot provided in the Decyder analysis. Protein ID is the item Entry name in the UniprotKB/Swissprot database, the number of spot containing that protein is indicated between brackets when higher than 1. Average ratio is the fold higher abundance (range when more than 1 spot) in TA (positive values in green) or in NA (negative values in red).

| Protein ID | Protein Name | Av. Ratio (TA/NA) | pI | Da |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|-------|--------|
| Transcription, RNA metabolism and transport, nuclear proteins | | | | |
| RM22_MOUSE | 39S ribosomal protein L22; mitochondrial | -1.58 | 10.5 | 24018 |
| CHD1_MOUSE | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 | -5.27 | 7.1 | 197601 |
| ROA1_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | 4.22 | 9.7 | 34289 |
| HNRPF_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | 1.77 | 5.31 | 45730 |
| HNRH1_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (2) | 2.74 to 3.61 | 5.89 | 49454 |
| HNRPK_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (2) | 2.08 to 3.21 | 5.39 | 51230 |
| H12_MOUSE | Histone H1.2 | -4.23 | 11.5 | 21254 |
| H14_MOUSE | Histone H1.4 | 2.35 | 11.1 | 21846 |
| H2A1F_MOUSE | Histone H2A type 1-F (2) | 3.17 to 6.8 | 11.05 | 14162 |
| HXC11_MOUSE | Homeobox protein Hox-C11 | -1.85 | 9.5 | 34144 |
| NOP56_MOUSE | Nucleolar protein 56 | 19.4 | 9.22 | 64880 |
| PCIF1_MOUSE | Phosphorylated CTD-interacting factor 1 | -1.83 | 8.5 | 81423 |
| ST18_MOUSE | Suppression of tumorigenicity protein 18 | -1.67 | 6 | 116275 |
| UACA_MOUSE | Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats | 1.76 | 6.8 | 16969 |
| Protein synthesis, metabolism, processing, degradation | | | | |
| PSD12_MOUSE | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 | -1.72 | 6.71 | 53243 |
| RSSA_MOUSE | 40S ribosomal protein SA | -9.02 | 4.8 | 32931 |
| ARF4_MOUSE | ADP-ribosylation factor 4 | 1.95 | 6.81 | 20397 |
| SYDC_MOUSE | Aspartyl-tRNA synthetase; cytoplasmic (2) | -1.71 to -3.33 | 6.07 | 57537 |
| EF1A1_MOUSE | Elongation factor 1-alpha 1 | 1.58 | 9.1 | 50114 |
| EF1D_MOUSE | Elongation factor 1-delta | 2.72 | 4.91 | 31293 |
| EIF3_MOUSE | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 1 | 3.3 | 5.38 | 36837 |
| SYG_MOUSE | Glycyl-tRNA synthetase | 3.55 | 6.24 | 8224 |
| LARP6_MOUSE | La-related protein 6 | -4.12 | 8.7 | 55067 |
| LGMN_MOUSE | Legumain | 2.49 | 5.72 | 34818 |
| DDAH1_MOUSE | N(G); N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 | -2.24 | 5.64 | 31760 |
| TRUB2_MOUSE | Probable tRNA pseudouridine synthase 2 | -4.94 | 9.7 | 37069 |
| PSA1_MOUSE | Proteasome subunit alpha type-1 | 2.41 | 6 | 29547 |
| PSA7_MOUSE | Proteasome subunit alpha type-7 | 1.72 | 8.59 | 28009 |
| PSB10_MOUSE | Proteasome subunit beta type-10 | -2.26 | 6.4 | 29330 |
| PSB3_MOUSE | Proteasome subunit beta type-3 | 2.29 | 6.15 | 22965 |
| SPB6_MOUSE | Serpin B6 | -2.34 | 5.53 | 42913 |
| SNX2_MOUSE | Sorting nexin-2 | 1.93 | 5.04 | 58549 |
| TCPQ_MOUSE | T-complex protein 1 subunit theta | 1.5 | 5.44 | 60088 |
| TTPC4_MOUSE | Trafficking protein particle complex subunit 4 | -1.57 | 5.83 | 24484 |
| Stress response | | | | |
| GRP78_MOUSE | 78 kDa glucose-regulated protein (6) | 3.07 to 6.25 | 5.07 | 72492 |
| AHSA1_MOUSE | Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 | -2.17 | 5.41 | 38321 |
| CATA_MOUSE | Catalase | -2.92 | 8.5 | 60013 |
| ERO1A_MOUSE | ERO1-like protein alpha | 3.49 | 6.12 | 54905 |
| GSTA4_MOUSE | Glutathione S-transferase A4 | -7.64 | 6.57 | 25547 |
| GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 (15) | -2.3 to -31.31 | 7.71 | 26067 |
| GSTM2_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 2 | -5.73 | 6.9 | 25871 |
| GSTM5_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 5 | -2.09 | 6.82 | 27016 |
| HSP7C_MOUSE | Heat shock cognate 71 kDa protein | 2.28 | 5.37 | 71055 |
| LGUL_MOUSE | Lactoylglutathione lyase | -2.56 | 5.24 | 29967 |
| PRDX1_MOUSE | Peroxisredoxin-1 (2) | -1.62 to -1.81 | 8.26 | 22390 |
| PRDX6_MOUSE | Peroxisredoxin-6 (6) | -2.57 to -18.96 | 5.71 | 24969 |
| PDIA3_MOUSE | Protein disulfide-isomerase A3 (2) | 2.74 to 3.53 | 5.88 | 57099 |
| PDIA6_MOUSE | Protein disulfide-isomerase A6 | 2.66 | 5 | 48469 |
| Cytoskeleton | | | | |
| ACTB_MOUSE | Actin; cytoplasmic 1 | 3.09 | 5.29 | 42052 |
| ACTB_MOUSE | Actin; cytoplasmic 1 (13) | -2.36 to -5.18 | 5.29 | 42052 |
| ARPC2_MOUSE | Actin-related protein 2 to 3 complex subunit 2 | -4.45 | 7 | 34450 |
| ARP3_MOUSE | Actin-related protein 3 | 2.99 | 5.61 | 47783 |
| CAP1_MOUSE | Adenylyl cyclase-associated protein 1 | -2.08 | 7.16 | 51885 |
| ACTY_MOUSE | Beta-centractin | 2.01 | 5.98 | 42369 |
| DYH17_MOUSE | Dynein heavy chain 17; axonemal | -2.04 | 5.4 | 514983 |
| EZR1_MOUSE | Ezrin (3) | -3.52 to -6.16 | 5.83 | 69478 |
| FSCN1_MOUSE | Fascin | 2.24 | 6.44 | 55215 |
| FSCN1_MOUSE | Fascin | -3.07 | 6.44 | 55215 |
| GELS_MOUSE | Gelsolin | -2.24 | 5.8 | 86287 |
| GFAP_MOUSE | Glial fibrillary acidic protein (2) | -2.23 to -6.66 | 5.27 | 49927 |
| LMNA_MOUSE | Lamin-A/C | 2.73 | 6.37 | 65446 |
| LMNB1_MOUSE | Lamin-B1 | 2.51 | 5.11 | 66973 |
| MAP9_MOUSE | Microtubule-associated protein 9 | -3.3 | 7.8 | 73580 |
| MOES_MOUSE | Moiesin (2) | -2.61 to -3.99 | 6.22 | 67839 |
| SEPT1_MOUSE | Septin-11 (2) | -1.51 to -3.3 | 6.24 | 50005 |
| SEPT2_MOUSE | Septin-2 | 1.96 | 6.1 | 41727 |
| SEPT7_MOUSE | Septin-7 | -2.42 | 8.73 | 50550 |
| TCPE_MOUSE | T-complex protein 1 subunit epsilon | 1.93 | 5.72 | 60042 |
| TPM1_MOUSE | Tropomyosin alpha-1 chain (2) | -8.01 to -8.04 | 4.5 | 32718 |
| TBB2A_MOUSE | Tubulin beta-2A chain | 3.17 | 4.78 | 49907 |
| TBB2C_MOUSE | Tubulin beta-2C chain | 2.57 | 4.78 | 50095 |
| VIME_MOUSE | Vimentin (2) | 3.25 to 6.91 | 5.06 | 53510 |
| VIME_MOUSE | Vimentin (6) | -1.92 to -12.12 | 4.9 | 53712 |
| MIO_MOUSE | WD repeat-containing protein mio | 3.18 | 6.27 | 99913 |

| Carbohydrate metabolism (Glycolysis and TCA cycle) and transport | | | | |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------|--------|
| ALD2_MOUSE | Aldose reductase-related protein 2 | 12.25 | 5.97 | 36440 |
| ENOA_MOUSE | Alpha-enolase (3) | 3,31 to 9,22 | 6.37 | 47453 |
| ENOB_MOUSE | Beta-enolase | 3.68 | 6.73 | 47337 |
| ALDOA_MOUSE | Fructose-bisphosphate aldolase A | 2.15 | 8.31 | 39787 |
| ALDOC_MOUSE | Fructose-bisphosphate aldolase C | -2.35 | 6.8 | 39796 |
| G6PI_MOUSE | Glucose-6-phosphate isomerase | -3 | 8.18 | 62767 |
| G3P_MOUSE | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (3) | 1,56 to 1,69 | 8.45 | 36072 |
| G3P_MOUSE | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | -1.61 | 9.2 | 36072 |
| GPDA_MOUSE | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]; cytoplasmic | 5.28 | 6.75 | 38176 |
| PYGB_MOUSE | Glycogen phosphorylase; brain form | -3.74 | 3.28 | 97353 |
| PYGM_MOUSE | Glycogen phosphorylase; muscle form | -1.93 | 6.7 | 97681 |
| LDHA_MOUSE | L-lactate dehydrogenase A chain (3) | 2,04 to 2,44 | 7.62 | 36817 |
| LDHB_MOUSE | L-lactate dehydrogenase B chain (4) | -3,04 to -21,32 | 5.7 | 36834 |
| MDHM_MOUSE | Malate dehydrogenase; mitochondrial (3) | 1,98 to 2,58 | 8.93 | 36045 |
| PGAM1_MOUSE | Phosphoglycerate mutase 1 (2) | 2,07 to 2,56 | 6.67 | 28928 |
| KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 (7) | 2,01 to 3,16 | 7.18 | 58378 |
| KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (3) | 2,78 to 4,71 | 7.18 | 58378 |
| KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 | -1.57 | 7.18 | 58378 |
| TALDO_MOUSE | Transaldolase | 3.82 | 6.57 | 37534 |
| TPIS_MOUSE | Triosephosphate isomerase | 3.09 | 6.9 | 27038 |
| UGPA_MOUSE | UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (2) | -1,81 to -2,22 | 7.18 | 57115 |
| Energy metabolism | | | | |
| ADK_MOUSE | Adenosine kinase | -3.91 | 5.8 | 40466 |
| KAD2_MOUSE | Adenylate kinase 2; mitochondrial | 1.63 | 6.96 | 26737 |
| ATPA_MOUSE | ATP synthase subunit alpha; mitochondrial | 2.2 | 8.28 | 55310 |
| ATPA_MOUSE | ATP synthase subunit alpha; mitochondrial | -0,254 | 9.7 | 59830 |
| ATPB_MOUSE | ATP synthase subunit beta; mitochondrial | 2.46 | 5.19 | 56265 |
| ATPB_MOUSE | Creatine kinase B-type | 4.48 | 5.4 | 42971 |
| KCRB_MOUSE | Creatine kinase B-type (3) | -2,32 to -2,96 | 5.4 | 42971 |
| KCRB_MOUSE | Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex; mitochondrial | 2.4 | 6.41 | 32145 |
| ODO2_MOUSE | Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex; mitochondrial | -1.99 | 9.9 | 49306 |
| IDHP_MOUSE | Isocitrate dehydrogenase [NADP]; mitochondrial (2) | -1,72 to -8,92 | 8.88 | 51330 |
| SUCB2_MOUSE | Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta; mitochondrial | -3.1 | 6.58 | 47096 |
| Lipid metabolism and transport | | | | |
| HCD2_MOUSE | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 | -4.28 | 9.4 | 27516 |
| ACOT1_MOUSE | Acyl-coenzyme A thioesterase 1 | -2.68 | 6.1 | 46335 |
| INSI2_MOUSE | Insulin-induced gene 2 protein | -1.78 | 9.6 | 25298 |
| ACOX1_MOUSE | Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (2) | 1,84 to 2,4 | 8.64 | 74986 |
| Amino acid metabolism | | | | |
| GABT_MOUSE | 4-aminobutyrate aminotransferase; mitochondrial | -4.36 | 8.35 | 57100 |
| SERA_MOUSE | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (2) | -2,85 to -3,05 | 6.1 | 57347 |
| DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial (2) | 1,63 to 1,78 | 8.05 | 61640 |
| DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial (4) | -1,99 to -4,09 | 8.05 | 61640 |
| GLNA_MOUSE | Glutamine synthetase | -1.98 | 6.7 | 42834 |
| OAT_MOUSE | Ornithine aminotransferase; mitochondrial (2) | -1,17 to -2,24 | 6.19 | 48723 |
| Nucleic acid | | | | |
| BPNT1_MOUSE | 3'(2'); 5'-bisphosphate nucleotidase 1 | 1.92 | 5.54 | 33517 |
| NDKB_MOUSE | Nucleoside diphosphate kinase B | 2.52 | 6.97 | 17466 |
| KCY_MOUSE | UMP-CMP kinase | 1.79 | 5.68 | 22165 |
| Signal transduction | | | | |
| 1433T_MOUSE | 14-3-3 protein theta | 2.06 | 4.69 | 28046 |
| 1433Z_MOUSE | 14-3-3 protein zeta/delta | 2.21 | 4.73 | 27925 |
| ANXA2_MOUSE | Annexin A2 | -1.51 | 7.55 | 38937 |
| ANXA3_MOUSE | Annexin A3 (2) | -3,72 to -8,98 | 5.33 | 36520 |
| ANXA5_MOUSE | Annexin A5 (4) | 2,57 to 4,58 | 4.83 | 35787 |
| GBB1_MOUSE | Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 | -2.3 | 5.6 | 38151 |
| GNAO_MOUSE | Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha | -2.56 | 5.34 | 40629 |
| GDIB_MOUSE | Rab GDP dissociation inhibitor beta | -2.09 | 5.9 | 51018 |
| RAB5A_MOUSE | Ras-related protein Rab-5A | 1.84 | 8.32 | 23599 |
| RAB5C_MOUSE | Ras-related protein Rab-5C | -6.24 | 8.64 | 23626 |
| PP2BA_MOUSE | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform | 3.33 | 5.58 | 58644 |
| Cell cycle/ Cell death | | | | |
| CDKL5_MOUSE | Cyclin-dependent kinase-like 5 | 3.08 | 9.6 | 105498 |
| Miscellaneous | | | | |
| FTHFD_MOUSE | 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase | -5.15 | 5.64 | 99502 |
| RT31_MOUSE | 28S ribosomal protein S31; mitochondrial | 2.63 | 6.71 | 37966 |
| CALU_MOUSE | Calumenin | 4.86 | 4.49 | 37155 |
| DPYL2_MOUSE | Dihydropyrimidinase-related protein 2 (2) | -1,66 to -6,92 | 5.95 | 62638 |
| DPYL3_MOUSE | Dihydropyrimidinase-related protein 3 | -2.46 | 6 | 62296 |
| HYEP_MOUSE | Epoxide hydrolase 1 | -3.42 | 8.74 | 52713 |
| FRIH_MOUSE | Ferritin heavy chain | 4.11 | 5.33 | 21224 |
| PGRC2_MOUSE | Membrane-associated progesterone receptor component 2 | 3.89 | 4.9 | 23434 |
| PUR6_MOUSE | Multifunctional protein ADE2 | -1.87 | 6.94 | 47781 |
| PLST_MOUSE | Plastin-3 | 5.27 | 5.42 | 72210 |
| F115A_MOUSE | Protein FAM115A | -2.24 | 6.6 | 103696 |
| TAGL2_MOUSE | Transgelin-2 | 2.62 | 8.44 | 22250 |
| DCUP_MOUSE | Uroporphyrinogen decarboxylase | 3.1 | 6.21 | 40951 |

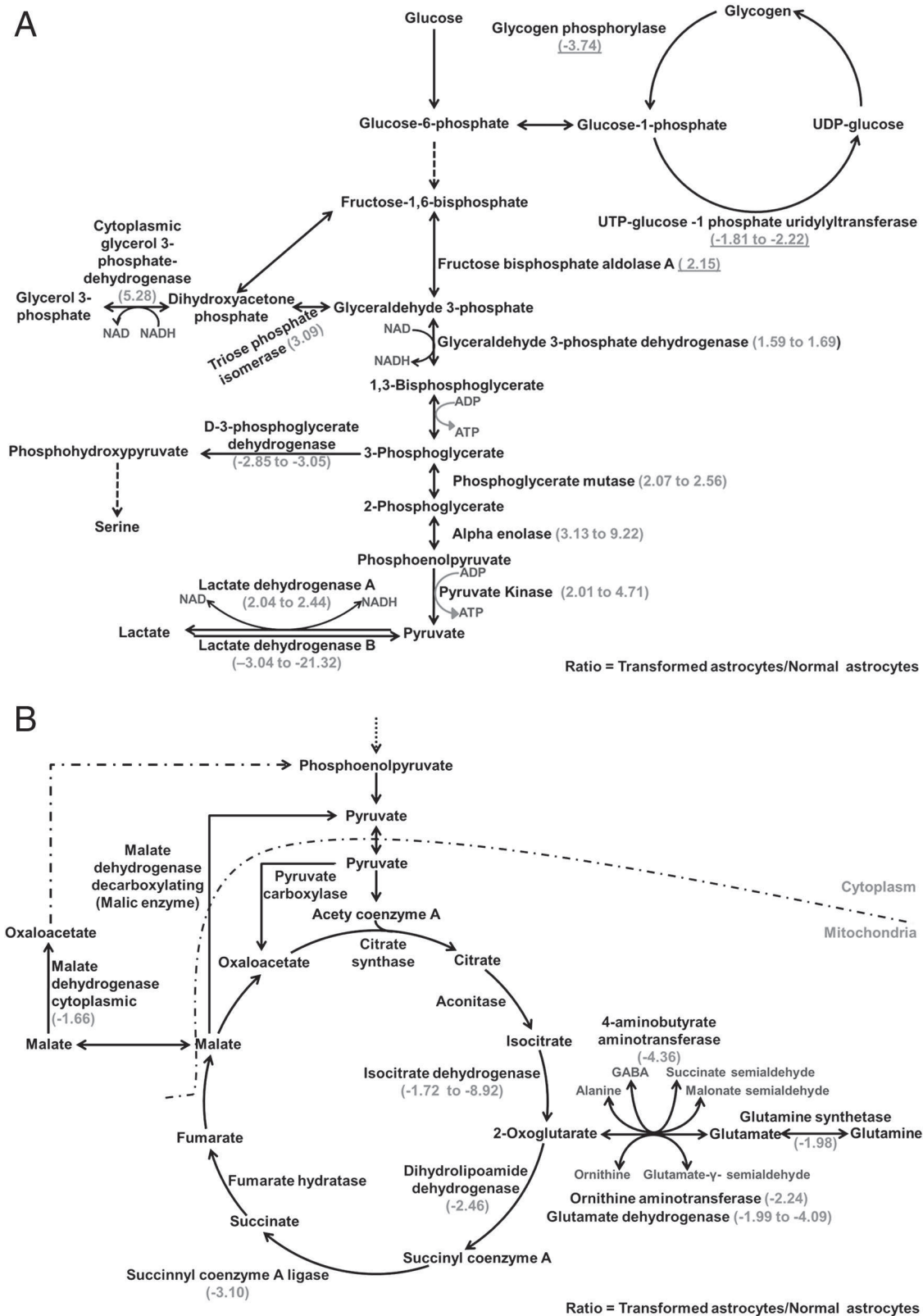


Fig. 3 – Carbohydrates and glutamate metabolism pathways incorporating the name of the identified enzymes and their respective ratio of abundance in TA versus NA. (A) Glycolysis and glycogen metabolism; (B) TCA cycle and Glutamate metabolism. The enzymes indicated without associated ratios were not detected in this analysis.

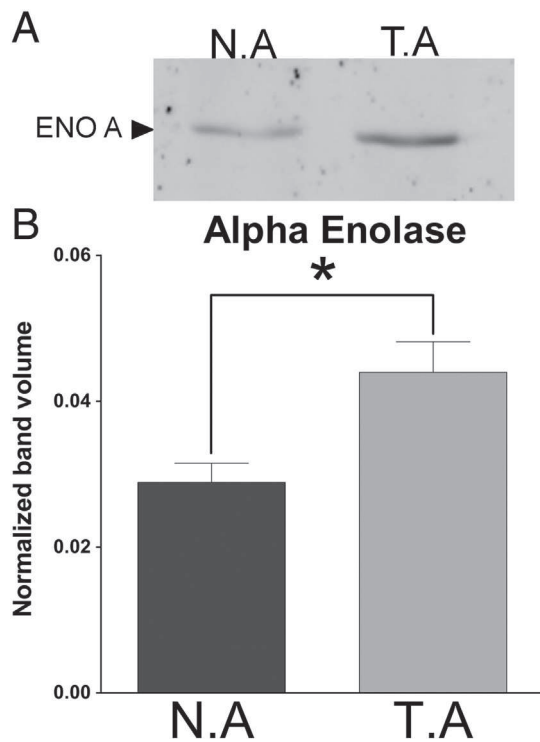


Fig. 4 – WB analysis for : (A) alpha Enolase (ENO A) in NA and TA protein extracts. (B), the intensity of ENO A bands were normalized using Ponceau red staining. ENO A protein expression was higher in TA (0.044 ± 0.004 ; $n = 4$) compared to NA (0.029 ± 0.0026 ; $n = 4$) with p value = 0.023. Values are the mean of normalized volumes \pm SEM.

ENO A and one spot corresponding to beta-enolase were identified and found to be more abundant in TA. ENO A higher abundance was also observed by WB analysis (Fig. 4A–B).

Changes in the abundance of several spots corresponding to PKM 2 were also observed (Fig. 5 in [30]). PKM 1 and PKM 2 are produced by alternative splicing of the same mRNA and differ only by 21 amino acid residues located in a 45 amino acids exon [31], and PKM 2 has been proposed to be the preponderant PKM isoform in cancer cells [32]. Despite the limited difference between these two isoforms, mass spectrometry analysis identified 7 spots as PKM 2, whereas the identity of 4 spots remained undetermined. These spots were listed as PKM1/M2. We therefore sought for an eventual differential expression of PKM isoforms using WB with antibodies specifically recognizing either PKM 1 or PKM 2. The results showed that both isoforms of PK are more abundant in TA (Fig. 5A–B). Measurements of the enzymatic activity of PK in soluble protein extracts showed a doubling of pyruvate kinase activity in TA versus NA (Fig. 5C).

3.3. Metabolic consequences of overexpression of PKM 2 in TA

Unlike other members of the family of PK (L, R and M1) characterized by a tetrameric quaternary structure, PKM 2 can exist as two different multimer assemblies: a tetrameric and a

dimeric form [33–36]. The tetrameric form is characterized by a high affinity for its substrate, PEP, and allows the production of pyruvate from glucose. The dimeric form of PKM 2 shows a low affinity for PEP and is inactive at physiological PEP concentrations. In its presence, glycolytic intermediates above pyruvate production accumulate, thereby providing a high yield of metabolic precursors for anabolic processes, such as the PPP, providing thus building blocks needed for cell proliferation [36–41]. In transformed astrocytes, 2D-DIGE analysis revealed a 4-fold higher level of transaldolase (TALDO) (Transformed/normal ratio: 3.82, T test = 0.0018) (Fig. 6A and 6 in [30]). In addition, WB showed a higher abundance of transketolase (TK), another major enzyme of the PPP (Fig. 6B).

To maintain a high rate of glycolysis in the low oxygen conditions encountered by most tumors, cells must dispose of excess reducing equivalents in order to regenerate the NAD pool required for the GAPDH step. Shuttles exist between the cytosol and the mitochondria that use either a malate–aspartate or a glycerol 3-phosphate – dihydroxyacetone phosphate exchange to carry electrons into mitochondria. Our proteomic quantitative analyses indicate a lower abundance of cytosolic malate dehydrogenase (MDH C) protein in TA (Figs. 3B and 8 in [30]) that was confirmed by WB measurements (Fig. 10). On the contrary a larger abundance in the cytosolic glycerol-3-phosphate-dehydrogenase protein in TA was documented, suggesting that those cells might recycle part of the NADH redox equivalents through oxidative respiration following their translocation by this particular shuttle system (Fig. 3A).

The 2D DIGE proteomic analysis allowed the identification of several spots corresponding to distinct isoforms of the A and B chain of LDH (Fig. 9 in [30]). LDH catalyzes the final step of glycolysis, converting pyruvate into lactate (Fig. 3A). The B chain predominates in NA, whereas the A chain isoform is more abundant following cancerous transformation (Fig. 7A, C, D). This suggests that cancerous transformation induced a major switch in LDH isoform expression.

To further characterize the expression pattern of the different LDH isoenzymes [42] in NA and TA, extracts of both cell types were analyzed by zymography. In accordance with our proteomic analysis, TA showed principally an expression of LDH A₄ (LDH 5) and LDH A₃B₁ (LDH4) tetramers and low expression of LDH A₂B₂ (LDH 3) tetramer, but not detectable LDH isoenzymes containing 3 or 4 B subunits (LDH 2 and LDH 1) (Fig. 7B). In contrast, NA expressed equivalent amounts of the 5 LDH tetramers, LDH1, 2, 3, 4 and 5.

The consequences of these different patterns of LDH isoenzymes expression were evaluated through measurement by NMR of the concentration of lactate within the cells and secreted in the culture medium. The intracellular concentration of lactate was reduced by half after astrocytes transformation (Fig. 7E), whereas extracellular lactate concentration after 12 h were twice higher in TA than in NA media (Fig. 7F). These results suggest an increased extracellular transport of this metabolite by transformed astrocytes.

3.4. Changes in mitochondrial enzymes

Most mitochondrial enzymes belonging to the TCA cycle were found in lower amounts in TA (Fig. 3B). Measurements of the

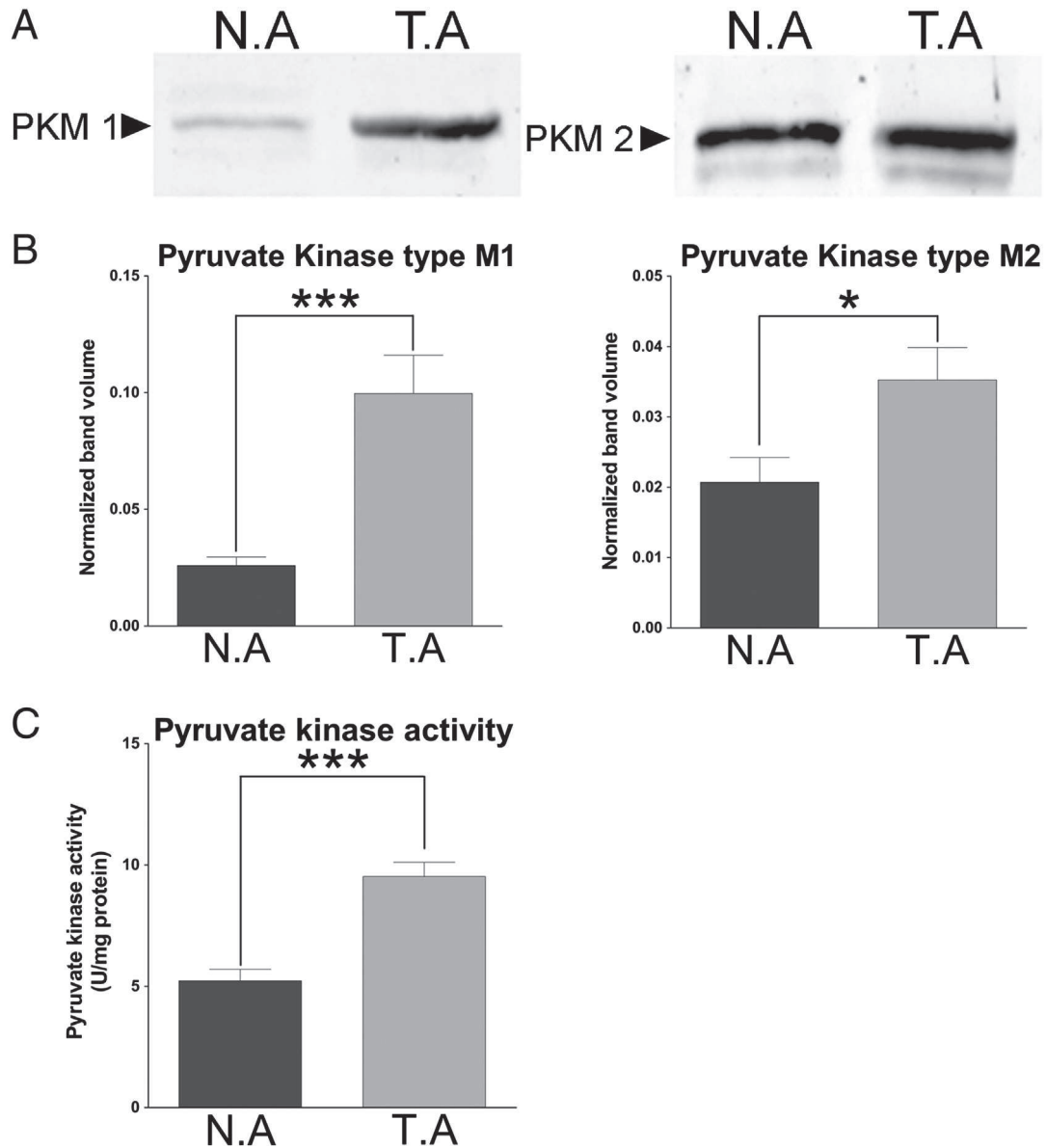


Fig. 5 – Quantification of Pyruvate Kinase isoforms PKM 1 and PKM 2 antigens and enzymatic activity. (A) WB analysis for PKM 1 and PKM 2 in NA and TA protein extracts. **(B)** Quantification of the intensity of PKM 1 and PKM 2 bands after normalization using Ponceau red staining. A significantly higher expression of M1 and M2 isoform of PK were observed in TA. PKM 1 in TA : 0.099 ± 0.016 , in NA : 0.026 ± 0.003 with p value = 0.0005. PKM 2 in TA : 0.035 ± 0.0045 , in NA : 0.020 ± 0.003 with p = 0.02; n = 9 for all determinations. Values are the mean of normalized band volumes \pm SEM. **(C)** TA show a two times higher enzymatic activity for PK (9.5 ± 0.57 enzymatic unit per mg of protein, n = 9) compared to NA (5.2 ± 0.47 unit per mg of protein, n = 9) with p value < 0.0001. One unit of activity converts one micromole of PEP to pyruvate per min at 30 °C and pH 7.5.

concentration of mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) antigen by WB confirmed this observation (Fig. 8A and 10 in [30]). IDH2 converts isocitrate into 2-oxoglutarate (Fig. 3). Accordingly, TA were found to consume oxygen at a much slower rate than NA (Fig. 8B). In closed cell culture compartments, on average consumption of 0.014% of initial oxygen per min occurred with TA against 0.030% of initial oxygen per min for NA (average consumption for 2×10^5 cells of each cell type).

Our proteomic investigation revealed also changes in the enzymes responsible for the transformation of glutamate and glutamine. Three enzymes that convert glutamate into 2-oxoglutarate, 4-aminobutyrate-aminotransferase, ornithine

aminotransferase and glutamate dehydrogenase (DHE 3) were less abundant in TA (Figs. 3B, 9A and Fig. 11 in [30]).

In addition, a 2-fold lower abundance of a major protein spot containing GS was observed in TA (TA/NA ratio: -1.98 , p value = 0.0026)(Fig. 12 in [30]). This was validated by a WB analysis showing that the level of GS in TA was 12 times lower than in NA (Fig. 9B).

Functional assay of the GS activity in protein extracts of NA and TA showed a lower activity in TA as compared to NA (NA mean activity = 7.09 ± 0.19 U.A, TA mean activity = 4.54 ± 0.28 U.A, mean \pm SEM, n = 3, Fig. 9C). We also quantified the concentration of glutamine in the culture

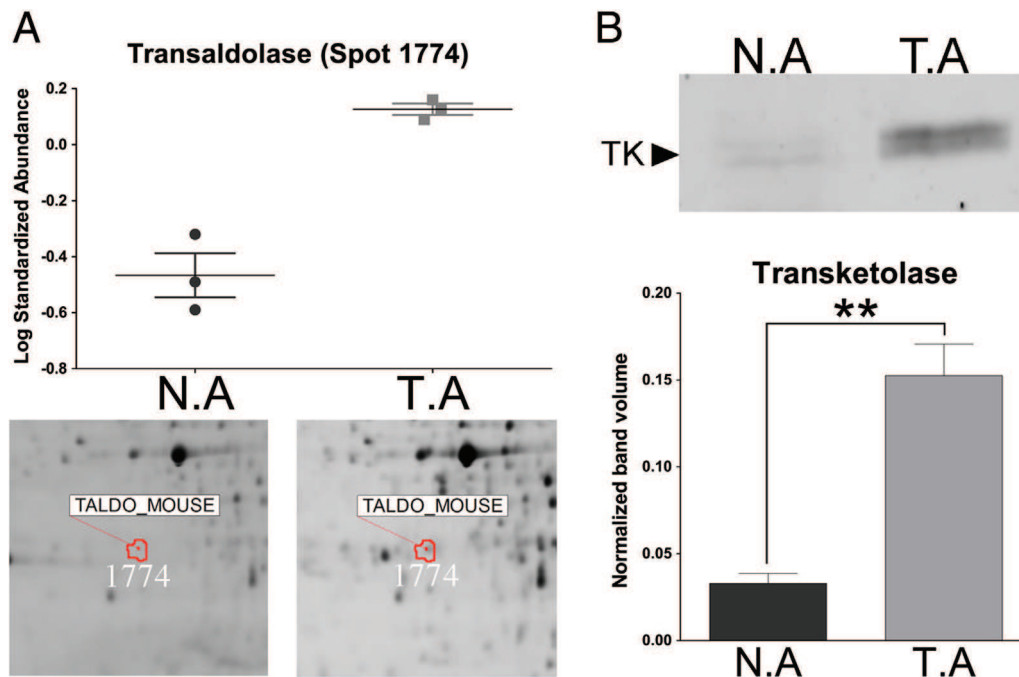


Fig. 6 – Quantification by 2D-DIGE or WB of two enzymes of the non-oxidative Pentose Phosphate Pathway. (A) Cropped images of a 2D separation of extracts of NA and TA showing spot 1774 corresponding to Transaldolase (TALDO), whose expression level is higher in TA (TA/NA ratio = 3.8, t-test = 0.0018). (B) Quantitative WB analysis of the expression level of Transketolase (TK). TA (0.152 ± 0.018 , $n = 3$), NA (0.033 ± 0.0057 ; $n = 3$) with p value = 0.003. Values are the mean of normalized band volumes \pm SEM.

medium by NMR and observed that, contrary to NA which are able to maintain an almost constant level of glutamine in the culture medium (with slight increasing trends), TA operate a 24% decrease of glutamine concentration in the culture medium over 24 h (Fig. 9D). NMR measurements of intracellular glutamine showed a depletion of this amino acid in TA where it remained under the threshold of detection (Fig. 9E).

3.5. Anabolic and anaplerotic reactions of the TCA cycle and glycogen metabolism

The proteomic analysis revealed a lower abundance in TA of several enzymes involved in anabolic and anaplerotic reactions of the TCA cycle. Besides the decrease observed for DHE3, we also noticed a decrease in the abundance of MDH C in TA (Figs. 3B, 10 and Fig. 4.5 in [30]), whereas the abundance of the three mitochondrial isoforms of malate dehydrogenase (MDH M) were found increased (Fig. 8 in [30]). By WB we also compared the abundance of pyruvate carboxylase (PC) (Fig. 10) in NA and TA. A robust reduction in the abundance of this mitochondrial enzyme, which diverts pyruvate to synthesize additional oxaloacetate for replenishing intermediates of the TCA cycle (Fig. 3), was observed in TA (Fig. 10).

A lower abundance after astrocyte transformation was also found for several enzymes that control the metabolism of glycogen. Enzymes involved in glycogen breakdown and synthesis were affected. Levels of glucose-6-phosphate isomerase and UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase that catalyze the initial step of glycogen synthesis were decreased (TA/NA

ratio: -3 , p value = 0.014, and -2.22 p value = 0.0094, respectively). Likewise, Glycogen Phosphorylase responsible for the last step of glycogen breakdown, was less abundant in TA (TA/NA ratio: -3.74 , p value = 0.024) (Fig. 3A).

3.6. ROS metabolism and stress-related proteins

A large number of protein spots with lower abundance in TA were found to contain multiple subunits of ROS-converting and glutathione-conjugating enzymes (Fig. 2). Both peroxiredoxin-1 (PRDX 1) and peroxiredoxin-6 (PRDX 6), present in two and four spots respectively were under-abundant in TA (lowest TA/NA ratio: -1.81 , p value = 0.0011 for PRDX 1 and lowest TA/NA ratio: -18.96 , p value = $6.7 \cdot 10^{-6}$ for PRDX 6) (Figs. 13, 14 in [30]). Three Glutathione-S-transferase Mu (GST M) subunits 1, 2 and 5 detected in 15, 1 and 1 spots, respectively, were under-abundant in TA (lowest TA/NA ratio: -31.31 , p value = 0.00099 for GSTM 1, TA/NA ratio: -5.73 , p value = 0.0025 for GST M2 and TA/NA ratio: -2.09 , p value = 0.0013 for GST M5) (Figs. 15, 16 in [30]). This was confirmed by WB quantification of the of GSTM1 and PRDX6 expression (Fig. 11A and B). Lactoylglutathione lyase, an enzyme participating in the glyoxalase pathway of detoxification of methylglyoxal, a by-product of glycolysis, was also less abundant in TA (TA/NA ratio: -2.56 , p value = 0.0084). The lower abundance of all these components of the glutathione-dependent ROS-scavenging system did not translate into decreased glutathione concentration, which was similar in NA and TA, as measured by NMR (Fig. 11C).

The six spots corresponding to isoforms of the 78 kDa glucose-regulated protein (GRP 78) showed increased relative

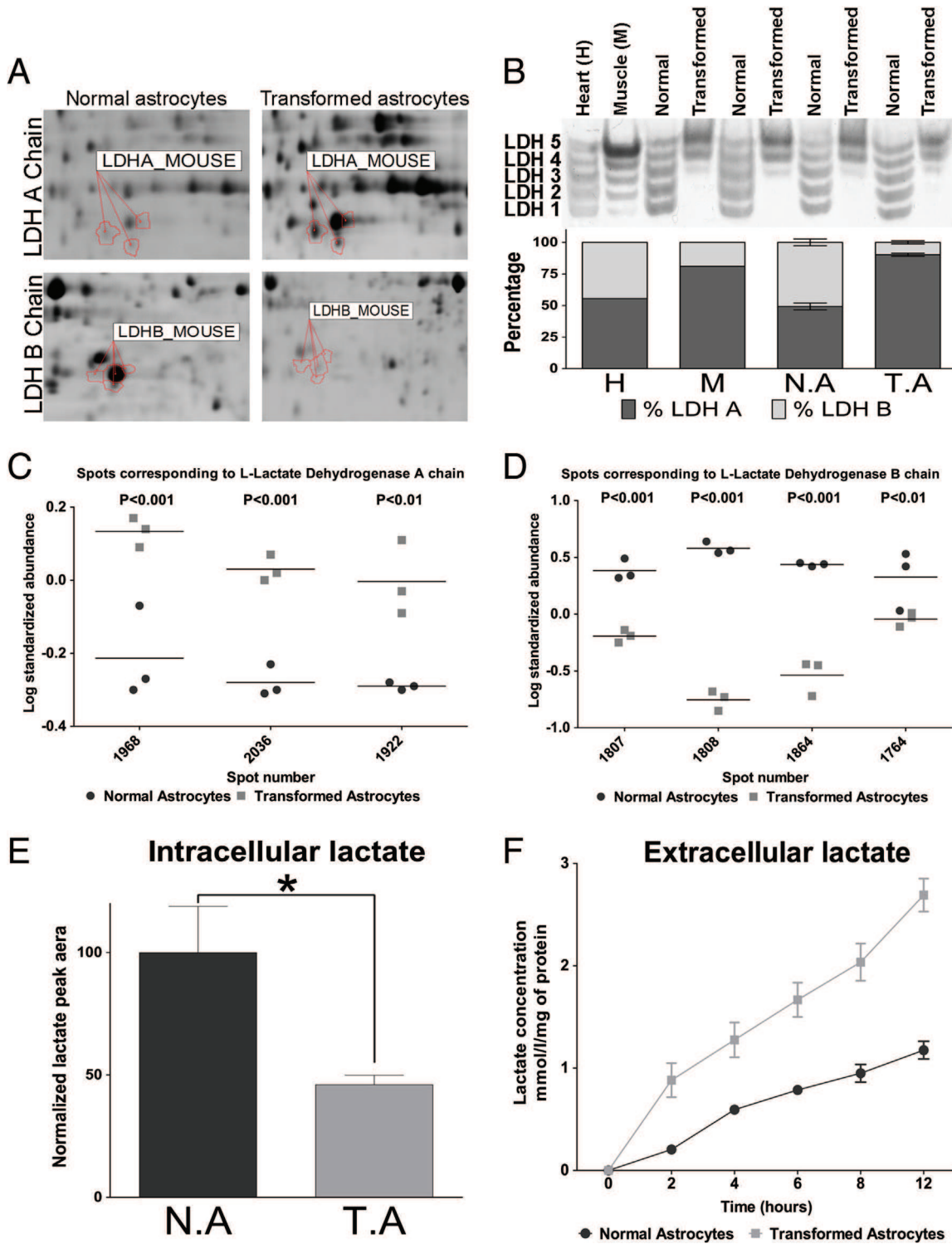


Fig. 7 – Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes (LDH tetramers 1 to 5) and isoforms (A chain and B chain) expression in NA and TA. (A) Cropped images of 2D separations of extracts of NA and TA. (B) Zymographic analysis of the pattern of expression of the different isoenzymes of LDH in NA and TA protein extracts. Heart (H) and muscle (M) extracts were used as reference. The quantification of the sum of expression of A and B chains in all isoenzyme bands from each samples shows that NA express equally A and B chain of LDH, while in TA, LDH is made of 90% A chain and 10% B chain. (C) and (D) quantification of the contoured spots in Fig. (A). (E) and (F): changes in Lactate abundance/concentration at the intracellular (E) and extracellular (F) level of NA and TA determined by 2D COSY NMR spectroscopy. Values in E are the mean of normalized peak area \pm SEM : NA 100 ± 18.89 , n = 5; TA 46.05 ± 3.799 , n = 4; p value = 0.0417.

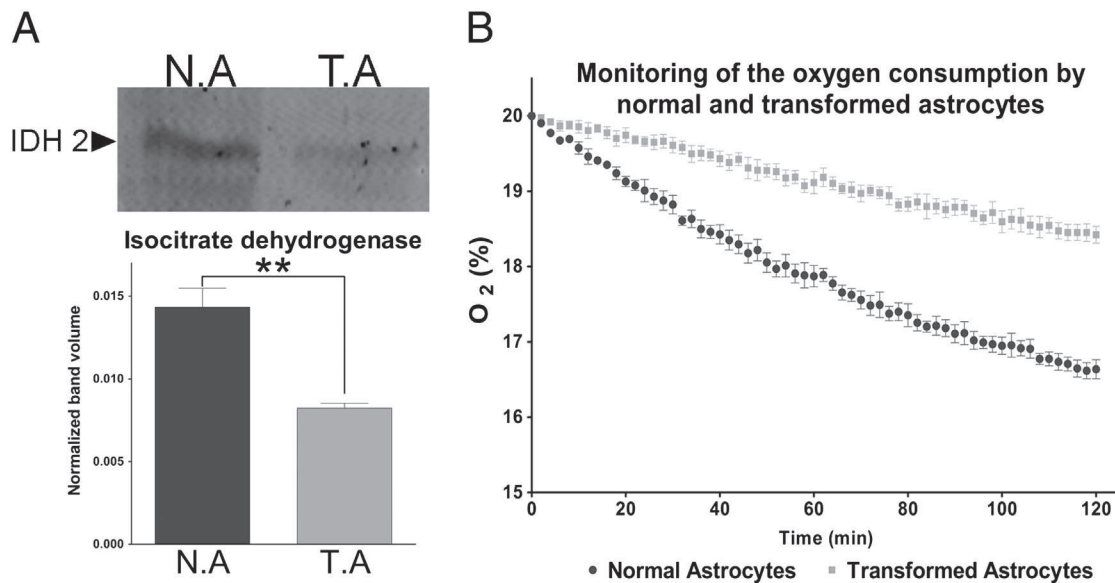


Fig. 8 – TA show a lower abundance of mitochondrial Isocitrate dehydrogenase (IDH2) and slower respiration. (A) Quantitative WB analysis of expression level of IDH2. Values are the mean of normalized band volumes \pm SEM. The abundance of IDH2 is 2 times lower in TA (0.0082 ± 0.0002 , $n = 3$) compared to NA (0.014 ± 0.001 ; $n = 3$) with p value = 0.006. (B) Measurement of the % of oxygen consumed by NA and TA. An equal amount of viable cells of each cells type were maintained in sealed 24 wells Oxo Dish in a SensorDish Reader. TA consume oxygen at a twice slower rate than NA.

abundances in TA compared to NA (range ratio from 3.07 to 6.25) (Fig. 17 in [30]). This chaperone protein is often up-regulated in glioblastomas and is involved in cell growth and resistance to apoptosis [43]. This observation was confirmed by WB against GRP78 (Fig. 11D).

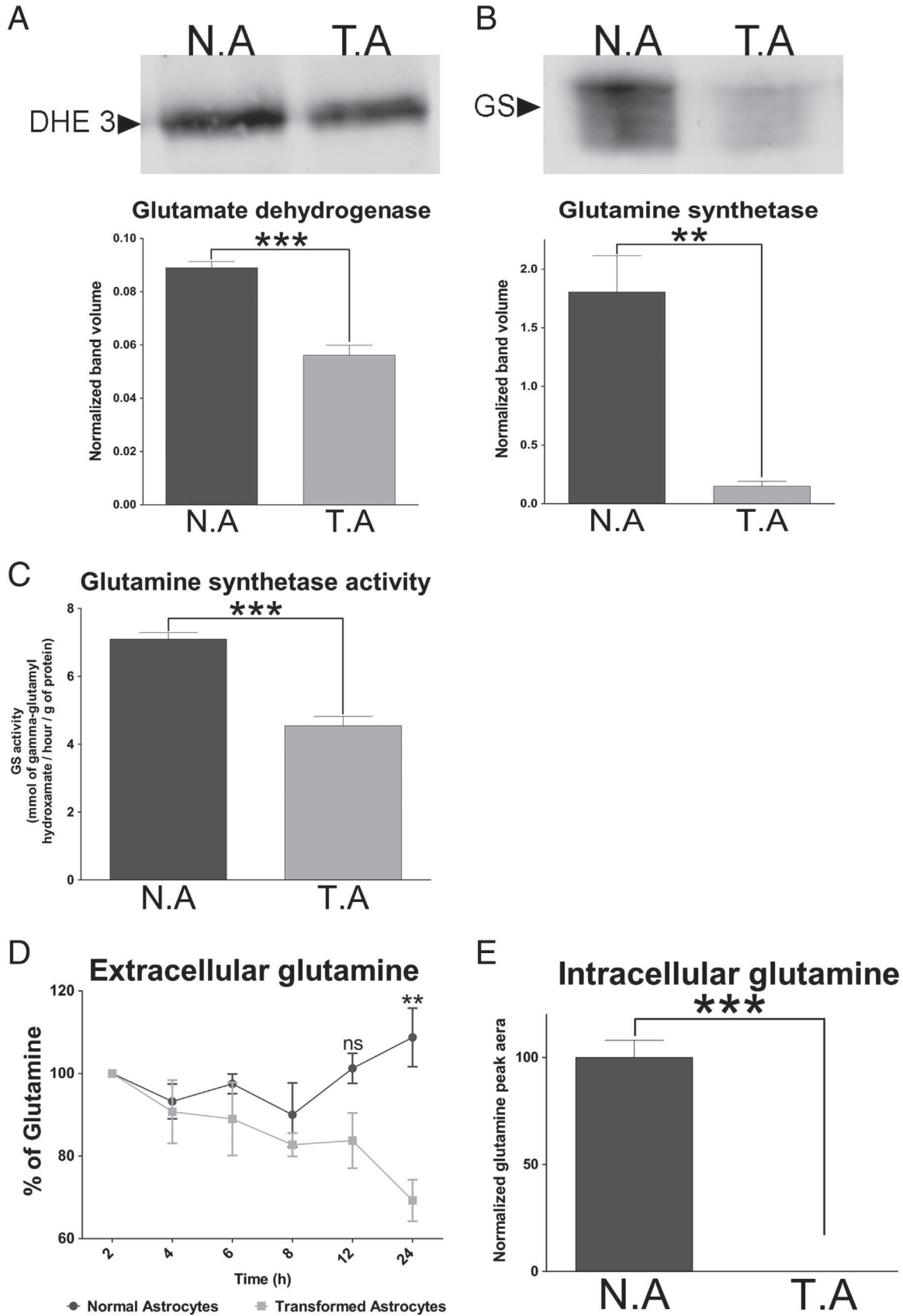
4. Discussion

Metabolic alterations are thought to play key roles in sustaining the survival and proliferation of cancer cells.

Our study aimed at characterizing the metabolic signature of transformed astrocytes as compared to that of normal astrocytes using comparative proteomic analysis. The 2D-DIGE analysis coupled with mass spectrometry (MALDI-TOF MS/MS) is a global, without a priori, proteomic approach particularly suited to identify and quantify enzymes isoforms and structural proteins, thus making it an efficient tool for the characterization of metabolic reprogramming following tumor transformation. We further detailed and validated through functional

measurements some of the major changes in protein abundance that were detected, thus allowing to establish a correlation between the quantitative determination of the abundance of selected enzymes and the metabolic profile of TA. In some cases, opposite regulation of different spots corresponding to the same protein occurs in our results. Indeed many proteins can be represented in the proteome by several protein species that arise through post-translational modifications. As each protein species can be generated or reduced differentially in the two phenotypes, their abundance can sometimes vary in opposing directions. Some discrepancies that appear between 2D-DIGE quantifications and Western blotting quantifications can be explained by the better resolution of 2D-DIGE that singles out individual protein species (and can sometimes provide no identification for some of them) while WB quantifies the total amount of one or multiple epitopes on several related protein species that bear them. Similarly, some discrepancies between immunoblotting data and enzymatic activity for a given enzyme can be explained by the fact that not all the immunodetected enzyme in a sample is necessarily catalytically active.

Fig. 9 – Glutamine metabolism in NA and TA. (A) Quantitative WB analysis of the abundance of Glutamate dehydrogenase (DHE 3). The abundance of DHE 3 is 1.5 times lower in TA (0.056 ± 0.003 , $n = 4$) compared to NA (0.09 ± 0.002 , $n = 4$) with p value = 0.0003. Values are the mean of normalized band volumes \pm SEM. (B) Quantitative WB directed against Glutamine synthetase (GS). Compared to NA (1.8 ± 0.31), TA show a strong decrease in the abundance of GS (0.149 ± 0.04); $n = 3$ and p value = 0.006. Values are the mean of normalized band volumes \pm SEM. (C) Determination of the enzymatic activity of GS shows a 1.6-fold decrease in TA (4.54 ± 0.28 U.A) compared to NA (7.09 ± 0.19 U.A); $n = 4$ and p value = 0.0003. One unit of activity (U.A) represents the amount, in mmoles, of γ -glutamyl hydroxamate produced per hour and per g of protein. (D) NMR quantification of changes in the concentration of extracellular glutamine in NA and TA. At 24 h, glutamine concentrations are $108.8\% \pm 7.087$ for NA and 69.25 ± 5.023 for TA of the initial concentration of glutamine in the culture medium; $n = 4$ and p value = 0.0039. (E) NMR quantification of changes in the concentration of intracellular glutamine in NA and TA. NA: 100 ± 7.98 , $n = 5$; TA: undetectable level, $n = 4$ and p value < 0.0001.



Apart from the metabolic changes that are discussed below, our study revealed some changes that classically accompany cancerous transformation. One of these is the reduction in abundance of some general structural elements of the cytoskeleton (actin, actin-associated proteins, ezrin, moesin...) and specific astrocytes cytoskeleton protein (GFAP) in TA.

Ezrin and moesin are part of ERM (Ezrin, Radixin and Moesin) family of proteins that play an important role in connecting the microfilament cytoskeleton to the plasma membrane. They structure the cell cortex, and are key players in the differentiation and morphogenesis of brain cells (for review [44]). The role of the ERM family in gliomas remains unclear. Some studies report a decrease in the expression of ezrin in certain categories of gliomas [45], whereas other publications report increased moesin expression in transformed cells [46]. GFAP is the main component of intermediate filaments in astrocytes (for review see [47]). The reduction/loss of expression of GFAP has been proposed as a step in glial tumor progression, in particular in most high-grade gliomas [48–52]. In addition, the decrease of GFAP abundance may be related to cell proliferation. Indeed, several studies show that in the same tumor, GFAP-negative cells proliferate more rapidly than GFAP-positive ones [53,54]. Thus, the large reduction in the expression of GFAP in TA that we observed could be interpreted as a marker of proliferation, but also as an indication of the dedifferentiation of these cells.

Major changes that were found involved an increase in the abundance of proteins implicated in the metabolism of carbohydrates (in particular enzymes of glycolysis), amino acids and nucleic acids as well as in the metabolism and modification of proteins. Conversely, decreases in the level of expression of several proteins involved in the TCA cycle were found. Many of the metabolic changes observed in transformed astrocytes evoked cell adaptations that characterize the aerobic glycolysis or “Warburg effect” [4,5].

Otto Warburg observed that in contrast to normal differentiated cells that use mainly mitochondrial oxidative phosphorylation to produce the energy required for several cellular processes, cancer cells use aerobic glycolysis characterized by high rates of glucose uptake and lactate production even in the presence of oxygen.

Our results revealed a higher abundance of almost all enzymes of glycolysis in TA suggesting a higher capacity for glucose uptake and metabolism by these cells. The consequences of this up regulation of functional glycolytic enzymes are likely more complex than a simple increase in glucose consumption because of the non-metabolic roles attributed to several of these enzymes. For example a recent study suggests a role in transcription regulation for LDH and GAPDH [55]. Other studies suggest that enolase is expressed at the cell surface where it acts as a receptor for plasminogen, promoting cell migration and cancer metastasis [56,57]. Independently of its role in glycolysis, pyruvate kinase M2 may have a role in programmed cell death [58] and in EGFR-induced beta-catenin transactivation [59]. However, while the various roles of these enzymes are also important in astrocytes functions, we will only discuss metabolic aspects here.

Among differentially expressed proteins we observed a higher abundance of both PKM 1 and PKM 2 in TA. For many years, investigators agreed that PKM 2 (also known as tumor form of PK)

was the sole PKM isoform expressed by tumor cells [38,40]. Christofk and colleagues [40] demonstrated that the expression of PKM 2 is indispensable for aerobic glycolysis. However, a recent study shows that the PKM 1/PKM 2 switch is not necessarily associated with tumor development, the authors concluding that PKM 2 is not specific to proliferating cells or tumors and suggesting that the increase of glycolytic activity observed in cancer cells is related to the total over-expression of all isoforms of PKM [60]. These conclusions are in agreement with our WB results showing that TA have higher abundance of both PKM 1 and PKM 2 isoforms when compared to NA. This results in an overall higher activity of PK in TA that we cannot attribute to a given isoform since we have no estimate of the relative abundance of PKM 1 and PKM 2. Recent report suggests that PKM 2 is less active than PKM 1 [61]. However, Bluemlein and collaborators also suggested that despite the lower intrinsic enzymatic activity of PKM 2 compared to PKM 1, the higher concentration of PKM 2 might be altogether responsible for a large part of PKM activity in normal tissues and cancers [60]. The overabundance of PKM 2 in TA compared to NA could have further important metabolic consequences as PKM 2 can exist in two multimeric conformations: an inactive dimeric and an active tetrameric form [33–36] leading to different metabolic and energy budgets.

The tetrameric form of PKM 2 is characterized by a high affinity for its substrate, PEP, and allows the production of pyruvate from glucose while the dimeric form is considered to be inactive. This activity of the tetrameric form of PKM 2, alone or together with the activity of PKM 1 when both isoforms are co-expressed in the same cells, requires that the NADH generated at the GAPDH step be oxidized to NAD⁺ for glycolysis to be able to run unabated. This depends on reactions catalyzed by either the malate-aspartate [62] or glycerol-3-phosphate dehydrogenase [38] shuttles under aerobic conditions or by the activity of LDH under anaerobic conditions. These last two enzyme systems were found to be overabundant in TA, suggesting that the glycolytic capacity of the transformed cells is high, regardless of their aerobic status. Thus the high lactate production detected in TA is evidence of a high ratio of enzymatically active tetrameric conformation of PKM 2.

Our results evidence a larger release of lactate in the culture medium of TA than in NA. This increase is in coherence with the slowdown of the TCA cycle (resulting from the down-regulation of certain enzymes involved in this cycle). Increased lactate release could additionally result from a switch of LDH isoforms expressed by TA [63]. The A chain of LDH, which is increased in TA, kinetically favors the production of lactate. The changes in LDH isoenzymes occurring in TA favor the formation of tetramers composed principally of the A chain, namely LDH5 and LDH4. A positive correlation between the expression of LDH5 and the grade/malignancy of some astrocytomas has been established [64]. Our results are thus consistent with the aggressive behavior of these TA able to form “high-grade glioma-like tumors” after brain grafting in Nude mice [19].

The dimeric form of PKM 2 has a low PEP affinity and is inactive at physiological concentrations of PEP causing a slowdown in pyruvate production and the accumulation of metabolic intermediates upstream of the reaction of PK that will fuel anabolic processes [36,37,39,40]. This increase in the availability of precursors for anabolic pathways was

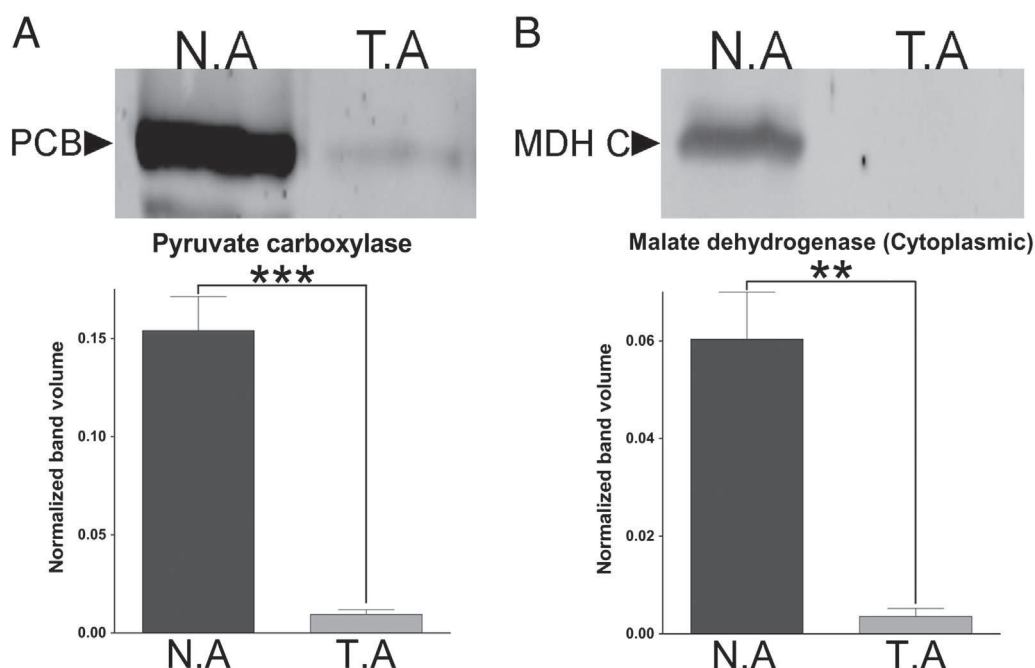


Fig. 10 – TA show a lower abundance of anabolic and anaplerotic enzymes. (A) Quantitative WB analysis of abundance of the brain form of Pyruvate carboxylase (PCB). The abundance of PCB is 16 times lower in TA (0.009 ± 0.002 , $n = 4$) compared to NA (0.15 ± 0.002 ; $n = 4$) with p value = 0.008. (B) Quantitative WB analysis of the abundance of cytoplasmic malate dehydrogenase (MDH C). The relative abundance of MDH C is 20 times lower in TA (0.0035 ± 0.0016 , $n = 4$) compared to NA (0.06 ± 0.009 ; $n = 4$) with p value = 0.015. Values are the mean of normalized band volumes \pm SEM.

accompanied by a higher abundance of transaldolase and transketolase (the main enzymes of the PPP) in TA. Thus an up-regulation of the activity of the PPP is concomitant with the presence of the dimeric form of PKM 2 in TA. The up regulation of the PPP would allow TA to synthesize ribose 5-phosphate and erythrose 4-P required for the synthesis of nucleotides and nucleic acids or of aromatic amino acids, respectively, that are needed for cell proliferation.

In addition to its role in the production of nucleotides, the PPP also plays a major role in detoxification and defense against free radicals [65–67]. Indeed, NADPH produced through the oxidative phase of the PPP is used by cells in the reductive biosynthetic reactions involved in the prevention of damage due to oxidative stress [68–70]. Thus the overabundance of PKM 2 in TA would promote anabolic processes and confer a selective advantage to these cells allowing them to maintain antioxidant response that prolong their survival under conditions of intense oxidative stress [71].

Cells, and in particular cancer cells, have several defenses against oxidative stress. Reduction of the activity of the TCA cycle and of mitochondrial respiration is one mode of control of the redox balance that allows cancerous cells to escape from apoptosis and to maintain their growth [72]. Accordingly, we observed reduced oxygen consumption in TA, and decreased abundance of several TCA cycle enzymes, possibly allowing the cells to produce less ROS and devote more metabolic resources to proliferation.

Enzymes that neutralize free radicals, such as the PRDXs, are another line of defense against oxidative stress. PRDXs act by regulating the intracellular concentration of peroxides,

which induce oxidative damage [73–75] and mediate signal transduction in mammalian cells [76,77]. PRDXs overexpression has been reported in various cancers [78–84] including some gliomas cases [85]. On the contrary, we observed a strong decrease in the relative abundance of PRDX 1 and PRDX 6 in TA. Interestingly, a recent study reported that while a significant proportion of diffuse astrocytoma have undetectable levels of PRDX 1 or PRDX 6, the PRDX 1- and PRDX 6-positive astrocytic tumors have a lower proliferation rate as compared to their negative counterparts [86]. These results, together with our findings of decreased PRDX 1 and PRDX 6 abundance in TA, which have a high proliferation rate [19], suggest that the role of PRDX 1 and PRDX 6 in transformed cells extends beyond the defense against oxidative stress.

2D-DIGE analysis revealed lower levels in TA than in NA of GST M1, 2, 5, and GST A4. These members of the GST family catalyze the conjugation of glutathione with a variety of endogenous products of oxidative stress and exogenous electrophilic compounds including various carcinogens, chemotherapeutic agents, and their metabolites [87–92]. Accordingly, a very low expression/abundance of GST M and GST A has been reported in human gliomas [93] and in human malignant astrocytoma cell lines [87], indicating that GSTs detoxification role is dispensable for brain tumors both in vitro and in vivo. At the same time, our observation that similar levels of GSH are maintained in NA and TA, can be linked to the important roles that GSH play in a multitude of cellular processes, including cell proliferation, DNA and protein synthesis as well as the regulation of many metabolic processes, including cancer growth and metastasis [94].

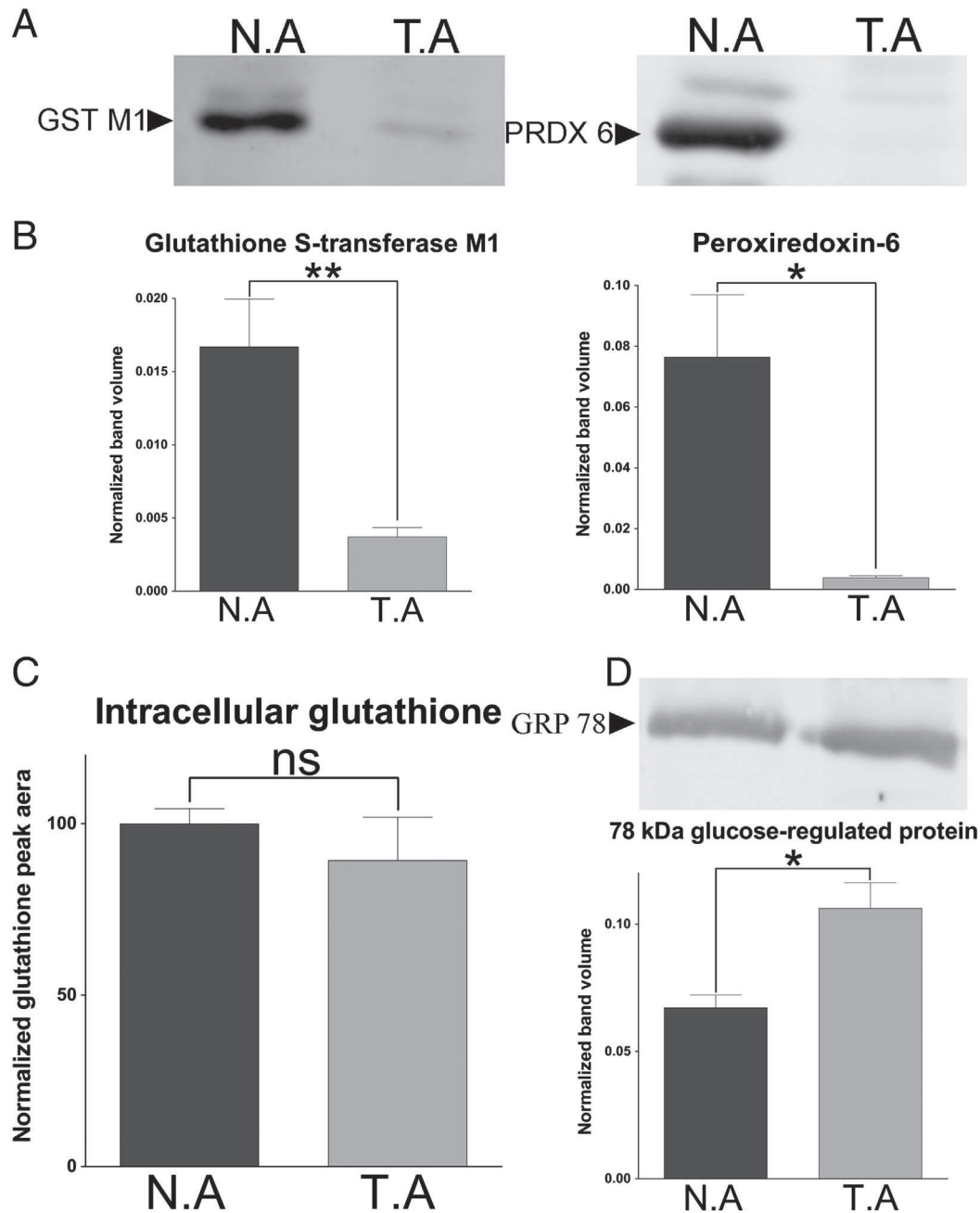


Fig. 11 – (A) Quantitative WB analysis of the relative abundance of Glutathione S-transferase M1 (GST M1) and Peroxiredoxin 6 (PRDX 6). (B) The abundance of GSTM1 is 5 times lower in TA (0.0037 ± 0.0006 , $n = 4$) compared to NA (0.017 ± 0.003 ; $n = 4$) with p value = 0.008 while the abundance of PRDX 6 is 20 times lower in TA (0.0038 ± 0.0006 , $n = 4$) compared to NA (0.076 ± 0.002 ; $n = 4$) with p value = 0.012. Values are the mean of normalized volumes \pm SEM. (C) NMR quantification of the concentration of intracellular glutathione in NA and TA. NA 100 ± 4.375 , $n = 5$; TA 89.28 ± 12.63 , $n = 4$; p value = 0.407. (D) WB analysis for 78 kDa glucose-regulated protein (GRP 78) in NA and TA protein extracts. The quantification of the intensity of GRP 78 bands after normalization shows a significantly higher abundance of GRP 78 in TA (0.1062 ± 0.01 ; $n = 4$) compared to normal astrocytes (0.06713 ± 0.005 ; $n = 4$) with p value = 0.01.

Another intriguing aspect of the metabolic reprogramming of TA is the loss of certain specific astrocytic proteins and functions. TA exhibit a low relative abundance of PC, glycogen degrading enzymes, GS and GFAP. PC is generally recognized as an astrocyte-specific marker [95], This mitochondrial enzyme catalyzes the conversion of pyruvate to oxaloacetate and plays

a major role as an anaplerotic enzyme that replenishes TCA cycle intermediates for amino acids, lipids and nucleic acids biosynthesis. PC functions in the pathway leading to the synthesis of glutamate and glutamine, and is paramount in astrocytes [96]. As it was established that PC is required for glutaminase-deficient tumor cells growth that cannot rely on

glutamine for anaplerosis [97], our results suggest that TA are dependent on glutamine.

Another astrocytic function that seems to be reduced after transformation is glycogen metabolism. It is generally accepted that brain glycogen is only localized in astrocytes [98], which express all the enzymes implicated in the synthesis and breakdown of glycogen. Among these enzymes, glycogen phosphorylase catalyzes a key step in glycogen breakdown that releases glucose-1-phosphate. Our observations made in normoxic conditions are at odd with recent work suggesting glycogen metabolism as an element of metabolic reprogramming in cancer cells [99,100]. However all these studies indicating that an increased turnover of glycogen sustains proliferation of tumors cells were done under hypoxic conditions [101,102].

Both the protein level of GS and its enzymatic activity are lower in TA than in NA. GS is an astrocytic enzyme playing a crucial role in the metabolism of ammonia and in glutamate recycling. Accumulation of extracellular glutamate, due to low expression levels of GS, is believed to be at the origin of seizures that may accompany gliomas [103]. Other studies established a negative correlation between the expression of GS and the degree of histological malignancy in brain tumors [104]. Thus the decrease in the abundance and activity of GS in TA can be considered as an indication of the malignancy of these cells.

In addition, using an NMR approach to study the evolution of metabolites in culture media, we observed a significant decrease in the concentration of glutamine in the culture medium of TA whereas NA maintain a stable concentration of extracellular glutamine. This is an interesting observation regarding the role of glutamine in cell survival, growth and proliferation. Glutamine is a source of both carbon and nitrogen that is essential for several biosynthetic processes, in particular for the synthesis of purines and pyrimidines, participating thus in cell proliferation [105]. Glutamine also plays an essential role in glutamate [106] and glutathione [107] synthesis. In some cancer cell lines, glutamine fuels a high fraction of the anaplerotic reactions, even in presence of non-limiting supplies of other nutrients, including glucose that could be used for anaplerosis [6]. Despite the decreased glutamine levels observed in the culture medium of TA compared to normal astrocytes, the possibility that TA would use glutamine as anaplerotic precursor does not correlate with the lower relative abundance of some of the enzymes (e.g. glutamate dehydrogenase) involved in these reactions in TA as shown by our 2D-DIGE and WB analysis. To resolve these conflicting observations we are currently conducting experiments aiming to determine the rate of use of glutamine as a carbon source by following metabolites derived from ¹³C-labeled glutamine using NMR spectroscopy.

In conclusion, the use of a global approach based on a 2D DIGE analysis allowed us to obtain a comprehensive view of the metabolic reprogramming undergone by astrocytes upon cancerous transformation. Indeed, except for a few enzymes such as PC and glutaminase that were not detected in our initial analysis, pertinent information on the abundance of most enzymes belonging to pathways relevant to metabolic reprogramming was directly obtained. Thus our approach appears to be readily applicable for the investigation of

changes in protein abundance that determine various transformed cell phenotypes. It could similarly be applied to the evaluation of the effects of treatments aimed at correcting the consequences of cell transformation.

6. Transparency Document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Concerted Research Action “Glyvir”, from the Leon Fredericq fund of the University of Liège and from the Fund for Medical Scientific Research (FRSM convention 3.4559.11). PL is a Senior Research Associate at the National Fund for Scientific Research (FNRS) Belgium. We thank S Labruzzo, P. Ernst and P.B. Van Lerberghe for their expert technical assistance.

REFERENCES

- [1] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009;324:1029–33.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
- [3] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11:325–37.
- [4] Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309–14.
- [5] Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927;8:519–30.
- [6] DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19345–50.
- [7] Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:441–64.
- [8] Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 2012;491:364–73.
- [9] Soga T. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci* 2013;104:275–81.
- [10] Mullen AR, DeBerardinis RJ. Genetically-defined metabolic reprogramming in cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:552–9.
- [11] Bouzier-Sore AK, Pellerin L. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 2013;7:179.
- [12] Guerrero-Cazares H, Attenello FJ, Noiman L, Quiñones-Hinojosa A. Stem cells in gliomas. *Handb Clin Neurol* 2012;104:63–73.
- [13] Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, et al. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 2012;338:1080–4.
- [14] Pellerin L, Stolz M, Sorg O, Martin JL, Deschepper CF, Magistretti PJ. Regulation of energy metabolism by

- neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia* 1997;21:74–83.
- [15] Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10625–9.
- [16] Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 1977;195:1356–8.
- [17] San Martin A, Ceballos S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF, et al. A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PLoS One* 2013;8:e57712.
- [18] Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997;18:2071–7.
- [19] Dufour C, Cadusseau J, Varlet P, Surena AL, de Faria GP, Dias-Morais A, et al. Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation. *Stem Cells* 2009;27:2373–82.
- [20] Sharif A, Legendre P, Prevot V, Allet C, Romao L, Studler JM, et al. Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene* 2007;26:2695–706.
- [21] Prevot V, Lomniczi A, Corfas G, Ojeda SR. erbB-1 and erbB-4 receptors act in concert to facilitate female sexual development and mature reproductive function. *Endocrinology* 2005;146:1465–72.
- [22] Mathy G, Cardol P, Dinant M, Blomme A, Gerin S, Ghysels B, et al. Proteomic and functional characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1. *J Proteome Res* 2010;9:2825–38.
- [23] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, et al. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem Soc Trans* 1996;24:893–6.
- [24] Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 2010;401:318–20.
- [25] Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* 2008;172:250–4.
- [26] Board M, Humm S, Newsholme EA. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem J* 1990;265:503–9.
- [27] van der Helm H. A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta* 1962;7:124–8.
- [28] Malmqvist U, Arner A, Uvelius B. Lactate dehydrogenase activity and isoform distribution in normal and hypertrophic smooth muscle tissue from the rat. *Pflugers Arch* 1991;419:230–4.
- [29] Wellner VP, Meister A. Binding of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate by glutamine synthetase. *Biochemistry* 1966;5:872–9.
- [30] Bentaib A, de Tullio P, Chneiweiss H, Hermans E, Junier MP, Leprince P. Data in support of metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: a proteomic study. *Data in brief*; 2014 1.
- [31] Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 1986;261:13807–12.
- [32] Luo W, Semenza GL. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:560–6.
- [33] Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Friis R. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Crit Rev Oncog* 1992;3:91–115.
- [34] Eigenbrodt EG H. Glycolysis – one of the keys to cancer? *Trends Pharmacol Sci* 1980;1:240–5.
- [35] Mazurek S, Michel A, Eigenbrodt E. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *J Biol Chem* 1997;272:4941–52.
- [36] Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E. Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochem J* 2001;356:247–56.
- [37] Boros LG, Lee PWN, Brandes JL, Cascante M, Muscarella P, Schirmer WJ, et al. Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: is cancer a disease of cellular glucose metabolism? *Med Hypotheses* 1998;50:55–9.
- [38] Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 2005;15:300–8.
- [39] Miccheli A, Tomassini A, Puccetti C, Valerio M, Peluso G, Tuccillo F, et al. Metabolic profiling by ¹³C-NMR spectroscopy: [1,2-¹³C₂]glucose reveals a heterogeneous metabolism in human leukemia T cells. *Biochimie* 2006;88:437–48.
- [40] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008;452:230–3.
- [41] Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:969–80.
- [42] Markert CL, Shaklee JB, Whitt GS. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 1975;189:102–14.
- [43] Lee HK, Xiang C, Cazacu S, Finniss S, Kazimirsky G, Lemke N, et al. GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. *Neuro Oncol* 2008;10:236–43.
- [44] Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:276–87.
- [45] Grzendowski M, Wolter M, Riemenschneider MJ, Knobbe CB, Schlegel U, Meyer HE, et al. Differential proteome analysis of human gliomas stratified for loss of heterozygosity on chromosomal arms 1p and 19q. *Neuro Oncol* 2010;12:243–56.
- [46] Zhu X, Morales FC, Agarwal NK, Dogruluk T, Gagea M, Georgescu MM. Moesin is a glioma progression marker that induces proliferation and Wnt/beta-catenin pathway activation via interaction with CD44. *Cancer Res* 2013;73:1142–55.
- [47] Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res* 2000;25:1439–51.
- [48] Tascos NA, Parr J, Gonatas NK. Immunocytochemical study of the glial fibrillary acidic protein in human neoplasms of the central nervous system. *Hum Pathol* 1982;13:454–8.
- [49] Velasco ME, Dahl D, Roessmann U, Gambetti P. Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer* 1980;45:484–94.
- [50] Jacque CM, Kujas M, Poreau A, Raoul M, Collier P, Racadot J, et al. GFA and S 100 protein levels as an index for malignancy in human gliomas and neurinomas. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:479–83.
- [51] van der Meulen JD, Houthoff HJ, Ebels EJ. Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1978;4:177–90.

- [52] Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J Neurol Sci* 1978;35:147–55.
- [53] Kajiwara K, Orita T, Nishizaki T, Kamiryo T, Nakayama H, Ito H. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and nucleolar organizer regions (NORs) in human gliomas. *Brain Res* 1992;572:314–8.
- [54] Hara A, Sakai N, Yamada H, Niikawa S, Ohno T, Tanaka T, et al. Proliferative assessment of GFAP-positive and GFAP-negative glioma cells by nucleolar organizer region staining. *Surg Neurol* 1991;36:190–4.
- [55] Zheng L, Roeder RG, Luo Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 2003;114:255–66.
- [56] Hsiao KC, Shih NY, Fang HL, Huang TS, Kuo CC, Chu PY. Surface alpha-enolase promotes extracellular matrix degradation and tumor metastasis and represents a new therapeutic target. *PLoS One* 2013;8:e69354.
- [57] Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 2005;30:142–50.
- [58] Stetak A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A. Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. *Cancer Res* 2007;67:1602–8.
- [59] Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, et al. Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 2011;480:118–22.
- [60] Bluemlein K, Grüning NM, Feichtinger RG, Lehrach H, Kofler B, Ralser M. No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget* 2011;2:393–400.
- [61] Vander Heiden MG, Locasale JW, Swanson KD, Sharfi H, Heffron GJ, Amador-Noguez D, et al. Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* 2010;329:1492–9.
- [62] McKenna MC, Waagepetersen HS, Schousboe A, Sonnewald U. Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. *Biochem Pharmacol* 2006;71:399–407.
- [63] Ross JM, Öberg J, Brené S, Coppotelli G, Terzioglu M, Pernold K, et al. High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:20087–92.
- [64] Rabow L, Kristensson K. Changes in lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in patients with tumours of the central nervous system. *Acta Neurochir (Wien)* 1977;36:71–81.
- [65] Weinberg F, Chandel NS. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1177:66–73.
- [66] Kondoh H, Leonart ME, Bernard D, Gil J. Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histol Histopathol* 2007;22:85–90.
- [67] Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Leonart ME. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev* 2013;12:376–90.
- [68] Cosentino C, Grieco D, Costanzo V. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J* 2011;30:546–55.
- [69] Vaughn AE, Deshmukh M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2008;10:1477–83.
- [70] Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, et al. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 2005;65:177–85.
- [71] Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, Boxer MB, Jiang JK, Shen M, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 2011;334:1278–83.
- [72] Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, et al. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol* 2006;175:913–23.
- [73] Datta K, Babbar P, Srivastava T, Sinha S, Chattopadhyay P. p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:148–57.
- [74] Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993;215:213–9.
- [75] Linden A, Gülden M, Martin HJ, Maser E, Seibert H. Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicol In Vitro* 2008;22:1371–6.
- [76] Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 2003;300:650–3.
- [77] Wood ZA, Schröder E, Robin HJ, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003;28:32–40.
- [78] Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Kim SW, Park IA, Chae HZ. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2085–90.
- [79] Yanagawa T, Ishikawa T, Ishii T, Tabuchi K, Iwasa S, Bannai S, et al. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett* 1999;145:127–32.
- [80] Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R, Kang SW, Rhee SG, et al. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002;196:316–23.
- [81] Chang JW, Jeon HB, Lee JH, Yoo JS, Chun JS, Kim JH, et al. Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:507–12.
- [82] Yanagawa T, Iwasa S, Ishii T, Tabuchi K, Yusa H, Onizawa K, et al. Peroxiredoxin I expression in oral cancer: a potential new tumor marker. *Cancer Lett* 2000;156:27–35.
- [83] Kim HJ, Chae HZ, Kim YJ, Kim YH, Hwang TS, Park EM, et al. Preferential elevation of Prx I and Trx expression in lung cancer cells following hypoxia and in human lung cancer tissues. *Cell Biol Toxicol* 2003;19:285–98.
- [84] Kinnula VL, Paakko P, Soini Y. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS Lett* 2004;569:1–6.
- [85] Odreman F, Vindigni M, Gonzales ML, Niccolini B, Candiano G, Zanotti B, et al. Proteomic studies on low- and high-grade human brain astrocytomas. *J Proteome Res* 2005;4:698–708.
- [86] Jarvela S, Rantala I, Rodriguez A, Kallio H, Parkkila S, Kinnula VL, et al. Specific expression profile and prognostic significance of peroxiredoxins in grade II-IV astrocytic brain tumors. *BMC Cancer* 2010;10:104.
- [87] Ali-Osman F, Stein DE, Renwick A. Glutathione content and glutathione-S-transferase expression in 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant human malignant astrocytoma cell lines. *Cancer Res* 1990;50:6976–80.
- [88] Hara A, Yamada H, Sakai N, Hirayama H, Tanaka T, Mori H. Immunohistochemical demonstration of the placental form of glutathione S-transferase, a detoxifying enzyme in human gliomas. *Cancer* 1990;66:2563–8.
- [89] Evans CG, Bodell WJ, Tokuda K, Doane-Setzer P, Smith MT. Glutathione and related enzymes in rat brain tumor cell resistance to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and nitrogen mustard. *Cancer Res* 1987;47:2525–30.
- [90] Britten RA, Green JA, Warenius HM. Cellular glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST) activity in human ovarian tumor biopsies following exposure to alkylating agents. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;24:527–31.
- [91] Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, et al. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and

- survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:936–42.
- [92] Bacolod MD, Johnson SP, Ali-Osman F, Modrich P, Bullock NS, Colvin OM, et al. Mechanisms of resistance to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in human medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Ther* 2002;1:727–36.
- [93] Usarek E, Kazmierczak B, Bojanowski K, Baranczyk-Kuzma A. Expression of glutathione S-transferase isoenzymes in human gliomas. *Pol Merkur Lekarski* 2005;18:676–9.
- [94] Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, et al. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:10.
- [95] Shank RP, Bennett GS, Freytag SO, Campbell GL. Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res* 1985;329:364–7.
- [96] Gamberino WC, Berkich DA, Lynch CJ, Xu B, LaNoue KF. Role of pyruvate carboxylase in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1997;69:2312–25.
- [97] Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Mates JM, et al. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:8674–9.
- [98] Cataldo AM, Broadwell RD. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol* 1986;15:511–24.
- [99] Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2011;21:67–72.
- [100] Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouyssegur J, Mazure NM. Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival. *Front Oncol* 2012;2:18.
- [101] Atkins RJ, Dimou J, Paradiso L, Morokoff AP, Kaye AH, Drummond KJ, et al. Regulation of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3beta) by the Akt pathway in gliomas. *J Clin Neurosci* 2012;19:1558–63.
- [102] Favaro E, Bensaad K, Chong MG, Tennant DA, Ferguson DJ, Snell C, et al. Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. *Cell Metab* 2012;16:751–64.
- [103] Rosati A, Marconi S, Pollo B, Tomassini A, Lovato L, Maderna E, et al. Epilepsy in glioblastoma multiforme: correlation with glutamine synthetase levels. *J Neurooncol* 2009;93:319–24.
- [104] Akimoto J. Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in normal human brain and intracranial tumors. *No To Shinkei* 1993;45:362–8.
- [105] Boza JJ, Moennoz D, Bournot CE, Blum S, Zbinden I, Finot PA, et al. Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. *Eur J Nutr* 2000;39:38–46.
- [106] Lieth E, LaNoue KF, Berkich DA, Xu B, Ratz M, Taylor C, et al. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. *J Neurochem* 2001;76:1712–23.
- [107] Babu R, Eaton S, Drake DP, Spitz L, Pierro A. Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. *J Pediatr Surg* 2001;36:282–6.

Annexe 2

Bentaib A, De Tullio P, Chneiweiss H, Hermans E, Junier MP,
Leprince P.

Data in support of metabolic reprogramming in transformed mouse
cortical astrocytes: A proteomic study

Data in Brief, Volume 2, March 2015, Pages 1–5



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib



Data Article

Data in support of metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: A proteomic study



Azeddine Bentaib^a, Pascal De Tullio^b, Hervé Chneiweiss^{c,1},
Emmanuel Hermans^d, Marie-Pierre Junier^{c,1},
Pierre Leprince^{a,*}

^a GIGA-Neuroscience, University of Liège, Liège, Belgium

^b Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmacy, University of Liège, Liège, Belgium

^c Glial Plasticity and Cerebral Tumors, UMR8246 CNRS/U1130 Inserm/ UMCR18, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

^d Institute of Neurosciences, Group of Neuropharmacology, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2014

Accepted 25 September 2014

Available online 7 November 2014

ABSTRACT

2D-DIGE analysis coupled with mass spectrometry is a global, without a priori, comparative proteomic approach particularly suited to identify and quantify enzymes isoforms and structural proteins, thus making it an efficient tool for the characterization of the changes in cell phenotypes that occur in physiological and pathological conditions. In this data article in support of the research article entitled “Metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: a proteomic study” [1] we illustrate the changes in protein profile that occur during the metabolic reprogramming undergone by cultured mouse astrocytes in a model of in-vitro cancerous transformation [2].

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.019>

* Correspondence to: GIGA-Neuroscience, University of Liège, CHU B36, 1 Av de l'hôpital, B4000 Liège, Belgium.

E-mail address: pleprince@ulg.ac.be (P. Leprince).

¹ These two authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2014.09.004>

2352-3409/© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Specifications table

| Subject area | Biology |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| More specific subject area | Cancer biology, Neurobiology |
| Type of data | Table, figures |
| How data was acquired | Fluorescence scanning of bi-dimensional electrophoretic separations of pre-labeled protein samples, using a Typhoon 9400 scanner. Mass spectrometry of peptides generated from proteins in 2D gel plugs, using an UltraFlex II spectrometer (Brüker Daltonics). |
| Data format | Analyzed using DeCyder 7.0 program |
| Experimental factors | Proteins extracted from treated and control cultures in a detergent and urea containing buffer, then labeled with CyDyes. |
| Experimental features | 2D electrophoresis (1st dimension pH 3–10 gradient; 2nd dimension 12.5% PAGE). Spot picking with EtanDalt Spotpicker. Trypsin digestion of proteins and MALDI-TOF/TOF analysis of the peptides. |
| Data source location | N/A |
| Data accessibility | Data is provided in Supplementary materials directly with this article. |

Value of the data

- Quantitative proteomics study exploring the changes in cellular protein abundance that result from metabolic reprogramming following astrocyte transformation.
- Multiple changes occur with similar amplitude for enzymes catalyzing successive steps in canonical metabolic pathways.
- Illustration of the power of 2D-DIGE to reveal (and quantify) changes in abundance of multiple isoforms of enzymes and cellular proteins.

1. Data, experimental design, materials and methods

Using the 2D-DIGE approach we have obtained relevant information on the changes in abundance of most enzymes implicated in major canonical metabolic pathways [1]. [Supplementary Table 1](#) lists all the identified proteins whose abundance differs by at least 1.5-fold ($p < 0.05$, student t -test) between normal astrocytes (NA) and transformed astrocytes (TA).

Our results suggest that transformation causes major losses of astrocyte-specific proteins and functions and the acquisition of metabolic adaptations that favor intermediate metabolites production for increased macromolecule biosynthesis. We also observe a loss of some enzymes implicated in the oxidative stress defense. This is illustrated in [Supplementary materials](#) showing zoomed-in 2D gels regions where the spots containing the proteins/enzymes that underwent these changes (e.g. Pyruvate kinase, Lactate dehydrogenase, Glutamate dehydrogenase, Glutamine synthetase, Transaldolase, Peroxiredoxin 1 and 6, Glutathione S-transferase Mu1...) are visible, together with a graphical representation of the quantitative data.

1.1. Cell culture preparation

Cultures of mouse normal astrocytes were prepared from cortices of 1-to-2-day-old C57Bl6/J mice according to protocols described by Sharif in 2007 [3] and Prevot in 2005 [4] with slight adaptations.

Briefly, cultures were established in MEM medium (Gibco, Life-technologies, UK) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Lonza, BioWhittaker[®], Belgium). Medium was changed every 2 days following washes with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). When confluence was reached, cultures were shaken overnight (250 rpm), trypsinized and seeded in 8 cm dishes at a density of 50,000 cell/cm². When confluence was reached again, the cells were maintained in serum-free MEM medium for 48 h, rinsed twice in PBS, and either extracted for protein sample preparation or frozen until further use. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes accounted for 91–96% of the cells in the NA cultures, the remaining 4–9% of cells being CD11b receptor-immunoreactive microglia [3].

The transformed astrocytes are obtained from normal mouse astrocytes that had undergone a treatment with TGF alpha allowing them to dedifferentiate into “neural progenitor-like cells” followed by gamma irradiation causing their *in vitro* transformation [2]. Transformed astrocytes are cultured in medium composed of a mixture of DMEM and F12 medium (Invitrogen, France), containing 0.6% glucose, 2 mM glutamine, 13 mM sodium bicarbonate, 5 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer, 5 IU/ml penicillin and 5 µg/ml streptomycin, and the B27 complement (Gibco, ref 12587-010). This medium was renewed once a week. Due to the selection process and growth conditions, all the cells generated from the irradiated cultures were transformed astrocytes.

1.2. Sample preparation for comparative proteomic studies

NA and TA were collected in lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 30 mM Tris, pH 8.5 (all from GE Healthcare) and 2% (w/v) ASB-14 (Sigma)) and sonicated for 10 min. After removal of the insoluble material by centrifugation (20,000g), each sample was precipitated using the 2D Clean-up kit (GE Healthcare) in order to remove salts and low molecular weight contaminants that interfere with CyDye-labeling and protein electrophoresis. Protein pellets were resuspended in adequate volume of lysis buffer and the pH was adjusted to 8.5 with 100 mM NaOH for efficient CyDye labeling.

Protein concentration was evaluated with the RC/DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories).

1.3. 2D-DIGE

2D-DIGE comparative proteomic analysis was performed using a set of 4 independent cultures in each experimental condition (NA and TA).

For analytical gels, 25 µg of each biological replicate were labeled separately with 200 pmol of CyDye (Cy3, Cy5; GE Healthcare) with dye-swapping to minimize dye-specific labeling effect, vortexed, and incubated 30 min in the dark. At the same time, a pool of equal amounts of proteins from all the biological replicates was labeled with Cy2 for use as an internal standard. After 30 min in the dark, the reaction was stopped with 10 mM lysine. Multiplexing was achieved by pooling 25 µg of Cy3- and Cy5-labeled samples together with 25 µg of Cy2-labeled internal standard, used for matching and normalization between gels, and the volume of the combined labeled samples was adjusted to 450 µL with standard rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% w/v ASB 14, 25 mM DTT, and 0.6% v/v pH 3–10 NL IPG buffer (GE Healthcare)). The mixed CyDye-labeled samples were used to rehydrate 24 cm IPG strips (pH 3–10 NL, GE Healthcare) for 12 h at 20 °C. Isoelectric focusing (IEF) was carried out at 500 V for 1 h, followed by two successive 3 h gradients (1st gradient, 500–1000 V, 2nd gradient 1000–8000 V), and constant setting at 8000 V for 70 kWh at 20 °C. The maximum current setting was 50 mA per strip in an IPGphor isoelectric focusing unit (GE Healthcare).

Prior to second dimension separation, the IPG strips were incubated 15 min at room temperature (RT) in equilibration buffer (30% glycerol (v/v), 1.6% SDS (w/v), 6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8) containing 1% DTT and then for 15 min in the same solution containing 5% iodoacetamide. They were then sealed with 0.5% agarose in SDS running buffer, and placed on top of 12.5% w/v polyacrylamide gels. The second dimension electrophoresis was performed overnight at 30 °C in an Ettan Dalt-6 system (GE Healthcare) at a 50 V constant voltage. Each gel was finally scanned with the Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare) at the emission wavelengths corresponding to each CyDye, namely 520 nm (Cy2), 580 nm (Cy3) and 670 nm (Cy5).

1.4. Image analysis

Images ($n=4$ for each experimental condition) were analyzed with the DeCyder 7.0 software (GE Healthcare) according to the manufacturer's instruction. In brief, co-detection and quantification of the three CyDye-labeled forms of each spot was performed using the Differential In-gel Analysis (DIA) module, allowing the calculation of ratios between samples and internal standard abundances for each spot. Matching of spots across all gels and correction of inter-gel variability through normalization of the Cy2 internal standard spot maps present in each gel was realized by the Biological Variance Analysis (BVA) module. Protein spots that showed a statistically significant Student's t -test ($p < 0.05$) for an average spot abundance change of at least 1.5 were subjected to identification by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.

1.5. In-gel digestion and mass spectrometry (MS) analysis

Preparative gels that contained 200–300 μg of either NA or TA protein samples and 25 μg of the internal standard were run in parallel and matched to the analytical gels master image to generate picking lists of differentially expressed spots used to drive automated gel plug collection by the Ettan Spotpicker (GE Healthcare). The proteins in gel pieces were subsequently in gel digested as described by Mathy and colleagues [5], according to Shevchenko and colleagues protocol [6]. The gel pieces were sequentially washed 3 times with 25 mM NH_4HCO_3 and 100% acetonitrile (ACN) to remove excess of detergent and buffer. After the last dehydration in ACN, piece of gels were rehydrated for 1 h at 4 °C with 2 μL of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsin proteomic grade solution (Roche) diluted in 25 mM NH_4HCO_3 in order to ensure sufficient trypsin diffusion and to prevent autocatalysis. Finally the temperature was increased to 37 °C for an overnight digestion.

Peptides were extracted by adding 5 μL of a 1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v)/30% ACN (v/v) solution and vortexing for 30 min. 2 μL of the resulting extract were deposited on a 384–600 MTP Anchorchip MALDI target plate (Brüker Daltonic) previously spotted with a 30 mg/mL (w/v) of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix solution (Sigma) diluted in acetone. After drop drying, each spot was desalted with cold 10 mM ammonium phosphate solution. Samples were analyzed with an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Brüker Daltonics) by MS fingerprint (spectra acquisition mass range: 70–4240 m/z). Peaks with the highest intensities obtained in TOF-MS mode were subsequently analyzed by LIFT MS/MS (mass range 40–1100). Proteins identifications were carried out with the biotools software (Brüker) using the Mascot search engine. The generated peak lists were used for mascot searching (www.matrixscience.com) using the following parameters for both PMF and MS/MS experiments: trypsin digestion, Cystein carbamidomethylation and Methionine oxidation as fixed and variable modifications respectively; mass values determined in monoisotopic mode with PMF experiments, the peptide charge state was set as +1 and the mass range was 70–4240 m/z . For MS/MS experiments, the fragment mass tolerance was ± 0.3 Da and the mass range was 0–1100 m/z . Searching was done against three version of UniprotKB/SwissProt database. Database A corresponds to version 57.1 (462764 sequences; 163773385 residues) released on April 2009 and database B corresponds to version 57.7 (497293 sequences; 175274722 residues) released on September 2009, database C corresponds to version 2014_05 (545388 sequences; 193948795 residues) released on May 2014.

1.6. Immunocytofluorescence

One thousand NA and TA cells were seeded as 50 μL drops on glass coverslips coated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polyornithine (Sigma) in MEM medium containing 10% FCS for 48 h. The cells were maintained in serum-free MEM medium for 24 h, rinsed twice in PBS, prior to be fixed with 4% paraformaldehyde.

The fixed cultures were washed 3 times in TBS buffer, permeabilized in 1% Triton-X100 (v/v) for 15 min and washed 3 times in TBS buffer. Non-specific binding was blocked using TBST containing non-fat milk powder (30 mg/mL) for 45 min. The cells were then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies mixture diluted in blocking buffer: Anti-PK (Chemicon international,

Ref: AB1235, Produced in goat,1/500), and Anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) (Dako, Ref: Z0334, produced in rabbit, 1/500). After 3 TBST washes, cells were incubated with FITC or RRX conjugated antibodies (Jackson Immunoresearch, Ref: 711-095-152 and 805-295-180, dilution 1:2500) for 1 h at RT and in the dark. Nucleus staining was achieved with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The preparations were examined using Olympus confocal (Leica).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2014.09.004>.

References

- [1] A. Bentaib, P. de Tullio, H. Chneiweiss, E. Hermans, M.P. Junier, P. Leprince, Metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: a proteomic study, *J. Proteomics* 113 (2015) 292–314.
- [2] C. Dufour, J. Cadusseau, P. Varlet, A.L. Surena, G.P. de Faria, A. Dias-Morais, N. Auger, N. Leonard, E. Daudigeos, C. Dantas-Barbosa, et al., Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation, *Stem Cells* 27 (10) (2009) 2373–2382.
- [3] A. Sharif, P. Legendre, V. Prevot, C. Allet, L. Romao, J.M. Studler, H. Chneiweiss, M.P. Junier, Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells, *Oncogene* 26 (19) (2007) 2695–2706.
- [4] V. Prevot, A. Lomniczi, G. Corfas, S.R. Ojeda, erbB-1 and erbB-4 receptors act in concert to facilitate female sexual development and mature reproductive function, *Endocrinology* 146 (3) (2005) 1465–1472.
- [5] G. Mathy, P. Cardol, M. Dinant, A. Blomme, S. Gerin, B. Ghysels, M. Cloes, E. DePauw, P. Leprince, C. Remacle, et al., Proteomic and functional characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1, *J. Proteome Res.* 9 (6) (2010) 2825–2838.
- [6] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, G. Neubauer, A. Shevchenko, P. Mortensen, M. Mann, A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone, *Biochem. Soc. Trans.* 24 (3) (1996) 893–896.

Table 1.

List of identified proteins whose abundance differs by at least 1.5-fold ($p < 0.05$, student t-test) between normal astrocytes (NA) and transformed astrocytes (TA). Proteins have been classified into biological processes as defined in the Uniprot Database Keywords list. Spot ID is the unique identifier of each protein spot provided in the Decyder analysis. Protein ID is the item Entry name in the UniprotKB database. Average Ratio is the fold higher abundance in TA (positive values in green) or in NA (negative values in red). p-value is the Student t-test result for the comparison of abundance. Matched/ Searched is the fraction of searched peptide masses that matched theoretical masses for the listed protein by PMF. Mowse score is the Mascot probability based scoring that the results are significant, either for PMF identification (threshold value = 59) or for MS/MS identification (threshold value = 42). % sequence coverage is the percent of the protein sequence that has been sequenced in the MS analysis. Number of matches is the number of non-overlapping identified peptides that resulted from the MS/MS search. Database: three version of SwissProt database were used, A corresponds to version 57.1 (462764 sequences; 163773385 residues, taxonomy: *Mus musculus*) released on April 2009, database B corresponds to version 57.7 (497293 sequences; 175274722 residues, taxonomy: *Mus musculus*) released on September 2009, database C corresponds to version 2014_05 (545388 sequences; 193948795 residues, taxonomy: Mammalia) released on May 2014.

Figure 1. Combined fluorescent image of a bidimensional separation of normal astrocytes (NA) (labeled with Cy3 and seen as green spots) and transformed astrocytes (TA) (labeled with Cy5 and seen as red spots) proteins. Twenty-five μg of each labeled extract were mixed together and subjected to bidimensional electrophoresis (focusing in a pH 3-10 range as first dimension and 12.5 % acrylamide SDS-PAGE (theoretical MW range : 12 – 180 kDa) as second dimension). The gel was then immediately scanned at the corresponding settings for Cy3 and Cy5 in a Typhoon 9400 laser-scanner. Contrast and luminosity have been adapted for appearance improvement.

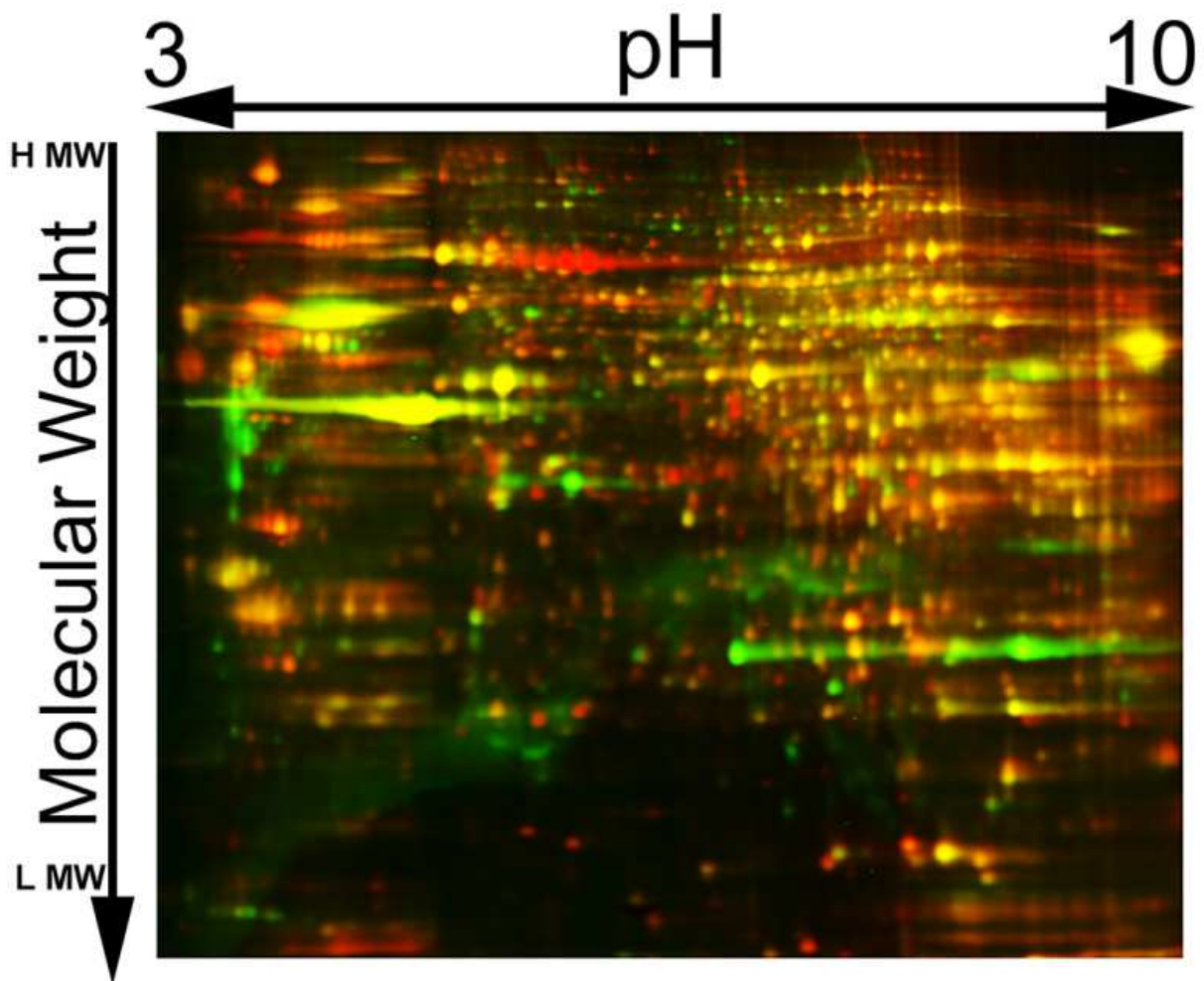


Figure 2.

A) Graphical representations of the results of the 2D DIGE analysis of proteomes of NA and TA

B) Percentage of protein identification by mass spectrometry

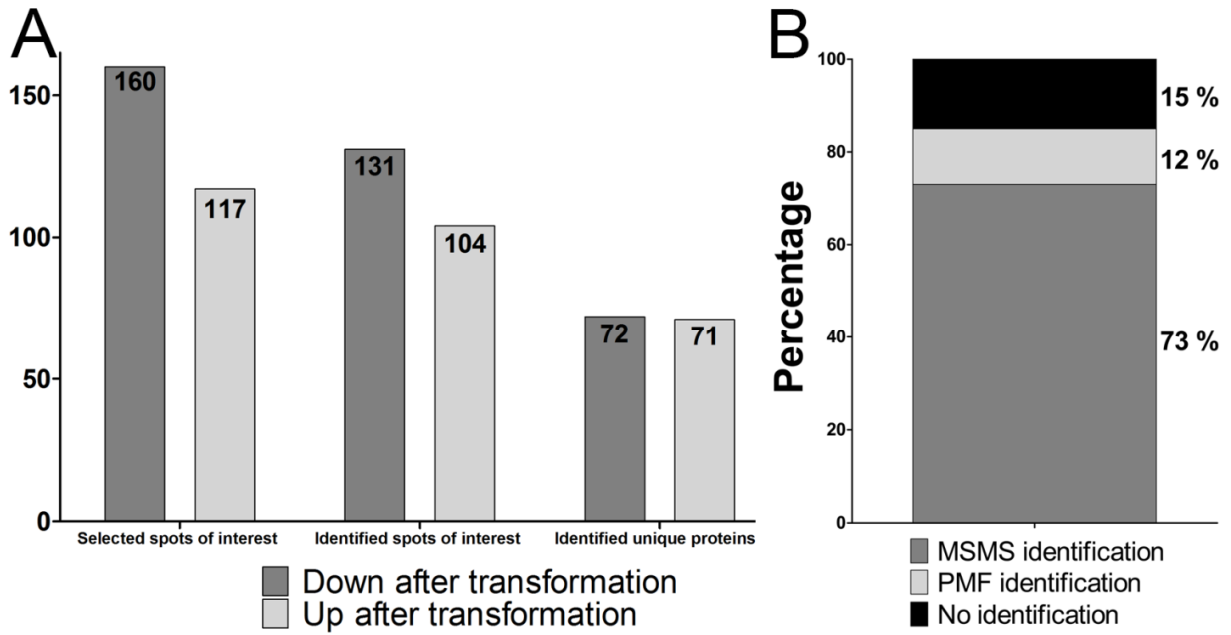


Figure 3.

Pyruvate kinase and GFAP immunostaining of NA and TA. The cells were immunostained with anti-PK (green) and anti-GFAP (red) antibodies. Nuclear staining (DAPI) is shown in blue. Scale bar represents 50 μm for all panels.

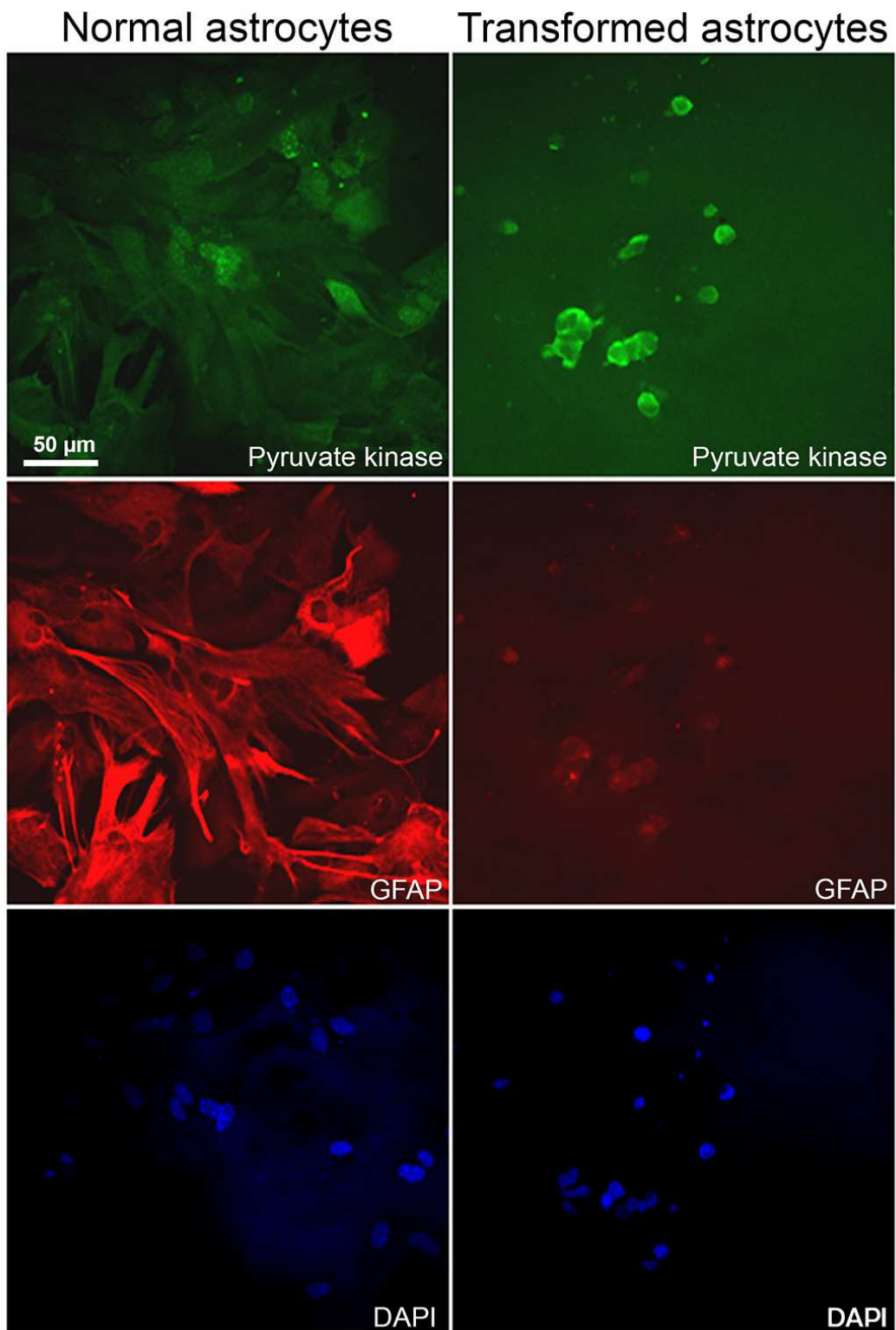


Figure 4.

Changes in the expression of alpha-enolase (ENO A) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of three spots corresponding to ENO A that are more abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of Eno A spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

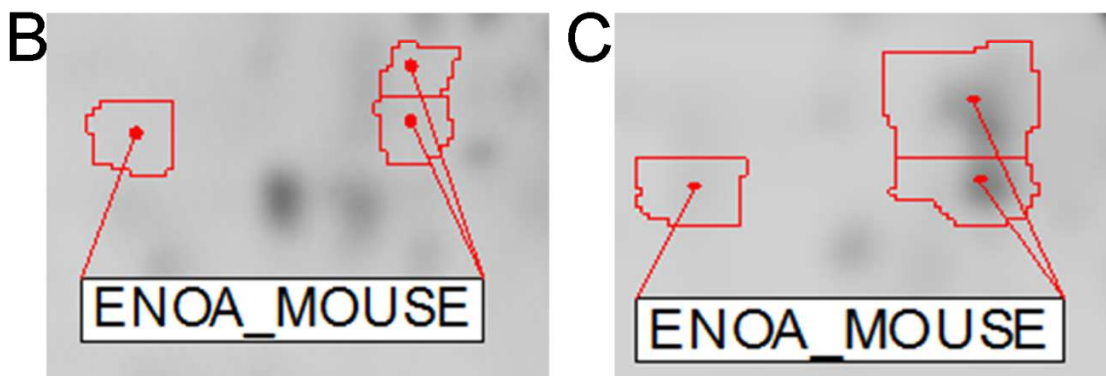
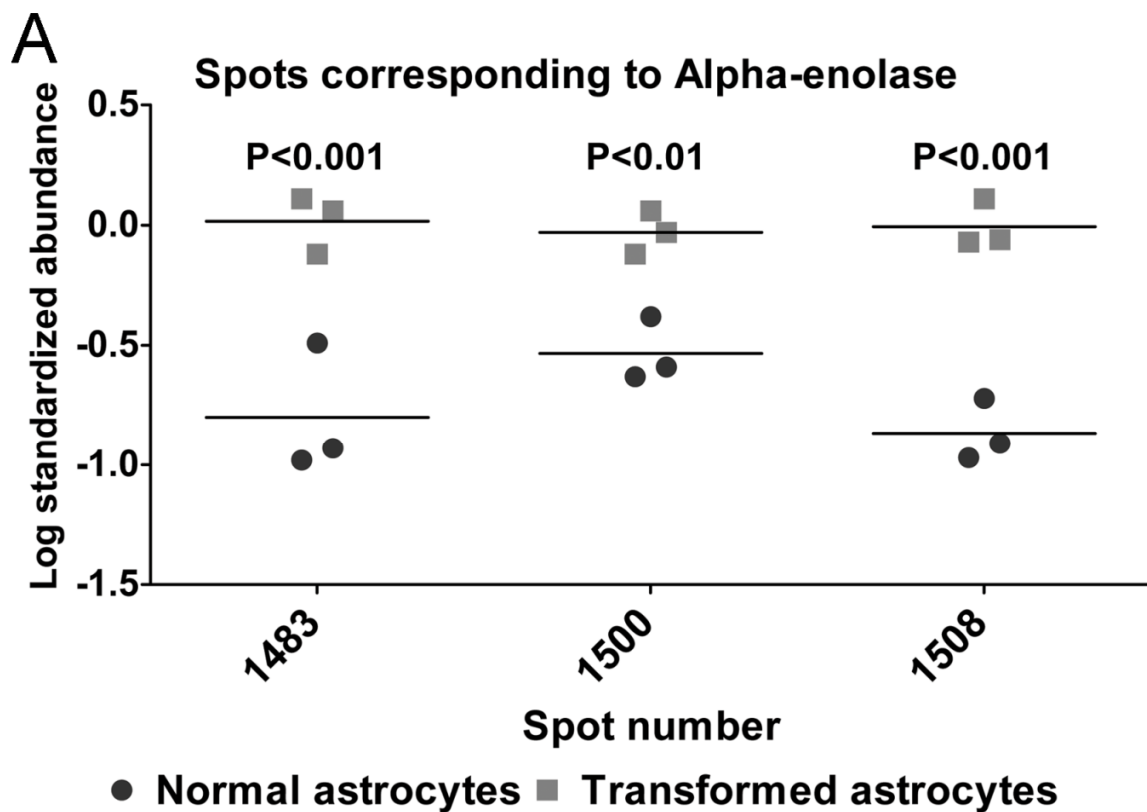


Figure 5.

Changes in the expression of pyruvate kinase M2 isoform (PKM 2) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of seven spots corresponding to PKM 2 that are more abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of PKM 2 spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

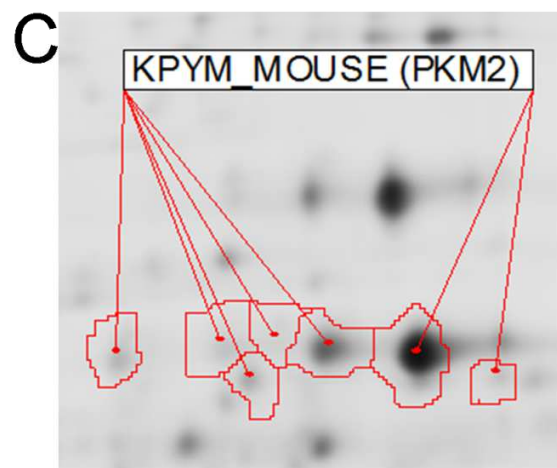
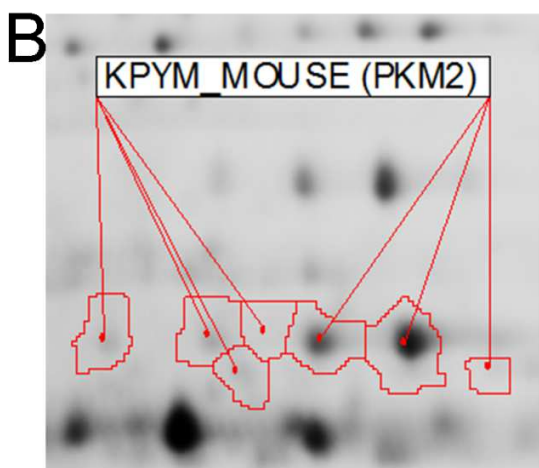
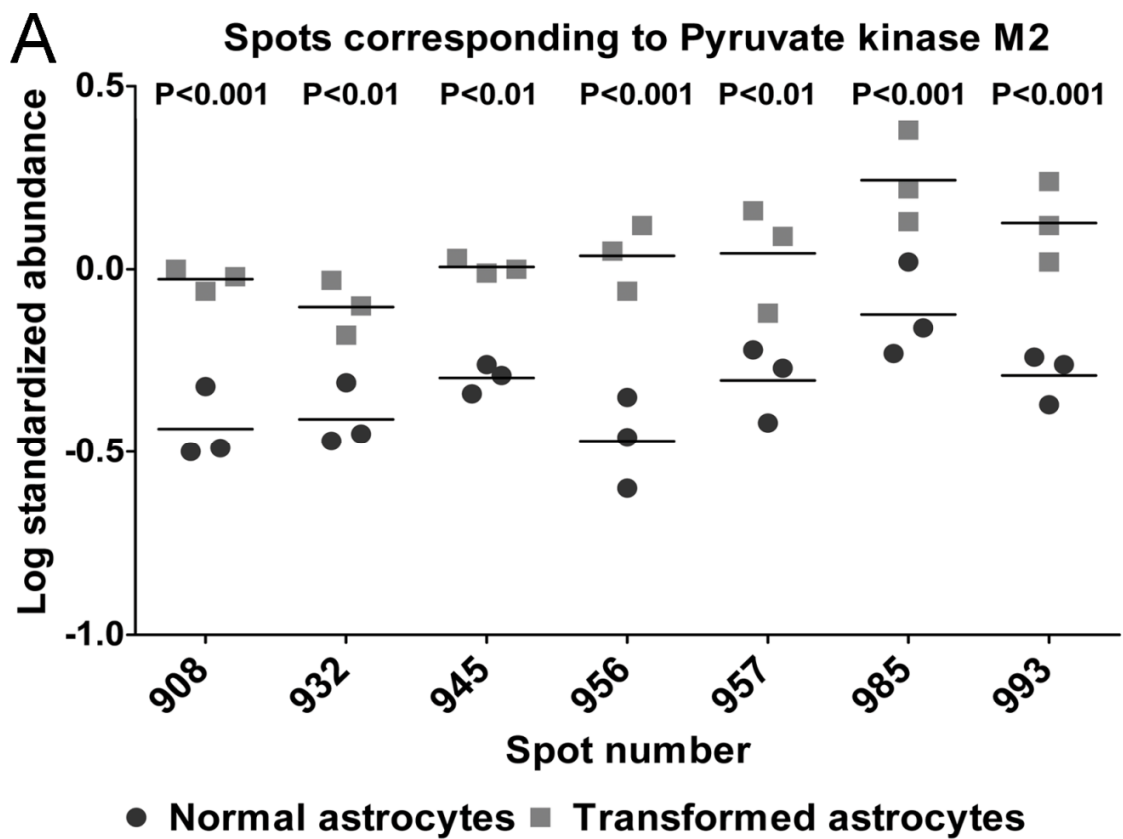


Figure 6.

Changes in the expression of transaldolase (TALDO) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of the spot corresponding to TALDO that is more abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of TALDO spot in NA (B) and TA (C) protein extracts.

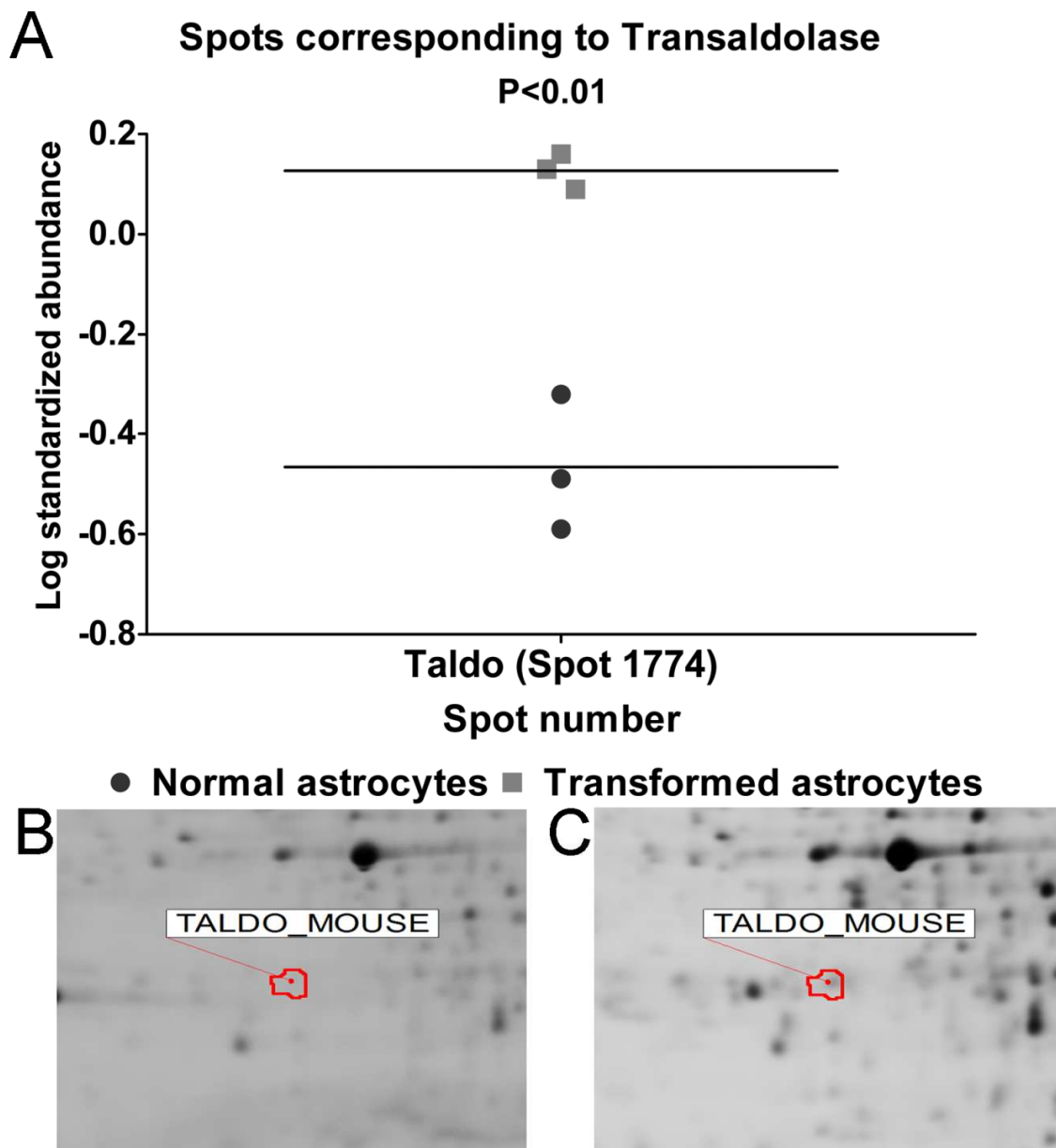


Figure 7.

Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (G3P) as an example of an enzyme identified in several spots exhibiting opposite changes in abundance:

A) Graphical representation of the Log standardized abundances of four spots corresponding to G3P (1820, 1740, 1714 and 1766) showing that spots 1820, 1714 and 1766 are more abundant in TA compared to NA, while spot 1740 shows a decrease in its relative abundance in TA.

B, C) Distribution in bidimensional gels of identified G3P spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

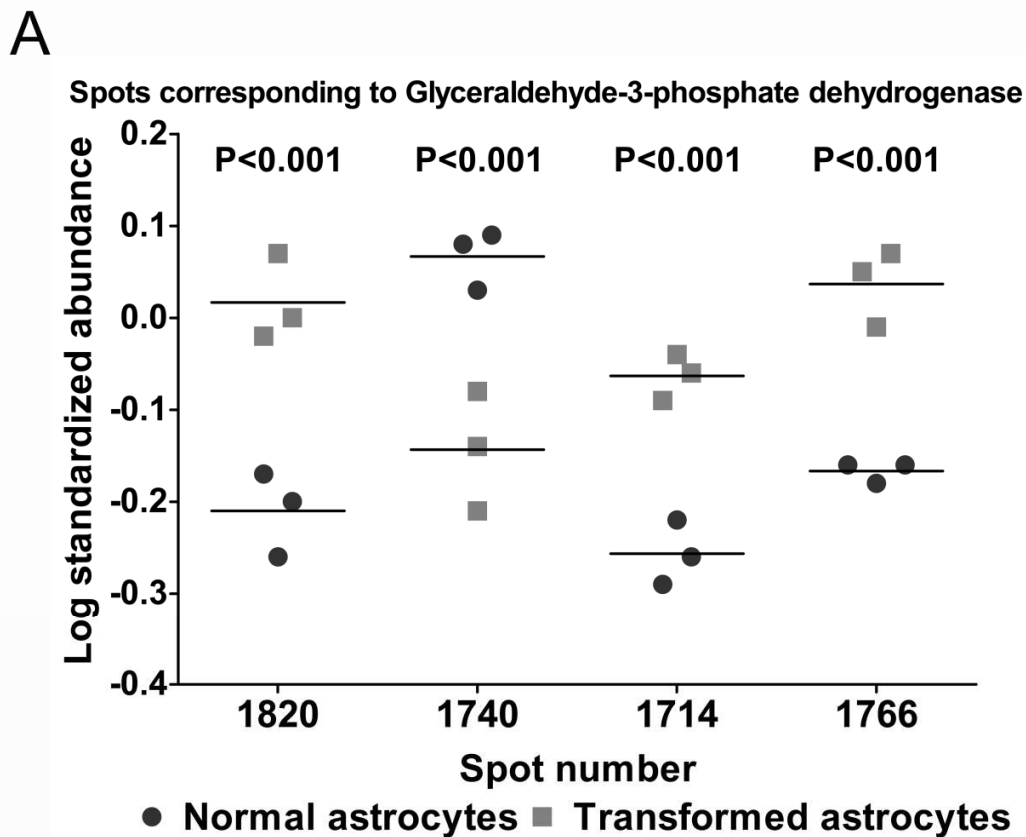


Figure 8.

Changes in the expression of cytosolic and mitochondrial isoenzymes of malate dehydrogenase (respectively MDH C and MDH M) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of four spots corresponding to MDH showing that the spot corresponding to the cytosolic isoenzyme (MDH C, 1984) is less abundant in TA compared to NA, while the spots corresponding to mitochondrial isoenzymes (MDH M, 1162, 1885 and 1889) are more abundant in TA. B, C) Distribution in bidimensional gels of MDH spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

A

Spots corresponding to Malate dehydrogenase

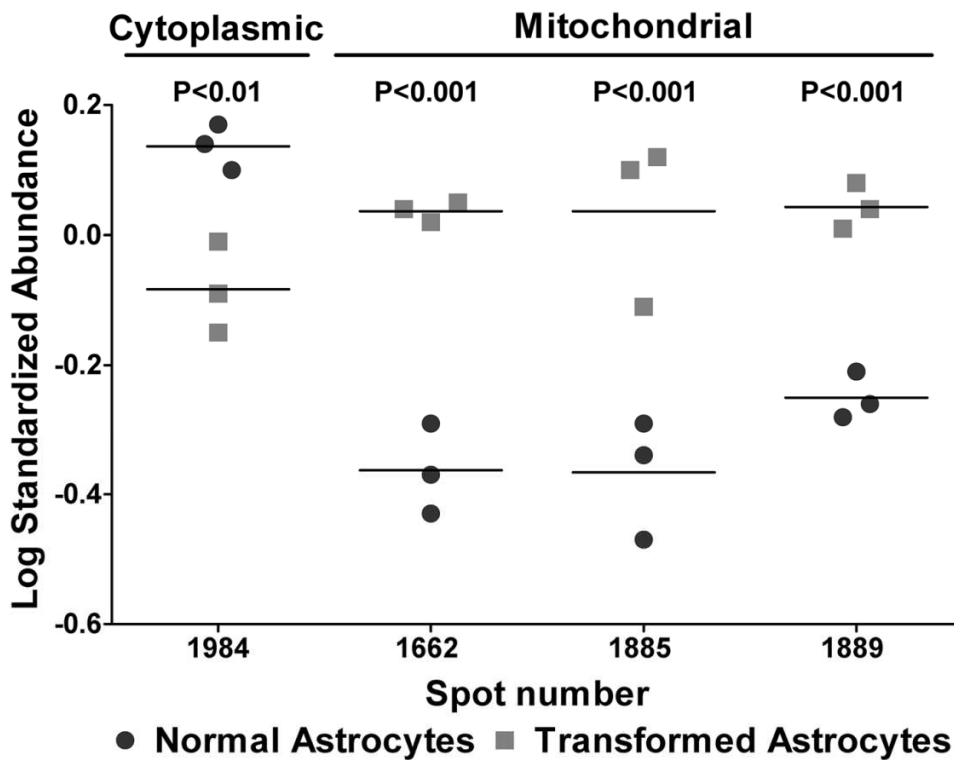
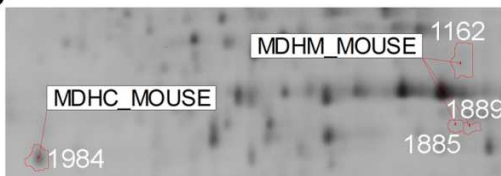
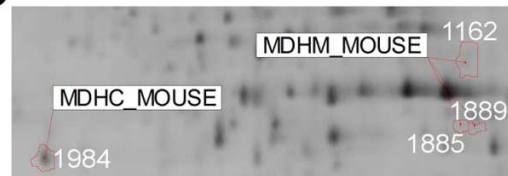
**B****C**

Figure 9.

Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes A and B distribution in NA and TA.

A) Graphical representation of the Log standardized abundances of three spots corresponding to LDH A that are more abundant in TA compared to NA,

B) Graphical representation of the Log standardized abundances of four spots corresponding to LDH B that are less abundant in TA compared to NA,

C) Distribution in bidimensional gels of identified LDH A and LDH B spots in NA and TA protein extracts.

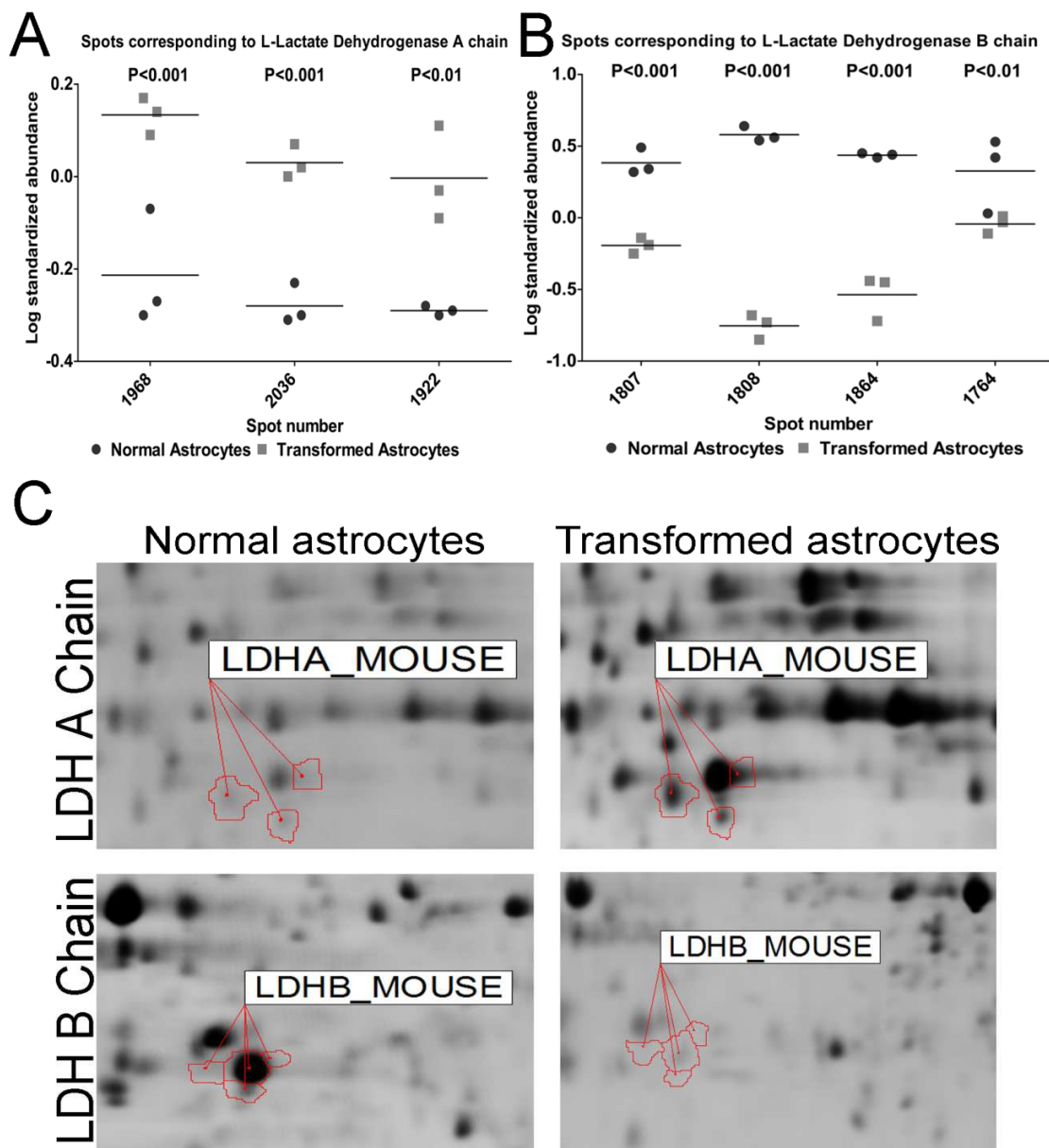


Figure 10.

Changes in the expression of mitochondrial isocitrate dehydrogenase (IDHP) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of two spots corresponding to IDHP that are less abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of IDHP spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

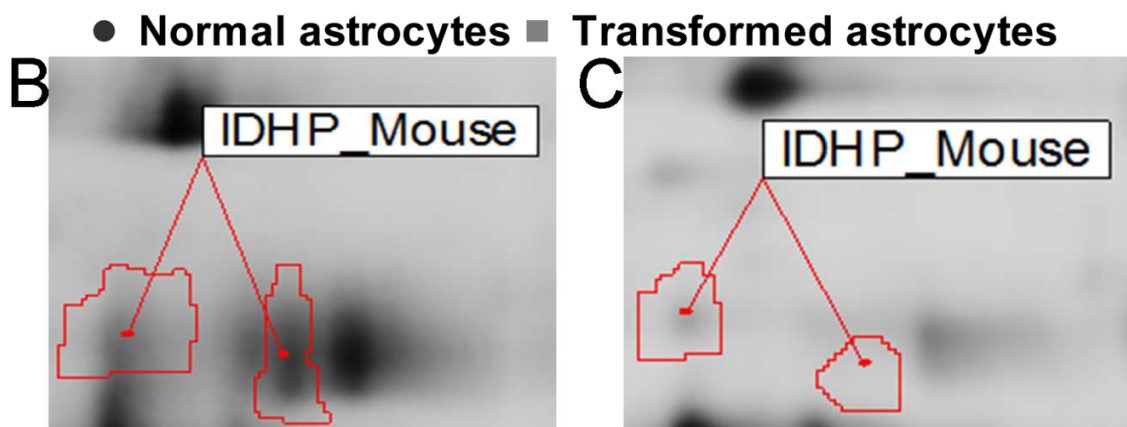
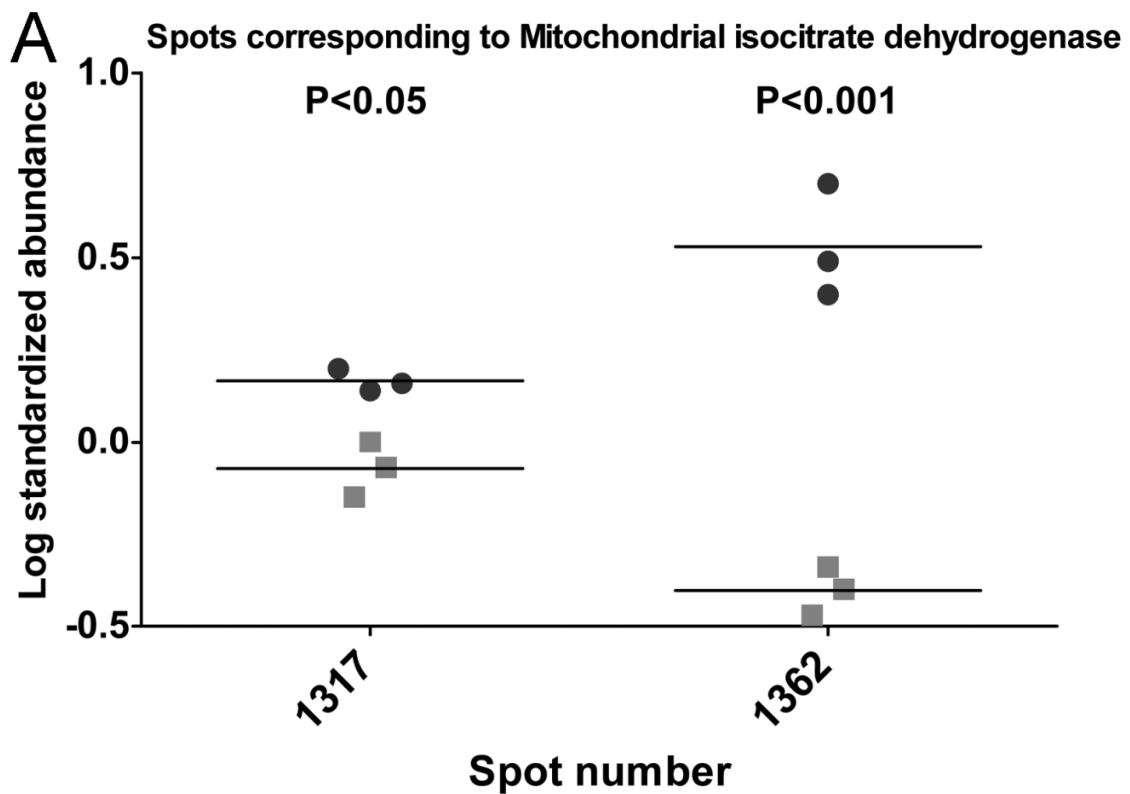


Figure 11.

Glutamate dehydrogenase (DHE 3) as an example of an enzyme identified in several spots and exhibiting opposite changes in abundance.

A) Graphical representation of the standardized abundance of six spots corresponding to DHE3 showing that spots 1168 and 1181 are more abundant in TA compared to NA, while spots 1076, 1073, 1071 and 1078 show a decrease in their relative abundance in TA.

B, C) Distribution in bidimensional gels of identified DHE3 spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

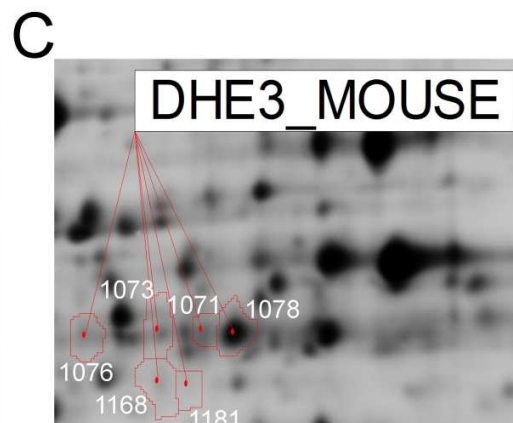
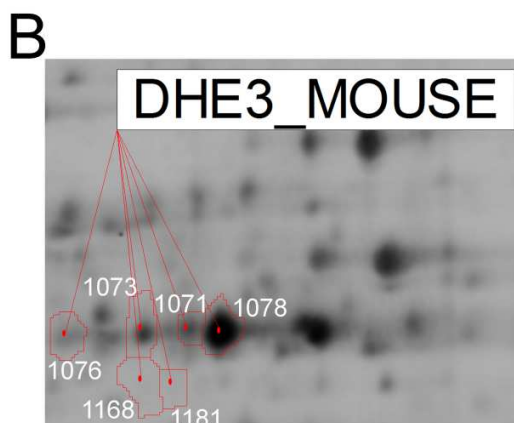
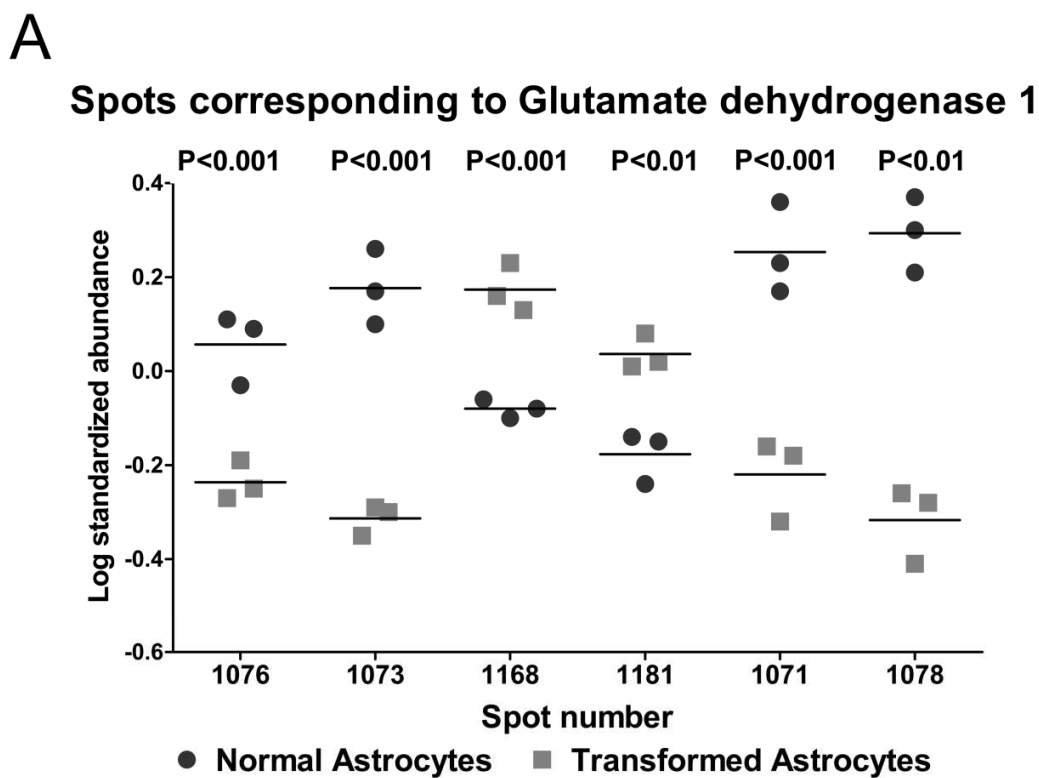


Figure 12.

Changes in the expression of glutamine synthetase (GS) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of the spot corresponding to GS that is more less in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of GS spot in NA (B) and TA (C) protein extracts.

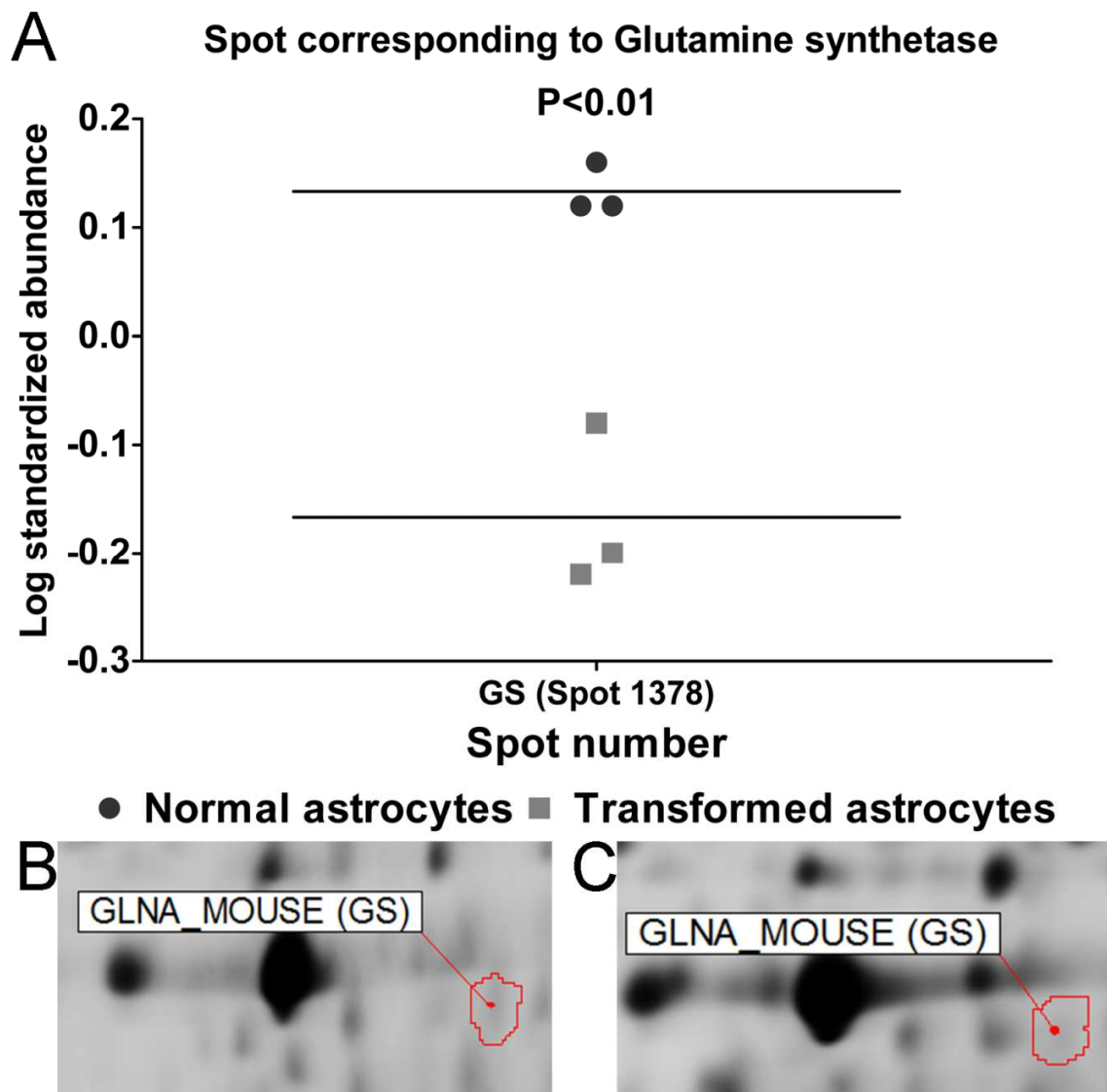
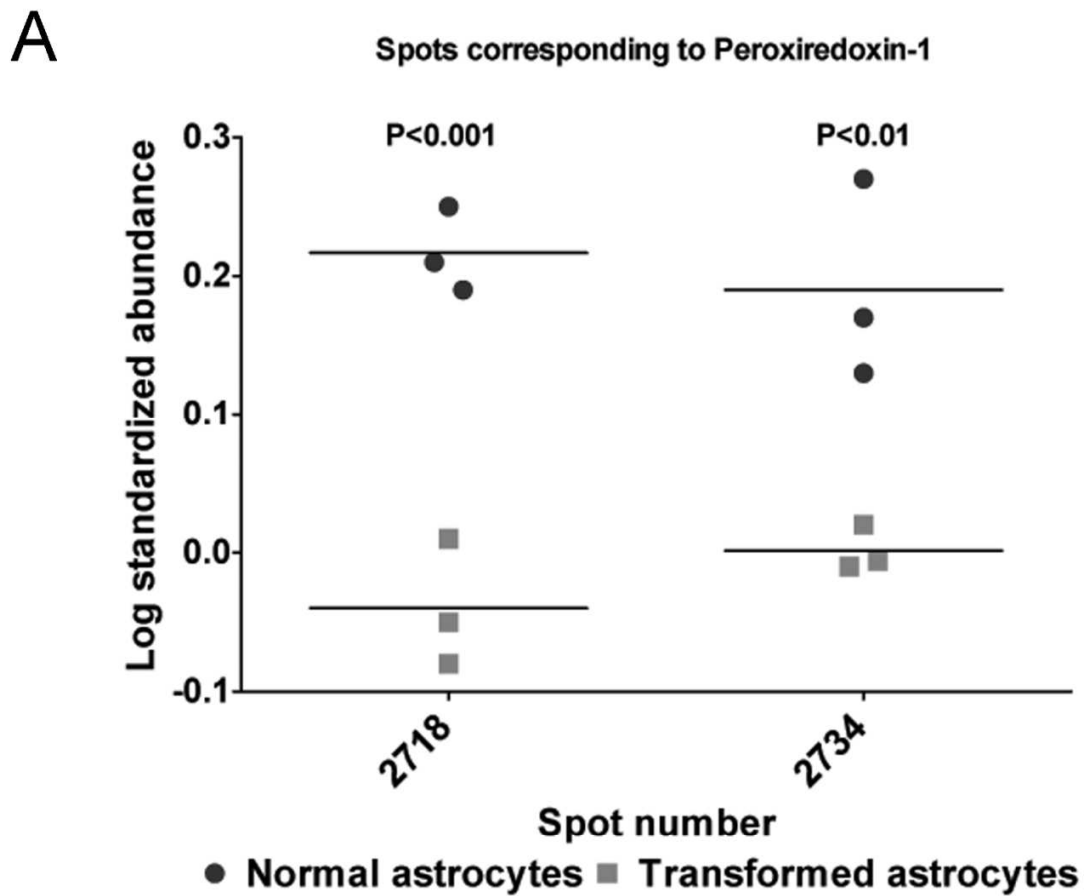


Figure 13.

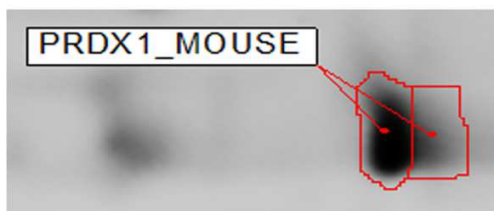
Changes in the expression of peroxiredoxin-1 (PRDX 1) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of two spots corresponding to PRDX 1 that are less abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of PRDX 1 spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.



B



C

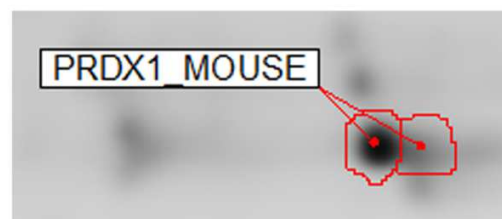


Figure 14.

Changes in the expression of peroxiredoxin-6 (PRDX6) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of six spots corresponding to PRDX6 that are less abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of PRDX6 spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

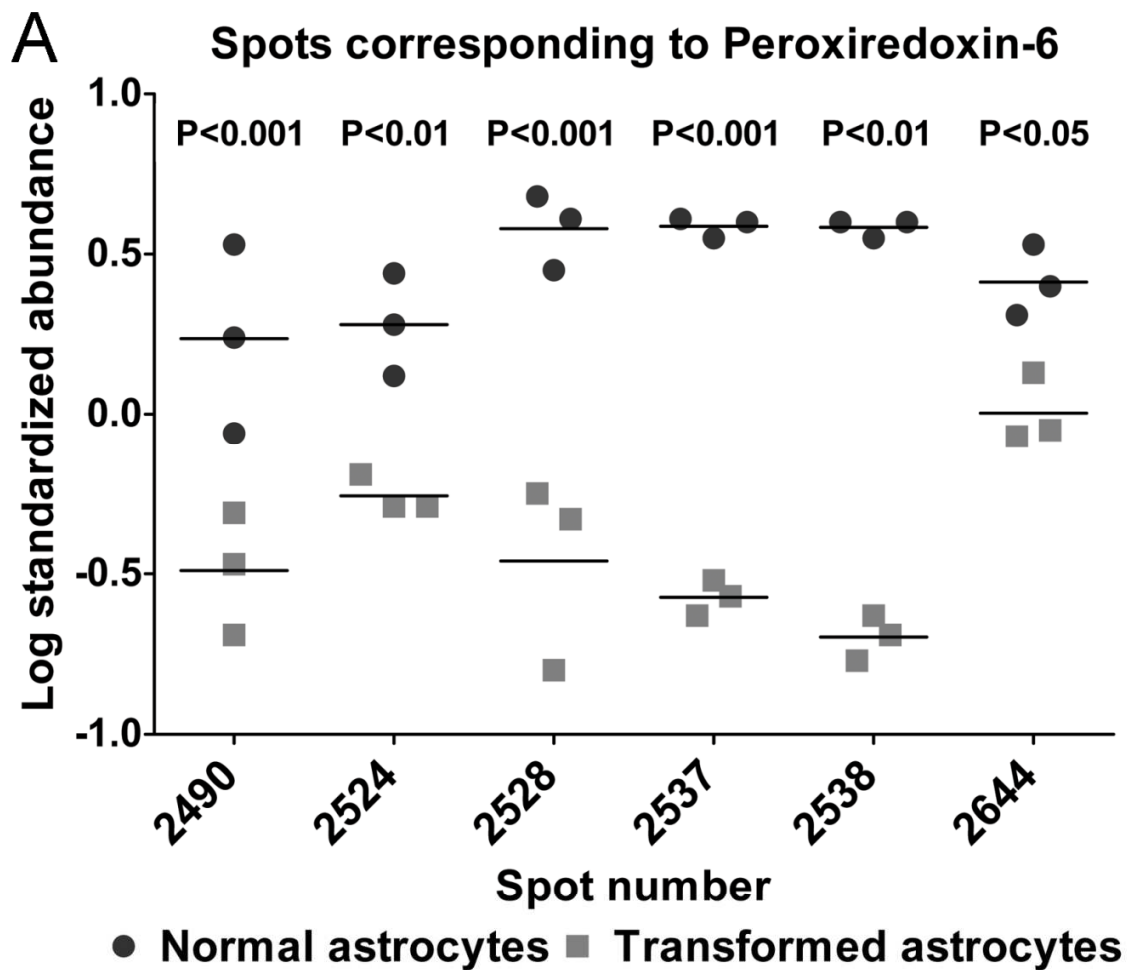
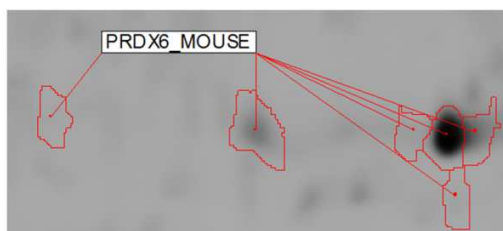
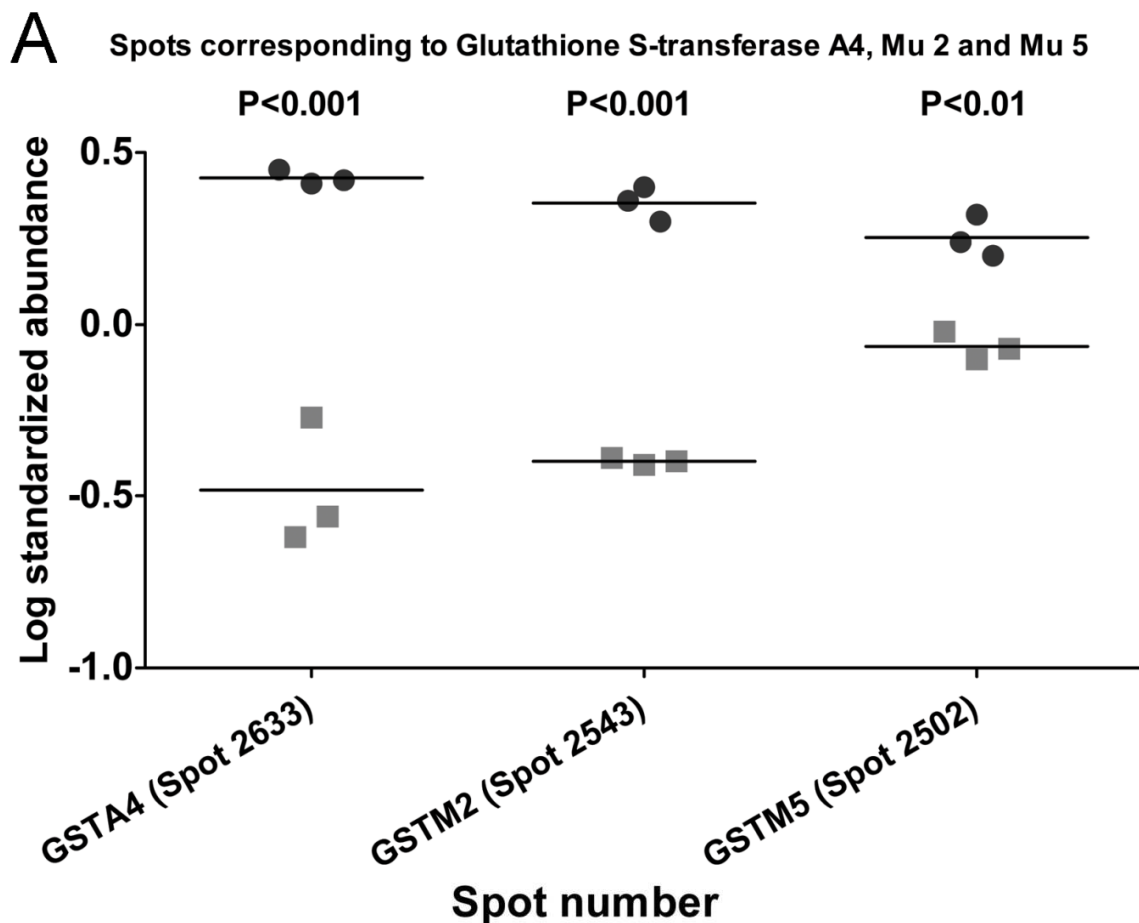
**B****C**

Figure 15.

Changes in the expression of glutathione S- transferase M2, M5, A4 (respectively GSTM2, GSTM5 and GSTA4) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of spots corresponding to GST M2, M5 and A4 that are less abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of GST M2, M5 and A4 spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.



● Normal astrocytes ■ Transformed astrocytes

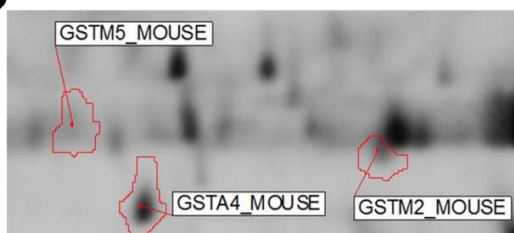
B**C**

Figure 16.

Changes in the expression of glutathione S- transferase M1 (GSTM1) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of fifteen spots corresponding to GST M1 that are less abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of GST M1 spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

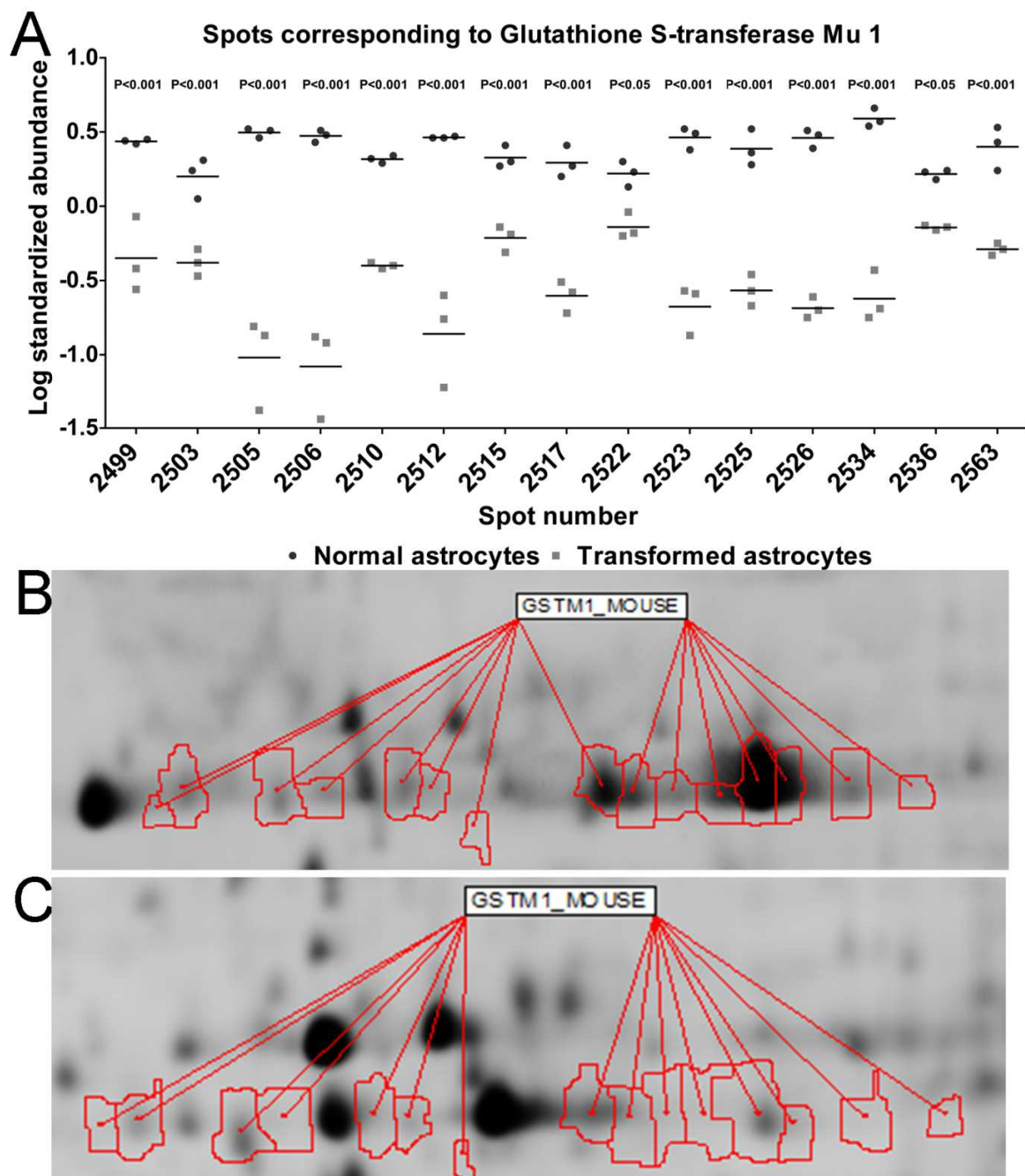
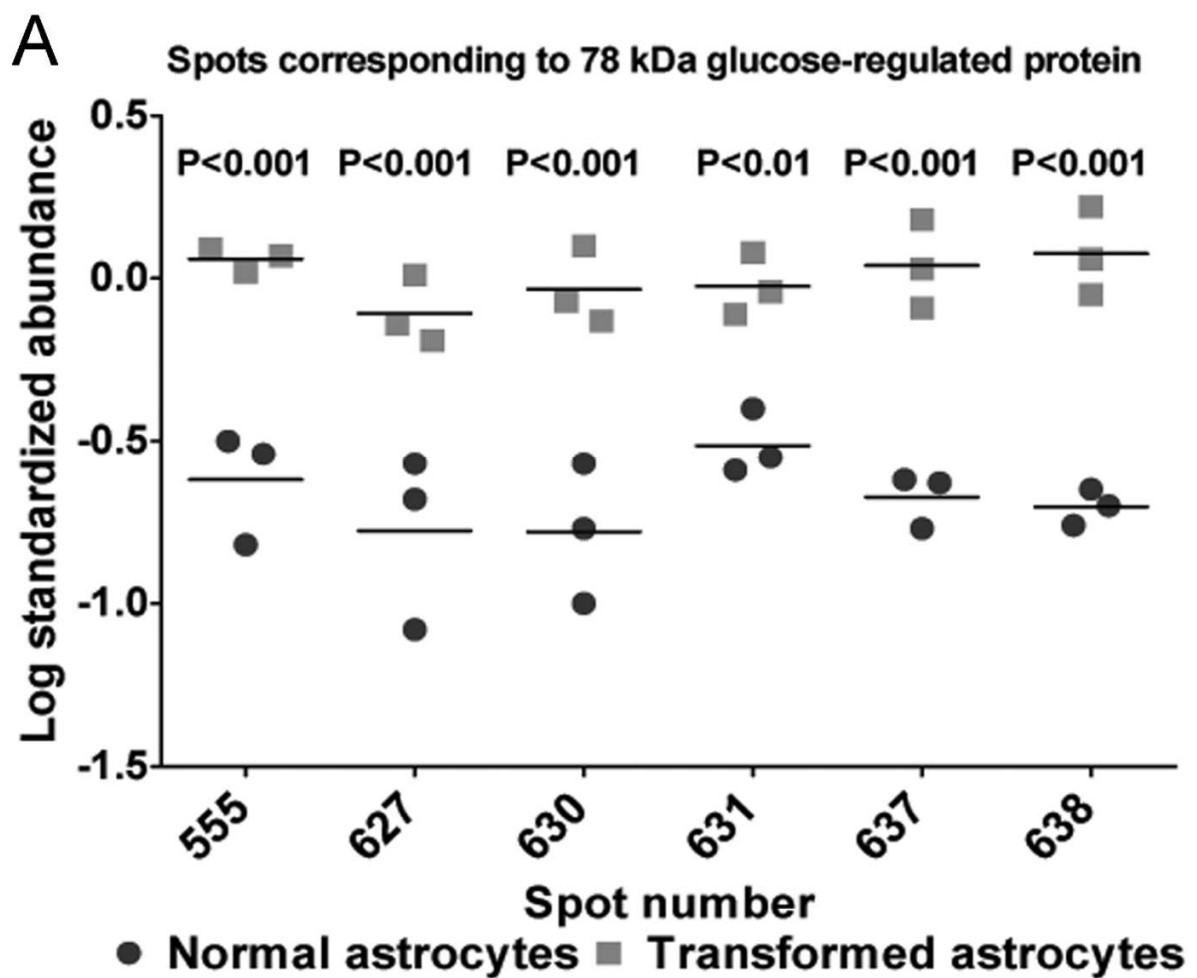
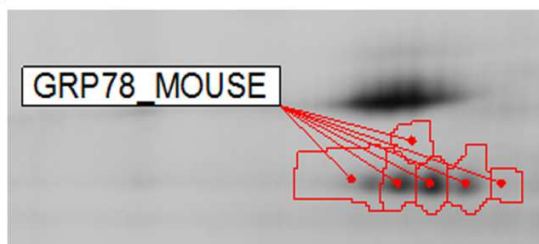
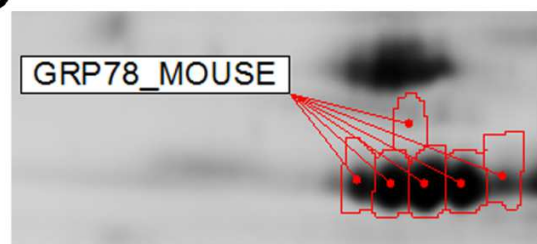


Figure 17.

Changes in the expression of 78 kDa glucose-regulated protein (GRP 78) in NA and TA.

A) Graphical representation of the standardized abundance of six spots corresponding to GRP 78 that are more abundant in TA compared to NA,

B, C) Distribution in bidimensional gels of GRP 78 spots in NA (B) and TA (C) protein extracts.

**B****C**

| Spot ID | Protein ID | Protein Name | Av. Ratio (TANA) | p-value | pl | Da | PMF | | | MSMS | | | Database |
|----------------------------------------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------|------------------|----------|-------|--------|-------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------|----------|
| | | | | | | | Matched/Searching | Prot Score | % Seq. Cov. | Prot. Score | % Seq. Cov. | Nb. Match | |
| Transcription, RNA metabolism and transport, nuclear proteins | | | | | | | | | | | | | |
| 2015 | RM22_MOUSE | 39S ribosomal protein L22: mitochondrial | -1.58 | 0.029 | 10.5 | 24018 | 64/9 | 52 | 42 | - | - | - | B |
| 3021 | CHD1_MOUSE | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 | -5.27 | 0.015 | 7.1 | 197601 | 18/66 | 51 | 13 | - | - | - | B |
| 2592 | ROA1_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | 4.22 | 0.002 | 9.7 | 34289 | 7/47 | 63 | 31 | - | - | - | B |
| 1252 | HNRPF_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | 1.77 | 0.0025 | 5.31 | 45730 | - | - | - | 64 | - | 2 | A |
| 1218 | HNRH1_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | 2.74 | 0.0016 | 5.89 | 49454 | 11/50 | 117 | 37 | 113 | 11 | 3 | A |
| 2614 | HNRH1_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | 3.61 | 0.0013 | 5.89 | 49454 | 10/45 | 89 | 23 | 119 | 6 | 2 | A |
| 854 | HNRPK_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K | 3.21 | 0.0012 | 5.39 | 51230 | 10/36 | 75 | 23 | 127 | 11 | 4 | A |
| 856 | HNRPK_MOUSE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K | 2.08 | 0.0018 | 5.39 | 51230 | 13/45 | 100 | 26 | 137 | 11 | 4 | A |
| 2486 | H12_MOUSE | Histone H1.2 | -4.23 | 0.024 | 11.5 | 21254 | 5/16 | 54 | 26 | - | - | - | B |
| 2373 | H14_MOUSE | Histone H1.4 | 2.35 | 0.017 | 11.1 | 21846 | 7/29 | 61 | 33 | - | - | - | B |
| 2687 | H2A1F_MOUSE | Histone H2A type 1-F | 6.8 | 0.012 | 11.05 | 14162 | - | - | - | 55 | 12 | 2 | A |
| 2703 | H2A1F_MOUSE | Histone H2A type 1-F | 3.17 | 0.04 | 11.05 | 14030 | - | - | - | 38 | 12 | 2 | A |
| 2422 | HXC11_MOUSE | Homeobox protein Hox-C11 | -1.85 | 0.00061 | 9.5 | 34144 | 5/20 | 52 | 19 | - | - | - | B |
| 1839 | NOP56_MOUSE | Nucleolar protein 56 | 19.4 | 0.0011 | 9.22 | 64880 | 11/55 | 67 | 24 | - | - | - | A |
| 2712 | PCIF1_MOUSE | Phosphorylated CTD-interacting factor 1 | -1.83 | 0.012 | 8.5 | 81423 | 9/53 | 63 | 15 | - | - | - | B |
| 1063 | ST18_MOUSE | Suppression of tumorigenicity protein 18 | -1.67 | 0.015 | 6 | 116275 | 12/44 | 64 | 14 | - | - | - | A |
| 2645 | UACA_MOUSE | Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats | 1.76 | 0.016 | 6.8 | 16969 | 16/37 | 80 | 13 | - | - | - | A |
| Protein synthesis, metabolism, processing, degradation | | | | | | | | | | | | | |
| 1084 | PSD12_MOUSE | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 | -1.72 | 0.0079 | 6.71 | 53243 | 14/46 | 65 | 23 | - | - | - | A |
| 1389 | RSSA_MOUSE | 40S ribosomal protein SA | -9.02 | 0.0056 | 4.8 | 32931 | 6/25 | 58 | 21 | 35 | 12 | 3 | A |
| 3044 | ARF4_MOUSE | ADP-ribosylation factor 4 | 1.95 | 0.00019 | 6.81 | 20397 | - | - | - | 41 | 7 | 2 | A |
| 1198 | SYDC_MOUSE | Aspartyl-HRNA synthetase; cytoplasmic | -1.71 | 0.029 | 6.07 | 57537 | 23/41 | 249 | 41 | 45 | 4 | 3 | A |
| 1384 | SYDC_MOUSE | Aspartyl-HRNA synthetase; cytoplasmic | -3.33 | 0.011 | 6.06 | 57117 | - | - | - | 93 | 8 | 4 | A |
| 3488 | EFTA1_MOUSE | Elongation factor 1-alpha 1 | 1.58 | 0.0046 | 9.1 | 50114 | - | - | - | 66 | 4 | 2 | A |
| 1850 | EFTD_MOUSE | Elongation factor 1-delta | 2.72 | 0.0064 | 4.91 | 31293 | 10/25 | 94 | 38 | 140 | 20 | 4 | A |
| 1724 | EIF3L_MOUSE | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I | 3.3 | 0.00086 | 5.38 | 36837 | 11/53 | 76 | 34 | 104 | 8 | 2 | A |
| 685 | SYG_MOUSE | Glycyl-HRNA synthetase | 3.55 | 0.032 | 6.24 | 8224 | 17/37 | 132 | 27 | 158 | 6 | 3 | A |
| 1902 | LARP6_MOUSE | La-related protein 6 | -4.12 | 0.0035 | 8.7 | 55067 | 7/48 | 66 | 14 | - | - | - | B |
| 1765 | LGMM_MOUSE | Legumain | 2.49 | 0.036 | 5.72 | 34818 | - | - | - | 42 | 5 | 2 | A |
| 1720 | DDAH1_MOUSE | N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 | -2.24 | 0.00089 | 5.64 | 31760 | 12/31 | 124 | 40 | 188 | 14 | 3 | A |
| 607 | TRUB2_MOUSE | Probable RNA pseudouridine synthase 2 | -4.94 | 0.00017 | 9.7 | 37069 | 6/37 | 50 | 20 | - | - | - | B |
| 2257 | PSA1_MOUSE | Proteasome subunit alpha type-1 | 2.41 | 0.00039 | 6 | 29547 | - | - | - | 122 | 12 | 3 | A |
| 2411 | PSA7_MOUSE | Proteasome subunit alpha type-7 | 1.72 | 0.013 | 8.59 | 28009 | 11/7 | 84 | 45 | 112 | 22 | 4 | A |
| 539 | PSB10_MOUSE | Proteasome subunit beta type-10 | -2.26 | 0.032 | 6.4 | 29330 | 4/13 | 53 | 17 | - | - | - | B |
| 2584 | PSB3_MOUSE | Proteasome subunit beta type-3 | 2.29 | 0.00042 | 6.15 | 22965 | 10/65 | 78 | 41 | 124 | 23 | 4 | A |
| 1499 | SPB6_MOUSE | Proteasome subunit beta type-3 | -2.34 | 0.005 | 5.53 | 42913 | 8/39 | 58 | 19 | - | - | - | A |
| 688 | SNX2_MOUSE | Sorting nexin-2 | 1.93 | 0.01 | 5.04 | 58549 | 9/38 | 63 | 20 | - | - | - | A |
| 904 | TPCQ_MOUSE | T-complex protein 1 subunit theta | 1.5 | 0.045 | 5.44 | 60088 | 14/50 | 84 | 21 | 198 | 7 | 4 | A |
| 2643 | TRPC4_MOUSE | Trafficking protein particle complex subunit 4 | -1.57 | 0.0011 | 5.83 | 24484 | 10/63 | 85 | 50 | 99 | 14 | 2 | A |
| Stress response | | | | | | | | | | | | | |
| 555 | GRP78_MOUSE | 78 kDa glucose-regulated protein | 4.6 | 0.0027 | 5.07 | 72492 | 28/40 | 290 | 45 | 297 | 10 | 4 | A |
| 627 | GRP78_MOUSE | 78 kDa glucose-regulated protein | 4.28 | 0.015 | 5.07 | 72492 | 25/61 | 205 | 37 | 202 | 9 | 4 | A |
| 630 | GRP78_MOUSE | 78 kDa glucose-regulated protein | 3.07 | 0.066 | 5.07 | 72492 | 27/50 | 234 | 42 | 316 | 9 | 4 | A |
| 631 | GRP78_MOUSE | 78 kDa glucose-regulated protein | 3.07 | 0.0034 | 5.07 | 72492 | 13/48 | 75 | 22 | 263 | 9 | 4 | A |
| 637 | GRP78_MOUSE | 78 kDa glucose-regulated protein | 5.3 | 0.0014 | 5.07 | 72492 | 18/42 | 145 | 33 | 263 | 10 | 4 | A |
| 638 | GRP78_MOUSE | 78 kDa glucose-regulated protein | 6.25 | 0.0057 | 5.07 | 72492 | 16/41 | 117 | 24 | 176 | 9 | 4 | A |
| 1467 | AHSA1_MOUSE | Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 | -2.17 | 0.00079 | 5.41 | 38321 | 8/35 | 65 | 25 | 34 | 7 | 2 | A |
| 1035 | CATA_MOUSE | Catalase | -2.92 | 0.0021 | 8.5 | 60013 | - | - | - | 30 | 2 | 1 | B |
| 953 | ERO1A_MOUSE | ERO1-like protein alpha | 3.49 | 0.0081 | 6.12 | 54905 | 16/37 | 155 | 36 | 160 | 12 | 4 | A |
| 2633 | GSTA4_MOUSE | Glutathione S-transferase A4 | -7.64 | 0.0012 | 6.57 | 25547 | 12/24 | 160 | 47 | 153 | 14 | 3 | A |
| 2499 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -5.5 | 0.0056 | 7.71 | 26067 | 9/45 | 72 | 40 | 32 | 9 | 2 | B |
| 2503 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -3.88 | 0.0034 | 7.71 | 26067 | 22/58 | 164 | 58 | 177 | 19 | 4 | B |
| 2505 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -28.57 | 0.0011 | 7.71 | 26067 | 22/70 | 185 | 72 | 215 | 21 | 4 | B |
| 2506 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -31.31 | 0.00099 | 7.71 | 26067 | 13/26 | 151 | 42 | 83 | 16 | 4 | A |
| 2510 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -5.21 | 8.00E-05 | 7.71 | 26067 | 17/55 | 141 | 54 | 173 | 15 | 4 | B |
| 2512 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -17.82 | 0.0021 | 7.71 | 26067 | 17/55 | 141 | 54 | 173 | 15 | 4 | B |
| 2515 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -3.44 | 0.0011 | 7.71 | 26067 | 13/72 | 183 | 55 | 75 | 15 | 3 | B |
| 2517 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -7.79 | 0.00052 | 7.71 | 26067 | 23/69 | 190 | 67 | 152 | 17 | 4 | B |
| 2522 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -2.31 | 0.0069 | 7.71 | 26067 | 18/93 | 134 | 19 | 134 | 19 | 4 | B |
| 2523 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -13.36 | 0.0004 | 7.71 | 26067 | 22/83 | 171 | 67 | 178 | 20 | 4 | B |
| 2525 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -8.94 | 0.004 | 7.71 | 26067 | 12/46 | 100 | 47 | 103 | 12 | 4 | A |
| 2526 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -14.03 | 3.10E-05 | 7.71 | 26067 | 14/33 | 165 | 48 | 57 | 12 | 4 | A |
| 2534 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -15.51 | 0.00032 | 7.71 | 26067 | 6/32 | 53 | 23 | 34 | 9 | 2 | B |
| 2536 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -2.3 | 0.00082 | 7.71 | 26067 | 7/33 | 67 | 33 | 45 | 15 | 3 | B |
| 2563 | GSTM1_MOUSE | Glutathione S-transferase Mu 1 | -5.02 | 0.009 | 7.71 | 26067 | 8/46 | 61 | 31 | - | - | - | B |

Carbohydrate metabolism (Glycolysis and TCA cycle) and transport

| | | | | | | | | | | | | | |
|------|-------------|--------------------------------------------------------|--------|----------|------|-------|-------|-----|----|-----|----|---|---|
| 1794 | ALD2_MOUSE | Aldose reductase-related protein 2 | 12.25 | 0.00052 | 5.97 | 36440 | 10/44 | 89 | 44 | 129 | 16 | 3 | A |
| 1483 | ENOA_MOUSE | Alpha-enolase | 5.87 | 0.0087 | 6.37 | 47453 | 17/32 | 150 | 45 | 338 | 4 | 4 | A |
| 1500 | ENOA_MOUSE | Alpha-enolase | 3.13 | 0.0058 | 6.37 | 47453 | 9/29 | 150 | 26 | 227 | 15 | 4 | A |
| 1508 | ENOA_MOUSE | Alpha-enolase | 9.22 | 0.0011 | 6.37 | 47453 | 9/47 | 66 | 31 | - | - | - | A |
| 1722 | ENOB_MOUSE | Beta-enolase | 3.68 | 0.00023 | 6.73 | 47337 | 7/37 | 56 | 17 | - | - | - | A |
| 1617 | ALDOA_MOUSE | Fructose-bisphosphate aldolase A | 2.15 | 0.0084 | 8.31 | 39787 | 9/53 | 70 | 38 | 212 | 15 | 3 | A |
| 1545 | ALDOA_MOUSE | Fructose-bisphosphate aldolase A | -2.35 | 0.023 | 6.8 | 39786 | 11/88 | 74 | 34 | 49 | 11 | 3 | B |
| 1079 | GFPL_MOUSE | Glucose-6-phosphate isomerase | -3 | 0.014 | 8.18 | 62767 | - | - | - | 63 | 4 | 2 | A |
| 1766 | G3P_MOUSE | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 1.59 | 0.0012 | 8.45 | 36072 | 10/34 | 77 | 32 | 187 | 14 | 4 | A |
| 1820 | G3P_MOUSE | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 1.69 | 0.0035 | 8.45 | 35810 | - | - | - | 56 | 4 | 1 | A |
| 1714 | G3P_MOUSE | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 1.56 | 0.0015 | 8.45 | 35810 | - | - | - | 76 | 8 | 2 | A |
| 1740 | G3P_MOUSE | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | -1.61 | 0.0066 | 9.2 | 36072 | 5/24 | 50 | 8 | - | - | - | B |
| 1841 | GPDA_MOUSE | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]; cytoplasmic | 5.28 | 0.019 | 6.75 | 38176 | 12/72 | 73 | 31 | 96 | 10 | 3 | A |
| 437 | PYGB_MOUSE | Glycogen phosphorylase; brain form | -3.74 | 0.024 | 3.28 | 97353 | 19/40 | 143 | 24 | 37 | 2 | 2 | A |
| 1272 | PYGM_MOUSE | Glycogen phosphorylase; muscle form | -1.93 | 0.0098 | 6.7 | 97681 | 12/57 | 59 | 15 | - | - | - | B |
| 1922 | LDHA_MOUSE | L-lactate dehydrogenase A chain | 2.44 | 0.0047 | 7.62 | 36817 | 16/48 | 124 | 41 | 140 | 7 | 3 | A |
| 1968 | LDHA_MOUSE | L-lactate dehydrogenase A chain | 2.17 | 0.011 | 7.62 | 36817 | 16/48 | 142 | 39 | 129 | 12 | 4 | A |
| 2036 | LDHA_MOUSE | L-lactate dehydrogenase A chain | 2.04 | 0.00057 | 7.62 | 36817 | 15/42 | 103 | 36 | 105 | 7 | 3 | A |
| 1764 | LDHB_MOUSE | L-lactate dehydrogenase B chain | -3.04 | 0.015 | 5.7 | 36834 | 14/28 | 151 | 44 | - | - | - | A |
| 1807 | LDHB_MOUSE | L-lactate dehydrogenase B chain | -3.82 | 0.00089 | 5.7 | 36834 | 9/31 | 87 | 24 | 37 | 9 | 3 | A |
| 1808 | LDHB_MOUSE | L-lactate dehydrogenase B chain | -21.32 | 2.10E-05 | 5.7 | 36834 | 16/31 | 145 | 47 | 123 | 13 | 4 | A |
| 1864 | LDHB_MOUSE | L-lactate dehydrogenase B chain | -9.07 | 0.00045 | 5.7 | 36834 | 15/33 | 149 | 41 | 158 | 12 | 4 | A |
| 1984 | MDHC_MOUSE | Malate dehydrogenase; cytoplasmic | -1.66 | 0.0085 | 6.16 | 36659 | 7/14 | 96 | 26 | 210 | 14 | 4 | A |
| 1662 | MDHM_MOUSE | Malate dehydrogenase; mitochondrial | 2.5 | 0.00064 | 8.93 | 36045 | 11/53 | 85 | 42 | 294 | 11 | 4 | A |
| 1885 | MDHM_MOUSE | Malate dehydrogenase; mitochondrial | 2.58 | 0.011 | 8.93 | 36045 | 12/43 | 115 | 44 | 238 | 15 | 4 | A |
| 1889 | PGAM1_MOUSE | Phosphoglycerate mutase 1 | 1.98 | 0.0005 | 8.93 | 36045 | 9/33 | 87 | 33 | 204 | 15 | 4 | A |
| 2404 | PGAM1_MOUSE | Phosphoglycerate mutase 1 | 2.56 | 0.0031 | 6.67 | 28928 | 14/30 | 163 | 58 | 223 | 21 | 4 | A |
| 2414 | PGAM1_MOUSE | Phosphoglycerate mutase 1 | 2.07 | 0.0068 | 6.67 | 28928 | - | - | - | 80 | 8 | 2 | A |
| 908 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 | 2.51 | 0.003 | 7.18 | 58378 | 19/39 | 162 | 42 | 93 | 8 | 3 | A |
| 932 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 | 2.02 | 0.011 | 7.18 | 58378 | 22/43 | 207 | 50 | 167 | 8 | 3 | A |
| 945 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 | 2.01 | 0.00037 | 7.18 | 58378 | 18/36 | 159 | 33 | 176 | 8 | 3 | A |
| 956 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 | 3.16 | 0.0048 | 7.18 | 58378 | 8/33 | 71 | 22 | 66 | 8 | 3 | A |
| 957 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 | 2.26 | 0.029 | 7.18 | 58378 | 26/53 | 210 | 49 | 229 | 12 | 4 | A |
| 985 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 | 2.32 | 0.024 | 7.18 | 58378 | 21/46 | 137 | 40 | 117 | 10 | 4 | A |
| 993 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozyme M2 | 2.67 | 0.0049 | 7.18 | 58378 | 17/57 | 103 | 39 | 56 | 10 | 4 | A |
| 1767 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 | 4.71 | 0.0088 | 7.18 | 58378 | 12/47 | 103 | 31 | 119 | 10 | 4 | A |
| 1795 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 | 3.32 | 0.0023 | 7.18 | 58378 | 13/60 | 73 | 32 | 51 | 2 | 1 | A |
| 1844 | KPYM_MOUSE | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 | 2.78 | 0.0014 | 7.18 | 58378 | 15/40 | 132 | 36 | 206 | 10 | 4 | A |
| 1774 | TALDO_MOUSE | Triosephosphate isomerase | -1.57 | 0.025 | 7.18 | 58378 | - | - | - | 34 | 5 | 2 | B |
| 2497 | TPIS_MOUSE | Triosephosphate isomerase | 3.82 | 0.0018 | 6.57 | 37534 | 13/67 | 68 | 29 | - | - | - | A |
| 1062 | UGPA_MOUSE | UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase | -2.22 | 0.0094 | 7.18 | 57115 | 12/49 | 109 | 24 | 102 | 9 | 4 | A |
| 1083 | UGPA_MOUSE | UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase | -1.81 | 0.011 | 7.18 | 57115 | 11/43 | 97 | 20 | 35 | 3 | 2 | A |

Energy metabolism

| | | | | | | | | | | | | | |
|------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------|------|-------|-------|-----|----|-----|----|---|---|
| 1428 | ADK_MOUSE | Adenosine kinase | -3.91 | 0.0003 | 5.8 | 40466 | 10/54 | 76 | 26 | 129 | 13 | 4 | B |
| 2409 | KAD2_MOUSE | Adenylate kinase 2; mitochondrial | 1.63 | 0.0076 | 6.96 | 26737 | 11/42 | 112 | 41 | 194 | 20 | 4 | A |
| 1190 | ATPA_MOUSE | ATP synthase subunit alpha; mitochondrial | 2.2 | 0.026 | 8.28 | 55310 | 16/73 | 90 | 28 | 50 | 4 | 2 | A |
| 1118 | ATPB_MOUSE | ATP synthase subunit alpha; mitochondrial | -0.254 | 0.026 | 9.7 | 59830 | 17/54 | 144 | 39 | 160 | 7 | 4 | B |
| 1257 | ATPB_MOUSE | ATP synthase subunit beta; mitochondrial | 2.46 | 0.0084 | 5.19 | 56265 | 21/60 | 119 | 38 | 147 | 11 | 4 | A |
| 1402 | KCRB_MOUSE | Creatine kinase B-type | 4.48 | 0.021 | 5.4 | 42971 | 9/31 | 94 | 30 | 72 | 7 | 3 | A |
| 1330 | KCRB_MOUSE | Creatine kinase B-type | -2.32 | 0.0041 | 5.4 | 42971 | 12/25 | 134 | 35 | 77 | 7 | 3 | A |
| 1350 | KCRB_MOUSE | Creatine kinase B-type | -2.96 | 0.002 | 5.4 | 42971 | 17/37 | 171 | 51 | 201 | 14 | 4 | A |
| 1374 | KCRB_MOUSE | Creatine kinase B-type | -2.58 | 0.02 | 5.4 | 42971 | 22/42 | 219 | 66 | 243 | 14 | 4 | A |
| 1248 | ODO2_MOUSE | Dihydroxylysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex; mitochondrial | 2.4 | 0.01 | 6.41 | 32145 | - | - | - | 50 | 4 | 2 | A |
| 1192 | ODO2_MOUSE | Dihydroxylysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex; mitochondrial | -1.99 | 0.0019 | 9.9 | 49306 | 8/28 | 65 | 14 | 212 | 8 | 4 | B |
| 1317 | IDHP_MOUSE | Isocitrate dehydrogenase [NADP]; mitochondrial | -1.72 | 0.0069 | 8.88 | 51330 | 7/29 | 63 | 15 | - | - | - | A |
| 1362 | IDHP_MOUSE | Isocitrate dehydrogenase [NADP]; mitochondrial | -8.92 | 0.00064 | 8.88 | 51330 | 23/74 | 172 | 43 | 145 | 8 | 4 | A |
| 1497 | SUCB2_MOUSE | Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta; mitochondrial | -3.1 | 0.00099 | 6.58 | 47096 | 8/19 | 87 | 19 | 37 | 2 | 1 | A |

| Lipid metabolism and transport | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------|-------|---------|------|--------|-------|-------|-----|----|-----|----|----|---|
| 2471 | HCD2_MOUSE | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 | -4.28 | 0.0037 | 9.4 | 27516 | - | 13/46 | - | 37 | 42 | 8 | 2 | B |
| 1430 | ACOT1_MOUSE | Acyl-coenzyme A thioesterase 1 | -2.68 | 0.0018 | 6.1 | 46335 | 121 | 34/6 | 121 | 37 | 93 | 11 | 4 | B |
| 1610 | INSIG_MOUSE | Insulin-induced gene 2 protein | -1.78 | 0.011 | 9.6 | 25298 | 53 | 4/40 | 53 | 20 | - | - | - | B |
| 1263 | ACOX1_MOUSE | Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 | 2.4 | 0.0085 | 8.64 | 74986 | 135 | 15/33 | 135 | 30 | 201 | 6 | 3 | A |
| 1288 | ACOX1_MOUSE | Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 | 1.84 | 0.046 | 8.64 | 74986 | 102 | 15/51 | 102 | 25 | 77 | 8 | 4 | A |
| 1182 | GABT_MOUSE | 4-aminobutyrate aminotransferase; mitochondrial | -4.36 | 0.00015 | 8.35 | 57100 | 138 | 17/41 | 138 | 33 | 167 | 9 | 4 | A |
| 1091 | SERA_MOUSE | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase | -2.85 | 0.01 | 6.1 | 57347 | 106 | 11/34 | 106 | 28 | 101 | 8 | 4 | A |
| 1096 | SERA_MOUSE | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase | -3.05 | 0.0057 | 6.1 | 57347 | 18 | 11/39 | 18 | 18 | 159 | 8 | 4 | B |
| 1168 | DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial | 1.78 | 0.0014 | 8.05 | 16140 | 126 | 20/59 | 126 | 31 | 166 | 7 | 4 | A |
| 1071 | DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial | 1.63 | 0.0064 | 8.05 | 16140 | 119 | 24/92 | 119 | 40 | 145 | 9 | 4 | A |
| 1071 | DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial | -3 | 0.0034 | 8.05 | 16140 | 109 | 19/88 | 109 | 32 | 204 | 12 | 4 | B |
| 1073 | DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial | -3.15 | 0.00059 | 8.05 | 16140 | 120 | 18/42 | 120 | 28 | 186 | 7 | 4 | A |
| 1076 | DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial | -1.99 | 0.0039 | 8.05 | 16140 | 107 | 18/55 | 107 | 29 | 116 | 7 | 4 | A |
| 1078 | DHE3_MOUSE | Glutamate dehydrogenase 1; mitochondrial | -4.09 | 0.00068 | 8.05 | 16140 | 126 | 20/56 | 126 | 35 | 269 | 9 | 4 | A |
| 1378 | GLNA_MOUSE | Glutamine synthetase | -1.98 | 0.0026 | 6.7 | 42834 | 61 | 9/55 | 61 | 23 | 24 | 4 | 1 | B |
| 1360 | OAT_MOUSE | Ornithine aminotransferase; mitochondrial | -2.24 | 0.0065 | 6.19 | 48723 | 77 | 10/41 | 77 | 19 | 35 | 7 | 3 | A |
| 1376 | OAT_MOUSE | Ornithine aminotransferase; mitochondrial | -1.71 | 0.018 | 6.19 | 48723 | 151 | 18/51 | 151 | 43 | 201 | 12 | 4 | A |
| Nucleic acid | | | | | | | | | | | | | | |
| 1624 | BPNT1_MOUSE | 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1 | 1.92 | 0.0099 | 5.54 | 33517 | 115 | 14/47 | 115 | 45 | 189 | 18 | 4 | A |
| 3111 | NDKB_MOUSE | Nucleoside diphosphate kinase B | 2.52 | 0.0019 | 6.97 | 17466 | 111 | 9/37 | 111 | 52 | 234 | 31 | 4 | A |
| 2692 | KCY_MOUSE | UMP-CMP kinase | 1.79 | 0.0059 | 5.68 | 22165 | - | - | - | - | 97 | 10 | 2 | A |
| Signal transduction | | | | | | | | | | | | | | |
| 3486 | 1433T_MOUSE | 14-3-3 protein theta | 2.06 | 0.0023 | 4.69 | 28046 | 113 | 12/25 | 113 | 40 | 92 | 14 | 4 | A |
| 2336 | 1433Z_MOUSE | 14-3-3 protein zeta/delta | 2.21 | 0.0089 | 4.73 | 27925 | 76 | 12/48 | 76 | 42 | 76 | 11 | 3 | A |
| 1753 | ANXA2_MOUSE | Annexin A2 | -1.51 | 0.0042 | 7.55 | 38937 | 154 | 17/57 | 154 | 56 | 194 | 13 | 4 | A |
| 1782 | ANXA3_MOUSE | Annexin A3 | -3.72 | 0.0011 | 5.33 | 36520 | 146 | 15/50 | 146 | 54 | 202 | 15 | 4 | A |
| 1797 | ANXA3_MOUSE | Annexin A3 | -8.98 | 0.00035 | 5.2 | 36520 | 152 | 18/86 | 152 | 59 | 183 | 13 | 4 | B |
| 1959 | ANXA5_MOUSE | Annexin A5 | 3.33 | 0.014 | 4.83 | 35787 | 166 | 18/39 | 166 | 54 | 220 | 11 | 4 | A |
| 1964 | ANXA5_MOUSE | Annexin A5 | 2.57 | 0.021 | 4.83 | 35787 | 109 | 15/38 | 109 | 53 | 234 | 14 | 4 | A |
| 1983 | ANXA5_MOUSE | Annexin A5 | 4.58 | 0.00073 | 4.83 | 35787 | 126 | 15/43 | 126 | 47 | 197 | 18 | 4 | A |
| 2024 | ANXA5_MOUSE | Annexin A5 | 2.61 | 0.011 | 4.83 | 35787 | 77 | 8/30 | 77 | 32 | 216 | 14 | 4 | A |
| 1888 | GBB1_MOUSE | Guanine nucleotide-binding protein G(i)(G(S)T) subunit beta-1 | -2.3 | 0.0049 | 5.6 | 38151 | 97 | 12/69 | 97 | 47 | 218 | 12 | 4 | B |
| 1694 | GNAO_MOUSE | Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha | -2.56 | 0.0012 | 5.34 | 40629 | 82 | 9/27 | 82 | 24 | 52 | 8 | 3 | A |
| 1280 | GDIB_MOUSE | Rab GDP dissociation inhibitor beta | -2.09 | 0.00086 | 5.9 | 51018 | 119 | 14/41 | 119 | 40 | 202 | 13 | 4 | B |
| 2420 | RAB5A_MOUSE | Ras-related protein Rab-5A | 1.84 | 0.0068 | 8.32 | 23599 | - | - | - | - | 29 | 9 | 3 | A |
| 2498 | RAB5C_MOUSE | Ras-related protein Rab-5C | -6.24 | 0.00012 | 8.64 | 23626 | 69 | 7/38 | 69 | 34 | - | - | - | A |
| 1005 | PP2BA_MOUSE | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform | 3.33 | 0.0029 | 5.58 | 58644 | - | - | - | - | 27 | 4 | 3 | A |
| Cell cycle/Cell death | | | | | | | | | | | | | | |
| 524 | CDKL5_MOUSE | Cyclin-dependent kinase-like 5 | 3.08 | 0.0034 | 9.6 | 105498 | 61 | 12/50 | 61 | 15 | - | - | - | A |
| Miscellaneous | | | | | | | | | | | | | | |
| 384 | FTHD_MOUSE | 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase | -5.15 | 0.041 | 5.64 | 99502 | 151 | 19/40 | 151 | 23 | 149 | 6 | 4 | A |
| 1639 | RT31_MOUSE | 28S ribosomal protein S31; mitochondrial | 2.63 | 0.026 | 6.71 | 37966 | - | - | - | - | 36 | 2 | 2 | A |
| 1287 | CALU_MOUSE | Calumenin | 4.86 | 0.00086 | 4.49 | 37155 | 7/41 | 7/41 | 59 | 28 | 179 | 16 | 4 | A |
| 882 | DPYL2_MOUSE | Dihydropyrimidinase-related protein 2 | -1.66 | 0.0068 | 5.95 | 62638 | 108 | 14/36 | 108 | 25 | 61 | 2 | 2 | A |
| 1024 | DPYL2_MOUSE | Dihydropyrimidinase-related protein 2 | -6.92 | 0.028 | 5.95 | 62638 | 13/33 | 13/33 | 108 | 23 | 116 | 7 | 4 | A |
| 1011 | DPYL3_MOUSE | Dihydropyrimidinase-related protein 3 | -2.46 | 0.0017 | 6 | 62296 | 90 | 13/47 | 90 | 26 | 180 | 10 | 4 | B |
| 1319 | HYEP_MOUSE | Epoxide hydrolase 1 | -3.42 | 0.001 | 8.74 | 52713 | 180 | 25/64 | 180 | 41 | 106 | 7 | 4 | A |
| 2755 | FRIH_MOUSE | Ferritin heavy chain | 4.11 | 0.034 | 5.33 | 21224 | 68 | 5/33 | 68 | 28 | 146 | 3 | 18 | A |
| 2527 | PGRG2_MOUSE | Membrane-associated progesterone receptor component 2 | 3.89 | 0.0021 | 4.9 | 23434 | 58 | 4/16 | 58 | 30 | - | - | - | B |
| 1382 | PUR6_MOUSE | Multifunctional protein ADE2 | -1.87 | 0.023 | 6.94 | 47781 | 183 | 20/48 | 183 | 43 | 140 | 7 | 3 | A |
| 815 | PLST_MOUSE | Plastin-3 | 2.27 | 0.033 | 5.42 | 72210 | 98 | 15/62 | 98 | 29 | 98 | 4 | 3 | A |
| 2487 | F115A_MOUSE | Protein FAM115A | -2.24 | 0.00065 | 6.6 | 103696 | 51 | 7/32 | 51 | 9 | - | - | - | B |
| 2765 | TAGL2_MOUSE | Transgelin-2 | 2.62 | 0.00079 | 8.44 | 22250 | 112 | 14/53 | 112 | 52 | 158 | 18 | 4 | A |
| 1784 | DCUP_MOUSE | Uroporphyrinogen decarboxylase | 3.1 | 0.0047 | 6.21 | 40951 | 77 | 11/58 | 77 | 27 | 53 | 11 | 4 | A |

Annexe 3

Shafiei R, Zarmehrkorshid R, **Bentaib A**, Babanezhad M, Leprince P,
Delvigne F, Thonart P.

The role of protein modifications in senescence of freeze-dried
Acetobacter senegalensis during storage.

Microb Cell Fact. 2014 Feb 19;13(1):26.

RESEARCH

Open Access

The role of protein modifications in senescence of freeze-dried *Acetobacter senegalensis* during storage

Rasoul Shafiei^{1,2*}, Raziye Zarmehrkhorshid¹, Azeddine Bentaib³, Manoochehr Babanezhad⁴, Pierre Leprince³, Frank Delvigne⁵ and Philippe Thonart^{1,5}

Abstract

Background: Loss of viability is one of the most important problems during starter culture production. Previous research has mostly focused on the production process of bacterial starters, but there are few studies about cellular protein deterioration causing cell defectiveness during storage. In the present study, we investigated the influence of storage temperature (−21, 4, 35°C) on the cellular protein modifications which may contribute to the senescence of freeze-dried *Acetobacter senegalensis*.

Results: Heterogeneous populations composed of culturable cells, viable but non-culturable cells (VBNC) and dead cells were generated when freeze-dried cells were kept at −21 and 4°C for 12 months whereas higher storage temperature (35°C) mainly caused death of the cells. The analysis of stored cell proteome by 2D-DiGE demonstrated a modified pattern of protein profile for cell kept at 4 and 35°C due to the formation of protein spot trains and shift of Isoelectric point (pI). Quantification of carbonylated protein by ELISA showed that the cells stored at 4 and 35°C had higher carbonylated protein contents than fresh cells. 2D-DiGE followed by Western blotting also confirmed the carbonylation of cellular proteins involved in translation process and energy generation. The auto-fluorescent feature of cells kept at 35°C increased significantly which may be an indication of protein glycation during storage. In addition, the percentage of cellular unsaturated fatty acid and the solubility of cellular proteins decreased upon storage of cells at higher temperature suggesting that peroxidation of fatty acids and possibly protein lipidation and oxidation occurred.

Conclusions: High storage temperature induces some deteriorative reactions such as protein oxidation, lipidation and glycation which may cause further protein modifications like pI-shift, and protein insolubility. These modifications can partly account for the changes in cell viability. It can also be deduced that even moderate carbonylation of some critical cellular proteins (like ribosomal proteins) may lead to VBNC formation or death of freeze-dried bacteria. Moreover, it seems that other mechanisms of biomolecule deterioration preceding protein carbonylation lead to VBNC formation under very low storage temperature.

Keywords: Starter, Acetic acid fermentation, Oxidative stress, Carbonylation, AGEs, Acetobacter, 2D-DiGE, VBNC, Protein

* Correspondence: ra.shafiei@gmail.com

¹Walloon Center of Industrial Biology, University of Liège, Liège, Belgium

²Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Full list of author information is available at the end of the article

Introduction

A starter culture may be defined as a preparation containing large numbers of viable and culturable microorganisms, which may accelerate a favorable fermentation process [1]. Vinegar technology is one of those fermentation technologies which still suffer from the lack of cost-effective starter cultures [2] due to the genetic instability of acetic acid bacteria during preservation [3] and the susceptibility of cells to downstream processes [4,5].

The viable cells which are used as vinegar starter must be able to tolerate acetic acid and metabolize ethanol efficiently under aggressive conditions of acetic acid fermentation [6]. The availability of appropriate vinegar starter cultures is desirable when a new fermentation run has to be started or when it needs to be restarted due to a sudden interruption of fermentation [2]. In recent years, *Acetobacter senegalensis*, a thermo-tolerant bacterium, has been used for starter production and vinegar production in a pilot plant scale acetifier [4,7]. Use of this strain in vinegar industry can decrease the cooling cost of bioreactors especially in tropical regions. In addition, since this strain can remain viable and active in a wide range of temperature during acetous fermentation [8], any fluctuation of fermentation temperature can be tolerated readily.

There are different industrial techniques to preserve microbial starters; however despite being an expensive and long process, freeze-drying is one of the most convenient and applicable methods compared to other drying methods [9]. However, as with other drying methods, loss of viability is one of the main problems during freezing and drying processes as well as storage period [4].

Intrinsic and environmental factors have considerable influence on the viability of microbial starters [9]. Generally, the survival rate of gram-positive bacteria immediately after freeze-drying tends to be higher than that of gram-negative bacteria [10]. In addition, pre-adaptation of cells in different culture media, usage of protectants and storage conditions affect bacterial viability significantly [5,11]. In this context, there are evidences that damage to DNA, cell wall and cell membrane of bacterial cells under different storage conditions occur [12,13], and it is now well accepted that membrane lipid peroxidation and change in the degree of un-saturated lipids strongly affect the survival of bacteria [7,9,13]. Furthermore, damage to ribosomes and their functions are speculated as the primary reasons of cell viability loss [11].

Cellular proteins are also subjected to deteriorating reactions during downstream processes. They are very susceptible to various modifications due to the range of functional groups displayed by amino acids [14]. Damage to proteins such as oxidation during preservation process and storage period has been studied in animal cells, plant cells, seeds as well as in therapeutic products

[15-19]. Oxidative changes of cellular proteins can lead to diverse detrimental consequences in structure and function of proteins such as inhibition of enzymatic activities, polymerization, loss of solubility, increased susceptibility to aggregation and proteolysis [14,20].

Although several protein oxidative modifications exist, most oxidized proteins exhibit carbonyl groups (aldehydes and ketones) [20]. However, compared to other oxidative modifications, carbonylation is relatively difficult to be induced and in contrast to, for example, methionine sulfoxide and cysteine disulfide bond formation, carbonylation is an irreversible oxidative process [21,22]. Carbonyl groups are introduced into the proteins through a variety of oxidative pathways: (I) a decline in the antioxidant defense system, (II) an increased production of reactive oxygen species (ROS), (III) a diminished capacity for removal of oxidized proteins, or (IV) an increased susceptibility of proteins to oxidative attack [23]. In addition, carbonyl derivatives are formed by a direct metal catalyzed oxidative (MCO) attack on the amino-acid side chains of proline, arginine, lysine, and threonine. Furthermore, carbonyl derivatives on lysine, cysteine, and histidine can be formed by secondary reactions with reactive carbonyl compounds on carbohydrates, lipids, and Advanced Glycation/lipoxidation End Products (AGEs) [23].

Advanced Glycation End products (AGEs) and AGE pigments (known also as lipofuscin) are created through non-enzymatic reactions (the Maillard reaction) between reducing sugars and free amino groups of proteins, lipids, or nucleic acids. These biomolecules contain transition metals such as iron, zinc, manganese and copper. These metals can cause a redox-active surface that can catalyze reactive releasing process [24]. AGEs alter the structure of proteins and compromise their functions. The rate of accumulation of AGEs in proteins may be viewed as an index of the rate of damage to other biomolecules, including lipids, glycol-conjugates and DNA [25]. A decreased enzymatic activity through oxidative reaction of proteins and Maillard reaction products has been demonstrated in plant seeds during storage [26,27]. However, there are few studies which address the protein modifications in bacterial cells during desiccation [17].

Despite the progress made so far in the context of bacterial starter production, to our knowledge there are only few studies on the cellular protein modifications occurring during storage of bacterial starters. The aim of this study was to investigate the influences of storage temperature on cellular viability and senescence of freeze-dried *A. senegalensis*. Specifically, the occurrence of modifications in protein content and properties affecting the survival of stored bacteria was studied. In this regard, three storage temperatures (-21, 4, and 35°C) were chosen and freeze-dried cells were stored for 12 months in sealed vials at the three mentioned temperatures. Then, the

oxidative damage and its subsequent effects on some cellular protein properties were analyzed. In addition, the consequence of protein oxidation on some other cellular features such as AGEs formation or cell respiration was studied.

Results and discussion

Heterogeneous populations are formed during storage of freeze-dried cells

Prolonged stability of freeze-dried starters is crucial for fermentation industry. Studies from our laboratory and others have shown that culturability and the viability of freeze-dried starters are dependent upon freeze-drying process as well as storage conditions [4,9,11,13,28-30]. We have also previously shown that storage temperature affect the viability and culturability of freeze-dried starter, and that even at low storage temperature (-21, 4°C), cells enter into VBNC state [4].

Culturability of cells was determined merely after freeze-drying (as control) and also after 12 months of storage at different temperatures. Cell culturability was affected considerably by storage temperature. As shown in Table 1, while the change in culturability at -21°C was limited, it decreased significantly at 4°C in comparison to -21°C. Additionally, the culturability of cells disappeared at 35°C. It is now well accepted that for long term storage, inactivation of the dried starter cultures extensively depends on the storage conditions [11]. Since the vials containing the freeze-dried samples were completely sealed, the moisture content did not change significantly (Table 1). In addition, they were kept in the dark, and originated from the same fermentation and freeze-drying batches; thus we can assume that the only affecting factor was storage temperature.

Measurement of total dehydrogenase activity (indicative of cell respiration) revealed that nearly all of the cell population (95%) kept at -21°C for 12 months was able to reduce CTC in the presence of glucose-phosphate buffer (Figure 1A). The small percentage of cells which were not able to reduce CTC were presumably dead cells or cells that could not be active under mentioned conditions.

Table 1 Culturable cells and moisture content of freeze-dried cells kept at various temperatures for 12 months

| | After freeze-drying process | Storage temperature | | |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------|--------------|
| | | -21°C | +4°C | +35°C |
| Direct count (cfu/g) | 5.96E + 11 | 6.01E + 11 | 6.21E + 11 | 5.89E + 11 |
| cfu/g on GY agar | 1.90E + 11 | 1.11E + 11 | 1.03E + 10 | <E + 2 |
| Dry matter (%) ¹ | 91.60 ± 1.64 | 91.7 ± 2.14 | 92.53 ± 1.18 | 93.29 ± 2.34 |

¹Values are presented as mean ± SD.

Storing of freeze-dried cells at 4°C for 12 months resulted in a heterogeneous population of bacteria according to CTC reduction ability (Figure 1B). This may indicate that some cellular enzymes involved in respiration system such as dehydrogenases were subjected to detrimental conditions which disabled the respiration system. However, about 23% of cells were able to carry out that reaction completely, resulting in high absorbance on FL3. It has been already shown that dehydrogenases are especially heat sensitive [31]. In our previous study, it was shown that storage of freeze-dried *A. senegalensis* at 4°C for nine months did not change the cell envelope integrity considerably [4], therefore the changes in dehydrogenase activity during storage at 4°C may not be due to the leakage of cellular components or entrance of liquids into the cells. In contrast, it could be due to direct inactivation of enzymes.

At 35°C, 85% of cells lost the capability of reducing CTC (Figure 1C). These cells can be considered as dead cells or cells needing some complementary components to perform respiration. Furthermore, our results indicate that although low temperature could decrease the proportion of non-viability and non-culturability, a fraction of cells entered into VBNC state at very low storage temperatures (i.e., -21°C) as indicated by summarizing the data in Figure 2. These results are in line with research showing that VBNC formation is also induced during preservation [32,33]. One possible explanation for entry of bacterial cells into VBNC state during storage period is irreparable damage to key structural or functional components (such as ribosomes and DNA) of cells which are completely necessary for multiplication [11,34,35].

Formation of fluorescent compounds is enhanced during storage at high temperature

One of the primary diagnostic criteria for development of a browning reaction in a product is the development of dark color in product. As shown in Figure 3, a browning reaction occurred in cells kept at 35°C that darkened after storage for 12 months, whereas the cells stored at lower temperature showed no visible change in color. Non-enzymatic browning may result from Maillard and Amadori reactions starting from a condensation reaction between reducing sugars and amino groups. These reactions are known to produce carbonyl intermediates which react with neighboring amino groups [36]. Protein glycation is a process in which reducing sugars interact with primary amines on the side chains of Lysine and Arginine, resulting in a chemical sequence of reactions known as "Amadori rearrangement" which leads to the formation of Amadori modified proteins (AMPs). AMPs can be further developed, in an oxidation-dependent manner, to form irreversible, highly stable compounds known as Advanced Glycation End-products (AGEs) [37].

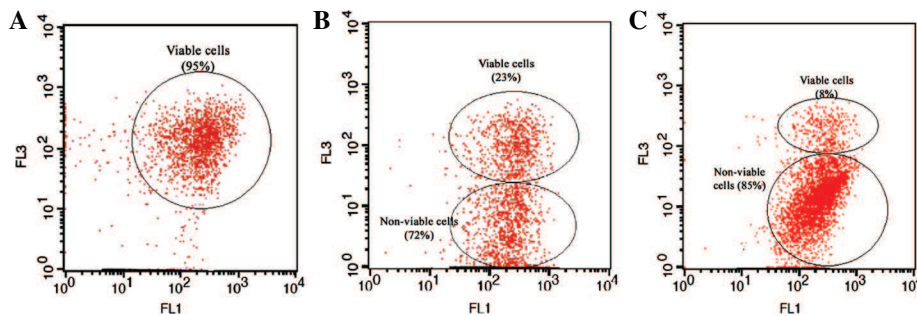


Figure 1 Flow-cytometric analysis of cellular dehydrogenases of freeze-dried *A. senegalensis* cells stored at -21°C (A), 4°C (B) and 35°C (C) for 12 months. Thiazole orange (TO) was used to stain all the cells (viable and non-viable cells). CTC is reduced by active cellular dehydrogenases, and the emitted light is absorbed on FL3. The activity of dehydrogenases which determined by CTC reduction was considered as a sign of viability.

In order to assess the development of AGEs in cells kept at different storage temperatures, the autofluorescent feature of cells were assessed by flow-cytometric technique. As Figure 4 shows, illumination of cells with blue laser light (488 nm), induced light emission which appeared on FL3. Since the *Kolmogorov–Smirnov* test showed that the signal intensity followed a normal distribution, *Duncan’s* multiple range test was used to compare the mean of the three populations. A significant difference in mean and median light intensity was observed between the cells kept at 35°C and -21°C or 4°C . However, there is no significant difference in light intensity between the cells kept at 4 and -21°C . Statistical analysis revealed that about 42% of cells kept at -21 and 4°C had overlap whereas there is no significant overlap between the cells kept at 35°C with the cells kept at lower storage temperature.

Recently, the evaluation of fluorescent compounds generated by the Amadori rearrangement product has become a routine practice. Besides its use in food quality control, fluorescence measurement is also employed

to evaluate Maillard reactions causing AGEs generation under physiological conditions, and also to assess AGEs development under pathological conditions [38]. The results obtained in this study are in agreements with those of Kurtmann and coworkers. They showed that browning of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* during storage under relatively mild conditions resulted in various types of non-enzymatic browning reactions including carbonyl-protein (or carbonyl-DNA) interactions and carbohydrate condensation/polymerization [28]. Furthermore, in our study, since the cells were not washed prior to freeze-drying (to avoid possible damage to the cells by low osmotic buffers) [4,5], residual reducing sugar (glucose) and proteins or even DNA or RNA released by cell lysis

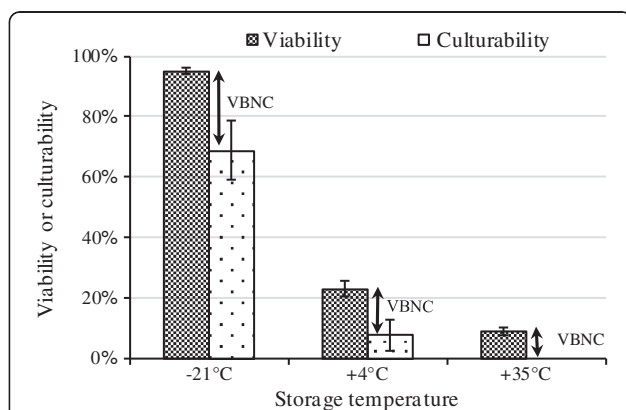


Figure 2 The influence of storage temperature on VBNC formation in freeze-dried *A. senegalensis* cells after 12 months of storage. Experiments were performed at least in three independent replicates. Error bar shows the standard deviation.

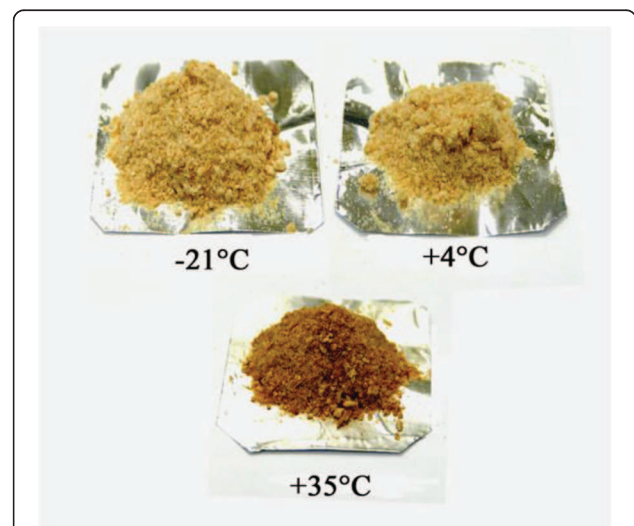


Figure 3 The appearance of freeze-dried *A. senegalensis* kept at different storage temperatures for 12 months. The color of freeze-dried cells preserved at 35°C changed to dark brown while the color of freeze-dried cells preserved at -21 and 4°C did not change.

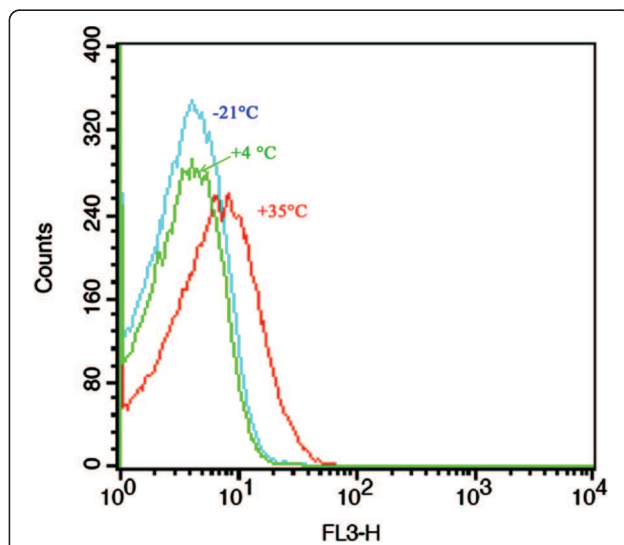


Figure 4 Auto fluorescence feature of freeze-dried *A. senegalensis* kept at different storage temperatures for 12 months. Light emitted from cells was collected and appeared on FL3. A significant difference ($p < 0.05$) was observed between the light intensity mean of cells kept at 35°C and the light intensity mean of cells stored at -21 or 4°C.

during fermentation or freeze-drying can enhance the non-enzymatic browning reactions [39].

It is believed that formulation strategies during freeze-drying process have great influence on the stability and viability of bacteria. Addition of compounds containing carbonyl groups has been suggested to be a cause of mortality occurring during storage of dried microorganisms [40].

Form these results, it can be deduced that some temperature-dependent reactions induce the formation of fluorescent compounds in the stored cells. These fluorescent compounds can be a sign of protein glycation.

The proteome is markedly affected in freeze-dried cells stored at high temperature

To study the molecular mechanisms associated with the loss of viability and culturability during storage, a differential proteomic analysis approach was used. First, we determined the distribution pattern of the cellular proteome by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DiGE) for cell kept at different temperatures. In the second part, the extent of protein carbonylation was studied using ELISA test and 2D-DiGE followed by immunoblotting (Western blotting).

The electrophoretic patterns of cellular proteins revealed major changes in protein profile of freeze-dried *A. senegalensis* kept at different storage temperatures (Figure 5). Triplicate samples of cells stored at each temperature were run on different gels, and representative gels are exhibited in Figures 5 and 6. The pattern of obtained spots was reproducible for each condition and includes many proteins appearing as single spots (for the cells kept at -21 and 4°C); however the majority of proteins appeared as trains of spots (white rectangles in Figure 5) or vertical streaks (the black rectangles in Figure 5) for samples kept at 35°C. These changed patterns made it difficult to distinguish unambiguously each protein from neighboring proteins. Different reasons can possibly explain the appearance of streaking in 2D-DiGE: inadequate isoelectric focusing and/or (bio) chemical modification of proteins. Contamination with salts, DNA, polysaccharides and lipids during preparation of protein samples can be a cause of streaking. Since the same standard procedure was applied to all the samples using high grade reagents, it seems that streaking cannot arise from the sample preparation procedures. In contrast, it may result from modifications of cellular proteins during storage at 35°C. Heterogeneous modifications such as lipidation (the covalent binding of a lipid group to a peptide chain), glycosylation and glycation can induce streaking in

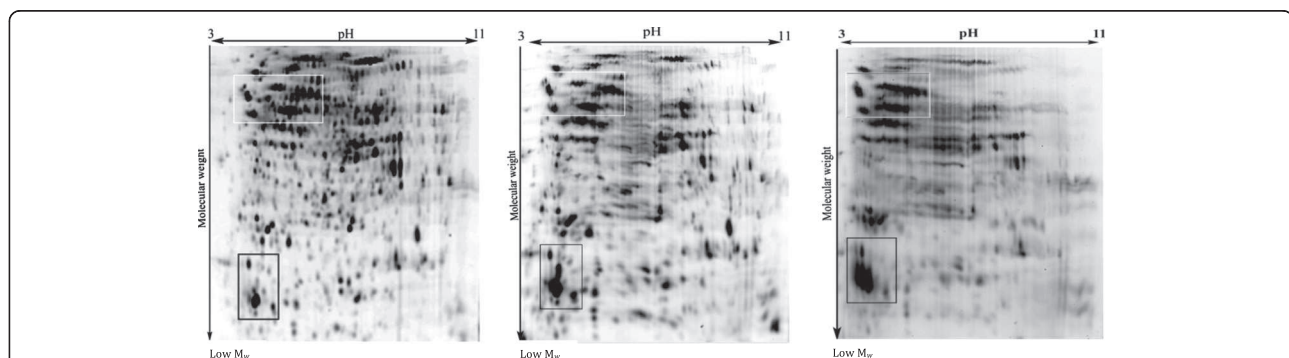


Figure 5 2D-DiGE of *A. senegalensis* preserved at -21 (left), 4 (middle) and 35°C (right). The proteins were pre-stained with Cy3 before separation. As it is evident, slight and moderate streaking and trains of spots were formed in the proteome pattern of cells kept at 4 and 35°C. The density of high molecular weight proteins at the basic side of the gel decreased at 35°C. The selected sections (white and black rectangles) show clearly the differences between the patterns of proteins.

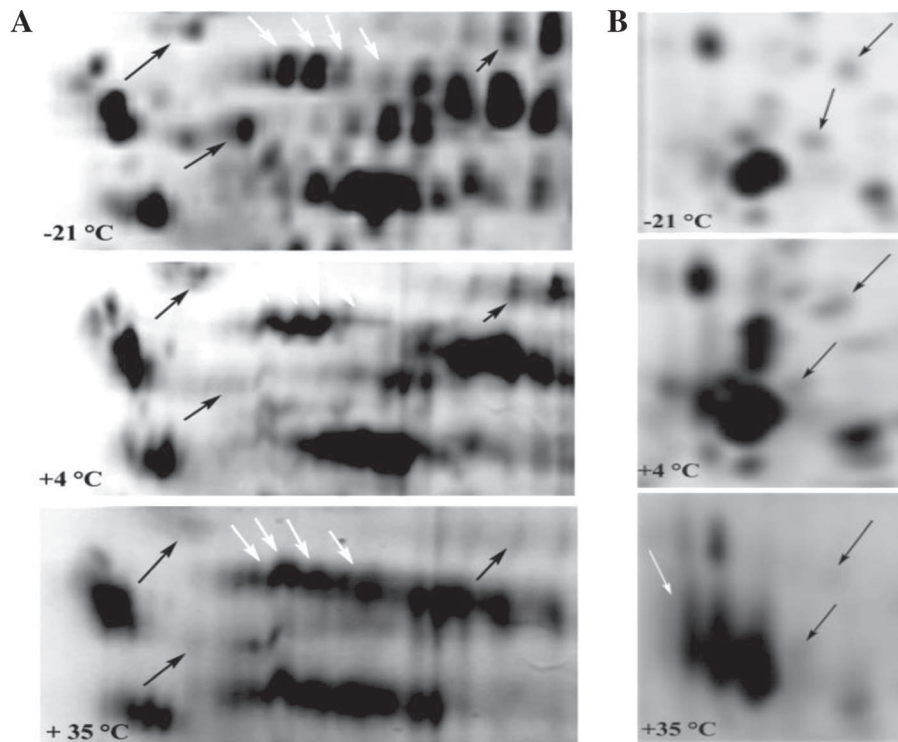


Figure 6 Comparison of selected 2D-profiles of proteins extracted from cells stored at different temperatures. **A** and **B** are the magnified sections (white and black rectangles) in Figure 5, respectively. The black arrows show the protein spots which exhibited a decrease in density during storage at 4 or 35°C. The white arrows show the intact protein spots (-21°C) and the trains of protein spots formed during storage at 4 or 35°C.

proteins pattern during bi-dimensional electrophoresis. As explained in the previous section, the development of fluorescent compounds in stored cells is already a sign of glycation.

Using 2D-DiGE, it was possible to detect changes in molecular weight and shift in Isoelectric point (pI) of cellular proteins. Visual assessment of the 2D protein patterns revealed significant changes that appeared as red or green spots (Figure 7). To quantify changes in protein abundance and position, measurement of all fluorescence-labeled proteins spots was conducted with the Decyder software. Two kinds of modifications were observed during storage at 35°C: a change in the abundance of proteins and a slight or considerable shift toward acidic pI. However, as already mentioned the determination of exact change in abundance of proteins during storage was not feasible due to the extensive formation of spot trains and streaking.

Table 2 lists three proteins with considerable shifts of pI for the cells stored at 35°C. They were found on the acidic side of the gel (pH 4.5-5) although their identification by MALDI-TOF-MS/MS showed that they are ribosomal proteins with theoretical pI between 10.5-11.5. Thus significant modifications occurred causing the displacement of proteins from basic to acidic side of

the gel. Modifications that may cause protein pI-shift include protein truncation, acetylation, phosphorylation, or glycosylation (or glycation) [41]. Among these modifications, glycation is more likely to happen since: first the molecular weights did not change excluding a significant truncation of these proteins, second upon phosphorylation, proteins with basic pI to shift only moderately to acidic pI [41], and finally the identification by MALDI-TOF-MS/MS did not reveal any acetylation.

Carbonylation of proteins increases massively during storage

Oxidation of side chains of proline, of Proline, Arginine, Lysine and Threonine leads to production of carbonyl groups (aldehyde and ketones) [42]. Since carbonyl groups are chemically stable, they can be used as biomarkers for detection of protein oxidation [42]. In addition, multiple oxidative agents such as ROS or indirect reactions caused by secondary by-products of oxidative stress can lead to production of carbonyl groups [21,43-45], however one of the disadvantage of protein carbonyl as biomarker is that they are nonspecific oxidation markers [46]. It is also noticeable that Methionine (Met) and Cysteine (Cys) are the amino acids most prone to oxidative attacks, and oxidation of other amino acids requires more

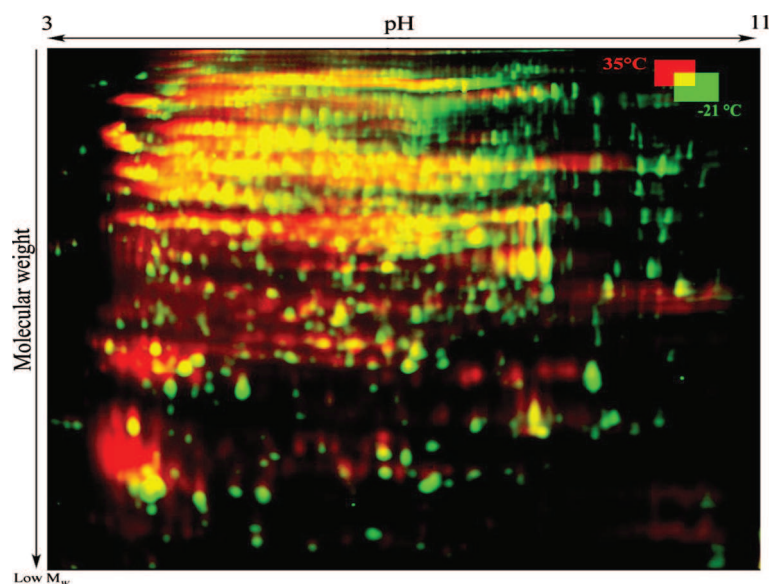


Figure 7 Comparison between the proteome of freeze-dried *A. senegalensis* preserved at -21 and 35°C for 12 months. The green and red spots indicate CyDye-labelled proteins from the cells kept at -21 and 35°C , respectively. Trains of red spots are mostly observed in the protein profile of cells stored at 35°C .

Table 2 Some cellular proteins modifications of freeze-dried *A. senegalensis* stored at 35°C for 12 months

| Master no. | Accession no. | Proteins | Modifications | MW (kD) | pI ¹ | Modified amino acid and site of carbonylation | Score/number of peptides/Percentage of coverage |
|------------------------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Shift of pI | | | | | | | |
| 1254 | gij258542052 | LSU ribosomal protein L17P | Shift of pI to about 4.5-5 | 15.5 | 10.8 | — | 254/6/36 |
| 1456 | gij258542952 | LSU ribosomal protein L21P | Shift of pI to about 4.5-5 | 13.1 | 11.4 | — | 196/4/31 |
| 1697 | gij258542032 | LSU ribosomal protein L22P | Shift of pI to about 4.5-5 | 15 | 11.5 | — | 229/4/30.9 |
| Carbonylated proteins | | | | | | | |
| 1581 | gij258542025 | Translation elongation factor Tu | Threonine carbonylation | 43.3 | 5.1 | Thr: 111 | 83/5/50 |
| 934 | gij258542743 | Translation elongation factor G | Proline carbonylation | 76.9 | 5.2 | Pro: 651, 681, 683 | 85/13/20 |
| 914 | gij258542743 | Translation elongation factor G | Proline carbonylation | 76.9 | 5.2 | Pro: 681 and 683 | 122/13/24 |
| 1313 | gij258541164 | SSU ribosomal protein S1 | Proline carbonylation | 63 | 5.2 | Pro: 262 | 80/7/15 |
| 773 | gij258542981 | Pyruvate phosphate dikinase | Proline carbonylation Threonine carbonylation Arginine carbonylation | 96.7 | 5.5 | Pro: 758, 623, 670 Thr: 290 Arg: 579 | 170/21/17 |
| 1552 | gij271502383 | Putative lipoprotein | Threonine carbonylation | 6.6 | 9.86 | Thr: 9 | 79/5/96 |
| 1368 | gij251798976 | PBS lyase | Threonine carbonylation Lysine carbonylation | 42.1 | 6.72 | Thr: 373 Lys: 86, 236 | 86/8/24 |
| 1392 | gij258541222 | ATP synthase F1 beta subunit | Proline carbonylation Arginine carbonylation | 52.6 | 4.6 | Pro: 238, 359, 364 Arg: 68, 289 | 125/15/39 |
| 1402 | gij258541220 | ATP synthase F1 alpha subunit | Proline carbonylation | 55.4 | 5.4 | Pro: 5 | 79/9/20 |
| 1540 | gij258542167 | Acetyl-CoA hydrolase | Proline carbonylation | 54.9 | 6.2 | Pro: 460, 464 | 88/10/24 |

¹The theoretical iso-electric point.

stringent conditions [14]. Thus, it can be assumed that disulfide bonds and Met sulphoxide residues are formed before or simultaneously with the formation of carbonyl groups in proteins [14]. Total content of carbonylated proteins was quantified by an ELISA method. As Figure 8 shows, the total amount of carbonylated proteins increased dramatically in freeze-dried cells kept at 35°C whereas the cells before freeze-drying (fresh cells) or the cells kept at -21°C did not show any significant difference in the content of carbonylated proteins. For the cells kept at 4°C, the amount of carbonylated proteins was moderately higher than the cells before freeze-drying.

To determine the effect of storage temperature on the extent of carbonylation of cellular proteins, 2D-DiGE followed by Western blotting was used. Immunoblotting of 2, 4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH)-derivatized proteins revealed that various proteins were slightly or heavily carbonylated in cells. Without DNPH derivatization, no spot was detected indicating that the proteins did not react with anti-DNP antibody. In addition, Cy3 and Cy5 dyes used for detection of sample proteins and internal standard proteins respectively, did not emit light when illuminated with 488 nm laser, thus there was no interference between total protein staining and antibody staining in the immunoblot procedure (Figure 9).

As shown in Figures 9 and 10, most of the high molecular weight proteins were carbonylated regardless of their pI whereas carbonylation process did not affect low molecular weight proteins or very basic ones.

By comparing the results of ELISA and western blotting, it was found that the results of Western blotting

for samples kept at -21 and 35°C are in accordance with the results of ELISA test. In contrast, a contradiction was observed for cells stored at 4°C. As already explained, a moderate increase in the amount of carbonylated proteins was observed by ELISA method for these cells, however no carbonylated protein were detected using 2D-DiGE followed by western blotting. It is believed that the latter method has significantly more sensitivity and specificity than all other total carbonyl assays such as spectrophotometric DNPH assay and ELISA method [14]. It should however be noted that there is a detection limit for oxidized proteins by immune-blotting methods, and oxidized proteins in low quantity cannot be detected easily [47]. Therefore, it can be assumed that some proteins may undergo very slight carbonylation which is not detectable by these methods. In addition, as already discussed, some other protein oxidation reactions may occur prior to carbonylation which may cause VBNC formation in cells. In order to identify the proteins that were oxidized when cells were kept at 35°C, 88 protein spots were selected and picked from preparative gel maps that had been matched to the 2-4-DNP-derivatized protein spots maps and subjected to identification by MSMS analysis. Proteins were identified in only 13 of the 88 selected spots from Figure 10 of which 10 contained carbonylated amino acids (Table 2). This low number technically results from the limited coverage of sequence (generally between 15 and 50%) that was achieved allowing only a small number of peptides to be analyzed. Thus, the lack of detection of carbonylated residues by MSMS analysis does not necessarily means that the identified proteins were not carbonylated. Lysine, Arginine, Threonine and Proline were identified as target amino acids where carbonylation occurred. Both structural proteins and enzymes were found among the carbonylated proteins.

Our results are considerably consistent with the studies showing the susceptibility of cell envelope protein and translational proteins to oxidative stress [47-50]. It has already been shown that exposure of *E. coli* to different stress conditions such as H₂O₂, iron overloading or super oxide generating compounds causes carbonylation of Elongation factor G (EF-G), outer membrane protein A (ompA), β-subunit of F0F1-ATPase, heat shock proteins and enolase. In addition, following such oxidative stress, the viability was affected to different extents depending on the type of exerted stress [47]. One group of carbonylated proteins identified in this study indeed belongs to the cell translation machine (Figure 10 and Table 2). SSU ribosomal protein S1 presumed function is to participate in the initiation of translation, possibly by binding mRNA and directing it to the ribosome [51]. There are also evidences that heat stress causes important irreversible reactions in the cell ribosomes; however more experimental evidence is still needed to determine whether or not ribosome is the critical

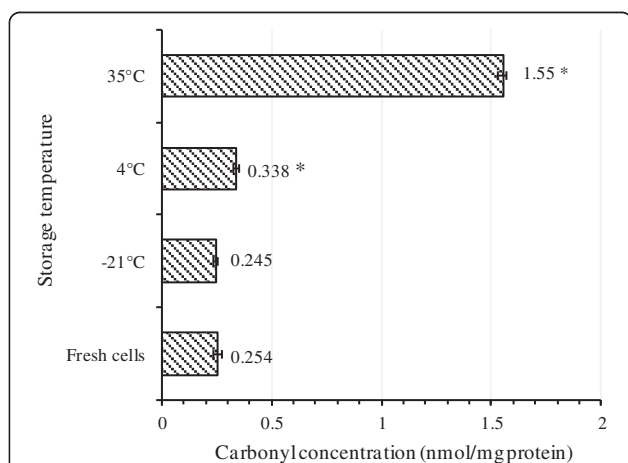


Figure 8 Quantification of total cellular carbonylated proteins by ELISA test. The amount of carbonylated proteins increased with storage temperature. For each kind of cell, at least three independent extractions were performed and carbonylated proteins were quantified in triplicates. Error bar represents the standard deviation. The asterisk shows significant difference ($p < 0.05$) between the carbonylated protein content of fresh cells and the carbonylated protein content of the cells kept at different temperature.

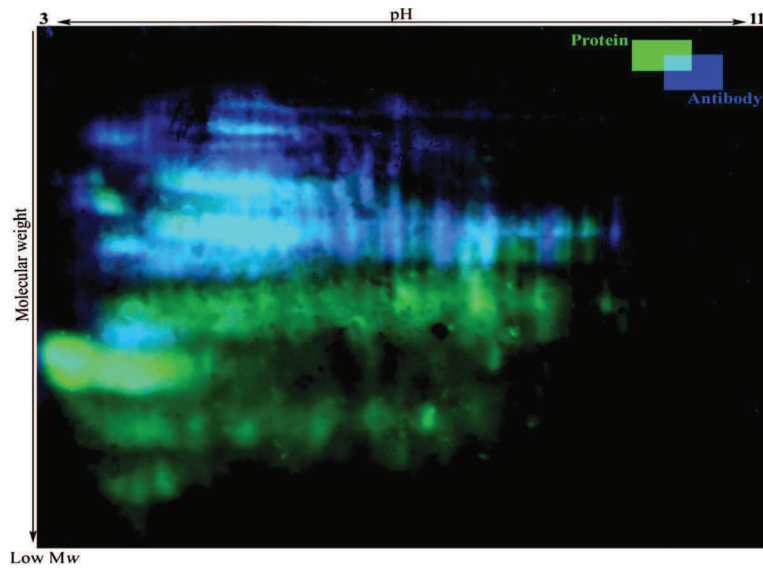


Figure 9 Protein carbonyl patterns of freeze-dried *A. senegalensis* kept at 35°C for 12 months. Total proteins were stained with Cy3 (green) and were separated by 2D-DiGE. Following transfer to PVDF membrane, the carbonyl groups in proteins were analyzed by immune-detection using a Cy2-coupled assay (blue).

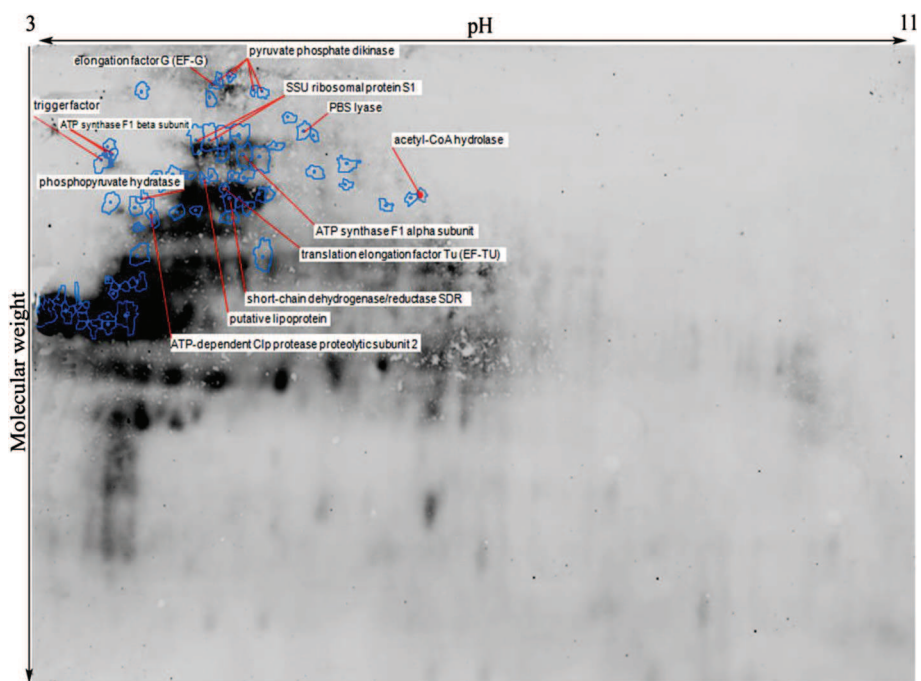


Figure 10 Identification of carbonylated proteins of freeze-dried *A. senegalensis* stored at 35°C after separation by 2D-electrophoresis. A preparative gel and a western blot gel containing the same sample were run in parallel. Anti-DNP antibody staining was realized on the WB to localize the carbonylated proteins spots that were then reported on the preparative gel image, as indicated by the blue spots. Eighty-eight proteins which underwent carbonylation were then picked from the preparative gel and analyzed by mass spectroscopy. Thirteen different proteins were identified as indicated on the gel image, of which 10 are carbonylated proteins with modifications in Arginine, Lysine, Proline and Threonine as listed on Table 2.

component responsible for the thermal death of microorganisms [11,52,53]. Thus, the obtained results can be used as an indication and also confirmation that during cell death at high storage temperature, ribosomal proteins are oxidized.

Other proteins involved in translation process which were also carbonylated during storage of cells at 35°C are Elongation factor G (EF-G) and Elongation factor TU (EF-TU). In the protein synthesis process by ribosome, loading of tRNA into the A site of 50S subunit is assisted by the elongation factor EF-Tu. Elongation factor G (EF-G) is involved in translocation of the tRNA holding the polypeptide [54]. Recently, it has been shown that the latter protein is very susceptible to oxidation during oxidative stress in *E. coli*. Under in vitro conditions, treatment of EF-G with H₂O₂ resulted in a complete loss of activity due to oxidation of cysteine residues [55]. In our previous study on storage of freeze-dried *A. senegalensis*, we have shown that cell envelope integrity was subjected to changes during freeze-drying process and storage at 35°C [4]. Those findings are consistent with the observations of the present study and some other studies stating that essential targets on which survival depends during ROS stress include membrane lipid integrity and ROS-susceptible proteins, including proteins required for faithful translation of mRNA [56].

Another group of oxidized proteins identified in this study is involved in cell energy generation. The α and β subunits of F1 ATP synthase were detected as heavily carbonylated proteins (Table 2). ATPases consist of two components, a multiprotein cytoplasmic complex called F1 that carries out the chemical function (ATP synthesis), connected to a membrane-integrated component called F0 that carries out the ion-translocating function [54]. As already mentioned, the respiration system of cells kept at 4 and 35°C was affected during storage (Figure 1). In addition, in our previous study on stored freeze-dried *A. senegalensis*, we observed that cellular respiration was impaired during storage at high temperature [4], thus the results of the present study suggest that respiration disability of these cells may be due to defective ATP synthase involved in respiration chain.

In our previous study on storage of freeze-dried *A. senegalensis*, we have also shown that the cell envelope integrity was subjected to changes during freeze-drying process and storage at 35°C [4]. Those findings are consistent with the observations of the present study and some other studies stating essential targets on which survival depends during ROS stress include membrane lipid integrity and ROS-susceptible proteins, including proteins required for faithful translation of mRNA [56]. According to the obtained results from the ELISA test and immunoblotting, with regard to the results of viability and culturability (Figure 2), it can be inferred that carbonylation of

proteins is not the main reason for the entrance of bacteria to VBNC at low storage temperature. Thus, it can be assumed that other deleterious reactions preceding carbonylation can lead to the death or VBNC formation at low temperatures.

Solubility of cellular proteins is reduced during storage

We found that solubility of cellular proteins decreases at high storage temperature (35°C). Total cellular proteins of stored cells were extracted using different solutions (low salt (LS), High Salt (HS), Ethanol, NaOH) and the amount of proteins in each fraction was determined by the Bradford method. As shown on Table 3, the amount of released proteins (RP) from cells kept at various temperatures after washing in phosphate buffer (KPB) did not show significant differences ($p > 0.05$, range 0.99), indicating that the discharge of proteins from damaged cells did not occur after storage. However, the amount of total soluble proteins which remained in the supernatant after ultra-sonication in low salt fraction (LS) decreased as the storage temperature increased. In other words, higher storage temperature caused protein insolubility. Storage of cells at lower temperature (-20, +4°C) for long time (12 months) did not cause protein insolubility in LS and NaOH fraction ($p > 0.05$, range 0.62) whereas storage at 35°C resulted in lower concentration of soluble proteins in LS and NaOH solutions ($p < 0.05$, range 0.004). A comparison between the cells kept at -21°C and 35°C shows that preservation of cells at 35°C caused about 21.3% insoluble proteins in LS fraction. As the moisture content of freeze-dried cells was constant during storage, it seems that the change in protein solubility was mainly related to the storage temperature.

One direct consequence of oxidative damage (such as carbonylation) to proteins is a change in protein solubility. High molecular-weight aggregates are formed when proteins are heavily carbonylated whereas the proteasomal system only moderately degrades carbonylated proteins [57]. Since carbonylation of proteins is an irreversible and irreparable oxidative damage [57,58], the generated

Table 3 Soluble protein contents (mg/g dried cells) of cells kept at different storage temperatures for 12 months

| Fractions | Storage temperature | | |
|-----------|---------------------|--------------|--------------|
| | -21°C | +4°C | +35°C |
| KPB | 9.54 ± 1.41 | 11.05 ± 3.33 | 11.14 ± 2.98 |
| LS | 74.1 ± 6.15 | 66.67 ± 4.05 | 58.75 ± 6.38 |
| HS | 0.74 ± 0.43 | 1.26 ± 0.21 | 1.25 ± 0.18 |
| Ethanol | 0.44 ± 0.18 | 0.39 ± 0.13 | 0.24 ± 0.12 |
| NaOH | 42.49 ± 0.71 | 41.99 ± 3.29 | 34.99 ± 5.65 |

KPB: 50 mM potassium phosphate buffer solution, pH 6.8; LS: low salt buffer; HS: high salt buffer. Ethanol 70% (v/v) and NaOH 0.1 M. Data are presented as mean ± SD.

aggregates accumulate as damaged or unfolded proteins [57]. An important question is whether protein insolubility which is observed in many aging processes (as well as in the present study) is also responsible for the death of bacterial cells into VBNC state. Whatever the causal relationship between protein oxidation and temperature, oxidative stress has been recognized to play a major role in cell viability by direct or indirect protein modifications [44]. Maisonneuve and coworkers have shown the presence of aggregated proteins in aerobically growing healthy *E. coli*. As the level of aggregation was correlated with the amount of ROS produced during growth, they finally concluded that aggregates may function as temporary trash organelles for detoxifications [59]. In addition, it has been shown that protein aggregates increase during population senescence of *E. coli*, and reach a maximum in stationary phase. The amount of protein aggregates is proportional to the ratio of dead cells [60]. Cao and et al. showed that viability of invading bacteria to plant cells was reduced through oxidation of special membrane transporters [61]. It was also shown that *E. coli* VBNC state during stationary phase is preceded by damage to proteins such as carbonylation of proteins which affects various bacterial compartments and proteins [62].

According to these results and in general agreements with earlier studies, it can be assumed that insolubility of proteins which can be one of the consequence of protein carbonylation increases during senescence of bacterial population in storage period, and thus can be considered as a cause of death.

Changes in fatty acid profile may enhance protein modification

As already discussed, the proteome of cells kept at 35°C showed trains of spots or streaking (Figures 5 and 6).

In the present study, the fatty acid content of fresh and freeze-dried cells was analyzed using gas chromatography

method. As Figure 11 shows, Palmitoleic acid (C16:1) and Oleic acid (C18:1n9c) were detected as the main unsaturated fatty acids in fresh cells before drying. Oleic acid (C18:1n9c) was the predominant fatty acid identified by this method. After storage of the cells at different temperatures, the fatty acid profile was subjected to changes, and the unsaturated fatty acid content of cells kept at 35°C decreased considerably ($p < 0.05$, range 0.002). In contrast, the percentage of some saturated fatty acids increased significantly ($p < 0.05$, range 0.001) in the cells kept at 35°C.

The same trend of fatty acid change was observed for cells kept at lower storage temperature; but, the extent of change was temperature dependent. The percentage of oleic acid moderately decreased during storage at 4°C ($p < 0.05$) and was even less reduced at -21°C ($p < 0.05$, range 0.004). Change of fatty acid ratio (unsaturated/saturated) of different lipid products during storage conditions have been reported by many authors [11,30,63-65]. It is well-known that the loss of bacterial viability during storage is increased following lipid oxidation [11,49]. α , β -unsaturated alkenals such as 4-hydroxynonenal produced during the peroxidation of polyunsaturated fatty acids have been shown to react with proteins [22] and to form stable covalent thioether adducts carrying a carbonyl function [44].

Considering the storage condition of our samples (normal atmosphere, low and high temperature) and the intrinsic factors in the formulation (presence of glucose, and spent growth culture media), several sources of ROS formation might exist. Formation of ROS during freeze-drying process and storage of freeze-dried products has indeed been reported [34,35]. At low moisture content, non-enzymatic reactions are known to occur, such as Amadori and Maillard reactions [66], as well as lipid peroxidation [34,66]. Enzymatic oxidation of lipids through lipoxygenase is also possible in low water activity (about 0.4) [66]. Indeed, it is widely accepted that presence of lipid moiety, specially unsaturated lipids may enhance free

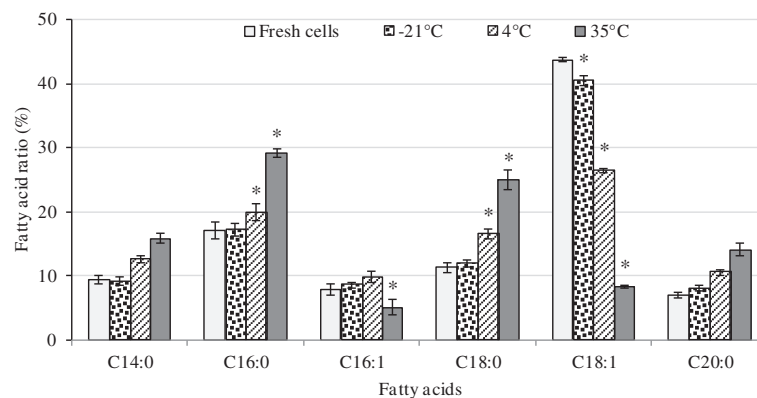


Figure 11 Fatty acid content of freeze-dried *A. senegalensis* cells stored at different temperatures for 12 months. The ratio of unsaturated fatty acid to total extracted fatty acid decreased during storage at high temperature. Error bar shows the standard deviation. Asterisk shows the significant difference ($p < 0.05$) between the content of fatty acid for fresh cells and stored cells.

radical-mediated oxidative damage [34,67] it has also been shown that presence of lipids in freeze-drying formulation can enhance the ROS formation during storage [34].

Conclusions

This work demonstrated that the protein content of freeze-dried *A. senegalensis* is subjected to different changes during storage period. In addition, storage temperature affects the total cellular proteome significantly. Although many studies attempted to improve viability in bacterial starter, modifications of bacterial cellular proteins during storage of freeze-dried starter have not been considered in details. An association between storage temperature and protein carbonylation was established in our study. Moreover, we showed that samples mainly composed of dead cells contained higher amount of carbonylated proteins including some critical proteins such as ribosomal proteins or proteins involved in energy generation. Moreover, since protein carbonylation is a reaction which normally occur after other oxidative reactions, it seems that some other reactions (such as lipid peroxidation or protein lipidation and glycation) happen prior or in parallel to carbonylation. These reactions may be involved in VBNC formation even at very low storage temperature.

Formation of fluorescent substances in the stored cells, the changed pattern of 2D-DiGE and the modifications in composition of cellular fatty acids can be considered as indications of Maillard reaction progression, AGEs formation and protein lipidation. Therefore, from a practical point of view, it is first suggested to decrease the residues of spent growth medium and the metals content in the freeze-drying formula (e.g. by washing cells with appropriate buffers before freezing process to eliminate the fermentation supernatant). Secondly, because a part of the cells already has been entered into VBNC state during drying process, it seems that the deterioration reactions were first initiated during freeze-drying process and enhanced during storage. Accordingly, to diminish the deterioration reactions during storage period, any process that may causes bacterial injuries during fermentation and freeze-drying process must be avoided. Finally, since the deterioration reactions are considerably temperature dependent it is recommended to keep the freeze-dried bacteria at low temperature.

Materials and methods

Microorganisms and production of biomass

A. senegalensis CWBI-B418T (=LMG 23690 T = DSM 18889 T), a thermo-tolerant acetic acid bacterium, isolated from mango fruit in Walloon Center of Industrial biology (CWBI), was used through this study [8].

A. senegalensis was grown in a 15 L laboratory-scale bioreactor (Bio Biolaffite, France) containing glucose (20 g/l), yeast extract (7.5 g/l), MgSO₄·7 H₂O (1 g/l),

and (NH₄)₂HPO₄ (1 g/l), K₂HPO₄ (1 g/l). The fermentation was performed under conditions previously described [4].

Production and storage of freeze-dried cells

Production of freeze-dried starter culture was performed as previously described [4] except that the cells were not mixed with mannitol. Instead, the cells were mixed with culture supernatant to reach the right dry weight. Freeze-dried cells were crushed and then dispensed into glass vials. The vials were sealed with septum and caps. They were then kept at three different temperature (-21, 4 and 35°C) up to 12 months in the dark.

Determination of total cell number and culturable cells after freeze-drying process

Total cell number of fresh cells and rehydrated cells was determined by using Brucker slides (Lo-Laboroptic Ltd, Lancing, UK). Briefly, 100 mg of freeze-dried cells were resuspended in 10 ml of GY medium. After 5 min of incubation at 30°C, it was mixed vigorously. The number of cells was then counted by using phase contrast microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Culturable cells in freeze-dried samples were determined by using spread plate technique. GY medium was used as the medium for enumeration of culturable cells. GY agar medium contained: glucose 20 g/l, yeast extract 7.5 g/l, MgSO₄·7 H₂O 1 g/l, and (NH₄)₂HPO₄ 1 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, agar 15 g/l. pH of medium was set at 6.0 ± 0.05.

GY broth (the same components as GY agar) were used as rehydration medium and diluting medium as well.

Determination of total dehydrogenase activity of stored cells

5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (CTC) (λ_{ex} 450 nm; λ_{em} 630 nm) and thiazole orange (TO) (λ_{ex} 509 nm; λ_{em} 530 nm) were used to determine the total dehydrogenase activity. CTC is a redox dye which is converted to a solid formazan dye by cellular respiratory chain. Solid formazan emits red fluorescence.

A stock solution of 50 mM CTC in filtrated deionized water, and a stock solution of 42 µmol/L TO in DMSO were prepared. The TO solution was diluted 10 times in DMSO just before staining of cells [4,5]. All experiments were performed using a BD FACSCalibur™ flow cytometer (Becton, Dickinson, USA) equipped with an air-cooled argon laser and a red diode laser. Data were analyzed using BD CellQuest™ Pro software (Becton, Dickinson, USA). Instrument settings and staining procedure were performed as already described [4]. Briefly, freeze-dried *A. senegalensis* were rehydrated and harvested by centrifugation, and the pellets were washed twice with saline phosphate buffer solution containing 18 mM glucose (PBSG). 45 µl of CTC solution was mixed with 450 µl of

cell suspension and incubated at 30°C for 90 min on shaker (130 rpm) in the dark, then 5 µl of diluted TO was added to each sample and incubation was continued for 5 min at 30°C in the dark before passing the samples to FACS Cytometry.

Assessment of fluorescent substance formation in stored cells

Auto-fluorescence of cells was detected according to the procedure explained by Sheehy [68]. Briefly, freeze-dried cells were suspended in PBS (100 mM, pH 7.4) for 10 min and washed three times to remove extracellular components. Then, the cell suspensions were delivered to BD FACSCalibur™ flow cytometer (Becton, Dickinson, USA) at low flow rate, corresponding to 500–700 events/s (in the Forward Scatter vs. Side Scatter plot). The autofluorescence signal was collected on FL3. For each cell population, three independent samples were prepared and introduced to the FACS. The total counted events for each sample were set on 55000.

Sequential extraction of cellular proteins

30 mg of freeze-dried cells were suspended in 10 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6.8), mixed vigorously and incubated at 25°C for 10 min, and then the cells were washed with the phosphate buffer solution twice. Washed cells were re-suspended in 1 ml of 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl buffer (pH 8.3) and sonicated (50% power, 5 cycles) for 135 seconds on ice. Afterwards, the sequential extraction was performed in protein free Eppendorf® tubes as follows: 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl buffer (pH 8.3) (Low Salt, LS) for 20 min on ice (twice); 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl buffer (pH 8.3) (High Salt, HS) for 20 min on ice; 70% (v/v) ethanol for 30 min at 65°C (E); and 0.1 M NaOH solution for 30 min on ice. At each extraction stage, 0.6 µl of protease inhibitor cocktail for general use (Sigma-Aldrich) was added to the solutions. Supernatants were obtained after 10 min centrifugation (14,000 g and 4°C), and then the amount of soluble protein in each fraction was determined by Bradford method.

2D-DiGE analysis of freeze-dried cells stored at different temperature

2D-DiGE proteomic analysis has been performed on freeze-dried cells kept at different temperatures for 12 months according to the procedures already used and published by Wislet-Gendebien et al. [69]. Proteins were extracted in a lysis buffer containing 7 M urea (GE Healthcare, Diegem, Belgium), 2 M thio-urea (GE Healthcare), 30 mM Tris (pH 8.5) (GE Healthcare) and 2% ASB14 (Sigma-Aldrich). The supernatant containing the extracted solubilized proteins was precipitated (2-D Clean-Up Kit; GE Healthcare) and proteins resolubilized in lysis buffer were quantified using RC-DC Protein

Assay (Bio-Rad). Each 25 µg of sample proteins was labeled with 200 pmol CyDye (GE Healthcare), either Cy3 or Cy5, and left for 30 min in the dark. The labeling reaction was stopped by adding 10 mM lysine for 10 min at 4°C. An internal standard was prepared by mixing equal quantities of all the experimental samples and was labeled with Cy2. Then, all the samples within the experiment were mixed in pairs together with 25 µg of the labeled internal standard and were separated by isoelectric focusing using pH 3–11 (24 cm) IPG strips in an Ettan IPGphor focusing system (GE Healthcare) in the first dimension.

Before initiating the second dimension step, proteins in IPG strips were reduced for 15 min in an equilibration buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS) containing 1% DTT and then they were alkylated in the same equilibration buffer containing 5% iodoacetamide. IPG strips were placed on top of classical 12.5% SDS-PAGE gels and the electrophoretic migration was completed in an Ettan Dalt apparatus (GE Healthcare) at 2 W/gel for 30 min, and then 25 W for 18 h. After scanning the gels with a Typhoon 9400 Laser Scanner (GE Healthcare) at three different wavelengths corresponding to the different CyDyes, 2-D gel analysis software (DeCyder version 7.0; GE Healthcare) was used for spot detection, spot quantification relative to the corresponding spot in the internal standard and gel matching. Protein spots that showed a significant variation in their abundance of at least twofold (Student's t test, $p < 0.05$) between storage conditions were selected for further identification and were automatically picked from preparative gels run in parallel with the Ettan Spot Picker (GE Healthcare). Proteins in spots were identified by MALDI-TOF-MS-MS at the GIGA-Research Proteomic platform. Gels plugs were subjected to automatic tryptic digestion (PROTEINEER dp automated digester; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Gel pieces were washed three times in 50 mM NH_4HCO_3 followed by 50% ACN/50 mM NH_4HCO_3 . Two other washes were carried out with 100% ACN to dehydrate the gels. In-gel digestion was performed with freshly activated trypsin (Roche, Basel, Switzerland) at a concentration of 10 ng l^{-1} in 50 mM NH_4HCO_3 /5% ACN. After rehydration of the gel pieces at 8°C for 60 min, tryptic digestion was carried out at 30°C for 4 h. The resulting digested peptides were extracted with 1% trifluoroacetic acid (TFA) for 30 min at 20°C with occasional shaking. A volume of 3 µl of protein digests was adsorbed for 3 min on Prespotted AnchorChip plates with *o*-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) as a matrix, using the PROTEINEER dp automat. Then the spots were briefly desalted with 10 mM dihydrogen ammonium phosphate in 0.1% TFA. MS fingerprints of the samples were acquired using the Ultraflex II MALDI-TOF-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) in the

mass range 700–3,500 Da. The Peptide Mass Fingerprinting (PMFs) was searched against the NCBI database. The variable and fixed modifications were methionine oxidation and cysteine carbamylation, respectively, with a maximum number of missed cleavages of 1. Mass precision tolerance error was set to 100 ppm. Peaks with the highest intensities, obtained in TOF/MS mode, were next analyzed by LIFT MS/MS. Proteins were identified with the Biotoools 3.0 software (Bruker Daltonics) using the Mascot search engine (Matrix Science, Boston, MA, USA).

Quantification of carbonylated proteins

Carbonyl assay was performed according to the procedure explained in the manual of protein carbonyl ELISA kit (Enzo® Life science catalog # ALX-850-312-KI01). Briefly, after extraction of total cellular proteins in extraction buffer (Tris 100 mM pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100, 0.5% Sodium Deoxycholate) by sonicator (50% power, 6 cycles, 5 min, on ice) and removal of DNA by streptomycin solution, the extracted proteins were reacted with Dinitrophenyl hydrazine (DNP); then the proteins were nonspecifically adsorbed to an ELISA plate. Unconjugated DNP and non-protein constituents were washed away. The adsorbed proteins were probed with biotinylated anti-DNP antibody followed by streptavidin-linked horseradish peroxidase. Adsorbances were related to a standard curve prepared with serum albumin containing increasing proportions of hypochlorous acid-oxidized proteins that has been calibrated colorimetrically.

Determination of carbonylated proteins by western blotting

For detection and identification of carbonylated proteins in freeze-dried cells, a modified 2D-DiGE analysis (200 µg of one individual sample per gel together with 25 µg internal standard) was run, followed by western blotting. 2D-DiGE procedure was performed as mentioned in the previous section except that before running the second dimension, the IPG strips were incubated in a 10 mM 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) solution for 20 min at 25°C. The IPG strips were then rinsed with Tris base/glycerol (2 M/30% (v/v)) solution and equilibration buffer. Each strip was then treated for reduction/alkylation and the second dimension of electrophoresis was run as mentioned above.

Three gels prepared from each cell samples (nine gels for the three storage temperature) were transferred to activated PVDF membranes. Carbonyl groups in the transferred derivatized proteins were immunodetected with anti-2,4-DNP primary antibody (1/500) overnight at 4°C in skimmed milk-TTBS buffer. Then, the membranes were washed three times in TTBS buffer and incubated with the second antibody (1/2500) at room temperature for 1 h. Finally, after three washings with TBS buffer, the membranes were scanned with a Typhoon

9400 Laser Scanner (GE Healthcare) at three different wavelengths corresponding to the different CyDyes and Anti-DNP antibody. 2-D gel analysis software (DeCyder version 7.0; GE Healthcare) was used for spot detection, gel matching and spot quantification relative to the corresponding spot in the internal standard.

Total fatty acid analysis

Analysis of the fatty acid content was performed after trans-esterification of extracted fatty acid. Briefly, 100 mg of freeze-dried cells was suspended in 10 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6.8), mixed vigorously and incubated at 25°C for 10 min, and then the cells were washed twice with the same phosphate buffer solution. The washed cells were then mixed with 300 µl of a solution containing Chloroform/Methanol (2:1). After addition of glass beads to the cell suspension, the cells underwent three cycle of heat shock (Liquid nitrogen-37°C). They were then mixed vigorously for 10 min. The supernatant was mixed with 1 ml of methylation mixture (33% methanolic 3 N HCl, 67% methanol, 10 µg/ml BTH), and methylation was performed at 85°C for 35 min. After cooling of the samples, 900 µl of 0.9% NaCl solution was added to each sample, and finally the lipid phase was dissolved in Heptan.

The gas chromatography analysis of the fatty acids contents was performed with a GC-2010 Shimadzu Gas chromatograph equipped with a SGE-capillary BPX70 column (30 m length). Supelco-FAME mix-37 (Sigma–Aldrich) was used as standard for fatty acids identifications and quantifications.

Statistical analysis

All the experiments were performed at least in three independent replicates. Kolmogorov-Smirnov normality test was used for checking the normality of data. The test showed that in all the experiments, the data are approximately normally distributed. Two-Factors Repeated Measures ANOVA was performed on the data by R.3.0.10 Software. After doing ANOVA, we performed *Duncan's* multiple range test (MRT) to investigate significant levels for the difference between any pair of means, regardless of whether a significant F resulted from ANOVA.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RS designed the experimental setup and carried out the fermentation, freeze-drying process, flow cytometry and proteomic analyses. RS also prepared the manuscript, figures and tables. RZ contributed in fermentation, ELISA analysis and helped in the revision of the manuscript. AB developed the protocol for Immunoblotting techniques. MB participated in the statistical analysis and interpretation of the data. PL supervised the proteomic analysis, and revised the manuscript. PT and FD supervised the whole work and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Sandra Ormenese and Mr. Raafat Stephan for their help, scientific and technical advice during flow-cytometric analyses. PL is a Senior Research Associate at the National Fund for Scientific Research (FNRS), Belgium. This work was supported by Iranian Ministry of Science, Research and Technology (MSRT) and also by the Belgian Fund for Medical Scientific Research (FRSM).

Author details

¹Walloon Center of Industrial Biology, University of Liège, Liège, Belgium. ²Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran. ³GIGA-Neuroscience, University of Liège, Liège, Belgium. ⁴Department of Statistics, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran. ⁵Bio-industry Unit, Gembloux Agro-Bio Tech, Gembloux, University of Liège, Liège, Belgium.

Received: 7 October 2013 Accepted: 7 February 2014

Published: 19 February 2014

References

- Holzappel WH: Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int J Food Microbiol* 2002, **75**:197–212.
- Sokollek SJ, Hammes WP: Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. *Syst Appl Microbiol* 1997, **20**:481–491.
- Azuma Y, Hosoyama A, Matsutani M, Furuya N, Horikawa H, Harada T, Hirakawa H, Kuhara S, Matsushita K, Fujita N, Shirai M: Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:5768–5783.
- Shafiei R, Delvigne F, Thonart P: Flow-cytometric assessment of damages to *Acetobacter senegalensis* during freeze-drying process and storage. *Acetic Acid Bacteria* 2013, **2**(s1):e10.
- Shafiei R, Delvigne F, Babanezhad M, Thonart P: Evaluation of viability and growth of *Acetobacter senegalensis* under different stress conditions. *Int J Food Microbiol* 2013, **163**:204–213.
- Gullo M, Mamlouk D, De Vero L, Giudici P: *Acetobacter pasteurianus* strain AB0220: cultivability and phenotypic stability over 9 years of preservation. *Curr Microbiol* 2012, **64**:576–580.
- Ndoye B, Weekers F, Diawara B, Guiro AT, Thonart P: Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa. *J Food Eng* 2007, **79**:1374–1382.
- Ndoye B, Lebecque S, Dubois-Dauphin R, Tounkara L, Guiro AT, Kere C, Diawara B, Thonart P: Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme Microb Technol* 2006, **39**:916–923.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P: Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol Prog* 2007, **23**:302–315.
- Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y: Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* 2000, **41**:251–255.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P: Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J Appl Microbiol* 2008, **105**:1–13.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G: Preservation of micro-organisms by drying: a review. *J Microbiol Methods* 2006, **66**:183–193.
- Lievens LC, Van't Riet K: Convective drying of bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1994, **51**:72–86.
- Shacter E: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000, **32**:307–326.
- Lund MN, Heinonen M, Baron CP, Estévez M: Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol Nutr Food Res* 2011, **55**:83–95.
- Ragoonanan V, Aksan A: Protein Stabilization. *Transfus Med Hemother* 2007, **34**:246–252.
- Fredrickson JK, Li SMW, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Zhai M, Solloway HM, Scholten JC, Brown MG, Balkwill DL, Daly MJ: Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *ISME J* 2008, **2**:393–403.
- Castellón M, Matiacevich S, Buera P, Maldonado S: Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage. *Food Chem* 2010, **121**:952–958.
- Claudette Job LR, Lovigny Y, Belghazi M, Job D: Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* 2005, **138**:790–802.
- Linares MA, Marín-García P, Méndez D, Puyet A, Bautista JM: Proteomic approaches to identifying carbonylated proteins in brain tissue. *J Proteome Res* 2011, **10**:1719–1727.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A: Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003, **9**:169–176.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A: Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007, **58**:459–481.
- Nystrom T: Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 2005, **24**:1311–1317.
- Jung T, Höhn A, Grune T: Lipofuscin: Detection and quantification by microscopic techniques. In *Advanced Techniques in Oxidative Stress II*. 594th edition. Edited by Armstrong D. Humana Press, Springer New York Dordrecht Heidelberg London; 2010:173–193. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-60761-410-4.
- Baynes JW: The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol* 2001, **36**:1527–1537.
- Murthy UMN, Liang Y, Kumar PP, Sun WQ: Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata*. *Physiol Plant* 2002, **115**:213–220.
- Murthy UMN, Kumar PP, Sun WQ: Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *J Exp Bot* 2003, **54**:1057–1067.
- Kurtmann L, Skibsted LH, Carlsen CU: Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *J Agric Food Chem* 2009, **57**:6736–6741.
- Nocker A, Fernández PS, Montijn R, Schuren F: Effect of air drying on bacterial viability: a multiparameter viability assessment. *J Microbiol Methods* 2012, **90**:86–95.
- Coulibaly I, Amenan AY, Lognay G, Fauconnier ML, Thonart P: Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. *Appl Biochem Biotechnol* 2009, **157**:70–84.
- Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, Ryser ET: Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Prot* 2009, **72**:1121–1138.
- Hoefman S, Van Hoorde K, Boon N, Vandamme P, De Vos P, Heylen K: Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria. *PLoS One* 2012, **7**:e34196.
- Vriezen JA, de Bruijn FJ, Nusslein KR: Desiccation induces viable but non-culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *AMB Express* 2012, **2**:6.
- Molina MD, Anchordoquy TJ: Degradation of lyophilized lipid/DNA complexes during storage: the role of lipid and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2008, **1778**:2119–2126.
- Molina MC, Anchordoquy TJ: Metal contaminants promote degradation of lipid/DNA complexes during lyophilization. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2007, **1768**:669–677.
- Narayana Murthy UM, Sun WQ: Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *J Exp Bot* 2000, **51**:1221–1228.
- Cohen-Or I, Katz C, Ron EZ: AGEs secreted by bacteria are involved in the inflammatory response. *PLoS One* 2011, **6**:e17974.
- Markowicz Bastos D, Monaro E, Siguemoto E, Séfóra M: Maillard reaction products in processed food: Pros and Cons. In *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. Edited by Valdez B; 2012.
- Kurtmann L, Carlsen CU, Skibsted LH, Risbo J: Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): influence of physical state on bacterial survival during storage. *Biotechnol Prog* 2009, **25**:265–270.
- Marshall BJ, Coote GG, Scott WJ: Some factors affecting the viability of dried bacteria during storage in vacuo. *Appl Microbiol* 1974, **27**:648–652.
- Löster K, Kannicht C: 2-Dimensional electrophoresis: detection of Glycosylation and influence on spot pattern. In *Post-translational Modifications of Proteins*. 446th edition. Edited by Kannicht C. Totowa Nj: Humana Press; 2008:199–214. *Methods in Molecular Biology*™.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003, **329**:23–38.

43. Oliver JD: **The viable but nonculturable state in bacteria.** *J Microbiol* 2005, **43 Spec No**:93–100.
44. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J: **Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species.** *Int Microbiol* 2000, **3**:3–8.
45. Møller IM, Rogowska-Wrzesinska A, Rao RSP: **Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective.** *J Proteomics* 2011, **74**:2228–2242.
46. Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies K: **Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells.** *J Gerontol A: Biol Med Sci* 2001, **56**:B459–B467.
47. Tamarit J, Cabiscol E, Ros J: **Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress.** *J Biol Chem* 1998, **273**:3027–3032.
48. Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J: **Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem* 2000, **275**:27393–27398.
49. Teixeira P, Castro H, Kirby R: **Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage.** *Lett Appl Microbiol* 1996, **22**:34–38.
50. Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M: **Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world.** *Philos Trans Royal Soc B: Biol Sci* 2007, **362**:1119–1134.
51. Wilson DN, Gupta R, Mikolajka A, Nierhaus KH: **Ribosomal proteins: Role in ribosomal functions.** In *eLS*. Chichester, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
52. Teixeira P, Castro H, Mohacsi-Farkas C, Kirby R: **Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress.** *J Appl Microbiol* 1997, **83**:219–226.
53. Fu N, Chen XD: **Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes.** *Food Res Int* 2011, **44**:1127–1149.
54. Madigan Michael T, Martinko John M, Stahl David A, Clark David P: **Molecular biology of bacteria.** In *Brock biology of microorganisms*. 13th edition; 2012:150–235.
55. Nagano T, Kojima K, Hisabori T, Hayashi H, Morita EH, Kanamori T, Miyagi T, Ueda T, Nishiyama Y: **Elongation factor G is a critical target during oxidative damage to the translation system of *Escherichia coli*.** *J Biol Chem* 2012, **287**:28697–28704.
56. Avery SV: **Molecular targets of oxidative stress.** *Biochem J* 2011, **434**:201–210.
57. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A: **Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression.** *J Cell Mol Med* 2006, **10**:389–406.
58. Maisonneuve E, Frayssé L, Lignon S, Capron L, Dukan S: **Carbonylated proteins are detectable only in a degradation-resistant aggregate state in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2008, **190**:6609–6614.
59. Maisonneuve E, Frayssé L, Moinier D, Dukan S: **Existence of abnormal protein aggregates in healthy *Escherichia coli* cells.** *J Bacteriol* 2008, **190**:887–893.
60. Maisonneuve E, Ezraty B, Dukan S: **Protein aggregates: an aging factor involved in cell death.** *J Bacteriol* 2008, **190**:6070–6075.
61. Cao B, Liu J, Qin G, Tian S: **Oxidative stress acts on special membrane proteins to reduce the viability of *Pseudomonas syringae* pv tomato.** *J Proteome Res* 2012, **11**:4927–4938.
62. Desnues B, Cuny C, Gregori G, Dukan S, Aguilaniu H, Nystrom T: **Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells.** *EMBO Rep* 2003, **4**:400–404.
63. Castro HP, Teixeira PM, Kirby R: **Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying.** *J Appl Microbiol* 1997, **82**:87–94.
64. Pimpo MT, Seri S: **Study of lipid changes in freeze-dried fish during storage: I: the interaction of relative humidity and tissue lipids.** *Boll Soc Ital Biol Sper* 1992, **68**:735–739.
65. Yao AA, Coulibaly I, Lognay G, Fauconnier ML, Thonart P: **Impact of polyunsaturated fatty acid degradation on survival and acidification activity of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **79**:1045–1052.
66. Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C: **ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation.** *Plant J* 2007, **50**:452–465.
67. Araseki M, Yamamoto K, Miyashita K: **Oxidative stability of polyunsaturated fatty acid in phosphatidylcholine liposomes.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2002, **66**:2573–2577.
68. Sheehy MRJ: **A flow-cytometric method for quantification of neurolipofuscin and comparison with existing histological and biochemical approaches.** *Arch Gerontol Geriatr* 2002, **34**:233–248.
69. Wislet-Gendebien S, Laudet E, Neirinckx V, Alix P, Leprince P, Glejzer A, Poulet C, Hennuy B, Sommer L, Shakhova O, Rogister B: **Mesenchymal stem cells and neural crest stem cells from adult bone marrow: characterization of their surprising similarities and differences.** *Cell Mol Life Sci* 2012, **69**:2593–2608.

doi:10.1186/1475-2859-13-26

Cite this article as: Shafiei et al.: The role of protein modifications in senescence of freeze-dried *Acetobacter senegalensis* during storage. *Microbial Cell Factories* 2014 **13**:26.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

