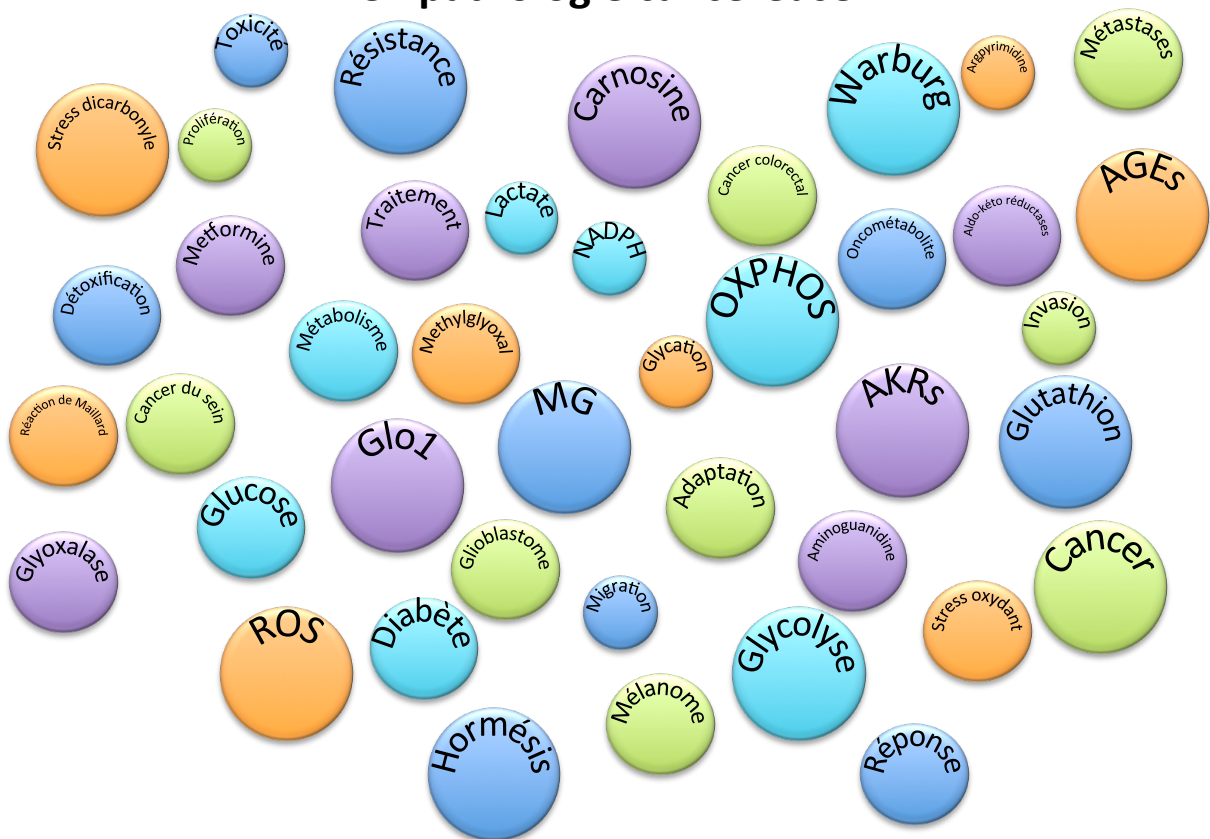


Laboratoire de Recherche sur les Métastases
Pr. Vincent Castronovo

Contribution à l'étude du stress dicarboxyle en pathologie cancéreuse



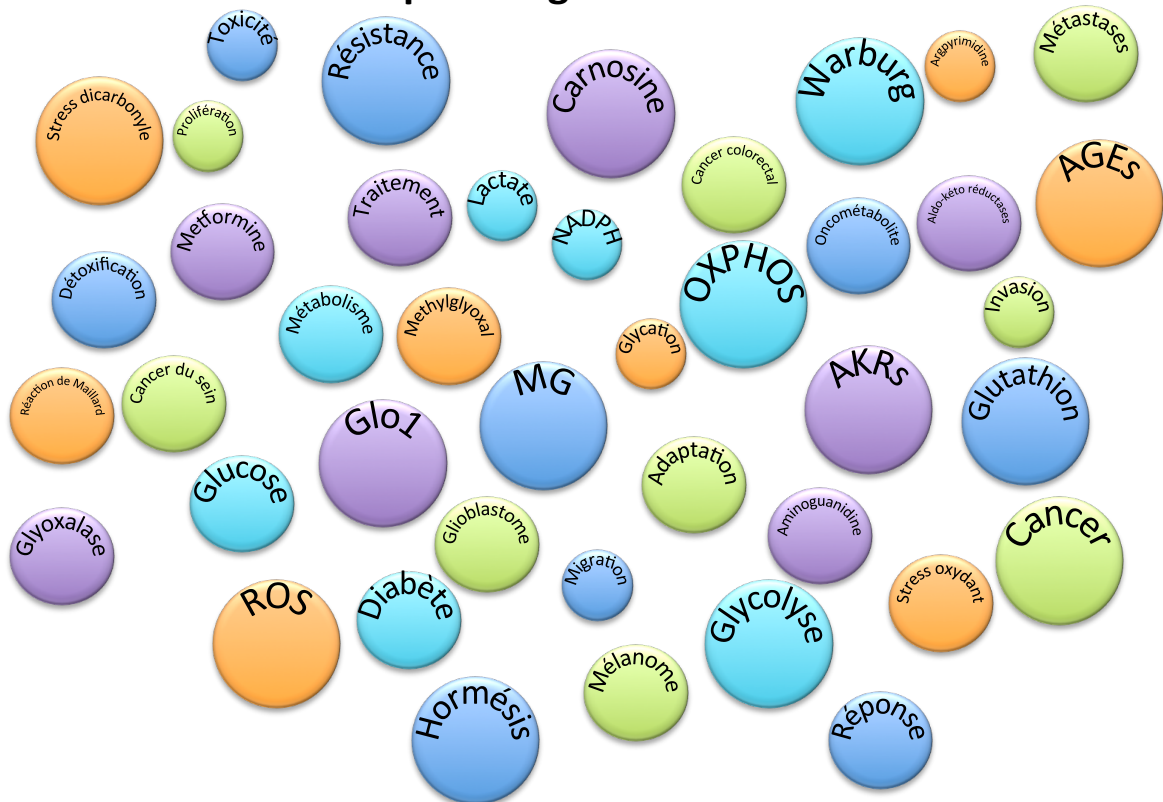
Florence Durieux

Thèse soumise en support de la candidature au grade de
docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteurs : Dr. Akeila Bellahcène et Pr. Vincent Castronovo

Année académique 2016-2017

Contribution à l'étude du stress dicarbone en pathologie cancéreuse



Florence Durieux

Thèse soumise en support de la candidature au grade de
docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteurs : Dr. Akeila Bellahcène et Pr. Vincent Castronovo

Année académique 2016-2017

Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre

Marie Curie

Remerciements

Après ces 4 années de thèse, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse de m'avoir suivie ainsi qu'avec les autres membres du jury d'avoir pris le temps de lire et de commenter ce manuscrit.

Je remercie mes promoteurs de thèse. Le Professeur **Vincent Castronovo**, de m'avoir accueillie dans son laboratoire dès mon mémoire de fin d'étude. Votre exigence et votre capacité à intégrer des connaissances et faire des liens entre des concepts sont des qualités que j'admire chez vous et qui reflètent votre âme de chercheur.

Je remercie le Docteur **Akeila Bellahcène** de m'avoir suivie au quotidien. Votre passion pour la recherche est communicative et inspirante. Nous avons partagé des discussions et réflexions qui sortaient parfois de notre question de départ mais qui ont toujours été enrichissantes.

Je tiens également à remercier le Docteur **Olivier Peulen**, notamment pour sa grande pédagogie, ses conseils et son aide. Merci également au Docteur **Andrei Turtoi** pour ses critiques stimulantes au cours des réunions.

Merci au Docteur **Paul Peixoto**, le « Papa » du labo. Tu m'as guidée avec gentillesse et efficacité pour une partie de ce travail et je te remercie pour ta pédagogie et ton amitié.

Merci au Docteur **Arnaud Blomme**, docteur ès souris ! Tu es un modèle de compétence et d'adaptabilité. Merci pour ton calme et ta sympathie.

Un tout grand et particulier merci au Docteur **Marie-Julie Nokin**. Tu as eu la patience de me prendre sous ton aile, à l'improviste, pendant mon mémoire. Tu m'as tout appris à mes débuts au labo et nous avons continué à apprendre ensemble plus tard. J'ai été ravie de travailler avec toi pendant ces années, je pense que nous faisons une bonne équipe. Merci pour ton amitié, tes conseils ainsi que ceux de **Michaël**. Tu incarnes pour moi l'exemple du chercheur doué, tenace et accompli. Je vous souhaite à Michaël et toi bonne chance et beaucoup de succès sur votre chemin.

Merci aux autres membres passés et présents du laboratoire et de la « MG Team ». Le Docteur **Barbara Chiavarina** pour ses conseils. Le Docteur **Aurélie Henry** pour sa complicité. Merci au docteur **Maude Gabriel** et à **Christine Monseur**. Merci à **Justine Bellier** pour sa gentillesse et son aide. Merci et bonne chance à **Eva Lardé**.

Merci aussi au Docteur **Brunella Constanza** pour ses conseils, son aide et son amitié. Merci aux techniciens du laboratoire, **Pascale Henneaux**, **Naïma Maloujahmoum**, **Selina Nüchtern** et **Vincent Hennequière**. Merci pour votre aide experte et vos conseils. Merci Naïma pour ta bonne humeur, ton relativisme et ta sympathie. Merci Vincent pour ta disponibilité, d'avoir arrangé tous les problèmes techniques et aussi pour ton soutien, tes conseils et ton amitié. Merci à **Véronique Goffin**. Tu es indispensable au fonctionnement de ce labo et tu prends bien soin de nous.

Merci au Professeur **Philippe Karoyan** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à Paris. Cette expérience en « territoire inconnu » m'a vraiment enrichie. Merci à **Thomas Denèfle** de m'avoir guidée et de m'avoir appris à être une apprentie chimiste. Merci à **Lucrezia Chappuit** et toute l'équipe chimie aux Ulysses pour leur bon accueil et leur humour. J'ai été ravie d'amener la Belgique et son chocolat chez vous.

Merci aux membres des plateformes du GIGA, les collaborateurs et les membres d'autres labo avec qui j'ai eu le plaisir de travailler ou de passer de bons moments.

Je remercie mes amis et les membres de ma famille d'avoir gardé un œil bienveillant sur l'avancée de ma thèse et de m'avoir encouragée, même si mon quotidien au labo vous paraissait parfois très loin du vôtre.

Papa, maman, merci. Votre amour et votre exigence ont forgé ma personnalité. Merci de m'avoir soutenue, réconfortée et de parfois m'avoir poussée par delà mes éternelles indécisions et insécurités. Vous êtes et restez forts et m'avez transmis votre énergie. Merci à **Nicolas**, mon frère, notre complicité et la confiance que nous partageons sont un bonheur pour moi.

Finalement, merci à **Björn**, mon amour. Merci de m'avoir écoutée, encouragée et soutenue. Merci d'avoir parfois joué l'avocat du diable pour m'aider à voir plus clair et pour ta conversation stimulante. Merci de partager ta vie avec moi. Tu m'apportes la force et la conviction qui me manquent parfois et j'espère être un aussi bon soutien pour toi.

Merci à tous et bon vent !

Florence

Avec le soutien de l'Université de Liège, du Fonds National de la Recherche Scientifique, du Télévie, du Fonds Léon Fredericq et du Centre Anti-Cancéreux.

Table des matières

Liste des abréviations

<u>I. Introduction</u>	<u>1</u>
1. Cancer	1
2. Cancer et métabolisme	2
2.1 Métabolisme du glucose et effet Warburg	
2.2 Métabolisme de la glutamine, cataplérose et anaplérose	
2.3 Métabolisme des lipides	
2.4 Régulation du métabolisme par les oncogènes	
2.5 Régulation du métabolisme par l'environnement	
3. Méthylglyoxal	15
3.1 Production du MG	
3.2 Glycation, MG-AGEs et stress dicarbone	
3.3 Détoxification du MG	
3.3.1 Le système des glyoxalases	
3.3.2 Les aldose réductases	
3.3.3 Les aldéhydes déshydrogénases	
3.3.4 La 2-oxoaldéhyde déshydrogénase	
3.4 « MG-scavengers » et modulateurs de l'activité Glo1	
3.4.1 Molécules capables de capturer le MG ou « MG-scavenger »	
3.4.2 Inhibition de Glo1	
3.4.3 Activation de Glo1	
3.5 Le MG, un métabolite toxique pour la tumeur	
3.6 Rôle protumoral du MG	
3.6.1 MG, AGEs et RAGEs	
3.6.2 MG, un oncométabolite	
3.7 Parallèle entre MG et ROS	
3.7.1 GSH	
3.7.2 Nrf2	
3.7.3 Effet hormétique	
<u>II. Objectifs du travail</u>	<u>37</u>
<u>III. Résultats</u>	<u>41</u>

1. Les tumeurs du sein de type triple-négatifs accumulent significativement moins d'adduits spécifiques du méthylglyoxal que les autres sous-types	41
1.1 Introduction	
1.2 Résultats	
1.3 Conclusions	
2. Le méthylglyoxal, un produit dérivé de la glycolyse, induit la glycation de HSP90, la croissance tumorale et le développement de métastases via YAP	63
2.1 Introduction	
2.2 Résultats	
2.3 Conclusions	
3. Potentiel hormétique du méthylglyoxal, un produit dérivé de la glycolyse, dans la transition des tumeurs de la progression à la mort	115
3.1 Introduction	
3.2 Résultats	
3.3 Conclusions	
4. Implication du méthylglyoxal dans la progression tumorale et le développement de la résistance à l'inhibition de BRAF dans le mélanome	169
4.1 Introduction	
4.2 Résultats	
4.3 Conclusions	
<u>IV. Discussion et perspectives</u>	<u>201</u>
<u>V. Références</u>	<u>211</u>
<u>VI. Bibliographie personnelle</u>	<u>237</u>

Liste des abréviations

AKRs	Aldo-kéto réductases
ATP	Adénosine-triphosphate
BBGC	S-p-bromobenzylglutathion Cyclopentyl Diester
CAM	Membrane chorioallantoïque de poulet
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif
GAPDH	Glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase
Glo1/2	Glyoxalase 1/2
GSH	Glutathion réduit
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HK	Hexokinase
HSP27/90	<i>Heat shock protein 27/90</i>
LATS1	<i>Large Tumour Suppressor 1</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
MCT	Transporteur de monocarboxylates
MG	Méthylglyoxal
AGEs	Produits de glycation avancée
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
PGC1a	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha</i>
PKM2	<i>Pyruvate kinase muscle isozyme</i>
RAGEs	Récepteurs aux AGEs
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
YAP	<i>Yes-associated protein</i>

I. Introduction

Introduction

1. Cancer

Le cancer est une pathologie caractérisée par la prolifération anarchique de cellules au sein d'un tissu. Ce type de maladie représente un impact sociétal important car il est une des causes majeures de mortalité, avec les maladies cardiovasculaires, dans les pays développés. Chez les hommes, l'incidence est la plus élevée pour les cancers du poumon, de la prostate, du colon et de l'estomac avec le cancer du poumon qui présente le plus haut taux de mortalité (Fig. 1). Chez les femmes, les cancers présentant la plus grande incidence sont les cancers du sein, du poumon, du colon et de l'utérus avec le cancer du sein qui conduit à la plus haute mortalité (Fig. 1).

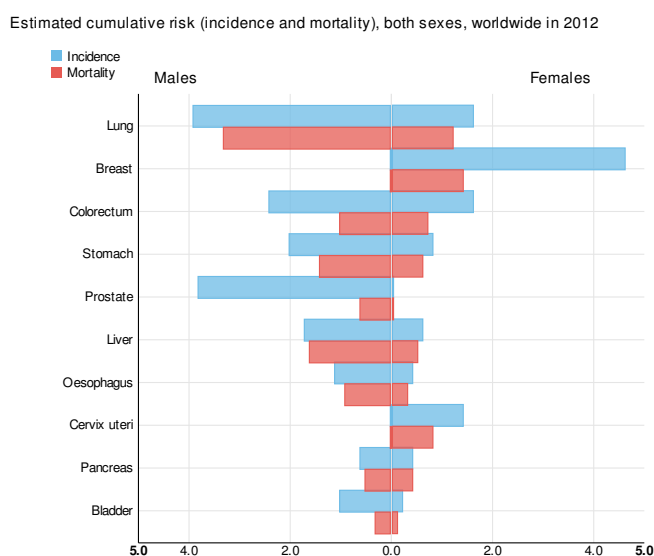


Figure 1. Incidence et mortalité des cancers dans le monde. Représentation graphique du risque cumulé d'incidence en bleu et de mortalité en rouge des cancers les plus fréquents dans le monde, en 2012, chez les hommes (à gauche) et chez les femmes (à droite). Source : Global Cancer Observatory.

L'acquisition, le maintien et la progression du phénotype malin des cellules sont liés à des caractéristiques générales, rassemblées en 2000 puis actualisées en 2011 par Hanahan et Weinberg^{1,2}. Les cellules tumorales présentent une activation persistante de la prolifération qui échappe au contrôle de suppresseurs de croissance comme l'inhibition de contact. Ces cellules sont capables de se répliquer de façon virtuellement infinie, elles atteignent donc une immortalité répliquative et résistent aux mécanismes d'induction de la mort cellulaire comme la sénescence et l'apoptose. Cette capacité de prolifération anarchique est notamment supportée par une instabilité génomique et une dérégulation du métabolisme énergétique. Par ailleurs, la progression tumorale se voit

aussi favorisée par l'activation de l'angiogenèse, l'évasion de la destruction par le système immunitaire, l'induction d'une inflammation chronique et pour finir la promotion de l'invasion et du processus métastatique (Fig. 2).

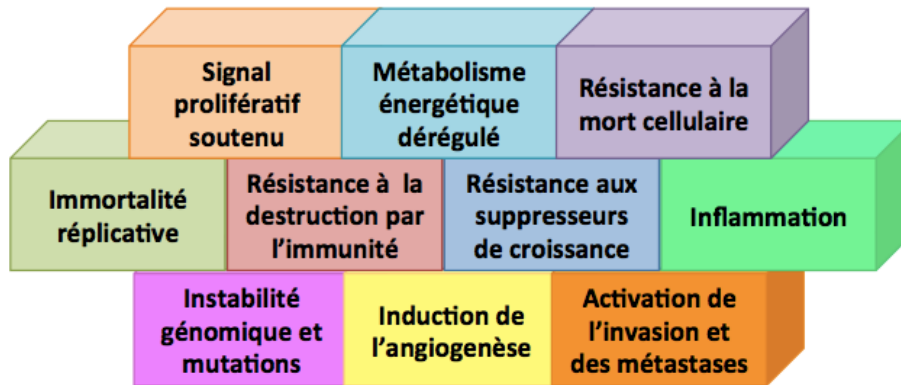


Figure 2. Caractéristiques des cellules tumorales. L'établissement et le maintien du processus de transformation maligne des cellules sont supportés par les perturbations représentées dans ce schéma. Adapté de Hanahan et Weinberg 2011¹.

2. Cancer et métabolisme

Comme mentionné ci-dessus, la dérégulation du métabolisme énergétique est l'une des caractéristiques des cellules tumorales. En effet, ces cellules en prolifération intense ont des besoins énergétiques et anaboliques élevés. Pour se multiplier, les cellules requièrent de l'énergie, des acides aminés pour produire de nouvelles protéines, des nucléotides pour répliquer leur ADN ainsi que des lipides pour constituer membrane plasmique et organites cellulaires.

Le métabolisme central des cellules normales a pour but de maintenir l'homéostasie et produit donc principalement de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Dans ce but, le glucose est traité de façon séquentielle au travers de la glycolyse dans le cytoplasme, du transfert dans la mitochondrie sous forme d'acétylCoA, du cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques, cycle TCA) dans la matrice mitochondriale puis le long de la chaîne de transport des électrons qui couplée à l'ATP synthase permet la production d'ATP à raison de 36 à 38 ATP par molécule de glucose (Fig. 3). Cette voie canonique de l'utilisation du glucose permet d'atteindre un taux optimal de production d'énergie pour assurer la maintenance cellulaire et entretenir des processus tels que le renouvellement protéique et la réparation de l'ADN.

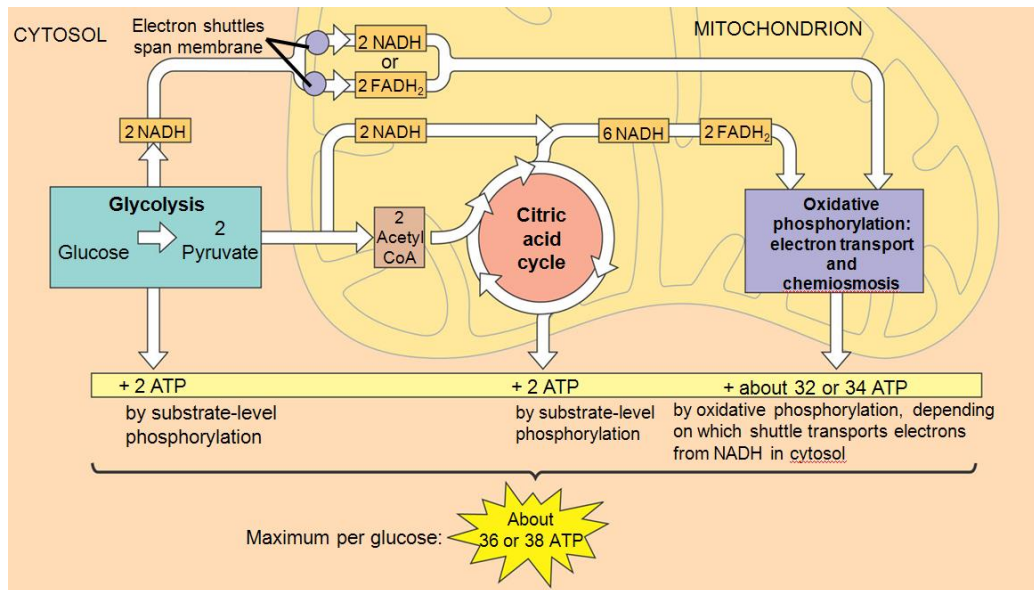


Figure 3. Représentation schématique de la respiration cellulaire. Oxydation partielle du glucose en 2 pyruvate au cours de la glycolyse qui produit 2 ATP et 2 NADH, entrée dans la mitochondrie et conversion en acétyl-CoA qui est oxydé dans le cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique) avec formation de 2 ATP, 6 NADH et 2 FADH₂. Ces équivalents réduits sont ensuite utilisés le long de la chaîne de transport des électrons qui fournit l'énergie nécessaire à la production d'ATP. Globalement, 36 à 38 molécules d'ATP sont fournies à partir d'1 molécule de glucose.

2.1. Métabolisme du glucose et effet Warburg

Au niveau des cellules tumorales, mais aussi des cellules normales en prolifération, une adaptation du métabolisme est nécessaire de façon à répondre aux besoins énergétiques et anaboliques ainsi qu'à maintenir un statut oxydatif (ou rédox) correct³. La plupart des cellules tumorales présentent une augmentation de la prise de glucose, du flux glycolytique et de la production de lactate, et ce en présence d'oxygène. Ce métabolisme est contraire à l'effet Pasteur qui indique une diminution de la fermentation lactique en présence d'oxygène. Ce comportement particulier avait déjà été observé par O. Warburg dans les années 20 et avait été attribué à un dysfonctionnement mitochondrial. Cette utilisation préférentielle de la glycolyse est depuis appelée glycolyse aérobie ou effet Warburg (pour revue du travail pionnier de Warburg, voir Koppenol et al. 2011⁴). Aujourd'hui, la glycolyse aérobie n'est plus considérée comme la conséquence d'une déficience au niveau des mitochondries. Les mitochondries des cellules prolifératives sont fonctionnelles mais au lieu de réaliser prioritairement la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie, elles sont reprogrammées pour servir d'organelles biosynthétiques⁵.

La réduction du pyruvate en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) interrompt le flux classique de la respiration cellulaire. Ce phénomène résulte en un

rendement bien moindre en ATP, atteignant seulement 2 ATP par glucose, mais apporte d'autres avantages à la cellule tumorale (pour revue voir Vander Heiden et al. 2009⁶).

L'avidité des cellules tumorales pour le glucose est mise à profit en clinique grâce à la détection d'un analogue non métabolisable du glucose, le ¹⁸-Fluorodéoxyglucose (¹⁸FDG), qui permet de visualiser les foyers tumoraux primaires et/ou secondaires chez les patients grâce au PET-scan (tomographie par émission de positrons, Fig. 4)⁷.

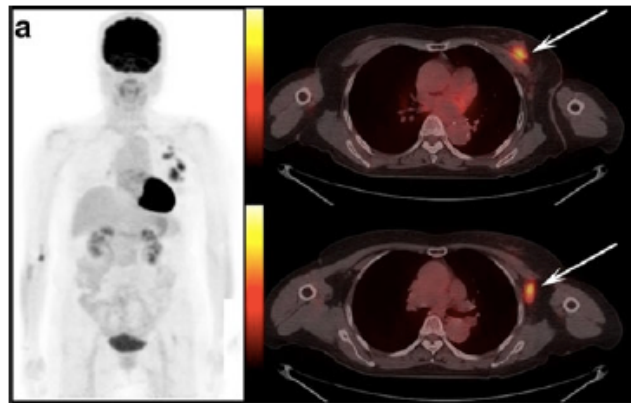


Figure 4. Images de ¹⁸-Fluorodéoxyglucose PET-Scan. Images d'une patiente présentant un cancer du sein avec une lésion focale au niveau du sein et un foyer au niveau du ganglion lymphatique axillaire indiqués par les flèches (image tirée de Song et al. 2011⁸).

Des études utilisant cette technologie ont permis de corréliser l'avidité des tumeurs pour le glucose avec la progression et avec un mauvais pronostic pour les patients souffrant de cancers gastriques⁹, du sein⁸, des poumons¹⁰ et du colon¹¹. Ces observations ont été confirmées *in vitro* au niveau de lignées cellulaires de cancer du sein. Ainsi les cellules invasives MDA-MB-231 présentent un métabolisme plus glycolytique que les cellules non-invasives MCF7 qui sont plus oxydatives¹² (Fig. 5).

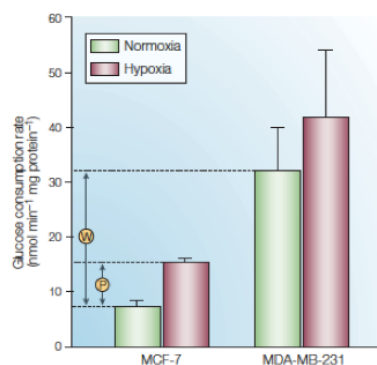


Figure 5. Les cellules invasives sont plus glycolytiques. Mesure de la consommation de glucose par les cellules non-invasives MCF7 et les cellules invasives MDA-MB-231 en normoxie (vert) et en hypoxie (rouge). Les cellules MDA-MB-231 consomment plus de glucose que les cellules MCF7 en normoxie, illustrant l'effet Warburg (W). En hypoxie, la consommation de glucose est augmentée au niveau des 2 lignées cellulaires, illustrant l'effet Pasteur (P). Figure tirée de Gatenby et Gillies 2014¹².

Le métabolisme des tumeurs en hypoxie repose également sur la glycolyse puisque un environnement pauvre en oxygène ne permet pas d'assurer la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS). Ces tumeurs hypoxiques présentent une capacité d'invasion et de formation de métastases plus importantes que les tumeurs en normoxie¹³⁻¹⁶.

En quoi ce métabolisme énergétique moins efficace est-il profitable aux cellules cancéreuses ?¹⁷ Tout d'abord, bien que le rendement en ATP de la glycolyse soit bien plus faible que celui de la respiration cellulaire, son processus est 10 à 100 fois plus rapide ce qui permet une fourniture rapidement mobilisable d'énergie¹⁸ et adaptable en fonction de la disponibilité du glucose et de la demande en ATP de la cellule¹⁹. De plus, les cellules tumorales ont des besoins qui s'étendent au delà de l'ATP. La prolifération cellulaire requiert des nucléotides, des acides nucléiques et des lipides. Le glucose, via l'effet Warburg, peut être utilisé pour générer cette biomasse^{6,20,21}.

Le glucose-6-phosphate peut être dévié vers la voie des pentoses phosphates, converti en ribose-5-phosphate et amené à la synthèse de nucléotides avec génération de NADPH (Fig. 6). Les intermédiaires de la glycolyse peuvent aussi servir de précurseurs à la synthèse de lipides grâce à la conversion de glycérol-3-phosphate provenant des trioses phosphates en triacylglycérol et phospholipides, participant ainsi au renouvellement des membranes. Le phosphoglycérate peut être converti en sphingolipides, d'autres composants des membranes (Fig. 6). Le phosphoglycérate et le pyruvate peuvent être transformés en acides aminés comme la sérine, la glycine, la cystéine ou l'alanine (Fig. 6). Dans l'ensemble, les intermédiaires de la glycolyse peuvent servir de base pour générer les principales macromolécules biologiques nécessaire à la prolifération cellulaire (Fig. 6).

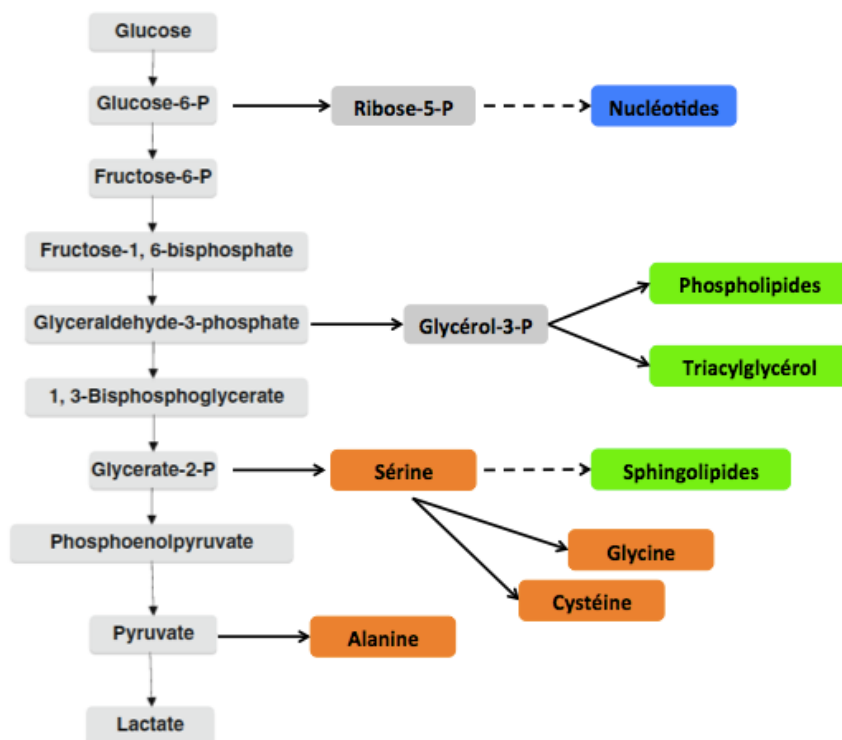


Figure 6. La glycolyse, source de précurseurs anaboliques. Plusieurs intermédiaires de la glycolyse peuvent être détournés pour fournir des nucléotides (en bleu), des lipides (en vert) et des acides aminés (en orange). Adaptée de Lunt et Vander Heiden 2011²⁰.

La sécrétion de lactate qui est augmentée au niveau des cellules tumorales ne représente pas une perte de carbone. En effet, la conversion du pyruvate en lactate par la LDH permet de régénérer le NAD⁺ nécessaire au fonctionnement de la glycolyse. La sortie de lactate, avec un proton, par des transporteurs de monocarboxylate (MCT) permet de réguler le pH intracellulaire et provoque l'acidification de milieu extracellulaire. Ce lactate sécrété a un rôle fonctionnel et la détection de taux élevés de lactate au niveau des tumeurs est associée à un mauvais pronostic.²²

L'acidose peut être mutagénique et clastogénique, potentiellement par inhibition de la réparation de l'ADN, favorisant l'instabilité génétique caractéristique des cellules tumorales²³.

L'acidification du milieu extracellulaire favorise l'invasion cellulaire et le processus métastatique en induisant la mort des cellules normales, laissant ainsi de l'espace aux cellules tumorales pour s'infiltrer dans le tissu. Le pH bas induit l'apoptose des cellules normales par activation de p53 et des caspases alors que les cellules tumorales, qui présentent souvent une mutation de p53, sont capables de s'adapter à ce milieu acide et survivent^{24,25}. De plus, la mort des cellules normales dans le microenvironnement tumoral pourrait induire une libération de nutriments et/ou

permettre une plus grande accessibilité à ces nutriments²⁶. Un milieu acide favorise également l'activation de métalloprotéinases et de cathepsines, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et des lames basales, ouvrant la voie à l'invasion tumorale^{27,28}.

L'acidification extracellulaire a aussi un effet immunosuppresseur. En effet, les lymphocytes T cytotoxiques ont également un métabolisme glycolytique entraînant une sécrétion de lactate. La haute concentration en lactate extracellulaire empêche la sécrétion par les lymphocytes car l'export de lactate dépend d'un gradient de concentration entre les espaces intra- et extracellulaires. Cette rétention de lactate dans les lymphocytes diminue leur capacité à sécréter des cytokines, réduisant ainsi la défense immunitaire anti-tumorale²⁹.

Le profil métabolique est hétérogène au niveau de la tumeur. Bien que la majorité des cellules tumorales présentent une glycolyse aérobie, certaines maintiennent un métabolisme oxydatif de type OXPHOS. Il existe ainsi une symbiose entre les zones tumorales glycolytiques qui produisent du lactate et les zones oxydatives qui importent ce lactate, le convertissent en acétyl-CoA pour nourrir leur cycle de Krebs³⁰.

Un autre avantage de l'utilisation préférentielle de la glycolyse par les cellules tumorales est le maintien d'un niveau bas des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont dommageables pour les cellules. En effet, la mitochondrie est la source majeure de production de ROS tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH\bullet$). Les ROS sont formés à partir de la liaison de l'oxygène à des électrons qui s'échappent de la chaîne de transport mitochondriale (Fig. 7). L'accumulation excessive de ROS entraîne un stress oxydant qui est toxique pour la cellule. La glycolyse aérobie diminue l'utilisation de la respiration mitochondriale et donc la formation des ROS par la mitochondrie. De plus, la déviation du glucose vers la voie des pentoses phosphates permet la génération de NADPH, un facteur essentiel pour le réapprovisionnement en glutathion réduit (GSH), un facteur antioxydant majeur (Fig. 7).

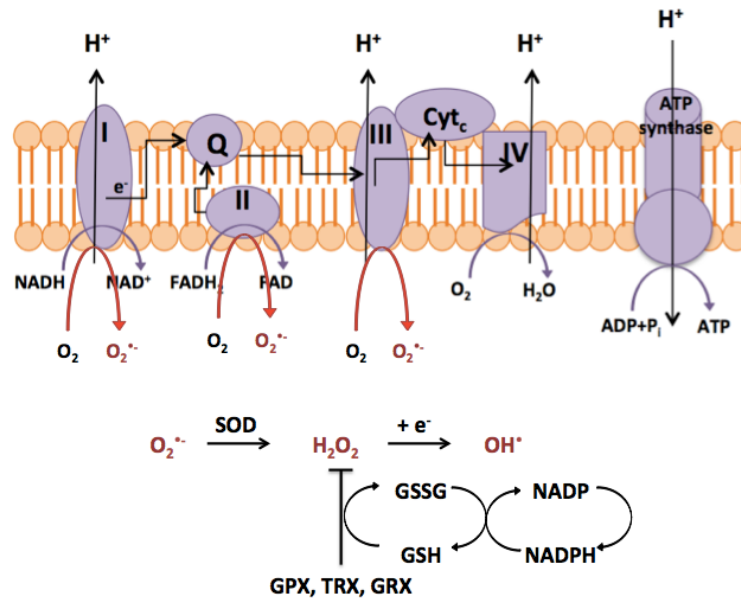


Figure 7. Production de ROS par la mitochondrie et détoxification. Les ROS sont notamment produits au niveau de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie par perte d'électrons (e^-) qui se lie à l'oxygène (O_2) pour former l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). L'anion superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD). H_2O_2 peut être converti en radical hydroxyle par ajout d'électron. Les radicaux libres sont neutralisés par des enzymes comme la glutathion peroxydase (GPX), la thiorédoxine (TRX) et la glutarédoxine (GRX). Ces enzymes utilisent le glutathion réduit (GSH) comme co-facteur qui est régénéré grâce au NADPH.

En plus de contrôler la production de ROS, l'utilisation réduite de la respiration mitochondriale protège les cellules tumorales de l'apoptose. La mitochondrie est une réserve de facteurs pro-apoptotiques qui sont libérés à travers les pores de la membrane mitochondriale. L'ouverture de ces pores dépend du potentiel membranaire généré par le transfert des protons lors de l'OXPHOS. La faible utilisation de la respiration mitochondriale entraîne un flux lent à travers la chaîne de transport des électrons ce qui permet un potentiel membranaire élevé, une diminution de l'ouverture des pores et donc une inhibition de l'apoptose³¹. L'enzyme hexokinase (HK) est surexprimée dans les cellules tumorales et participe à l'effet Warburg^{32,33}. HK peut être localisée à la surface de la membrane mitochondriale externe^{32,34,35} ce qui inhibe la libération des facteurs pro-apoptotiques et protège les cellules tumorales de l'apoptose³⁶.

2.2. Métabolisme de la glutamine, cataplérose et anaplérose

Une autre modification importante du métabolisme des cellules cancéreuses est l'augmentation de l'utilisation de la glutamine, appelée la glutaminolyse. En effet, la glycolyse seule ne remplit pas tous les besoins anaboliques des cellules en prolifération.

Bien que la respiration mitochondriale soit inhibée, une partie du pyruvate produit à partir du glucose est envoyé dans le cycle de Krebs. Le cours de son déroulement est cependant tronqué car le citrate est dévié pour la production d'acides gras en passant par sa transformation en acétylCoA par l'ATP citrate lyase (ACL). Le détournement d'intermédiaires du cycle de Krebs (cataplérose) doit être compensé par un apport extérieur (anaplérose) (Fig. 8). L'absorption de glutamine, transformée en glutamate par l'enzyme glutaminase (GLS) puis en α -kétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (GDH) permet au cycle de continuer à tourner. Le cycle de Krebs est une source importante d'intermédiaires anaboliques. Ainsi, il fournit les métabolites nécessaires à la synthèse d'acides gras (citrate et acétylCoA) et à la formation d'acides aminés.

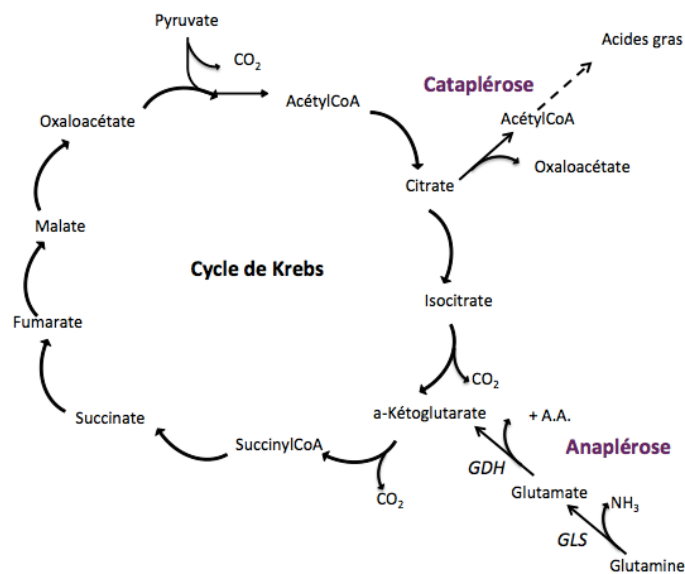


Figure 8. Cataplérose et anaplérose au niveau du cycle de Krebs. Sortie d'intermédiaires du cycle au niveau du citrate qui peut être utilisé pour la synthèse d'acides gras (cataplérose). Entrée d'intermédiaires du cycle (anaplérose) par la glutamine qui est convertie en glutamate par la glutaminase (GLS) et la conversion du glutamate en α -kétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (GDH).

De plus, la conversion de la glutamine en glutamate puis en α -kétoglutarate constitue une véritable plateforme de conversion des acides aminés et de production de GSH (Fig. 9).

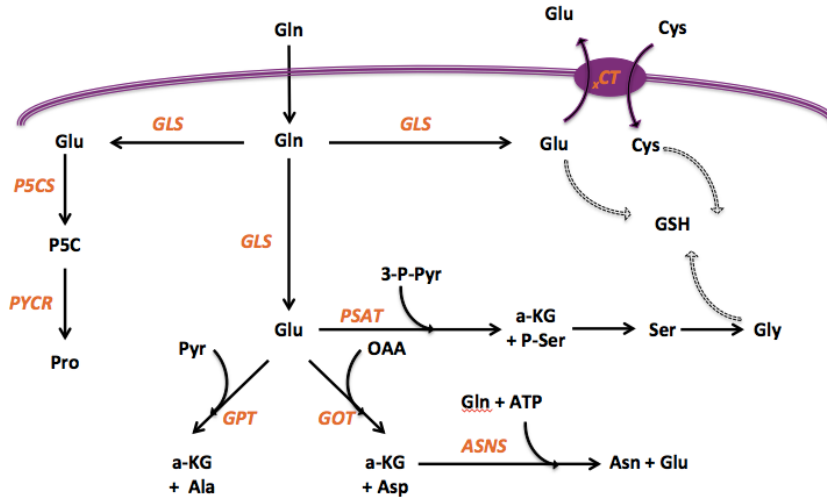


Figure 9. Contrôle de la réserve en acides aminés à partir de la glutamine. La glutamine (Gln) peut être convertie en glutamate (Glu) par la glutaminase (GLS). Le glutamate peut être converti en pyrroline-5-carboxylate (P5C) par la P5C-synthase (P5CS) puis en proline (Pro) par la P5C-réductase (PYCR). Le glutamate peut aussi être converti en α -kétoglutarate (α -KG) et alanine (Ala) s'il est transformé en compagnie de pyruvate (Pyr) par la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) ; en α -kétoglutarate et phospho-sérine en compagnie de 3-phosphohydroxy-pyruvate (3-P-Pyr) par la phosphosérine aminotransférase (PSAT). La phospho-sérine peut être ensuite convertie en sérine (Ser) puis en glycine (Gly). Le glutamate donne de l' α -kétoglutarate et de l'aspartate (Asp) s'il est converti avec l'oxaloacétate (OAA) par la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT). L'aspartate (Asp) avec la glutamine (Gln) peuvent être convertis, en présence d'ATP, en asparagine (Asn) et glutamate (Glu) par l'asparagine synthase (ASNS). Un échangeur xCt permet l'entrée de cystéine (Cys) en échange de la sortie du glutamate. La condensation de glycine, glutamate et cystéine permet la synthèse de glutathion réduit (GSH). Adapté de Altman et al. 2016³⁷.

2.3. Métabolisme des lipides

Les cellules tumorales adaptent également leur métabolisme des lipides. Les lipides sont les composants principaux des membranes cellulaires dont le renouvellement est indispensable au bon fonctionnement et à la prolifération des cellules. Les lipides sont aussi des molécules de signalisation, en effet, le diacylglycérol (DAG) et le phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP₃) sont des seconds messagers impliqués dans des voies de signalisation. Enfin, les lipides sont de grandes molécules dont le catabolisme (bêta-oxydation)³⁸ peut fournir de l'énergie et leur stockage sous forme de triglycérides constitue une réserve d'énergie.

La synthèse *de novo* d'acides gras par l'enzyme FASN (*fatty acid synthase*)³⁹ est corrélée à la croissance tumorale et à la survie des cellules cancéreuses^{40,41}. Cette enzyme est exprimée lors du développement embryonnaire et chez l'adulte au niveau du foie, du tissu adipeux et de la glande mammaire en lactation. La réactivation de FASN au niveau des cellules cancéreuses pourrait indiquer un retour à un niveau de différenciation de type embryonnaire⁴². La synthèse d'acides gras par

FASN peut être augmentée⁴³ en cas de demande métabolique élevée, en cas de diminution de la disponibilité des acides gras dans le microenvironnement ou après une altération génomique⁴⁴ comme au niveau du cancer du sein.

La synthèse d'acides gras *de novo* se fait à partir d'acétylCoA provenant de diverses sources (Fig. 10). Le pyruvate produit lors de la glycolyse est converti et envoyé dans le cycle de Krebs dans la mitochondrie. Le citrate généré par le cycle est clivé en acétylCoA et en oxaloacétate par l'enzyme ATP-citrate lyase (ACL)⁴⁵. L'acétylCoA ainsi produit est transformé en malonylCoA par l'acétylCoA carboxylase (ACC)⁴⁶. La condensation de 7 molécules de malonylCoA avec une molécule d'acétylCoA par FASN⁴⁷ génère le palmitate, un acide gras saturé composé de 16 carbones. Le palmitate peut ensuite être allongé et/ou désaturé pour former des acides gras de longueurs et de degrés de saturation variables⁴⁸. Ces acides gras synthétisés *de novo* et ceux importés dans la cellule à partir de l'environnement forment un groupe de substrats complexes pour la synthèse de lipides. L'acétylCoA peut aussi provenir de l'absorption d'acétate par la cellule ou de la glutamine qui est convertie successivement en glutamate, α -kétoglutarate, isocitrate et citrate.

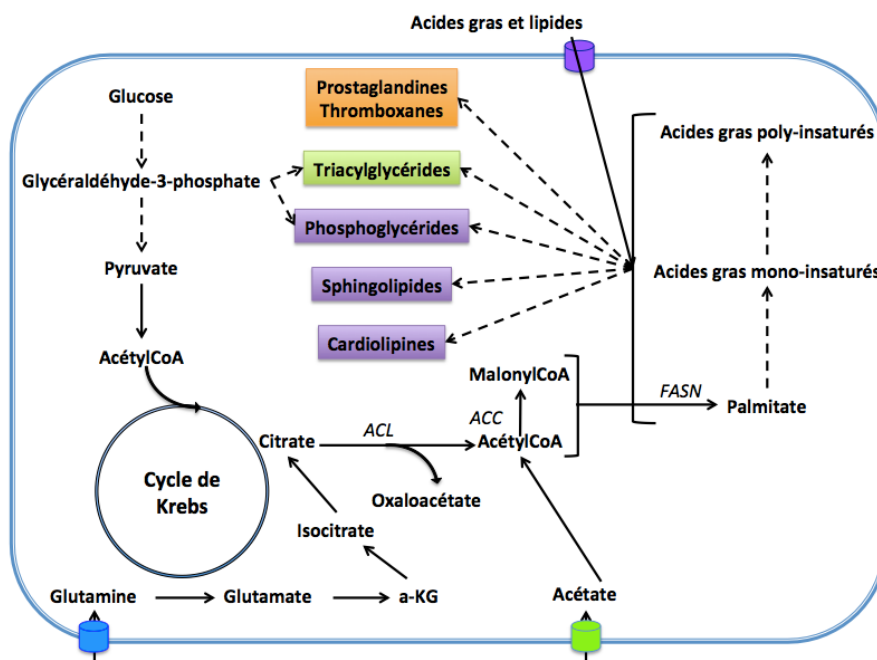


Figure 10. Synthèse des acides gras. Synthèse des acides gras et des lipides à partir d'acétylCoA. Les lipides cellulaires comprennent des lipides de stockage énergétiques comme les triacylglycérides (en vert) qui sont synthétisés à partir de la collection d'acides gras ou de glycéraldéhyde-3-phosphate dérivé de la glycolyse. Ces précurseurs donnent aussi naissance aux phosphoglycérides. Les acides gras permettent la synthèse d'eicosanoïdes comme les prostaglandines et les thromboxanes qui sont des molécules de signalisation inflammatoire (en orange). Les sphingolipides et cardiolipines sont aussi produits à partir des acides gras et sont, avec les phosphoglycérides, des composants membranaires (en mauve). Adapté de Rohrig & Schulze 2016⁴³

L'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras est sous le contrôle de facteurs de transcription de type SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) qui se lie à l'ADN au niveau d'éléments de réponse SRE⁴⁹(*sterol regulatory elements*) et au niveau d'E-Box dans les promoteurs des gènes cibles⁵⁰. Ces facteurs contrôlent également le processus de synthèse du cholestérol⁵¹. La synthèse des acides gras est consommatrice de NADPH dont des procédés de régénération sont aussi sous le contrôle transcriptionnel de SREBP, comme la voie oxydative des pentoses phosphates, l'expression des enzymes maliques (ME) et des isocitrate déshydrogénases (IDH)⁵²⁻⁵⁴(Fig. 11).

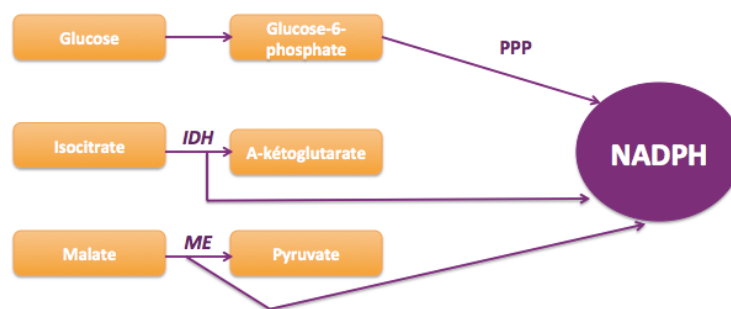


Figure 11. Voies de production de NADPH sous le contrôle de SREBP. SREBP exerce un contrôle transcriptionnel sur des voies favorisant la production de NADPH nécessaire à la synthèse *de novo* d'acides gras. SREBP favorise la voie oxydative des pentoses phosphates (PPP), la conversion d'isocitrate en a-kétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et la conversion de malate en pyruvate par l'enzyme malique (ME), trois procédés générateurs de NADPH.

2.4. Régulation du métabolisme par les oncogènes

La transformation maligne est accompagnée de certaines mutations, amplifications ou pertes de gènes qui ont un impact non seulement sur les capacités prolifératives mais aussi sur le métabolisme. Les perturbations métaboliques rencontrées au niveau des cellules tumorales sont notamment la conséquence de programmes génétiques, soit l'activation d'oncogènes, soit la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur. L'activation de la glycolyse, de la glutaminolyse et du métabolisme des lipides au niveau des cellules tumorales est liée à l'augmentation de l'expression de certaines enzymes sous le contrôle d'oncogènes.

L'oncogène **MYC** régule la synthèse des nucléotides⁵⁵, la biogenèse mitochondriale et induit la glycolyse aérobie. MYC favorise la consommation de glucose en augmentant l'expression de ses transporteurs⁵⁶ et la production de lactate⁵⁷. Myc augmente l'absorption de glutamine par ses transporteurs^{58,59} et son incorporation dans le cycle de Krebs^{60,61}. La viabilité des tumeurs présentant une expression oncogénique

de Myc est dépendante de la glutamine⁵⁸. Myc favorise aussi la synthèse des acides gras en induisant l'expression de FASN^{62,63}.

Akt induit l'augmentation de l'expression de transporteurs du glucose⁶⁴ et de l'hexokinase^{65,66}, favorisant l'effet Warburg et l'addiction des cellules cancéreuses au glucose. Akt stimule l'expression membranaire de transporteurs de la glutamine⁶⁷ et les enzymes de conversion de la glutamine en α -kétoglutarate⁶⁸. En aval d'Akt, **mTORC1** (*mammalian target of rapamycin 1*) est impliqué dans la régulation du métabolisme mitochondrial. Il favorise la production des acides aminés par les réactions de transamination au niveau de la mitochondrie comme la production d'aspartate à partir d'oxaloacétate et de glutamate⁵ (Fig. 9). Akt augmente la stimulation du facteur SREBP⁶⁹⁻⁷², via mTORC1, et ainsi l'activité de l'enzyme ATP-citrate lyase (ACL) ce qui favorise la synthèse des acides gras⁷³. De plus, la dégradation du citrate en acétylCoA catalysée par ACL permet de réduire la quantité de citrate intracellulaire. Cette régulation est bénéfique à la glycolyse car le citrate est un inhibiteur allostérique de la glycolyse^{5,74}. De plus, une autre cible majeure de l'activation de mTORC1 est HIF⁵⁴.

HIF1a (*Hypoxia inducible factor 1a*) est un facteur de transcription dont la dégradation spontanée via le protéasome est empêchée en cas d'hypoxie. Dans ces conditions, HIF1a peut jouer son rôle au niveau du noyau et stimuler la transcription de gènes liés au métabolisme anaérobie et donc liés à la glycolyse. Dans les tumeurs, HIF1a est maintenu actif et favorise la glycolyse aérobie en induisant l'expression de transporteurs du glucose et de la pyruvate kinase déshydrogénase (PDK)⁷⁵. PDK inhibe l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) ce qui favorise la conversion du pyruvate en lactate⁷⁵ plutôt que son envoi dans le cycle de Krebs sous forme d'acétylCoA.

La mutation de **Ras** favorise l'expression du transporteur de glucose GLUT1⁷⁶. Il est intéressant de noter que la carence en glucose augmente le taux d'apparition de mutations Ras au niveau de cellules de carcinome du colon⁷⁷, ce qui indique l'avidité de ces cellules pour le glucose. Ras favorise également l'absorption et la synthèse des acides gras⁷⁸.

p53 est un gène suppresseur de tumeur et la transformation tumorale s'accompagne souvent d'une mutation avec perte de fonction de ce gène. De façon générale, p53 inhibe la glycolyse. Il est responsable de la diminution de l'expression des transporteurs de glucose⁷⁹, de la fructose-biphosphatase⁸⁰, des transporteurs du lactate⁸¹ et de PDK⁸². De plus, p53 entre en compétition avec HIF⁸³ et est capable

d'activer la respiration mitochondriale⁸⁴. Il est intéressant de noter que la restriction calorique induit la dégradation de p53 muté mais pas de la forme normale, indiquant que la mutation de p53 favorise l'acquisition d'un phénotype avide de glucose⁸⁵.

2.5. Régulation du métabolisme par le microenvironnement

Le métabolisme des cellules cancéreuses est aussi influencé par leur environnement et la glycolyse aérobie a d'abord été considérée dans le contexte d'une adaptation à l'hypoxie. Au fur et à mesure de la croissance tumorale, l'approvisionnement en oxygène et nutriments est réduit car les cellules en prolifération sont situées à une distance grandissante des vaisseaux sanguins. Dès 1919, Krogh a mis en évidence que le niveau d'oxygénation des tissus se réduisait avec la distance par rapport à la circulation et qu'à partir de 150 μ m de distance, l'oxygénation était limitée⁸⁶. De la même façon, la disponibilité en facteurs de croissance, glucose et autres nutriments est limitée dans le microenvironnement tumoral. Cet environnement hostile mène à la sélection de cellules capables de survivre dans ces conditions d'hypoxie⁸⁷ et d'acidose⁸⁸. L'expansion clonale de la tumeur est limitée par la disponibilité des nutriments⁸⁹. La restriction en oxygène est la première barrière car la concentration en oxygène diminue plus rapidement avec la distance que celle de glucose⁹⁰. L'hypoxie présente dans les tumeurs induit un environnement adaptatif qui favorise le métabolisme anaérobie et donc la glycolyse. Cependant, l'environnement tumoral est dynamique et entraîne des fluctuations dans l'approvisionnement en oxygène et glucose. Ces cycles de normoxie-hypoxie induisent une sélection des cellules dans lesquelles le métabolisme anaérobie du glucose est constitutivement augmenté. L'hypoxie induit également l'autophagie, un processus de dégradation lysosomale des organelles altérés et de protéines, qui permet un recyclage des macromolécules et constitue un mécanisme de survie dans un milieu pauvre en nutriments⁹¹.

En conclusion, la dérégulation du métabolisme énergétique des cellules tumorales est le résultat d'une adaptation à des altérations génétiques et à un environnement carencé qui est nécessaire pour la fourniture d'énergie, d'intermédiaires anaboliques et le maintien du statut rédox (Fig. 12).

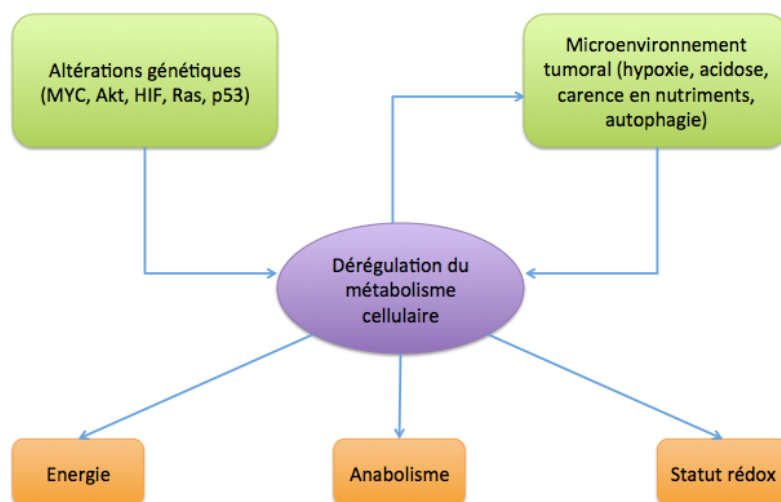


Figure 12. Déterminants du phénotype métabolique des tumeurs. Le métabolisme tumoral est régulé par des mutations génétiques intrinsèques et par une réponse au microenvironnement tumoral. Des signaux oncogéniques stimulés par la perte de suppresseur de tumeur (p53) ou l'activation d'oncoprotéines (Akt, Ras, Myc, HIF) résultent en une altération de la signalisation qui modifie le métabolisme. Un environnement anormal comprenant de l'hypoxie, de l'acidose et la carence en nutriments induit des réponses cellulaires qui affectent également l'activité métabolique. Ces adaptations optimisent le métabolisme cellulaire pour fournir l'énergie, les ressources anaboliques et maintenir le statut rédox de façon à promouvoir la prolifération cellulaire. Adapté de Cairns et al. 2011³.

3. Méthylglyoxal

3.1. Production du méthylglyoxal

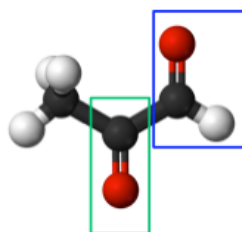


Figure 13. Structure chimique du méthylglyoxal. Le méthylglyoxal est un dicarbone comprenant un groupe aldéhyde en bleu et un groupe cétone en vert.

Le méthylglyoxal (MG, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{COH}$) est un dicarbone (Fig. 13) également appelé pyruvaldéhyde ou 2-oxopropanal qui est principalement formé dans les cellules lors de la glycolyse. En effet, la perte spontanée de phosphate à partir des trioses phosphates, glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP), entraîne la formation de MG^{92,93}. Ces trioses sont formés au cours de la quatrième étape de la glycolyse par l'enzyme aldolase à partir de fructose-1,6-biphosphate et sont interchangeables par l'enzyme triose phosphate isomérase (TPI) (Fig. 14). La formation de MG est 8 fois plus probable à partir du GAP mais l'abondance de DHAP est 20 fois

plus importante dans les cellules. L'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est importante pour la régulation du taux de formation de MG car elle catalyse la réaction suivante de la glycolyse, transformant les trioses phosphates en 1,3-diphosphoglycérate. Une activité faible de GAPDH favorise l'accumulation des trioses phosphates et ainsi la production spontanée de MG⁹⁴. L'activité de cette enzyme clé est notamment régulée par sa modification par le MG⁹⁵ suggérant que le MG exercerait un rétrocontrôle sur sa propre production. La formation de MG n'est cependant qu'une petite proportion du flux glycolytique, environ 0,1%⁹⁶. Cette proportion peut augmenter jusqu'à 1% dans les conditions d'hyperglycémie associées au diabète⁹⁷. D'autres voies conduisent à la formation de MG comme l'oxydation de l'acétone lors du catabolisme des corps cétoniques⁹⁸ et l'oxydation de l'acétoacétone dans le catabolisme de la thréonine⁹⁹. La dégradation oxydative des lipides (peroxydation)¹⁰⁰, celles des protéines glyquées par le glucose ou des monosaccharides¹⁰¹ contribue également à la formation de MG. Au niveau des bactéries, le MG peut également être produit par une réaction enzymatique catalysée par la méthylglyoxal synthase¹⁰². Il est important de noter, que sous sa forme hydrophobe non hydratée, le MG est capable de diffuser passivement à travers les membranes cellulaires¹⁰³.

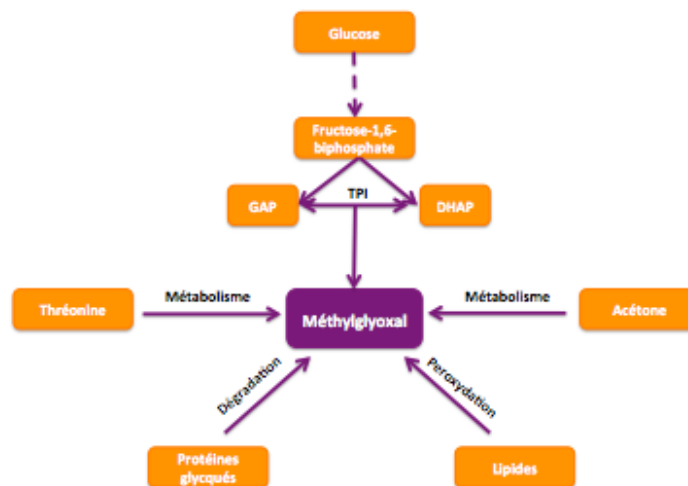


Figure 14. Voies de production du méthylglyoxal. La source principale du MG est la glycolyse, à partir des trioses phosphates (GAP et DHAP) qui sont maintenus en équilibre par la TPI. Le MG peut aussi être produit lors du métabolisme de l'acétone et de la thréonine, de la peroxydation de lipides et de la dégradation de protéines glyquées.

La famille des dicarbonyles compte deux autres membres majeurs, le glyoxal (GO) et le 3-déoxyglucosone (3-DG) (Fig. 15). Ils sont principalement formés lors

de la dégradation non-enzymatique du glucose et des protéines glyquées par le glucose¹⁰¹. La peroxydation lipidique¹⁰⁴ et la dégradation de nucléotides peuvent aussi former le GO alors que le 3-DG peut être produit par la dégradation du fructosamine-3-phosphate lors de la réparation des protéines glyquées ou de la dégradation du fructose-3-phosphate^{105,106}.

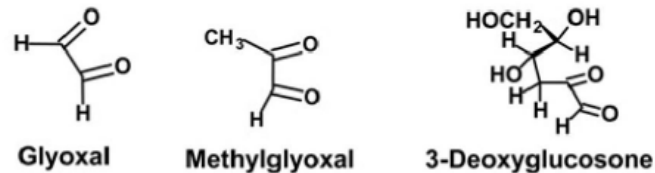


Figure 15. Structures chimiques des dicarbonyles glyoxal, méthylglyoxal et 3-déoxyglucosone.

3.2. Glycation, MG-AGEs et stress dicarbonyle

De part ses deux groupements carbonyles, le MG est une molécule très réactive. En effet, dès les années 60, plusieurs équipes ont mis en évidence la réaction des dicarbonyles avec les groupes amines et guanides de macromolécules biologiques¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ pour former les produits de glycation avancée (AGEs). Ces glycations ont depuis été impliquées dans l'étiologie de maladies chroniques (Fig. 16) telles que le vieillissement prématuré, le diabète et ses complications, l'obésité, l'insuffisance rénale, les maladies cardiovasculaires, l'ostéoarthrite, les maladies neurodégénératives et le cancer (pour revue voir Rabbani et Thornalley 2015¹¹⁰).

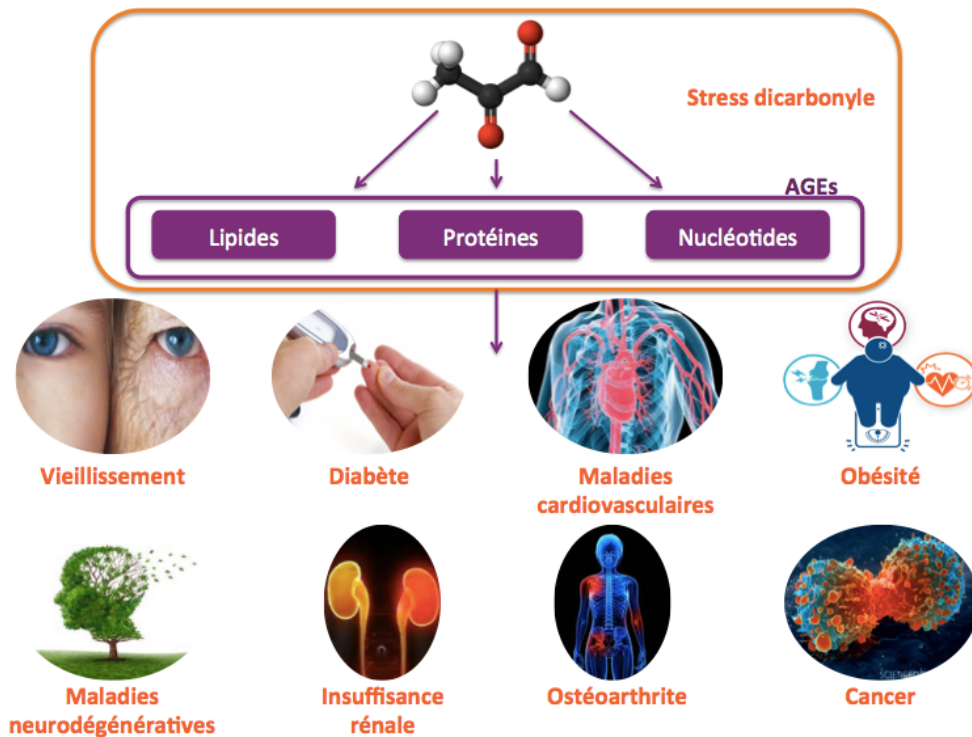


Figure 16. Implication du stress dicarbonyle dans des pathologies chroniques. L'accumulation de MG et de ses AGEs induit un stress dicarbonyle qui a été impliqué dans l'étiopathologie des maladies chroniques représentées dans ce schéma.

Le MG est donc une molécule extrêmement réactive et un agent glycant puissant. La modification des protéines par le MG est 10 000 à 50 000 fois plus efficace que par le glucose¹⁰⁴. Le MG forme des adduits de glycation au niveau des protéines, des acides nucléiques et des lipides. La glycation est un processus de liaison d'un sucre à une protéine de façon non-enzymatique, qui doit bien être distinguée de la glycosylation qui requiert une activité enzymatique¹¹¹. Donc le terme glycation désigne la modification non-enzymatique de protéines par des saccharides ou leurs dérivés. La glycation se déroule en une succession de réactions connues sous le nom de réaction de Maillard. Ce procédé implique de multiples réactions non-enzymatiques entre des groupes carbonyles et amines menant à la formation des AGEs¹¹² et s'apparente à une caramélisation.

La réaction de Maillard (Fig. 17) débute par une attaque nucléophile de l'azote du groupe amine sur le groupe carbonyle électrophile du sucre pour former une glycosamine. Après perte d'une molécule d'eau, une base de Schiff instable apparaît puis suit un réarrangement spontané (appelé réarrangement d'Amadori) en fructosamine ou produit d'Amadori¹¹³. Ces intermédiaires sont désignés sous le nom d'adduits précoces de glycation¹¹⁴. La fructosamine est alors dégradée en adduits plus stables appelés

produits de glycation avancée (AGEs). De plus, des carbonyles, formés lors d'une dégradation de base de Schiff en ne suivant pas la voie d'Amadori, peuvent entraîner par la suite la production d'AGEs^{104,114}. En effet, les dicarbonyles peuvent induire la formation d'AGEs plus directement, c'est à dire sans passer par les adduits de glycation précoce¹¹⁵.

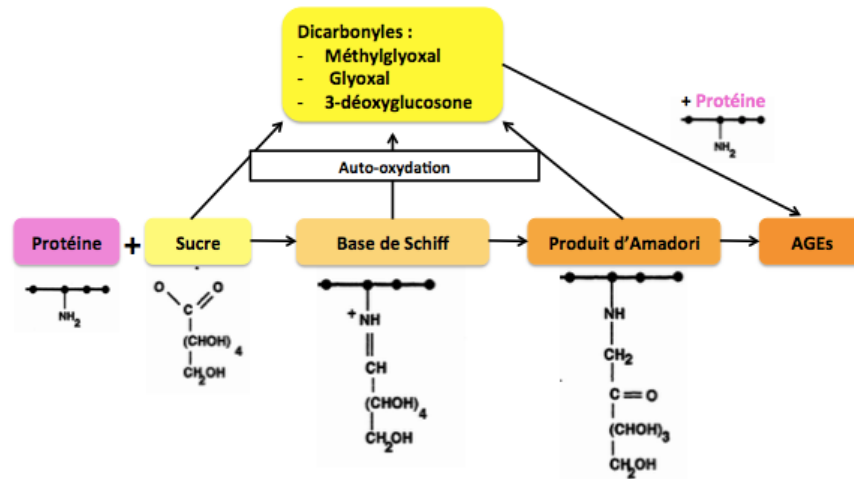


Figure 17. Glycation des protéines par la réaction de Maillard.

Les adduits formés par le MG sur les protéines, ou MG-AGEs (*methylglyoxal-derived AGEs*), ciblent particulièrement les arginines et dans une moindre mesure les lysines. Les hydroimidazolones (MG-H1/2/3), les argpyrimidines, les tétrahydropyrimidines (THF) sont les adduits formés par le MG sur les arginines. La formation d'adduits du MG à partir de lysine résulte en N^ε-(carboxyethyl)lysine (CEL) ou en dimères 1,3-di(N^ε-lysino)-4-méthyl-imidazolium (MOLD). L'adduction de lysine et d'arginine ensemble par le MG forme les adduits MODIC (*methylglyoxal-derived imidazolium cross-link*) (Fig. 18).

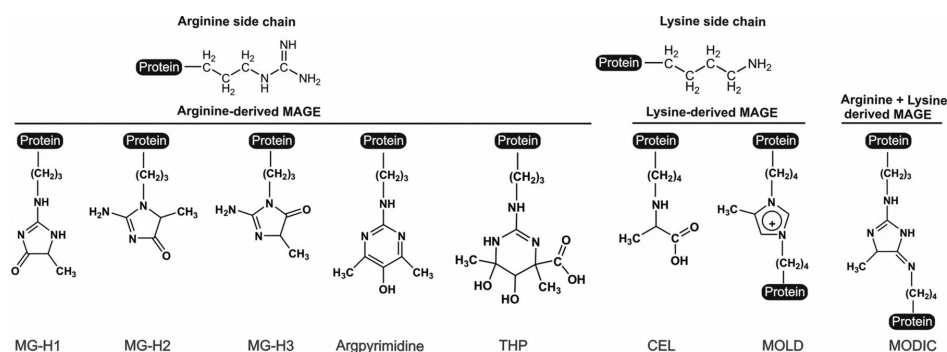


Figure 18. MG-AGEs, adduits du méthylglyoxal sur les acides aminés. L'adduction du MG sur les résidus arginines permet la formation de MG-H1, MG-H2, MG-H3, argpyrimidine et THP. L'adduction du MG sur les acides aminés lysines permet la formation de CEL et MOLD. La condensation de lysine et d'arginine par le MG donne les adduits MODIC.

Puisque le MG est présent dans toutes les cellules et est le dicarbone le plus réactif *in vivo*, l'identification de ses cibles est d'un intérêt scientifique certain. Les molécules modifiées par le MG sont principalement les résidus amines libres des protéines, des nucléotides et de certains lipides¹¹⁶. La proportion des molécules modifiées par le MG est de 0,1-1% des résidus lysine et arginine des protéines, 1/100.000 nucléotides et 0,1% des phospholipides basiques¹¹⁷. L'accumulation de ces adduits au niveau des macromolécules biologiques entraîne un nouveau type de stress cellulaire : le stress dicarbone¹¹⁸.

3.3. Détoxification du MG

Les cellules ont développé des systèmes de détoxification du MG pour se protéger de la glycation qu'il engendre. En effet, l'accumulation du MG induit la formation des AGEs et perturbe les fonctions cellulaires. La glycation des protéines provoque notamment l'inactivation d'enzymes, la dénaturation et la dégradation de protéines. La glycation des nucléotides augmente l'instabilité génétique, la mutagenèse et l'apoptose. La glycation des lipides perturbe l'intégrité de la membrane cellulaire. Ces effets délétères du MG sont évités grâce à la détoxification de 99% du MG cellulaire par des systèmes enzymatiques¹¹⁹.

3.3.1. Le système des glyoxalases

La voie majeure de détoxification du MG passe par le système des glyoxalases. Il s'agit d'un système conservé au cours de l'évolution comprenant 2 enzymes¹²⁰, les glyoxalases 1 et 2 (Glo1 et Glo2), qui détoxifient le MG en D-lactate¹²¹. L'hémithioacétal formé spontanément entre le MG et le GSH est converti par Glo1 en S-D-lactoylglutathion puis en D-lactate avec régénération du GSH par Glo2¹²² (Fig. 19). Glo1 catalyse aussi la détoxification d'autres α -oxoaldéhydes comme le glyoxal, le phénylglyoxal et l'hydroxyl-pyruvaldéhyde^{123,124}.

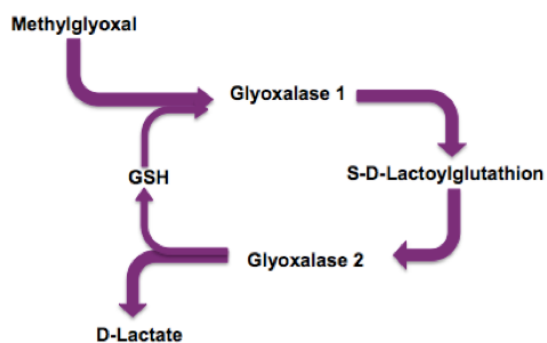


Figure 19. Détoxification du MG par le système des glyoxalases. Adapté de Thornalley et Rabbani 2011¹²⁵.

Le D-lactate produit peut quitter la cellule par diffusion à travers la membrane ou par un transporteur spécifique du lactate¹²⁶. L'inhibition de Glo1 par des analogues de GSH ou la déplétion en GSH augmente l'accumulation de MG¹²⁶⁻¹²⁸ alors que la sur-expression de l'enzyme réduit la quantité de MG cellulaire et prévient la formation des MG-AGEs¹²⁹. L'efficacité de cette voie de détoxification dépend de la disponibilité en GSH¹³⁰ qui détermine la formation spontanée du substrat hémithioacétal et de l'activité de Glo1 qui forme le produit non-toxique S-D-lactoylglutathion.

Glo1 est une isomérase homodimérique dépendante du Zn^{2+} . L'expression de Glo1 est régulée au niveau génique et par des modifications post-traductionnelles. Des polymorphismes génétiques ont récemment été identifiés en association avec une modification de l'activité enzymatique de Glo1¹³¹⁻¹³³. Les modifications post-traductionnelles de Glo1 regroupent la phosphorylation, la nitrosylation et la glutathionylation. Ce dernier type de modification au niveau de la cystéine 139 induit une inhibition de l'activité Glo1 en réponse au statut rédox de la cellule¹³⁴.

Glo2 est une thiolestérase monomérique qui contient un site de liaison des métaux binucléaires (zinc ou fer) qui est essentiel à la liaison du substrat et à l'activité catalytique¹³⁵. Glo2 est exprimée dans le cytosol et au niveau de la mitochondrie¹³⁶. Son rôle mitochondrial n'est pas encore élucidé mais l'activité Glo2 pourrait y être une source de GSH¹³⁷.

Une troisième glyoxalase, **Glo3**, a été décrite chez *Escherichia coli*¹³⁸ et des homologues ont été indentifiés chez *Caenorhabditis elegans* et chez la souris. Glo3 permet la conversion directe du MG en D-lactate. Une nouvelle enzyme Glo, capable de détoxifier le MG en lactate sans GSH, a été découverte chez l'humain. Cette enzyme, la déglycose **DJ-1**, aussi appelée PARK7 (*Parkinson disease protein 7*), est une protéine

chaperonne impliquée dans l'apparition de la maladie de Parkinson^{139,140}. DJ-1 est capable d'inverser la glycation précoce des protéines et délivre des acides aminés réparés et le MG détoxifié sous forme de lactate. La déglycation des acides aminés par DJ-1 a rétabli l'activité de protéines modifiées par le MG comme l'albumine, la GAPDH, l'aldolase et l'aspartate aminotransférase¹⁴¹.

3.3.2 Les aldoses réductases

Le MG peut aussi être détoxifié par les enzymes de la famille des aldoses réductases. Cette superfamille d'enzymes est capable de réduire le MG. Les enzymes de la classe A (AKR1A) sont des aldéhydes réductases (EC 1.1.1.2) alors que les enzymes de la classe B (AKR1B) sont des aldo-kéto réductases (EC 1.1.1.21). La réduction du MG par les aldo-kéto réductases est 100 fois plus efficace que celle par les aldéhydes réductases¹⁴². Parmi ces aldo-kéto réductases (AKRs) l'isoenzyme AKR1B1 est la plus active pour détoxifier le MG^{119,143}. Au niveau de cellules endothéliales, la contribution à la détoxification du MG a été évaluée à 60% par le système Glo1 et à 40% par AKR1B1 dans des conditions de faible concentration en MG (1-20 μ M)¹⁴³ alors qu'à plus hautes doses de MG, la contribution de Glo1 augmente. La détoxification du MG par les AKRs nécessite la présence de NADPH comme co-facteur et peut mener à la production de 2 produits différents en fonction de la disponibilité de GSH (Fig. 20). En effet, quand AKR métabolise le MG sans GSH, le produit principal formé est l'acétol à 95% et le lactaldéhyde à 5%¹⁴². Alors qu'en présence de GSH, AKR forme principalement le lactaldéhyde¹⁴⁴.

3.3.3 Les aldéhydes déshydrogénases

Un autre groupe d'enzyme, les aldéhydes déshydrogénases, sont capables de détoxifier le MG. En particulier, l'isoenzyme ALDH9, ou bétaine aldéhyde déshydrogénase, oxyde le MG en présence de NAD⁺ en pyruvate^{145,146} (Fig. 20).

3.3.4 La 2-oxoaldéhyde déshydrogénase

Finalement, la 2-oxoaldéhyde déshydrogénase (2-OHD) catalyse l'oxydation du MG en pyruvate, principalement au niveau du foie¹⁴⁵ (Fig. 20).

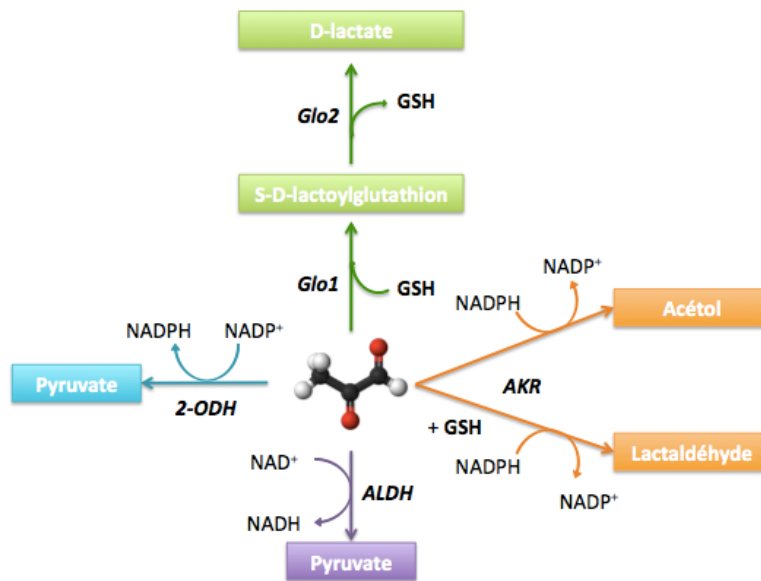


Figure 20. Voies de détoxification du MG. Le MG peut être détoxifié par 4 voies enzymatiques. En vert, le système des glyoxalases converti séquentiellement l'hémithioacétal formé entre le MG et le GSH en S-D-lactoylglutathion puis en D-lactate grâce aux enzymes Glo1 et Glo2. En orange, le MG peut être détoxifié par les aldoses réductases (AKR) qui utilisent le NADPH comme co-facteur. Le produit de réaction est majoritairement l'acétol en absence de GSH et le lactaldéhyde en présence de GSH. En mauve, le MG est oxydé en pyruvate par les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) avec le NAD⁺ utilisé comme co-facteur. En bleu, l'oxydation du MG en pyruvate est catalysée en présence de NADP⁺ par la 2-oxoaldéhyde déshydrogénase (2-ODH). Adapté de Vander Jagt et al ¹⁴⁵.

3.4. « MG-scavengers » et modulateurs de l'activité Glo1

Dans le but de moduler le MG intracellulaire et le stress dicarbone, diverses approches sont possibles. D'une part, l'utilisation de molécules capables de capturer le MG, les « MG-scavengers », empêchant ainsi la glycation des macromolécules et la formation des AGEs. D'autre part, la modulation de l'activité de Glo1, en tant que système majoritaire de détoxification du MG, permet de réguler la concentration en MG.

3.4.1 Molécules capables de capturer le MG ou « MG-scavengers »

Des molécules qui jouent un rôle de « scavenger » du MG sont cours d'évaluation dans des études concernant principalement le diabète et les pathologies cardiovasculaires. Parmi ces molécules, l'aminoguanidine, le N-phénacylthiazolium bromure, l'alagébrium, la carnosine, la pyridoxamine, la N-acétylcystéine et la metformine ont montré une capacité de capture et d'inhibition du MG (Fig. 21).

L'**aminoguanidine** est un composé hydrazine nucléophile qui capture le MG par ses groupes guanidinium et permet ainsi de réduire la formation des AGEs^{147,148}.

Le **N-phénylthiazolium bromure** et l'**alagébrium** sont des molécules capables de casser les acides aminés condensés (*cross-link*) comme les MODIC. Leur évaluation en études précliniques montre une amélioration des complications vasculaires du diabète grâce à une diminution de la formation des AGEs¹⁴⁹⁻¹⁵².

La **carnosine** est un dipeptide naturel (β -alanyl-L-histidine) produit au niveau du cerveau, du foie, des reins et des muscles. La carnosine est capable de capturer les ROS, les NRS (espèces réactives de l'azote), les dicarbonyles et a un pouvoir chélateur (pour revue voir Boldyrev et al. 2013¹⁵³). La carnosine capture le MG¹⁵⁴ et est capable d'interférer à différents niveaux de la réaction de Maillard pour empêcher la formation des AGEs¹⁵⁵ et serait également capable d'inverser la formation d'AGEs¹⁵⁶. La carnosine a donc un effet protecteur à différents niveaux vis-à-vis du stress dicarbonyle et du stress oxydant. Malheureusement, cette molécule est dégradée dans le sérum humain par la carnosinase¹⁵⁷ ce qui restreint son utilisation thérapeutique.

La **pyridoxamine** est un analogue de la vitamine B6 qui est capable de capturer le MG et d'augmenter l'activité de Glo1¹⁵⁸. Cette molécule montre des effets bénéfiques contre la majorité des complications liées au diabète et est en cours d'étude pour son utilisation dans le traitement des patients atteints de diabète de type 2¹⁵⁹.

La **N-acétylcystéine** est une molécule bien connue par ses propriétés anti-oxydantes mais est aussi un « scavenger » du MG^{160,161}. Son effet anti-oxydant peut également être impliquée dans son inhibition de la cascade de glycation¹⁶².

La **metformine** est une molécule utilisée par le traitement des diabétiques de type 2. La metformine inhibe la néoglucogenèse hépatique et favorise l'absorption cellulaire du glucose ce qui induit une action hypoglycémiant¹⁶³. La metformine est aussi capable de capturer le MG par liaison entre leurs groupes guanidium et carbonyles¹⁴⁸. Le traitement de patients diabétiques à la metformine permet de réduire leur taux plasmatique de MG¹⁶⁴.

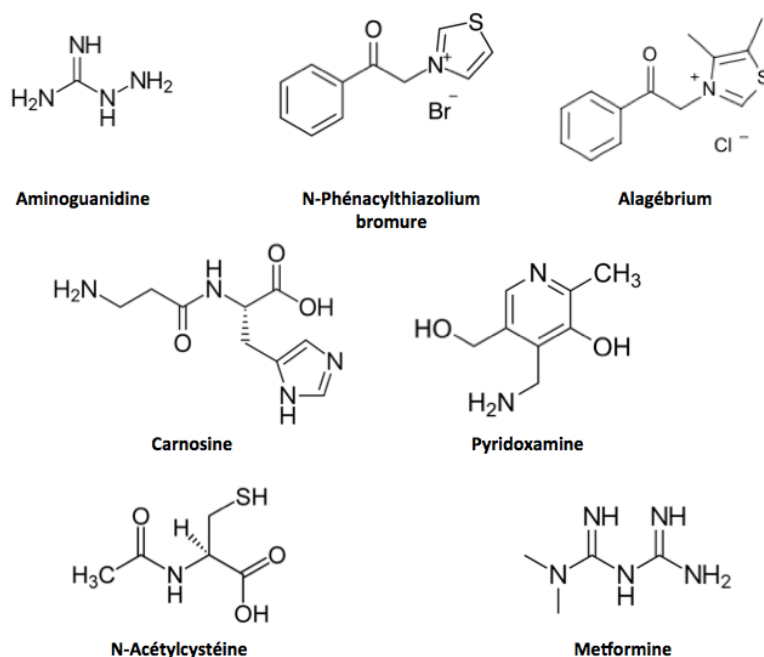


Figure 21. Structure chimique des molécules décrites comme étant capables de capturer le MG ou « MG-scavengers ».

3.4.2. Inhibition de Glo1

L'inhibition de Glo1 a pour conséquence de réduire la détoxification du MG et donc favorise son accumulation ainsi que l'induction d'un stress oxydant.

Plusieurs composés naturels sont capables d'inhiber Glo1 tels que les flavonoïdes (quercétine, lutéoline, naringine)^{165,166}. La curcumine, une autre molécule naturelle induit une inhibition compétitive de Glo1 avec une plus grande efficacité que les flavonoïdes¹⁶⁷.

Des inhibiteurs synthétiques de Glo1 ont également été développés, notamment sur base d'analogues du GSH, comme le S-p-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester (BBGC). La membrane cellulaire est perméable à cette molécule dont le pouvoir inhibiteur est révélé après que ses groupes esters soient enlevés par des estérases cellulaires non spécifiques¹⁶⁸. Cette pro-drogue a été encore améliorée pour augmenter sa stabilité dans le plasma^{169,170}.

Le méthotrexate est une drogue chimiothérapeutique largement utilisée dans le traitement de différents cancers dont les leucémies. Il s'agit d'un analogue de l'acide folique qui inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Une diminution de la concentration plasmatique en D-lactate chez les patients traités avec le méthotrexate a permis de mettre en évidence son action inhibitrice de Glo1¹⁷¹.

3.4.3. Activation de Glo1

La stimulation de l'activité de Glo1 a pour effet de diminuer le taux cellulaire de MG. L'activation du facteur de transcription en charge de la régulation de Glo1, Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), est une stratégie pour induire l'expression et l'activité de l'enzyme de détoxification du MG¹⁷². Le resvératrol est un activateur de Nrf2 qui est en cours d'évaluation clinique dans le traitement de l'obésité¹⁷³. De façon intéressante, Nrf2 est aussi impliqué dans la régulation de l'expression des AKRs^{174,175}.

3.5. Le MG, un métabolite toxique pour la tumeur

Dans les années 60, le méthylglyoxal a été proposé comme une molécule anti-cancer¹⁷⁶. Des expériences *in vivo* ont montré une action anti-tumorale d'injections intrapéritonéales ou intra-veineuses de MG^{177,178}. Plus récemment, le traitement au MG de souris porteuses de xénogreffe de cancer colorectal a permis de réduire le volume tumoral en inhibant l'expression de Myc et en diminuant la glycolyse¹⁷⁹. L'action anti-tumorale du MG est aussi liée à l'inhibition de l'activité de la GAPDH^{95,180}.

Plusieurs études font état de l'induction de l'apoptose au niveau de cellules cancéreuses par le MG, via différents mécanismes. L'augmentation du stress dicarbone induit la génération de ROS et la carence en GSH¹⁸¹, inhibe la respiration mitochondriale¹⁸²⁻¹⁸⁴, induit des modifications et des adductions ADN-protéines engendrant une instabilité génétique¹⁸⁵, inhibe le cycle cellulaire^{183,185}, provoque une inhibition de molécules anti-apoptotiques en même temps qu'une induction de molécules pro-apoptotiques¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ et perturbe la perméabilité de la membrane mitochondriale, facilitant le relargage du cytochrome c¹⁸⁹.

En plus des ces effets pro-apoptose, le MG est aussi capable de diminuer les capacités migratoires et invasives des cellules des cancers hépatique¹⁹⁰ et colorectal¹⁷⁹.

Cependant, la toxicité du traitement au MG pour les cellules normales a mis un terme à l'utilisation de ce dicarbone comme drogue anti-cancéreuse¹⁹¹. Dès lors la stratégie adoptée pour induire une augmentation toxique de MG dans les tumeurs a été d'inhiber Glo1^{128,168} puisque cette enzyme est surexprimée au niveau des cancers du sein¹⁹², du pancréas¹⁹³, de la prostate¹⁹⁴, des poumons¹⁹⁵, du mélanome¹⁹⁶ et du colon¹⁹⁷. Le traitement des cellules tumorales avec le BBGC induit un stress dicarbone élevé qui induit l'apoptose de cellules du cancer du poumon¹⁹⁵. Depuis, d'autres études ont confirmé une corrélation entre une activité Glo1 élevée et la sensibilité des cellules au

BBGC¹⁹⁸. De même, le traitement à la curcumine, un autre inhibiteur de Glo1, diminue la croissance tumorale dans les cancers du sein, de la prostate et l'astrocytome¹⁶⁷. L'inhibition de l'expression de Glo1 par l'utilisation de petits ARN interférants (siRNA) augmente la sensibilité de cellules cancéreuses mammaires à la radiothérapie¹⁹⁹. Ainsi, ces études et d'autres ont établi la stratégie de cibler Glo1 comme une thérapie anti-proliférative et pro-apoptotique pour contrer la progression tumorale^{185,200,201}.

3.6 Rôle protumoral du MG

3.6.1 MG, AGEs et RAGEs

Plus récemment, notre laboratoire et d'autres ont mis en évidence un effet protumoral du MG et du stress dicarbone. En effet, l'accumulation ou le traitement avec des **AGEs** induit la prolifération, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses mammaires²⁰². Une cible protéique du MG dans le contexte du cancer est HSP27 (*heat-shock protein 27*). La glycation de cette chaperonne anti-apoptotique renforce son activité²⁰³ et protège les cellules de cancer du poumon²⁰⁴ et du cancer gastrointestinal²⁰⁵ de l'apoptose.

Les **RAGEs** sont les récepteurs membranaires des AGEs. Ils sont surexprimés dans le cancer gastrique et associés à la capacité invasive et métastatique de ces tumeurs²⁰⁶. Au niveau de ce type de cancer, l'inhibition des RAGEs diminue la signalisation Akt, réduit l'expression de la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP-2) impliquée dans le processus métastatique et diminue l'expression de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), un facteur nucléaire marqueur de la prolifération cellulaire²⁰⁷. L'expression des RAGEs est liée au phénotype métastatique de cellules primaires de mélanome²⁰⁸, ces récepteurs sont surexprimés au niveau du mélanome humain par rapport à la peau saine et le développement tumoral de mélanome en modèle murin est inhibé par un traitement avec un anticorps bloquant²⁰⁹. L'inhibition des RAGEs diminue la prolifération des cellules cancéreuses mammaires²¹⁰, induit l'apoptose et inhibe la croissance de tumeurs de la prostate²¹¹. La perte des RAGEs inhibe également l'angiogenèse et la progression du cancer colorectal²¹². L'inhibition des RAGEs est capable de diminuer la croissance tumorale et l'apparition de métastases au niveau de souris ayant subi une xénogreffe et de souris développant spontanément des tumeurs²¹³. Les RAGEs sont également d'importants médiateurs de l'inflammation qui régulent les échanges entre des voies de survie et d'autophagie dans les cellules

tumorales. Les RAGEs favorisent l'autophagie et limitent l'apoptose²¹⁴. L'interaction AGE-RAGE induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de NFκB et des MAP kinases, favorisant l'inflammation et la survie des cellules cancéreuses^{215,216}.

3.6.2 MG, un oncométabolite

Un nouveau concept lie la progression et le métabolisme tumoral, il s'agit des **oncométabolites**. « Un oncométabolite est un métabolite qui, quand il est présent à des niveaux assez élevés, est suffisant à promouvoir la transformation cellulaire ou à conférer un phénotype associé au cancer »²¹⁷. Des variations du métabolisme peuvent amener à des niveaux de base modifiés de certains métabolites qui ont une influence sur le métabolisme lui-même, la signalisation cellulaire, la différenciation et le potentiel métastatique.

L'accumulation des oncométabolites peut être la conséquence de (a) la perte de fonction d'une enzyme avec accumulation de son substrat, (b) du gain de fonction d'une enzyme avec accumulation de son produit et (c) de l'apparition d'une activité néomorphique suite à une mutation avec l'accumulation d'un nouveau métabolite ou (d) de produits dérivés du métabolisme²¹⁷.

Des exemples bien établis d'oncométabolites sont le succinate, le fumarate et le 2-désoxyglutarate (2-HG). Le succinate et le fumarate sont accumulés au niveau des cellules tumorales suite à une perte de fonction des enzymes succinate déshydrogénase (SDH)²¹⁸ et fumarate hydratase (FH)²¹⁹, respectivement. L'accumulation de 2-HG est due à la mutation de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) qui acquiert une activité catalytique modifiée menant à la production de ce nouveau métabolite²²⁰. Le mécanisme d'action de ces 3 oncométabolites est semblable car ils partagent une structure similaire, proche de celle de l'α-kétoglutarate et constituent donc des inhibiteurs compétitifs pour une famille d'enzymes comprenant les dioxygénases dépendantes de l'α-kétoglutarate^{221,222} (Fig. 22).

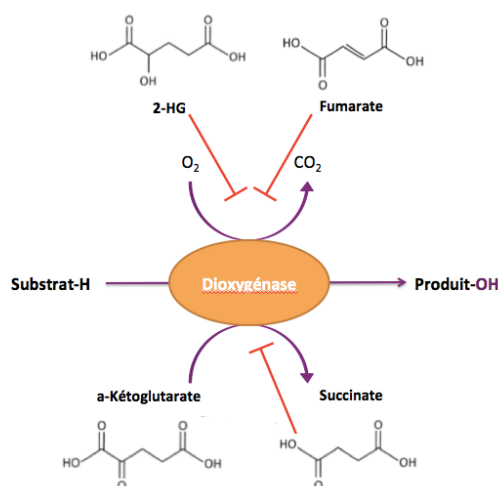


Figure 22. Inhibition des dioxygénases dépendantes de l'a-kétoglutarate par les oncométabolites 2-HG, fumarate et succinate. La superfamille des dioxygénase dépendante de l'a-kétoglutarate utilise l'a-kétoglutarate (a-KG) et l'oxygène comme co-substrats pour hydroxyler un substrat en catalysant la décarboxylation de l'a-KG en succinate et CO₂. L'activité de ces enzymes peut être inhibée par les oncométabolites 2-hydroxyglutarate (2-HG), fumarate et succinate qui entrent en compétition avec l'a-KG. Adapté de Nowocki & Gottlieb 2015²²³ et de Sullivan et al 2016²²⁴.

Parmi ces enzymes, les prolyl-hydroxylases (PHD) qui sont notamment en charge de la régulation d'HIF1a. En présence d'oxygène, les PHD hydroxylient les groupes prolyl de HIF ce qui permet sa liaison à la protéine von Hippel-Lindau et mène à sa dégradation par le protéasome. L'accumulation de succinate ou de fumarate induit un phénotype pseudohypoxique en inhibant les PHD ce qui stabilise HIF1a et favorise son rôle pro-tumoral^{218,225,226}. Un autre exemple est la régulation épigénétique opérée par les oncométabolites en inhibant les enzymes TET (*translocation methylcytosine dioxygenase*). Les TET sont impliquées dans le processus de déméthylation de l'ADN et leur inhibition par le succinate, le fumarate ou le 2-HG induit une hyperméthylation de l'ADN au niveau de promoteurs et donc la répression de l'expression de certains gènes^{222,227,228}. Ces oncométabolites sont aussi capables de perturber l'activité des histones déméthylases (HDM)²²⁹, augmentant le niveau de méthylation des histones, ce qui peut avoir différents effets selon les histones et les résidus méthylés considérés. Par exemple, la méthylation au niveau de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4) est liée à une augmentation de l'expression génique alors que la méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone 3 (H3K9 et H3K27) est liée à une répression génique^{230,231}.

Le MG, produit dérivé de la glycolyse, peut être considéré comme un oncométabolite. Le MG exogène à faible dose augmente la signalisation de voies pro-cancer, démontrant un potentiel cancérigène du MG²³². De plus, l'effet mutagène du MG,

en glycant les acides nucléiques et en induisant un stress oxydant, contribue à la progression tumorale. Une étude indique qu'une diminution de l'expression de Glo1 est suffisante pour transformer des hépatocytes pré-cancéreux et permettre la croissance tumorale²³³.

Le MG pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation épigénétique du cancer. Dans le contexte du diabète, la glycation de l'histone H2A par le MG a été identifiée, perturbant sa structure et potentiellement la régulation de la chromatine²³⁴. La modification des histones par le MG est par ailleurs une cible potentielle par des auto-anticorps circulants chez les patients atteints de diabète de type 1²³⁵. Une réaction immunitaire contre des AGEs pourrait induire un environnement inflammatoire favorisant le développement tumoral.

3.7. Parallèle entre MG et ROS

Les stress oxydant et dicarbone présentent de nombreux points communs et sont liés l'un à l'autre. En effet, l'accumulation de MG induit un dysfonctionnement mitochondrial qui provoque l'augmentation de la production de ROS²³⁶⁻²³⁸. Le stress oxydant favorise la production de MG et des AGEs (réaction de Maillard)¹²⁷. Brownlee²³⁹ a montré que l'hyperglycémie rencontrée dans le diabète induit la production de superoxyde mitochondrial qui provoque des dommages à l'ADN et l'activation de PARP (Poly-ADP-ribose polymérase). Les polymères générés par PARP se lient à la GAPDH et inhibent son activité. L'inhibition de GAPDH induit l'accumulation des trioses phosphates qui sont les précurseurs de la formation spontanée de MG⁹². De plus, le stress oxydant résultant de l'hyperglycémie induit la peroxydation des lipides, une autre source de production du MG¹⁰⁰.

3.7.1 GSH

Le MG est capable d'inhiber l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme du GSH, la GSH peroxydase et la GSH réductase, réduisant ainsi la disponibilité de ce facteur majeur dans la défense anti-oxydante^{119,240}. L'activité de Glo1 nécessite le GSH comme co-facteur et réquisitionne ainsi une partie du GSH. D'autre part, quand le stress oxydant s'accapare les réserves de GSH, celui-ci n'est plus disponible pour la détoxification du MG et le dicarbone s'accumule.

La détoxification du MG par les AKR a aussi un impact sur le stress oxydant car le co-facteur de cette réaction est le NADPH. Le NADPH est un équivalent réduit indispensable à la régénération du GSH²⁴¹.

3.7.2 Nrf2

Nrf2 (*NF-E2 related factor*) est un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress. Dans les conditions normales, Nrf2 est négativement régulé par Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Keap1 favorise l'ubiquitination de Nrf2 et sa dégradation par le protéasome. En condition de stress, la liaison Keap1-Nrf2 est inhibée, ce qui permet l'activité transcriptionnelle de Nrf2 dans le noyau où il se lie à des éléments de réponse antioxydante (ARE) (Fig. 23). Les gènes cibles de Nrf2 sont impliqués dans la défense antioxydante, la détoxification, le métabolisme de l'hème, le métabolisme des lipides, la lipo- et la néoglucogénèse, la génération de NADPH et la voie des pentoses phosphates, l'autophagie et l'apoptose et la métabolisation des xénobiotiques (pour revue voir Menegon et al 2016)²⁴². Ces différents processus biologiques sont liés à la protection des cellules contre le stress.

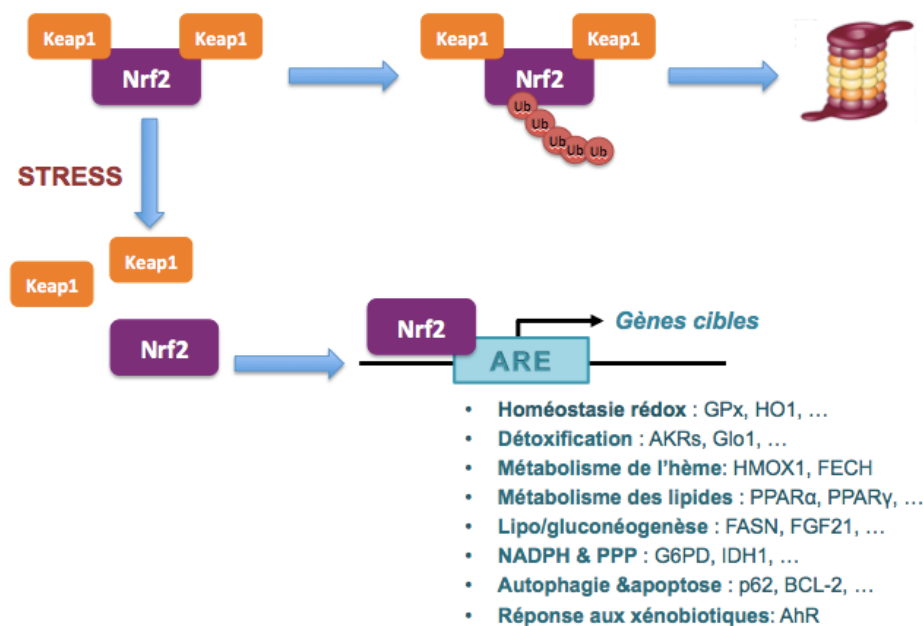


Figure 23. Régulation de Nrf2 par Keap et fonctions biologiques contrôlées par Nrf2. La liaison de Keap1 à Nrf2 provoque son ubiquitination et sa dégradation dans le protéasome. En condition de stress, Keap1 se détache de Nrf2 qui peut alors se lier au niveau de l'élément de réponse antioxydante (ARE) pour activer la transcription de gènes impliqués dans les processus listés.

Nrf2 est un facteur protecteur des cellules qui est considéré d'une part comme un suppresseur de tumeur et d'autre part comme un oncogène. En effet, en activant des

processus de défense contre les stress, Nrf2 protège les cellules normales des métabolites réactifs comme les ROS et le MG. Il empêche des dommages carcinogéniques²⁴³⁻²⁴⁵ et son efficacité pour la chimoprévention du cancer est étudiée dans des modèles animaux et dans des études cliniques chez l'homme²⁴⁶.

D'autre part, Nrf2 est surexprimé ou hyperactivé dans les cancers. L'activation d'oncogènes comme KRAS, c-Myc et BRAF mène à l'augmentation de l'expression de Nrf2²⁴⁷. Dans les cancers du poumon et hépatocellulaire, des mutations inhibitrices de Keap1²⁴⁸ et activatrices de Nrf2²⁴⁹ mènent à l'activation du facteur de transcription. Ces mutations sont principalement somatiques, augmentent la défense antioxydante des cellules cancéreuses et favorisent leur survie (pour revue voir Menegon et al 2016²⁴²). De plus, l'activation de Nrf2 favorise la prolifération cellulaire et la résistance au cisplatine de cellules cancéreuses pulmonaires²⁵⁰.

Nrf2 a un effet à la fois sur le stress oxydant et sur le stress dicarbone. Nrf2 est responsable du contrôle transcriptionnel de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la défense antioxydante²⁵¹ telle que l'hème oxygénase (HO1) qui catalyse la dégradation de l'hème en biliverdine, un agent antioxydant. L'expression de la glutathion peroxydase (GPX) est aussi régulée par Nrf2. Cette enzyme utilise le GSH pour réduire les radicaux libres comme H₂O₂. La glutathion réductase qui régénère le GSH est aussi une cible de Nrf2. L'activité Nrf2 est donc favorable à la production du GSH et à son utilisation pour l'élimination des ROS. Le GSH produit peut aussi être utilisé pour l'activité de détoxification du MG via Glo1.

Nrf2 contrôle l'expression d'enzymes impliquées dans la détoxification dont Glo1 et les AKRs. Le promoteur de Glo1 contient un site ARE qui permet la liaison de Nrf2¹⁷². Les enzymes AKR sont aussi régulées transcriptionnellement par Nrf2^{174,252,253} et leur expression est d'ailleurs considérée comme un biomarqueur de l'activité de Nrf2 au niveau des cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules¹⁷⁵.

Il est intéressant de noter que l'activité Nrf2 est soumise à un rétrocontrôle en réponse aux métabolites réactifs. En cas de stress, les métabolites réactifs comme les ROS et le MG sont accumulés et les cystéines régulatrices de Keap1 peuvent être oxydées par les ROS ou le succinate (oncométabolite), libérant ainsi Nrf2. Nrf2 favorise la synthèse de GSH et son rôle antioxydant ce qui réduit le stress, lève l'inhibition de Keap et déstabilise Nrf2 (Fig. 24)²²⁴.

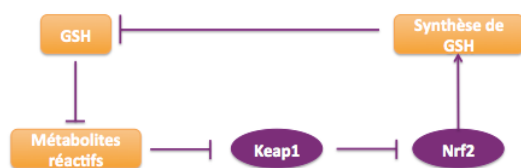


Figure 24. Rétrocontrôle de l'activité Nrf2. Adapté de Sullivan & Vander Heiden 2016²²⁴.

7.3 Effet hormétique

Une dernière similitude entre stress oxydant et stress dicarbone est qu'à faible dose ils exercent des effets protumoraux tandis qu'à fortes doses, ils deviennent toxiques pour les cellules cancéreuses. Il s'agit d'un effet hormétique²⁵⁴ (Fig. 25).

Il a été démontré qu'une situation de stress oxydant modérée est bénéfique à la progression tumorale. Par exemple, la mutation KRAS entraîne la formation de ROS dans la mitochondrie et l'inhibition de ce stress oxydant inhibe la prolifération cellulaire et la croissance indépendante du substrat²⁵⁵. Une autre étude démontre l'effet pro-métastatique des ROS au niveau de cellules de cancer utérin²⁵⁶. Le stress oxydant est capable d'induire une instabilité de l'ADN mitochondrial qui est favorable au phénotype métastatique²⁵⁷. D'autre part, une concentration élevée de ROS est toxique pour les cellules tumorales. Des études mettent à profit cette hypothèse en inhibant les défenses antioxydantes dans les cellules cancéreuses de façon à augmenter leur quantité de ROS endogène et ainsi induire l'apoptose. Ainsi, l'inhibition de Nrf2^{247,258} ou de la superoxyde dismutase (SOD)²⁵⁹ réduit la progression tumorale in vivo.

Pareillement, le stress dicarbone pourrait avoir ces effets biphasiques. En effet, la littérature reporte à la fois des effets anti-tumoraux et pro-tumoraux du MG. L'induction de l'apoptose et de la régression tumorale sous traitement au MG sont potentiellement dans une zone de concentrations élevées du dicarbone qui devient toxique. Alors que les effets pro-tumoraux du MG sont induits dans des conditions de stress dicarbone plus modérées, gérables par les cellules cancéreuses à leur bénéfice.

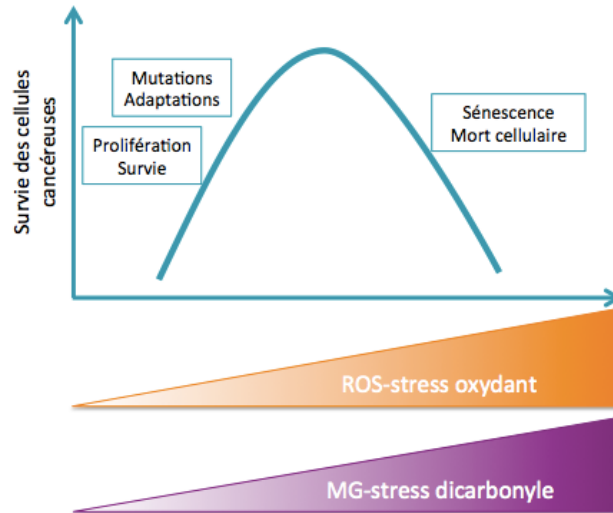


Figure 25. Effet hormétique des stress oxydants et dicarbonyle. De faibles concentrations en ROS et MG peuvent être bénéfiques aux cellules cancéreuses et favoriser leur prolifération, leur survie et leur progression en provoquant l'instabilité génétique et les adaptations métaboliques. Des stress trop élevés ne sont plus contrôlés par les cellules cancéreuses et deviennent toxiques, induisant la sénescence et la mort. Adapté de Cairns 2011³.

II. Objectifs du travail

Objectifs du travail

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une dérégulation de leur métabolisme énergétique. Leur utilisation préférentielle de la glycolyse, plutôt que de la respiration mitochondriale, en présence d'oxygène (effet Warburg) est un phénotype largement décrit dans différents types de cancer. L'augmentation de l'activité glycolytique mène à la production spontanée du méthylglyoxal (MG). Le MG est un dicarbonyle réactif capable de former des adduits de glycation (par la réaction de Maillard) sur les amines des macromolécules biologiques, lipides, acides nucléiques et protéines. Ces adduits sont appelés produits de glycation avancée (AGEs). Les cellules ont développé des voies de détoxification du MG. Le système des glyoxalases (Glo), composé de 2 enzymes Glo1 et Glo2, est responsable de la majorité de la détoxification du MG en le convertissant en D-lactate. L'accumulation de MG et des AGEs induit un stress dicarbonyle qui a été largement étudié dans le contexte du diabète. Cependant le rôle du stress dicarbonyle dans le développement du cancer a été peu exploré à ce jour.

En 2013, le Laboratoire a initié une nouvelle thématique de recherche visant à étudier le rôle du stress dicarbonyle dans le processus tumoral et métastatique. Le projet de cette thèse est intégré dans cette thématique de recherche et comprend trois principaux objectifs :

Le premier objectif a été d'évaluer l'état du stress dicarbonyle au niveau des cancers et d'établir le rôle pro-tumoral du MG. Pour ce faire, nous avons mis en relation l'accumulation des AGEs avec le caractère malin dans le cancer du sein et le cancer colorectal grâce à des études immunohistochimiques permettant la détection des adduits du MG, argpyrimidine et MG-H1. Nous avons également développé un test permettant de mesurer l'activité enzymatique de Glo1. De plus, nous avons prouvé le rôle pro-tumoral du MG dans des modèles de croissance tumorale *in vivo* et l'inhibition de ces effets par le traitement avec une molécule bloquant le MG, la carnosine. Finalement, nous avons identifié une nouvelle cible protéique de la glycation par le MG et lié cette modification à l'inhibition d'une voie suppresseur de tumeur. Nos travaux ont permis de révéler pour la première fois un mécanisme moléculaire pro-oncogénique lié au stress dicarbonyle et contré efficacement par la carnosine, un puissant agent bloqueur du MG.

Le second objectif de cette étude était de comprendre le rôle paradoxal du MG rapporté dans le contexte du cancer. En effet, des études montrent un rôle anti-tumoral du MG alors que d'autres, dont nos propres travaux, ont montré un rôle pro-tumoral du MG. Pour ce faire, nous avons comparé le métabolisme énergétique et la réponse au stress dicarbone de lignées cancéreuses de différents types. Nous avons aussi utilisé un modèle de croissance tumorale *in ovo* pour démontrer un effet biphasique du MG c'est à dire induisant la croissance tumorale à faible dose et l'inhibant à forte dose.

Le troisième objectif de cette étude était de tester l'hypothèse selon laquelle la résistance des tumeurs de mélanome aux traitements ciblés serait liée à leur capacité à contrôler le stress dicarbone.. Pour ce faire, nous avons comparé les niveaux de stress dicarbone dans des modèles cellulaires de mélanome sensibles ou ayant acquis une résistance au traitement par le Vémurafenib.

Nos travaux pionniers dans le contexte de l'étude du stress dicarbone en pathologie cancéreuse établissent un lien nouveau entre l'adaptation du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses et leur phénotype agressif. De manière intéressante, nos travaux démontrent que les drogues connues pour leur effet inhibiteur du MG (comme la metformine et la carnosine) pourraient représenter un moyen thérapeutique anticancéreux prometteur dont il faudra poursuivre la caractérisation et le développement.

III. Résultats

Résultats

1. Les tumeurs du sein de type triple-négatifs accumulent significativement moins d'adduits spécifiques du méthylglyoxal que les autres sous-types

1.1 Introduction

Le cancer du sein représente la forme de cancer la plus fréquente et la plus mortelle chez les femmes²⁶⁰. Cet ensemble de malignités est subdivisé en catégories selon leurs caractéristiques histologiques et moléculaires. L'une des classifications les plus utilisées en clinique repose sur le profil d'expression de certains récepteurs et permet la ségrégation des lésions tumorales du sein en quatre principaux sous-groupes²⁶¹. Les tumeurs triple positives présentent l'expression des récepteurs aux oestrogènes (ER+), à la progestérone (PR+) et le récepteur HER2/Neu (HER2+). Les autres catégories sont les tumeurs HER2 positives (HER2+), les tumeurs HER2 négatives (HER2-) et les tumeurs triple négatives (ER-, PR-, HER2-) qui n'expriment aucun des ces trois récepteurs. Cette catégorisation permet d'adapter le traitement médicamenteux proposé aux patientes. En effet, les tumeurs triple positives et HER2- peuvent être traitées par hormonothérapie, les tumeurs de type HER2+ par un anticorps bloquant ce récepteur comme le Trastuzumab. Malheureusement, les tumeurs triple négatives ne permettent à ce jour aucune stratégie de traitement ciblé et ne sont donc prises en charge qu'à l'aide de chimiothérapie comme le cisplatine. Cette dernière catégorie de cancer du sein rassemble 15 à 20% des cas²⁶² et présente un profil agressif. Les tumeurs ER-/PR-/HER2- constituent donc un véritable défi thérapeutique car elles sont difficiles à traiter et associées à un mauvais pronostic.

Les tumeurs malignes sont caractérisées par un haut taux de prolifération qui doit être supporté par un approvisionnement énergétique important. La dérégulation du métabolisme énergétique est une des particularités reconnues des cellules cancéreuses¹. Le cancer du sein a été associé à l'obésité²⁶³ et au diabète²⁶⁴, deux autres pathologies liées à des perturbations métaboliques et plus spécifiquement à l'utilisation du glucose.

La détection du stress dicarbone au niveau de tumeurs malignes humaines est encore peu explorée, notamment au niveau du cancer du sein. Seule une brève étude a montré l'accumulation de ces AGEs dans les tumeurs mammaires²⁶⁵. Dans cette étude, la spécificité d'un anticorps anti-argpyrimidine a été vérifiée et la détection de ces adduits a révélé une forte accumulation au niveau de 5 cas d'adénocarcinomes mammaires. L'investigation de l'impact du MG sur le développement de ce type de malignité est

encore à ses débuts. En effet, quelques études ont lié l'augmentation de l'expression et de l'activité Glo1 au caractère malin dans le sein¹⁹² et ont corrélé cette expression avec le stade tumoral²⁶⁶. D'autre part, une amplification du gène GLO1 a été observée dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses mammaires¹⁹⁸.

L'objectif de cette étude est d'évaluer le stress dicarbone au niveau de tumeurs mammaires humaines et de lignées cellulaires de cancer du sein.

1.2 Résultats

Nous avons évalué l'accumulation d'adduits protéiques du MG, en particulier les résidus argpyrimidine, au niveau d'échantillons tumoraux et de tissu mammaire normal adjacent provenant de 7 patientes atteintes de cancer du sein. La détection des ces adduits par immunoblot, en utilisant le même anticorps spécifique dirigé contre les argpyrimidine que dans l'étude de van Heijst²⁶⁵, a montré une accumulation plus élevée au niveau des lésions tumorales qu'au niveau des échantillons du tissu sain (Fig. 26).

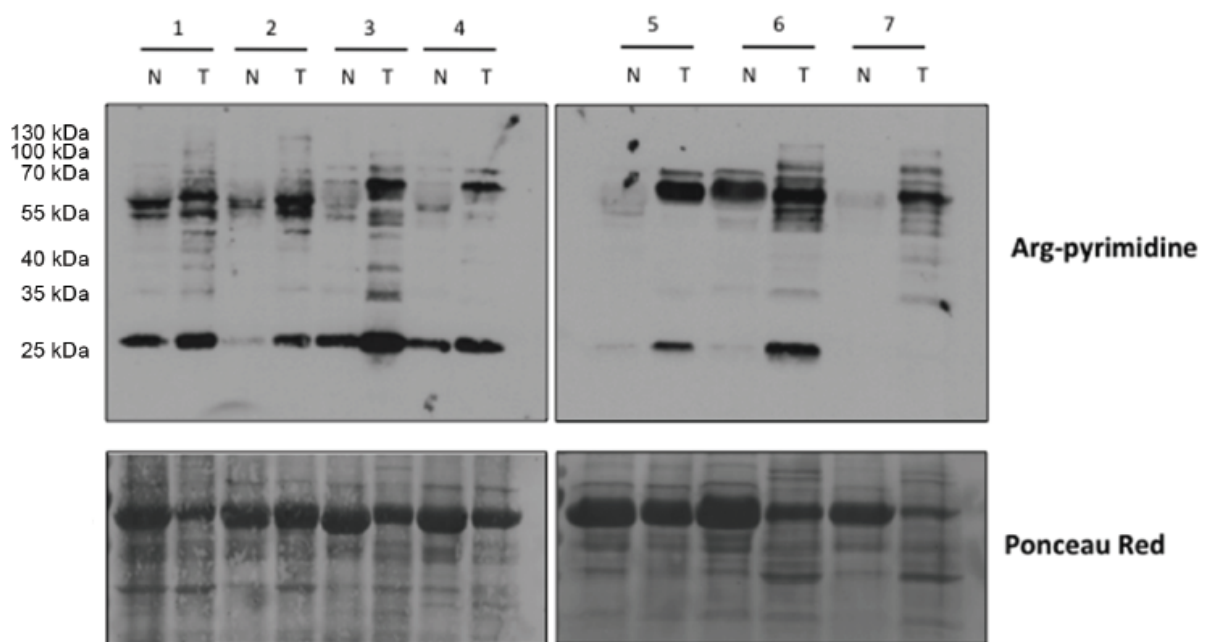


Figure 26. Augmentation de l'accumulation des adduits argpyrimidine au niveau des lésions tumorales en comparaison au tissu normal adjacent. Le niveau des résidus argpyrimidine a été évalué par immunoblot au niveau de 7 échantillons tumoraux humains de sein (T) et de tissu sain adjacent (N). Le rouge ponceau est montré comme indicateur d'une charge protéique équivalente.

Ensuite, nous avons conduit une étude immunohistochimique avec le même anticorps sur une collection de 93 tumeurs cancéreuses mammaires humaines et 2 spécimens de sein normal provenant de mammoplasties réductrices pour la détection des adduits argpyrimidine. Les tumeurs étaient réparties selon les 4 catégories

pathologiques : triple positives (n=23), HER2+ (n=25), HER2- (n=22) et triple négatives (n=23). Nous avons confirmé notre observation précédente indiquant que les tumeurs mammaires accumulent plus de MG-AGEs que le tissu normal correspondant (Fig. 27). Nous avons également constaté que les tumeurs de type triple négatives présentaient significativement moins de ces adduits que les autres sous-types (Fig. 27 H). De plus, nous avons mis en évidence une association statistique significative entre l'accumulation des résidus argpyrimidine et le sous-type de cancer mammaire.

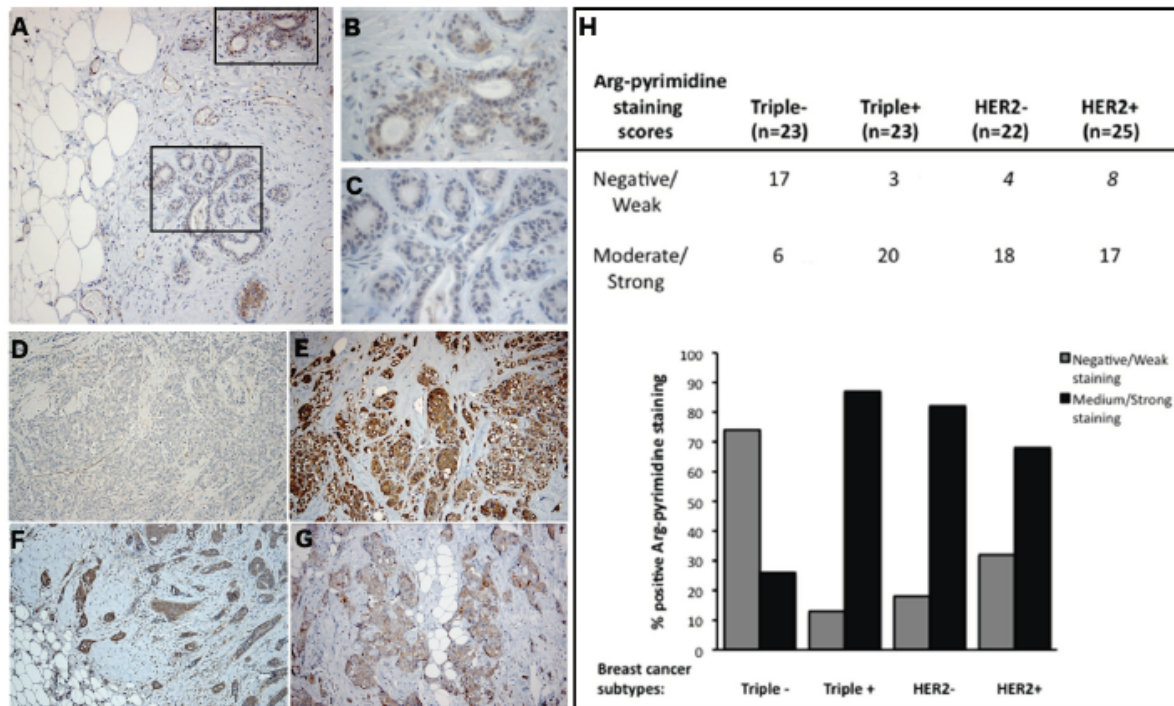


Figure 27. Les tumeurs triple négatives accumulent moins d'adduits argpyrimidine que les sous types triple positif, HER2+ et HER2-. (A) Les résidus argpyrimidine sont détectables au niveau de tissu normal de sein obtenu par mammoplastie réductrice. Les images (B) et (C) montrent les régions encadrées en A à grossissement plus élevé (400x). Les lésions triple négatives (D) montrent une accumulation d'adduits argpyrimidine significativement moins importante que les tumeurs triple positive (E), HER2- (F) et HER2+ (G), à grossissement 100x. L'évaluation du score immunohistochimique est représentée en (H) sous forme graphique.

Pour tenter de comprendre cette particularité des lésions triple négatives, nous avons ensuite procédé à la détection de l'enzyme majoritaire de détoxification du MG, la glyoxalase 1, au niveau des mêmes échantillons. L'expression de Glo1 n'a pas montré d'association significative avec le sous-type de la lésion considéré (Fig. 28). Le niveau d'expression de Glo1 étant élevé au niveau de la majorité des tumeurs triple négatives (80%) et triple positives (90%).

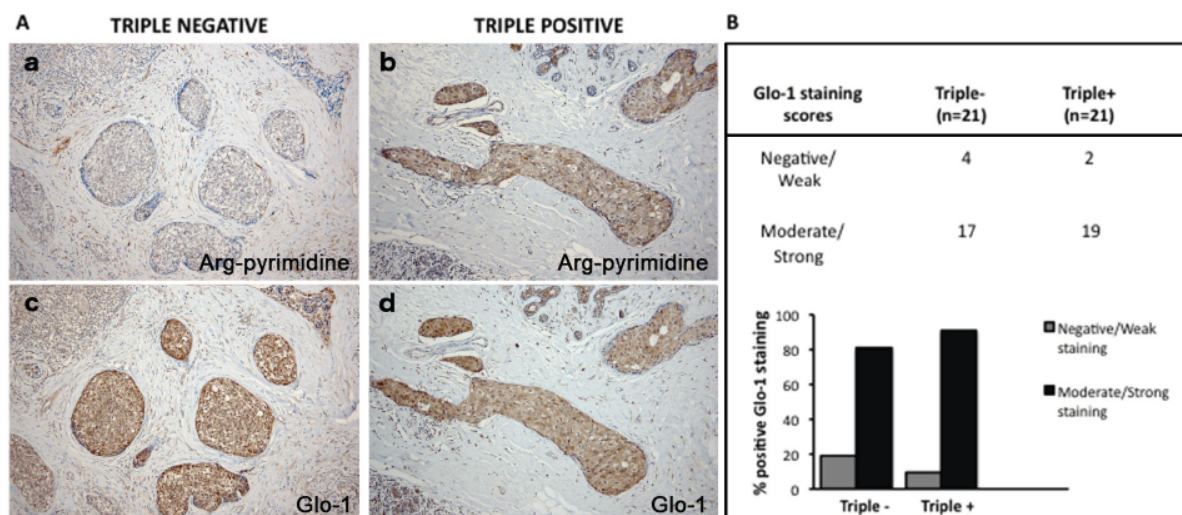


Figure 28. Images représentatives du marquage immunohistochimique de Glo1 au niveau de lésions de cancer du sein humain triple négatives et triple positives. L'expression de Glo1 a été évaluée au niveau de tumeurs triple négatives (n=21) et triple positives (n=21) de patientes atteintes de cancer du sein. Une image représentative du marquage de Glo1 de chaque groupe est montrée en A(c, d). L'immunomarquage de Glo1 a été comparé à celui des adduits argpyrimidine (a, b). Glo1 est hautement exprimée au niveau des 2 types de lésions et il n'y a pas de différence statistique entre les groupes. L'évaluation du score immunohistochimique est montrée en (B). Grossissement 100x.

Puisque le niveau d'expression de l'enzyme n'a pas permis de distinguer de différences permettant de justifier les niveaux différents d'adduits argpyrimidines observés, nous avons choisi d'en mesurer l'activité au niveau des 2 sous-types d'intérêt. De façon intéressante, l'activité Glo1 est plus élevée au niveau des lésions triple négatives ce qui pourrait expliquer leur accumulation amoindrie en adduits protéiques du MG (Fig. 29).

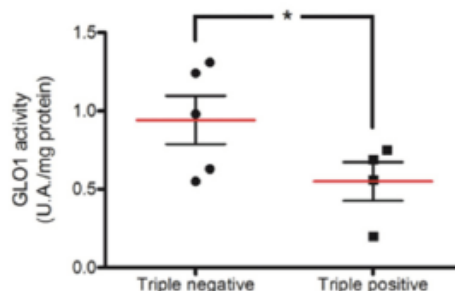


Figure 29. L'activité Glo1 est significativement plus élevée au niveau des tumeurs mammaires triple négatives par rapport aux triple positives. L'activité Glo1 a été mesurée au niveau d'échantillons de tumeurs mammaires triple positives (n=4) et triple négatives (n=5). * $p_{\leq} 0,05$

Pour compléter les observations réalisées sur les prélèvements de patientes, nous avons entrepris d'analyser l'abondance des résidus argpyrimidine au niveau de lignées cellulaires de cancer du sein HER2+ (SKBR3), HER2- (MCF7) et triple négatives (MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT549, Hs597T). En accord avec le marquage

immunohistochimique réalisé sur les tumeurs, nous avons observé par Immunoblot une accumulation moindre des AGEs au niveau de la majorité des lignées triple négatives analysées par rapport aux autres lignées (Fig. 30).

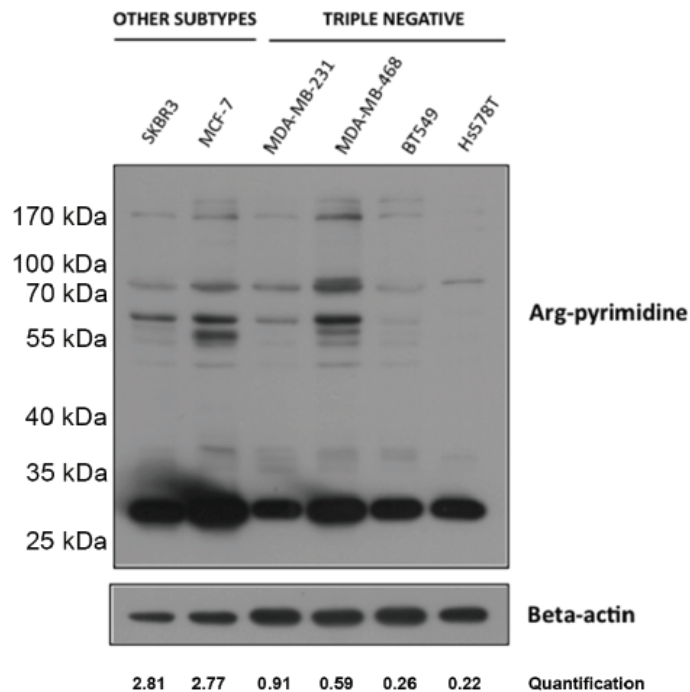


Figure 30. Faible accumulation d'adduits Argpyrimidine au niveau des lignées cellulaires cancéreuses mammaires triple négatives. Le niveau d'accumulation des résidus Argpyrimidine a été évalué par immunoblot au niveau de 6 lignées de cancer du sein dont les cellules SKBR3, MCF-7 et les lignées triple négatives MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT549 et HS578T. La bêta-actine sert de normalisateur et une quantification densitométrique a été réalisée.

Ensuite, nous avons voulu explorer la possibilité que les lignées cellulaires triple négatives soient plus aptes à se défendre du stress dicarbylyle en augmentant leur expression/activité de Glo1. Lorsqu'elles sont traitées avec des doses croissantes de MG pendant 6h, seules les cellules triple négatives MDA-MB-231 et MDA-MB-468 sont capables d'augmenter leur niveau d'expression de Glo1 (Fig. 31 A) ainsi que son activité (Fig. 31 B).

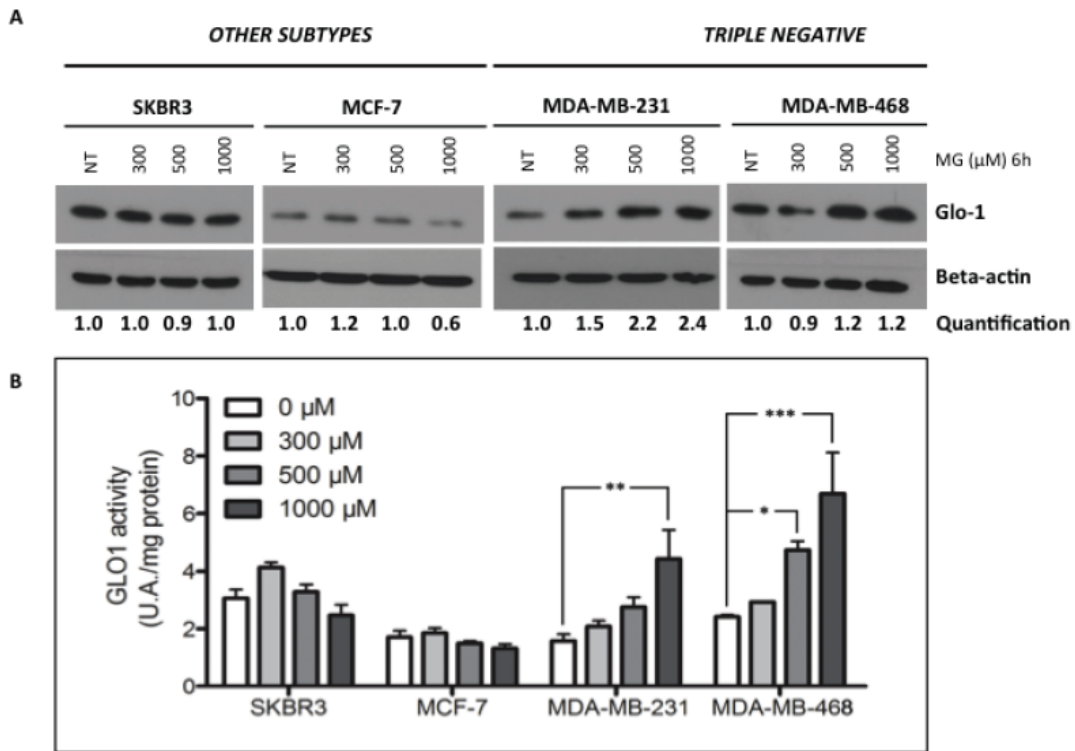


Figure 31. Expression et activité de Glo1 au niveau de lignées cellulaires de cancer du sein sous traitement au MG. Les cellules cancéreuses mammaires ont été traitées pendant 6h au MG à 300, 500 ou 1000 μ M. Seules les lignées triple négatives sont capables de répondre au traitement en augmentant l'expression (A) et l'activité (B) de Glo1. La bêta-actine sert de normalisateur et une quantification densitométrique a été réalisée. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

1.3 Conclusions

Au terme de cette étude²⁶⁷, nous avons mis en évidence la présence de stress dicarbonyle au niveau de lésions tumorales cancéreuses mammaires par rapport au tissu sain. L'accumulation d'AGEs est dépendante du type de tumeurs puisque les cas triple négatifs présentent moins de ces résidus que les autres sous-types. Cette différence peut être expliquée par une activité de détoxification du MG par les glyoxalases accrue au niveau des ces tumeurs. Les cellules cancéreuses triple négatives, connues pour être agressives et actuellement ciblées par aucun traitement spécifique, semblent posséder la capacité de se défendre du stress dicarbonyle en augmentant les glyoxalases pour détoxifier le MG. De plus, la charge en MG étant liée à la glycolyse, la différence observée entre ces lignées cancéreuses est potentiellement attribuable à leur gestion du glucose. Dans la littérature, la lignée cellulaire MDA-MB-231 est connue comme étant un modèle de cellules cancéreuses glycolytiques alors que la lignée MCF7 est considérée comme ayant un métabolisme oxydatif, tourné vers la respiration mitochondriale¹². On peut donc imaginer que les cellules triple négatives, comme la lignée MDA-MB-231, de par leur métabolisme

glycolytique sont exposées de façon constante à un stress dicarbone élevé et sont donc équipées pour y faire face. Ces cellules seraient déjà préparées à répondre au stress engendré par le MG alors que des cellules cancéreuses plus oxydatives comme les cellules MCF7, qui ne sont pas exposées à un stress dicarbone constant, sont moins aptes à se défendre contre le MG en augmentant l'expression et l'activité de l'enzyme de détoxification Glo1.

Cette étude suggère un intérêt potentiel à sensibiliser les tumeurs du sein triple négatives au stress dicarbone à travers une nouvelle stratégie thérapeutique visant à bloquer leur défense anti-MG de manière efficace à l'aide d'inhibiteurs de Glo1 par exemple.

Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes

Chiavarina B*, Nokin MJ*, **Durieux F**, Bianchi E, Turtoi A, Peulen O, Peixoto P, Irigaray P, Uchida K, Belpomme D, Delvenne P, Castronovo V & Bellahcène A

Oncotarget, 2014, 5 (14), 5472-82

Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes

Barbara Chiavarina^{1,*}, Marie-Julie Nokin^{1,*}, Florence Durieux¹, Elettra Bianchi², Andrei Turtoi¹, Olivier Peulen¹, Paul Peixoto¹, Philippe Irigaray³, Koji Uchida⁴, Dominique Belpomme³, Philippe Delvenne², Vincent Castronovo¹ and Akeila Bellahcène¹

¹ Metastasis Research Laboratory, GIGA-Cancer, University of Liège, Liège, Belgium

² Department of Anatomy and Pathology, University of Liège, Liège, Belgium

³ Association for Research and Treatments Against Cancer (ARTAC), Paris, France

⁴ Laboratory of Food and Biodynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan

* These Authors contributed equally to this work

Correspondence to: Akeila Bellahcène, **email:** a.bellahcene@ulg.ac.be

Keywords: methylglyoxal, breast cancer, advanced glycation end-products, Arg-pyrimidine adducts, glyoxalase 1

Received: April 11, 2014

Accepted: June 18, 2014

Published: June 20, 2014

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Metabolic syndrome and type 2 diabetes are associated with increased risk of breast cancer development and progression. Methylglyoxal (MG), a glycolysis by-product, is generated through a non-enzymatic reaction from triose-phosphate intermediates. This dicarbonyl compound is highly reactive and contributes to the accumulation of advanced glycation end products. In this study, we analyzed the accumulation of Arg-pyrimidine, a MG-arginine adduct, in human breast adenocarcinoma and we observed a consistent increase of Arg-pyrimidine in cancer cells when compared with the non-tumoral counterpart. Further immunohistochemical comparative analysis of breast cancer subtypes revealed that triple negative lesions exhibited low accumulation of Arg-pyrimidine compared with other subtypes. Interestingly, the activity of glyoxalase 1 (Glo-1), an enzyme that detoxifies MG, was significantly higher in triple negative than in other subtype lesions, suggesting that these aggressive tumors are able to develop an efficient response against dicarbonyl stress. Using breast cancer cell lines, we substantiated these clinical observations by showing that, in contrast to triple positive, triple negative cells induced Glo-1 expression and activity in response to MG treatment. This is the first report that Arg-pyrimidine adduct accumulation is a consistent event in human breast cancer with a differential detection between triple negative and other breast cancer subtypes.

INTRODUCTION

Breast cancer represents the highest incidence of cancers and the second most common cause of death in women. This malignancy is characterized by a highly heterogeneous group of lesions with molecular and biochemical signatures, disease course, prognosis and treatment response. The classification based on gene expression patterns is commonly used to assess prognosis and therapy regimen. Breast malignant tumors are

categorized into 4 main subtypes: luminal A (or HER2 negative tumors), luminal B (or triple positive tumors), HER2 positive, and basal-like (or triple negative tumors) [1-3]. This latter group represents around 15-20% of newly diagnosed breast cancers [4]. Typically, these lesions are characterized by high proliferation rate, high histologic grade, tumor necrosis and poor prognosis [5, 6]. Currently no treatment except chemotherapy is available for these patients.

Emerging evidence shows that cancer is a metabolic

disease and that altered cellular energy metabolism is a common feature of malignant tumors. In recent studies, a link between obesity, diabetes and breast cancer has been made through insulin/insulin-like growth factor and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways and through obesity-induced chronic inflammation caused by adipose tissue dysfunction [7-9].

In proliferating cells, glucose metabolism and growth control are strictly linked [10, 11]. The Warburg effect according to which cells can rely on glycolysis as a major source of energy rather than oxidative phosphorylation, even in normoxic conditions, has been well described in many tumors including breast, melanoma, lung and colorectal cancer [12, 13]. Methylglyoxal (MG) is a highly reactive dicarbonyl compound and a potent glycation agent, mainly generated as a by-product of glycolysis through a spontaneous degradation of triosephosphates [14]. Accumulation of glycated proteins has been observed in several human diseases including diabetes, inflammation, aging, neurodegenerative disorders and cancer [15-25].

MG reacts with arginine, lysine and cysteine residues, nucleic acids and lipids generating advanced glycation end products (AGEs). In mammalian cells, MG is detoxified by the glyoxalase system, an enzymatic pathway consisting of two enzymes called glyoxalase 1 (Glo-1) and glyoxalase 2 (Glo-2). Glo-1 catalyzes the isomerisation of the hemithioacetal, formed spontaneously from MG and reduced glutathione (GSH) to S-D-lactoylglutathione. The second enzyme, Glo-2, converts the S-D-lactoylglutathione to D-lactate and recycles reduced glutathione [26, 27]. It has been shown that Glo-1 expression and activity is increased in many human cancer types such as colon [28], prostate [29, 30], melanoma [31], lung [32], and breast [33] and that Glo-1 overexpression is correlated with cancer progression and drug resistance [34, 35]. In a recent proteomic study, Glo-1 expression has

been shown to be positively correlated with high tumor grade in breast cancer [36].

The reaction of MG with arginine residues generates stable MG-moieties called Arg-pyrimidine [37, 38]. So far only few studies analyzed the expression of Arg-pyrimidine adducts in cancer. Van Heijst and collaborators performed an Arg-pyrimidine immunohistochemical evaluation in 4 different types of human cancers, including a limited number of breast cancer lesions (n=5). Their conclusion was that Arg-pyrimidine level differs greatly between different types of tumors. To date the best-studied Arg-pyrimidine-modified protein identified in malignant tumors is the heat shock protein 27 (Hsp27). This chaperone protein facilitates the proper refolding of damaged proteins and plays a key role in cell resistance to stress. In cancer cells, MG post-translationally modified Hsp27 prevented apoptotic cell death notably through the inhibition of cytochrome C-mediated caspase activation [39-41].

In this study, we evaluated for the first time Arg-pyrimidine adducts accumulation in a large collection of breast cancer lesions categorized into the 4 main molecular subtypes using an immunohistochemistry approach. We demonstrated that triple negative breast tumors accumulate least Arg-pyrimidine adducts because of an efficient Glo-1-based detoxification system. These findings suggest that sensitizing triple negative tumors to carbonyl stress may represent a good strategy for aggressive cancer subtypes.

RESULTS

Arg-pyrimidine adducts are accumulated in human breast cancer tissues

We evaluated the presence of Arg-pyrimidine adducts in 7 breast cancer tissues and in their non-tumoral

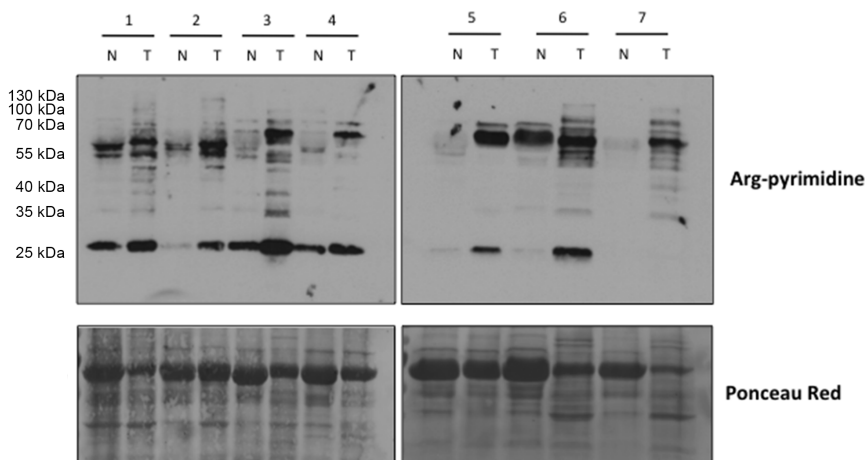


Figure 1: Increased Arg-pyrimidine residues in human breast cancer tissues compared with the non-tumoral counterparts. Arg-pyrimidine adducts were evaluated in 7 breast cancer tissues (T) and in their non-tumoral counterpart (N) using western blot analysis (20 μ g of proteins were loaded). The Ponceau S-stained membrane is shown as an indicator of equal protein loading.

counterparts by Western blot analysis. The antibody was specifically directed against Arg-pyrimidine adducts. As shown in Figure 1, tumoral lesions accumulated more Arg-pyrimidine moieties in comparison with the corresponding non-tumoral counterparts. Some MG-modified proteins appeared enriched and/or uniquely observed in cancer lesions.

Triple negative breast tumors accumulate less Arg-pyrimidine adducts compared with other breast cancer subtypes

Using immunohistochemistry, we next examined Arg-pyrimidine accumulation in 2 normal human breast samples and in a collection of 93 breast tumors categorized in triple negative, triple positive, HER2 positive and HER2 negative. Arg-pyrimidine staining was mainly localized to the cytoplasm of breast epithelial cells, however in some cells a nuclear staining was also detectable. In good accordance with the Western blot analysis conducted on adjacent non tumoral breast samples, a moderate Arg-pyrimidine immunostaining was detected in normal breast tissue (Figure 2A-C). It is noteworthy that endothelial cells lining the visible blood vessels adjacent to normal mammary glands were positive (Figure 2A). Interestingly, when we evaluated Arg-pyrimidine accumulation in the different breast cancer subtypes we found that Arg-

pyrimidine staining was significantly associated (chi-square test $p < 0.0001$) with the cancer subtypes. Indeed, we observed that the majority of triple negative lesions (Figure 2D) exhibited low staining for MG-adducts in comparison with the other subtypes (Figure 2E-G). In fact, more than 70% of triple negative breast tumors exhibited a negative to weak staining for Arg-pyrimidine while the majority of the 3 other breast cancer subtypes evaluated showed a moderate to strong level of MG-adducts (Figure 2H). No significant staining was observed in tumor stroma in all the sections analyzed.

Triple negative breast cancer cell lines globally showed less Arg-pyrimidine adducts than other tumor subtypes

Next, we investigated Arg-pyrimidine accumulation in HER2 positive (SKBR3), estrogen/progesterone receptor-positive (MCF-7) and 4 triple negative (MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT549, Hs579T) human breast cancer cell lines using Western blot analysis. All triple negative cell lines showed less Arg-pyrimidine accumulation compared with non-triple negative cell lines (Figure 3). This result is consistent with our immunohistochemical observations indicating that different breast cancer subtypes show distinct glycosylated adducts accumulation.

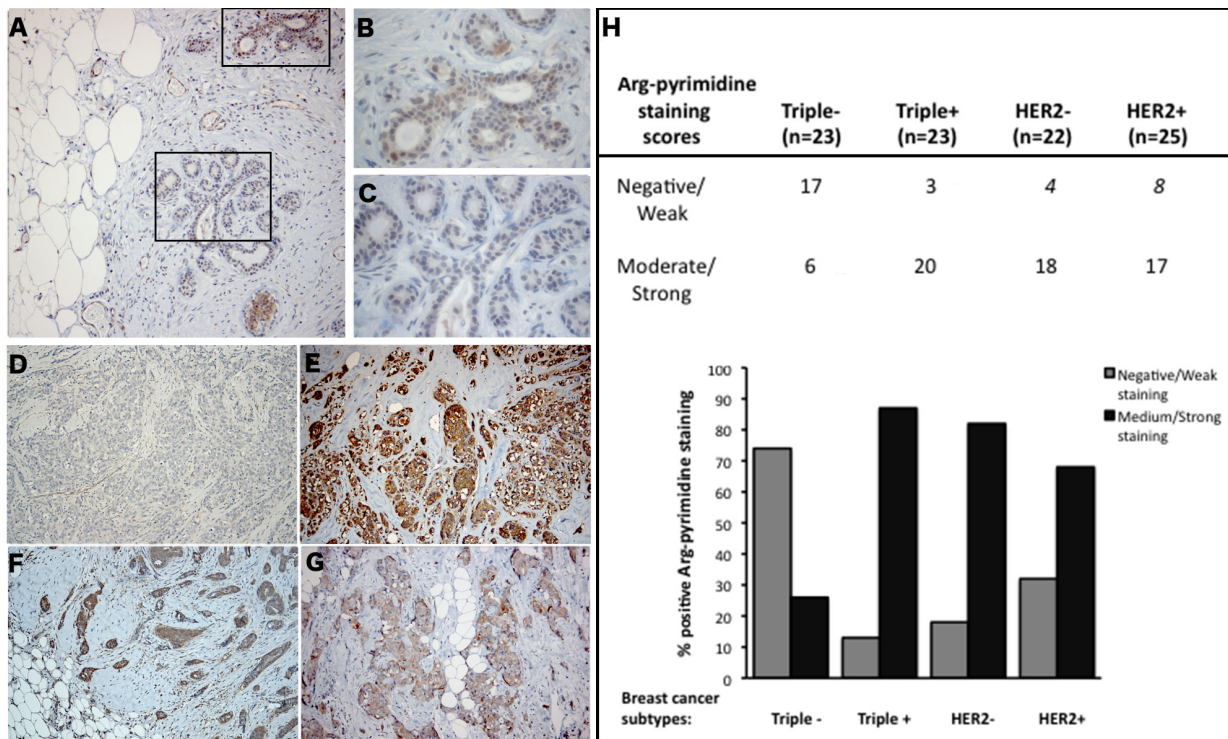


Figure 2: Triple negative breast tumors accumulated less Arg-pyrimidine adducts in comparison with triple positive, HER2- and HER2+ tumors. (A) Arg-pyrimidine adducts are detectable in breast tissue from reduction mammoplasty. The panels (B) and (C) show a higher magnification (400x) of the cellular regions boxed in panel A. Triple negative lesions (D) exhibited a significantly lower accumulation of Arg-pyrimidine residues compared to triple positive (E), HER2- (F) and HER2+ (G) subtypes, magnification 100x. Immunohistochemical quantification (H) was performed as described in Materials and Methods section.

Increased glyoxalase 1 (Glo-1) activity in triple negative tissues

To further explore the observed difference in

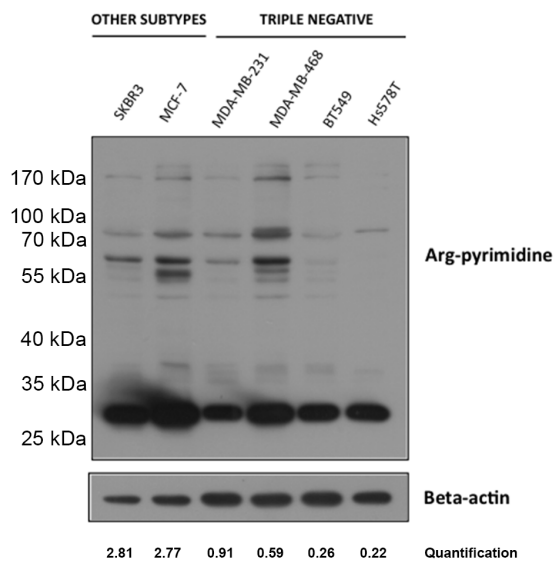


Figure 3: Low basal Arg-pyrimidine adducts accumulation in triple negative breast cancer cell lines. Arg-pyrimidine levels were evaluated using Western blot analysis on 6 breast cancer cell lines including SKBR3, MCF-7 and 4 triple negative cell lines. In comparison with MCF-7 and SKBR3, all triple negative cells expressed less Arg-pyrimidine accumulation. Beta-actin expression was used to normalize the amount of loaded proteins. Semi-quantitation of total Arg-pyrimidine adducts was done using beta-actin.

accumulation of glycated adducts, serial sections were stained for both Arg-pyrimidine (Figure 4A, a and b) and the main MG-detoxifying enzyme, Glo-1 (Figure 4A, c and d). High Glo-1 staining was observable in both tumor subtypes regardless of the different levels of Arg-pyrimidine and no significant association (Fisher's exact test) was observed between the staining intensity and the different cancer subtypes evaluated. Indeed, most of triple negative (80%) and triple positive (90%) lesions expressed high levels of Glo-1 (Figure 4B). Therefore, we sought to examine the enzymatic activity of Glo-1 in these samples. The measurement performed on tissue extracts showed a significant increase in Glo-1 activity in triple negative tumors when compared with triple positive ones (Figure 5).

Only triple negative breast cancer cell lines respond to MG stimulation by increasing their Glo-1 expression and activity

To investigate whether triple negative breast cancer cells could respond to MG stimulation by increasing Glo-1 expression and activity, we treated breast cancer cells with MG at 300, 500 or 1000 μ M during 6 hours. MG treatment neither affected the level of expression (Figure 6A) nor the activity (Figure 6B) of Glo-1 in MCF-7 and SKBR3 breast cancer cells. However, MG significantly induced a dose-dependent effect on both Glo-1 expression and activity in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 triple negative cell lines (Figure 6A and B). Moreover, the 2-way ANOVA

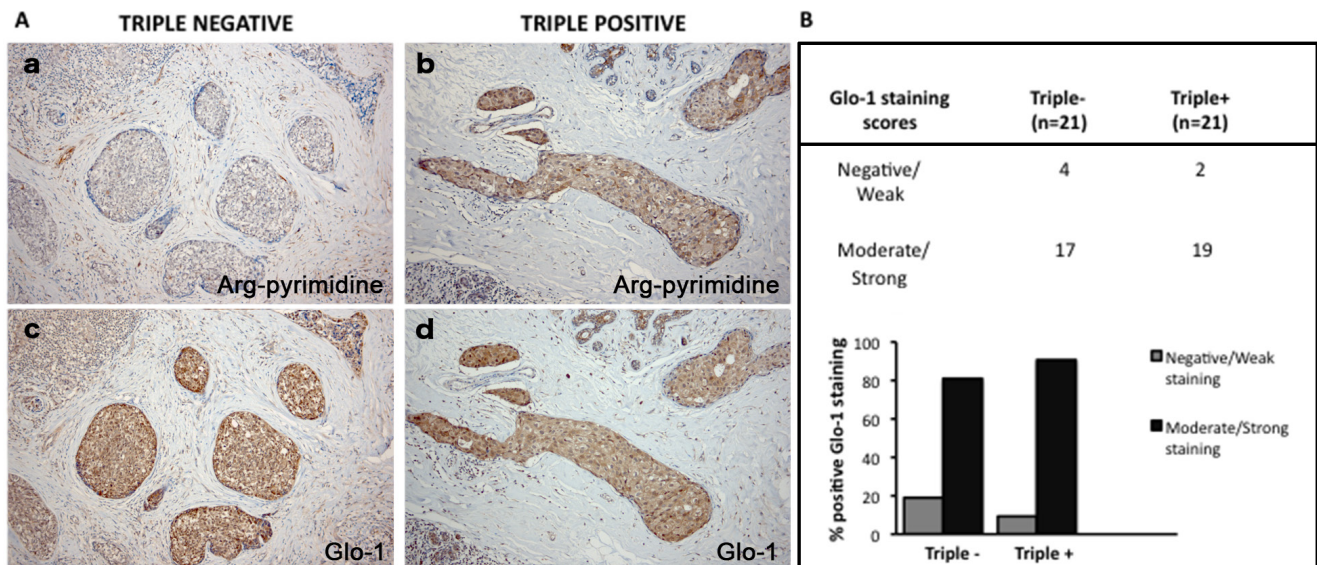


Figure 4: Representative immunohistochemical staining of Glo-1 expression in triple negative versus triple positive human breast tissues. Glo-1 expression was evaluated in triple negative (n= 21) and triple positive (n= 21) breast cancer patients and one representative case of each is shown in panel A (c, d). The staining of Glo-1 was compared with the immunostaining for Arg-pyrimidine accumulation in the same triple negative (a) and triple positive (b) human specimen. Glo-1 is highly expressed in both triple positive and triple negative tumors and there was no significant difference between the two breast cancer subtypes. Glo-1 immunohistochemical quantification is shown in panel (B). The evaluation of the staining was performed as described in Materials and Methods section. Magnification 100x.

analysis proved that the 4 cell lines evaluated responded differently to MG treatment. Indeed, the interaction between MG concentration and cell lines significantly accounted for 32.11% of the total variance ($p < 0.0001$). In order to exclude the potential MG acute toxicity on cancer cells, we also measured Glo-1 activity in MDA-MB-231 and MCF-7 cells after 3 weeks of chronic treatment at lower concentrations of MG (5-50 μM) (Figure 7). As

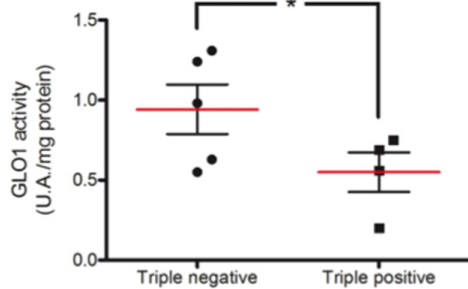


Figure 5: Increased Glo-1 activity in triple negative breast cancer tumors in comparison with triple positive ones. Glo-1 activity was measured in breast cancer tumor samples comprising 4 triple positive and 5 triple negative lesions. Glo-1 enzymatic assay was performed on tissue total protein extracts as described in Material and Methods. Statistical comparison was performed by one-tailed Student's t-test ($*p \leq 0.05$).

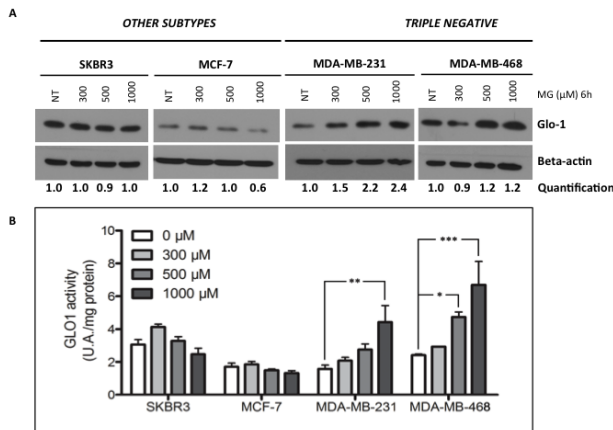


Figure 6: Glo-1 expression and activity in human breast cancer cells upon MG stimulation. Breast cancer cells were treated with MG at 300, 500 or 1000 μM for 6 hours. Only triple negative cancer cells are capable to respond to MG treatment by up-regulating both Glo-1 expression (A) and activity (B). No modulation of Glo-1 was observed in the other cell subtypes analyzed. Beta-actin expression was used to normalize the amount of loaded proteins. Semi-quantitation analysis was done using beta-actin as a loading control. Results are the average of independent experiments ($n = 3$). Data were statistically analyzed with two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$ vs untreated cells).

observed under acute treatment, triple negative cells showed a dose dependent induction of Glo-1 activity while MCF-7 cells maintained their basal level of Glo-1 activity in all conditions tested (Figure 7). Moreover, the 2-way ANOVA analysis indicated that the interaction between MG concentration and the 2 cell lines accounted for 20.33% of the total variance ($p < 0.0015$).

DISCUSSION

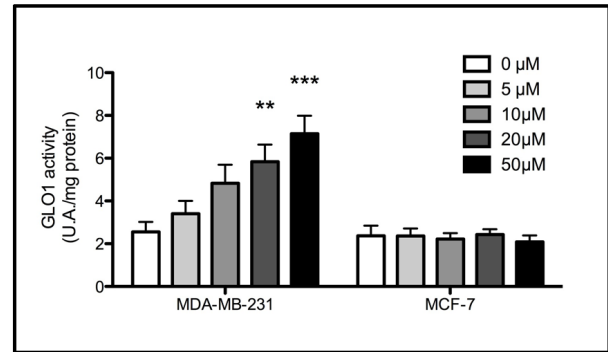


Figure 7: Increased Glo-1 activity in triple negative cells exposed to chronic treatment with MG. Glo-1 activity was measured in triple negative MDA-MB-231 and in ER/PR positive MCF-7 cells after three weeks treatment with low doses of MG. A significant increase of Glo-1 activity was observed only in triple negative cells. Results are the average of 4 independent experiments. Data were statistically analyzed with two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$ vs untreated cells).

While both cancer initiation and progression have been linked to oxidative stress [42] to date there is no clear evidence regarding the importance of the carbonyl stress in such processes. In cancer, reactive oxygen species (ROS) generate genomic damage and instability, activate mitogenic and survival mechanisms and favor cell invasion [43]. However, when the intracellular levels of oxidants reach a cytotoxic threshold, apoptotic and necrotic pathways are activated and cancer cells need to protect themselves from oxidative stress to survive [44].

Beside the well-established oxidative stress concept, endogenous dicarbonyl compounds such as MG also affect proteins, lipids and nucleic acids, leading to AGEs formation and carbonyl stress [45]. The carbonyl stress has been primarily described in diabetes where AGEs accumulation is a major event associated with diabetic complications [46]. High concentrations of MG and formation of AGEs have been reported in diabetic patients [47]. To date, known MG protein targets include albumin, hemoglobin, Sin3A, type IV collagen, alpha A-crystallin, protein p300 and 20S proteasome subunits, all associated with protein dysfunction [45].

Cancer cells predominantly produce energy by increasing their rate of glycolysis and as a consequence, triosephosphates-derived MG is increased in malignant

tumor cells. MG is a potent cytotoxic compound and exerts an anti-tumor activity *in vivo* [48, 49] and was first viewed as a potential therapeutic agent in cancer [50]. However, the recent identification of MG-modified proteins in cancer cells brought the new possibility where MG may have pro-tumorigenic effects. Indeed, MG induced the modification of Hsp-27 at arginine 188 (MG-Hsp27) in cancer cells and MG-Hsp27 facilitated cancer cell evasion from caspases-dependent cell apoptosis [39-41].

Several types of protein modifications by MG have been reported [37, 51], among which those directed to the guanidino group of arginine residues are well represented. In this study, we detected Arg-pyrimidine adducts using immunohistochemistry in a large series of human breast cancer lesions. Non-tumoral breast tissue presented detectable Arg-pyrimidine basal accumulation which was consistently lower than the one observed in matched tumoral samples. We report for the first time the differential accumulation of Arg-pyrimidine moieties between the different breast cancer subtypes analyzed. We observed that triple negative breast cancer tumors had fewer detectable Arg-pyrimidine adducts than the ER/PR positive, HER2 negative and HER2 positive lesions. These original findings were further reinforced by our observation that Arg-pyrimidine adducts were significantly less detectable in triple negative breast cancer cell lines when compared to cell lines from other subtypes. Interestingly, while Arg-pyrimidine immunostaining was mainly cytoplasmic some nuclei presented a positive staining suggesting the presence of nuclear MG-modified proteins in cancer cells. Using the same antibody, Nakadate and collaborators have reported the accumulation of Arg-pyrimidines in the nucleus of neural cells [52]. Ongoing experiments in our laboratory aim to identify new potential nuclear targets of MG such as transcription factors and co-regulator proteins in breast cancer cells.

Glo-1 is the main enzyme involved in the detoxification of MG. It has been reported that Glo-1 expression and activity are increased in breast tumor cells, most likely to control the high MG level spontaneously produced due to high glycolytic activity [33]. Glo-1 expression was significantly higher in Her-2 positive breast tumors when compared with Her-2 negative ones. Thus, Her-2 positive tumors associated with an aggressive phenotype and a poor prognosis overexpress Glo-1 [53]. However, Glo-1 enzymatic activity was not evaluated in these tumors. In this study, Glo-1 immunostaining performed on human triple negative and triple positive breast cancer lesions did not show any significant difference. Conversely, the measurement of Glo-1 activity performed on fresh samples showed a significant increase in Glo-1 enzymatic activity in triple negative tumors. Accordingly, we found that MDA-MB-231 and MDA-MB-468 triple negative breast cancer cells adapted their level of Glo-1 expression and activity

when treated with exogenous increasing doses of MG. Considering that MCF-7 cells remained stable for Glo-1 under the same conditions, it is tempting to speculate that triple negative breast cancer cells increased their Glo-1 activity as a control defense mechanism to prevent MG accumulation. This hypothesis was further sustained by the increased dose-dependent Glo-1 activity observed in both MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells in response to a chronic sub-toxic MG treatment when compared to MCF-7 cells. Such adaptive response to MG has been previously reported in Carl-1 human melanoma cells and was described as a defense mechanism against MG toxicity [54].

Our study adds to the growing body of evidence suggesting a major role of non-enzymatic glycation in cancer. The increase of Glo-1 activity may represent a strategy adopted by aggressive cancer cells such as triple negative breast cancer cells as a defense mechanism against the glycation damage induced by high intracellular MG accumulation. Our data suggest that inhibition of Glo-1 activity in triple negative breast tumors could be a new potential therapeutic strategy. In support of this concept, previous studies reported that a specific Glo-1 inhibitor, S-p-bromobenzyl-glutathione cyclopentyl diester (SpBrGSHCp₂), demonstrates an anti-tumor effect against Glo-1-overexpressing tumors that are unresponsive to conventional therapies. This Glo-1 inhibitor has been shown to increase the sensitivity of human leukemia cells to anti-tumor agents [55]. In human lung cells with high expression and activity of Glo-1, the treatment with SpBrGSHCp₂ activated apoptosis through the activation of the stress-activated protein kinases JNK1 and p38 MAPK which finally led to caspase activation [32]. In human prostate cancer cells, the treatment with SpBrGSHCp₂ significantly affected tumor growth [14].

Oxidative stress has several pro-tumorigenic effects but it also exerts an anti-tumorigenic action as it has been linked to senescence and apoptosis. As a major actor of the carbonyl stress, MG also plays a dual role as a cytotoxic compound and as a pro-tumorigenic factor depending on the global cellular context. Moreover, one must consider that oxidative and carbonyl stresses are tightly linked together and may work in tandem to influence tumor phenotype. Indeed, the formation of both ROS and AGEs by cancer cells generates a sequence of reactions mutually enhancing each other [56].

Our study opens a new alley of investigations toward individualized cancer therapy based on the determination of metabolomic changes in tumors that might enable the targeted blockade of cancer progression.

MATERIALS AND METHODS

Clinical tumor samples

Patient tissue samples were obtained from the Pathology Department of the University Hospital of Liège in accordance with ethical guidelines of the University of Liège (Liège, Belgium). The immunohistochemical analysis was conducted on a collection of 93 breast cancer patients grouped into 4 biological subtypes (triple negative, triple positive, HER2- and HER2+) and 2 normal breast specimens obtained from reduction mammoplasties. ER, PR, and HER2 status was evaluated routinely by anatomic-pathological examination. In this series, HER2 positive tumors were all negative for ER and PR receptors and all HER2 negative tumors were positive for both hormone receptors. Patients received standard guideline-based according to standard guideline: hormone therapy for all patients with ER-positive tumours, trastuzumab for those with HER2-positive tumours, anthracycline chemotherapy for high-risk lymph node-negative lesions, and anthracycline plus taxane chemotherapy for lymph node positive tumors. Western blot analysis was conducted on total protein extracts from 7 breast ductal adenocarcinoma (grade II and III) and their matched non-tumoral counterpart.

Cell lines

Human breast cancer cell lines BT549, Hs578T, MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and MDA-MB-468 cell line was a kind gift from Prof. Sebastiano Andò (Laboratory of General Pathology, University of Calabria, Italy). Breast cancer cell lines usually cultured in DMEM (standard glucose concentration of 4.5 g/L, Lonza) containing 10% fetal bovine serum, and 2 mM L-glutamine, were adapted to grow in DMEM medium with a glucose concentration of 1 g/L for several weeks. This glucose level is physiological and reflects the in vivo concentration in human serum. Conversely, the routine culture media concentration of 4.5 g/L corresponded to a diabetic condition.

Western blot analysis and antibodies

Cell and tissue samples were extracted in RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Na-deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) containing protease and phosphatase inhibitors (Roche). After incubation under rotation at 4°C for 40 minutes, lysates were then centrifuged at 14,000 g for 15 minutes at 4°C to remove insoluble debris. Protein concentrations were

determined using the BCA assay (Pierce). Protein extracts were then separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Next, the membranes were blocked for 1h in TBS-Tween containing 5% nonfat dried milk (Bio-Rad) and incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. The membranes were probed with anti-Arg-pyrimidine (mAb6B) monoclonal antibody (1:10,000). The specificity of this antibody has been previously confirmed by competitive ELISA and it has been shown to not react with other MG-arginine adducts such as 5-hydro-5-methylimidazolone and tetrahydropyrimidine [57]. Anti-Human Glyoxalase I monoclonal antibody (1:1,000 dilution, cat#02-14, BioMac Leipzig) and anti-beta-actin (1:5,000 dilution, cat# A5441, Sigma) were used. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies [anti-mouse, 1:6,000 dilution (Dako) or anti-rabbit 1:3,000 (Invitrogen)] were used to visualize bound primary antibodies, with the ECL Western blotting substrate (Pierce). Where indicated, ImageJ software 1.46r (imagej.nih.gov) was used for semi-quantitation using beta-actin as a loading control.

Immunohistochemistry on breast tissues

Formalin-fixed paraffin-embedded sections were deparaffinized in xylene and rehydrated. To block endogenous peroxidase activity, the tissues were treated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes and washed in PBS for 20 minutes. Antigen retrieval was performed in 10 mM sodium citrate, pH 6.0 for 40 minutes at 95°C. Sections were then incubated with 1.5% normal horse serum (cat#S-2000, Vector Laboratories) for 30 minutes to block the nonspecific serum-binding sites. Then, sections were incubated with anti-Arg-pyrimidine (1:2,000 dilution) or anti-human Glyoxalase I (1:100 dilution) antibody overnight at 4°C. Antibody binding was detected using an anti-mouse biotinylated secondary (cat#BA-2000, Vector Laboratories) for 30 minutes followed by incubation with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories). Immunoreactivity was revealed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). The slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted.

Evaluation of immunohistochemical staining

The immunohistochemically stained sections were reviewed by two examiners including an anatomopathologist (E.B). Scoring of the staining was done according to the intensity of the staining (0, 1+, 2+, 3+) and the percentage of positive cancer cells (0-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100%). The results obtained with the 2 scales were multiplied together as we previously described [58], yielding a single scale with steps of 0, 1+,

2+, 3+, 4+, 6+ and 9+ where 0, 1+ and 2+ were considered to be negative or weak staining and 3+, 4+, 6+ and 9+ were considered to be medium or strong staining.

Glyoxalase I assay

The activity of Glo-1 was measured in breast cancer cell lines and in human breast cancer tissues after protein extraction in RIPA buffer, by measuring the initial rate of S-D-lactoylglutathione formation from the hemimercaptal obtained by preincubation of an equimolar (1 mM) mixture of MG (cat#M0252, Sigma) and GSH (cat#G4251, Sigma) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, at 25°C for 15 minutes. S-D-lactoylglutathione formation was followed spectrophotometrically by the increase in absorbance at 240 nm at 25 °C. One enzyme unit was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of S-D-lactoylglutathione per minute at the saturating substrate concentration.

Chronic treatment with MG. Breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 were treated with MG at different concentrations (5, 10, 20, 50 μM) for three weeks. The first week, a daily treatment was performed and for the remaining 2 weeks the treatment was repeated twice a week. Glo-1 activity was measured as described above on cell lysates after protein extraction in RIPA buffer.

Statistical analysis

The data were statistically analyzed using either one-tailed Student t-test or with two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons. One-tailed t-test was selected because the H1 hypothesis was “triple negative Glo-1 activity is below or equal to triple positive”. Number of cases for Arg-pyrimidine or Glo-1 staining in each cancer subtypes was analyzed in a contingency table using chi-square test and Fisher’s exact test, respectively. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

BC is a Télévie Post-Doctoral Fellow, MJN is a Télévie Fellow, AT is a Post-Doctoral Research Fellow and AB is a Senior Research Associate, all from the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium). This work was also supported by the Centre Anti-Cancéreux, University of Liège, Belgium. The authors are thankful to Prof. Talesa’s laboratory (University of Perugia, Italy) and Pr. M-C De Pauw (University of Liège) for technical support for the measure of Glyoxalase 1 enzymatic activity and Mrs. N. Maloujahmoum for expert technical assistance with the cell culture. We also thank the Biothèque of the University of Liège - CHU Liège for

providing human tumor samples.

Author contributions

BC and MJN contributed equally to this work; BC, MJN, FD performed the experiments; EB performed the immunohistochemistry quantification; OP performed all the statistical analysis; KU provided the anti-Arg-pyrimidine antibody; DB and PD contributed to data analysis and discussion of the results; KU, AT, PI, PP gave technical support and conceptual advices; AT sampled and provided fresh tissue for analysis; BC and AB wrote the paper; VC and AB supervised the work and analyzed the data. All authors analyzed the data and discussed the results.

No conflicts of interest were declared.

REFERENCES

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797):747-752.
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(19):10869-10874.
3. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ and Panel m. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011; 22(8):1736-1747.
4. Penault-Llorca F and Viale G. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012; 23 Suppl 6:vi19-22.
5. Foulkes WD, Smith IE and Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2010; 363(20):1938-1948.
6. Kim S, Kim do H, Jung WH and Koo JS. Metabolic phenotypes in triple-negative breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013; 34(3):1699-1712.
7. Jiang W, Zhu Z and Thompson HJ. Dietary energy restriction modulates the activity of AMP-activated

- protein kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin in mammary carcinomas, mammary gland, and liver. *Cancer research*. 2008; 68(13):5492-5499.
8. Hursting SD, Lashinger LM, Wheatley KW, Rogers CJ, Colbert LH, Nunez NP and Perkins SN. Reducing the weight of cancer: mechanistic targets for breaking the obesity-carcinogenesis link. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2008; 22(4):659-669.
 9. Sundaram S, Johnson AR and Makowski L. Obesity, metabolism and the microenvironment: Links to cancer. *Journal of carcinogenesis*. 2013; 12:19.
 10. Ward PS and Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell*. 2012; 21(3):297-308.
 11. Vander Heiden MG, Cantley LC and Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324(5930):1029-1033.
 12. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956; 124(3215):269-270.
 13. Bensinger SJ and Christofk HR. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Seminars in cell & developmental biology*. 2012; 23(4):352-361.
 14. Thornalley PJ. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug metabolism and drug interactions*. 2008; 23(1-2):125-150.
 15. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865):813-820.
 16. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM and Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006; 114(6):597-605.
 17. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y and Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circulation research*. 2003; 93(12):1159-1169.
 18. Yan SF, Ramasamy R and Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2008; 4(5):285-293.
 19. Oudes AJ, Herr CM, Olsen Y and Fleming JE. Age-dependent accumulation of advanced glycation end-products in adult *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of ageing and development*. 1998; 100(3):221-229.
 20. Morcos M, Du X, Pfisterer F, Hutter H, Sayed AA, Thornalley P, Ahmed N, Baynes J, Thorpe S, Kukudov G, Schlotterer A, Bozorgmehr F, El Baki RA, Stern D, Moehrlen F, Ibrahim Y, et al. Glyoxalase-I prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*. 2008; 7(2):260-269.
 21. Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppasamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P and et al. Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nature medicine*. 1995; 1(7):693-699.
 22. Kuhla B, Boeck K, Schmidt A, Ogunlade V, Arendt T, Munch G and Luth HJ. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of aging*. 2007; 28(1):29-41.
 23. Kalaria RN. Neurodegenerative disease: Diabetes, microvascular pathology and Alzheimer disease. *Nature reviews Neurology*. 2009; 5(6):305-306.
 24. van Heijst JW, Niessen HW, Hoekman K and Schalkwijk CG. Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of N-epsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005; 1043:725-733.
 25. Grote VA, Nieters A, Kaaks R, Tjonneland A, Roswall N, Overvad K, Nielsen MR, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Racine A, Teucher B, Lukanova A, Boeing H, Drogan D, Trichopoulou A, Trichopoulos D, et al. The associations of advanced glycation end products and its soluble receptor with pancreatic cancer risk: a case-control study within the prospective EPIC Cohort. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2012; 21(4):619-628.
 26. Xue M, Rabbani N and Thornalley PJ. Glyoxalase in ageing. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011; 22(3):293-301.
 27. Rabbani N and Thornalley PJ. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011; 22(3):309-317.
 28. Ranganathan S and Tew KD. Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue from human colon. *Biochimica et biophysica acta*. 1993; 1182(3):311-316.
 29. Davidson SD, Cherry JP, Choudhury MS, Tazaki H, Mallouh C and Konno S. Glyoxalase I activity in human prostate cancer: a potential marker and importance in chemotherapy. *The Journal of urology*. 1999; 161(2):690-691.
 30. Romanuk TL, Ueda T, Le N, Haile S, Yong TM, Thomson T, Vessella RL and Sadar MD. Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts. *The American journal of pathology*. 2009; 175(6):2264-2276.
 31. Bair WB, 3rd, Cabello CM, Uchida K, Bause AS and Wondrak GT. GLO1 overexpression in human malignant melanoma. *Melanoma research*. 2010; 20(2):85-96.
 32. Sakamoto H, Mashima T, Sato S, Hashimoto Y, Yamori T and Tsuruo T. Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American*

- Association for Cancer Research. 2001; 7(8):2513-2518.
33. Rulli A, Carli L, Romani R, Baroni T, Giovannini E, Rosi G and Talesa V. Expression of glyoxalase I and II in normal and breast cancer tissues. *Breast cancer research and treatment*. 2001; 66(1):67-72.
 34. Sakamoto H, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Hashimoto Y, Naito M and Tsuruo T. Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood*. 2000; 95(10):3214-3218.
 35. Thornalley PJ and Rabbani N. Glyoxalase in tumorigenesis and multidrug resistance. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011; 22(3):318-325.
 36. Fonseca-Sanchez MA, Rodriguez Cuevas S, Mendoza-Hernandez G, Bautista-Pina V, Arechaga Ocampo E, Hidalgo Miranda A, Quintanar Jurado V, Marchat LA, Alvarez-Sanchez E, Perez Plasencia C and Lopez-Camarillo C. Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase I expression and high tumor grade. *International journal of oncology*. 2012; 41(2):670-680.
 37. Shipanova IN, Glomb MA and Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1997; 344(1):29-36.
 38. Westwood ME and Thornalley PJ. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *Journal of protein chemistry*. 1995; 14(5):359-372.
 39. Sakamoto H, Mashima T, Yamamoto K and Tsuruo T. Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277(48):45770-45775.
 40. Oya-Ito T, Naito Y, Takagi T, Handa O, Matsui H, Yamada M, Shima K and Yoshikawa T. Heat-shock protein 27 (Hsp27) as a target of methylglyoxal in gastrointestinal cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2011; 1812(7):769-781.
 41. van Heijst JW, Niessen HW, Musters RJ, van Hinsbergh VW, Hoekman K and Schalkwijk CG. Argpyrimidine-modified Heat shock protein 27 in human non-small cell lung cancer: a possible mechanism for evasion of apoptosis. *Cancer letters*. 2006; 241(2):309-319.
 42. Sosa V, Moline T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H and ME LL. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*. 2013; 12(1):376-390.
 43. Visconti R and Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer. *Current opinion in drug discovery & development*. 2009; 12(2):240-245.
 44. Pani G, Galeotti T and Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer metastasis reviews*. 2010; 29(2):351-378.
 45. Rabbani N and Thornalley PJ. Methylglyoxal, glyoxalase I and the dicarbonyl proteome. *Amino acids*. 2012; 42(4):1133-1142.
 46. Giacco F, Du X, D'Agati VD, Milne R, Sui G, Geoffrion M and Brownlee M. Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice. *Diabetes*. 2014; 63(1):291-299.
 47. Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE, Florkowski CM, Jones AF, Lunec J and Barnett AH. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 1989; 7(2):115-120.
 48. Szent-Gyorgyi A. Bioelectronics. Intermolecular electron transfer may play a major role in biological regulation, defense, and cancer. *Science*. 1968; 161(3845):988-990.
 49. Antognelli C, Mezzasoma L, Fettucciari K and Talesa VN. A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in prostate cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013; 45(4):836-844.
 50. Kang Y, Edwards LG and Thornalley PJ. Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leukemia research*. 1996; 20(5):397-405.
 51. Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General pharmacology*. 1996; 27(4):565-573.
 52. Nakadate Y, Uchida K, Shikata K, Yoshimura S, Azuma M, Hirata T, Konishi H, Kiyama H and Tachibana T. The formation of argpyrimidine, a methylglyoxal-arginine adduct, in the nucleus of neural cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009; 378(2):209-212.
 53. Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK and Koay ES. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2005; 4(11):1686-1696.
 54. Amicarelli F, Bucciarelli T, Poma A, Aimola P, Di Ilio C, Ragnelli AM and Miranda M. Adaptive response of human melanoma cells to methylglyoxal injury. *Carcinogenesis*. 1998; 19(3):519-523.
 55. Thornalley PJ, Edwards LG, Kang Y, Wyatt C, Davies N, Ladan MJ and Double J. Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochemical pharmacology*. 1996; 51(10):1365-1372.
 56. Kalapos MP. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-biological interactions*. 2008; 171(3):251-271.
 57. Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T and Uchida K. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274(26):18492-18502.
 58. Waltregny D, Bellahcene A, Van Riet I, Fisher LW, Young

M, Fernandez P, Dewe W, de Leval J and Castronovo V. Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998; 90(13):1000-1008.

2. Le méthylglyoxal, un produit dérivé de la glycolyse, induit la glycation de HSP90, la croissance tumorale et le développement de métastases via YAP

2.1 Introduction

Notre étude précédente nous ayant indiqué un rôle du stress dicarbynyle dans le cancer du sein, nous avons voulu explorer plus en détail son impact au niveau des cellules cancéreuses mammaires et plus particulièrement son potentiel effet pro-tumoral.

Lors de l'étude immunohistochimique de l'accumulation d'adduits du MG au niveau d'adénocarcinomes mammaires, nous avons remarqué un marquage à la fois cytoplasmique et nucléaire. Intrigués, nous nous sommes intéressés à l'identification de protéines modifiées par le MG.

A notre connaissance, jusqu'à présent, la seule protéine-cible du MG identifiée dans le contexte du cancer est la protéine chaperonne *Heat Shock Protein 27* (HSP27). Trois équipes indépendantes ont identifié sa modification post-traductionnelle par le MG et l'effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose que cette glycation confère aux cellules tumorales²⁰³⁻²⁰⁵.

Au cours de notre exploration de la littérature, à la recherche de cibles potentielles du MG, nous avons remarqué une autre protéine chaperonne, la *Heat Shock Protein 90* (HSP90), dont l'expression et l'activité sont modifiées par le MG dans le contexte du diabète²⁶⁸. En effet, l'abondance des protéines chaperonnes HSP90 et HSC70 est réduite au niveau de des cellules humaines d'épithélium de la rétine traitées au MG. Dans ces conditions, les auteurs ont mis en évidence une perturbation du système ubiquitine-protéasome. Il semblerait donc que les protéines chaperonnes de type *Heat Shock Protein* sont particulièrement sensibles au stress dicarbynyle.

HSP90 est actuellement sujet à un engouement dans le domaine oncologique et plusieurs études cliniques sont en cours pour déterminer l'intérêt de l'utilisation de molécules inhibitrices de HSP90 dans le traitement anti-cancéreux²⁶⁹. HSP90 est une protéine ubiquitaire et très abondante, elle représenterait 1 à 3% du contenu total en protéines des cellules humaines²⁷⁰. Elle est impliquée dans la bonne conformation de nombreuses protéines, environ 400 protéines ont été identifiées comme étant des « clientes » de HSP90²⁷¹. Plusieurs protéines kinases sont reprises dans cette liste, ce qui explique l'intérêt d'inhiber l'activité chaperonne de HSP90 pour diminuer la viabilité des cellules cancéreuses. L'une de ces clientes est la kinase LATS1

et l'inhibition de HSP90 par un traitement avec le 17-AAG induit une diminution de l'expression de LATS1²⁷². Cette kinase est impliquée dans la voie de signalisation suppresseur de tumeur Hippo (Fig. 32)²⁷³.

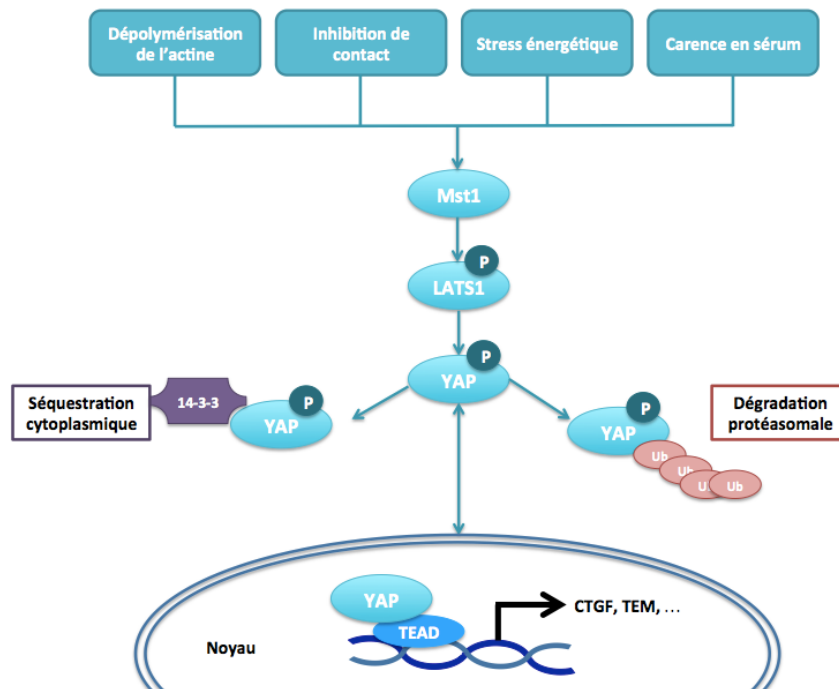


Figure 32. La voie de signalisation Hippo. L'activation de la voie par différents stimuli induit la phosphorylation en cascade de kinases (Mst1 et LATS1) puis celle de YAP. YAP phosphorylé est séquestré dans le cytoplasme par liaison à la protéine 14-3-3 ou dégradé par le protéasome. L'absence de phosphorylation permet l'entrée de YAP dans le noyau où il forme un complexe transcriptionnel avec les protéines TEAD pour activer l'expression génique de cibles comme le CTGF et le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

Quand YAP est non-phosphorylé, il est présent dans le noyau où il peut exercer son activité de co-facteur de transcription. YAP est considéré comme une protéine oncogénique car son activité transcriptionnelle enclenche notamment l'expression de programmes cellulaires tels que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)²⁷⁴ et l'expression de CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*)²⁷⁵ qui sont liés à la transformation et à la progression tumorales.

De façon intéressante, la littérature rapporte un lien entre le métabolisme du glucose et l'activité de YAP. En effet, la diminution des taux d'ATP cellulaire par privation de glucose entraîne une diminution de l'activité YAP²⁷⁶⁻²⁷⁸. Le stress énergétique active la protéine régulatrice AMPK qui induit la phosphorylation de YAP par LATS1 et son exclusion du noyau. D'autre part, la glycolyse aérobie favorise l'activité de YAP par un mécanisme impliquant la liaison de la phosphofructokinase1 aux facteurs de transcriptions TEAD (*Transcriptional Enhancer Factor*) qui sont des partenaires de YAP dans le noyau.

2.2 Résultats

Comme mentionné précédemment, un lien entre métabolisme du glucose et activité de YAP a été établi dans les cellules cancéreuses. Considérant un flux glycolytique élevé dans les cancers mammaires, nous pouvons présumer d'une augmentation de la production de MG au niveau de ces tumeurs et leur accumulation d'adduits comme observé dans notre première étude²⁶⁷. Nous avons envisagé la possibilité d'un lien entre le stress dicarbone et l'activité de l'oncoprotéine YAP dans le cancer du sein. Pour cela, nous avons mené une étude immunohistochimique de YAP au niveau de 87 échantillons de tumeurs mammaires humaines que nous avons catégorisées en « faible stress dicarbone » et « haut stress dicarbone » en fonction de l'intensité de leur accumulation d'adduits Argpyrimidine. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une corrélation positive ($R_{\text{Spearman}} = 0,3975$, $p=0,0001$) entre le marquage nucléaire de YAP et le haut stress dicarbone (Fig. 33) alors qu'il n'y a pas de relation avec le marquage cytoplasmique de YAP.

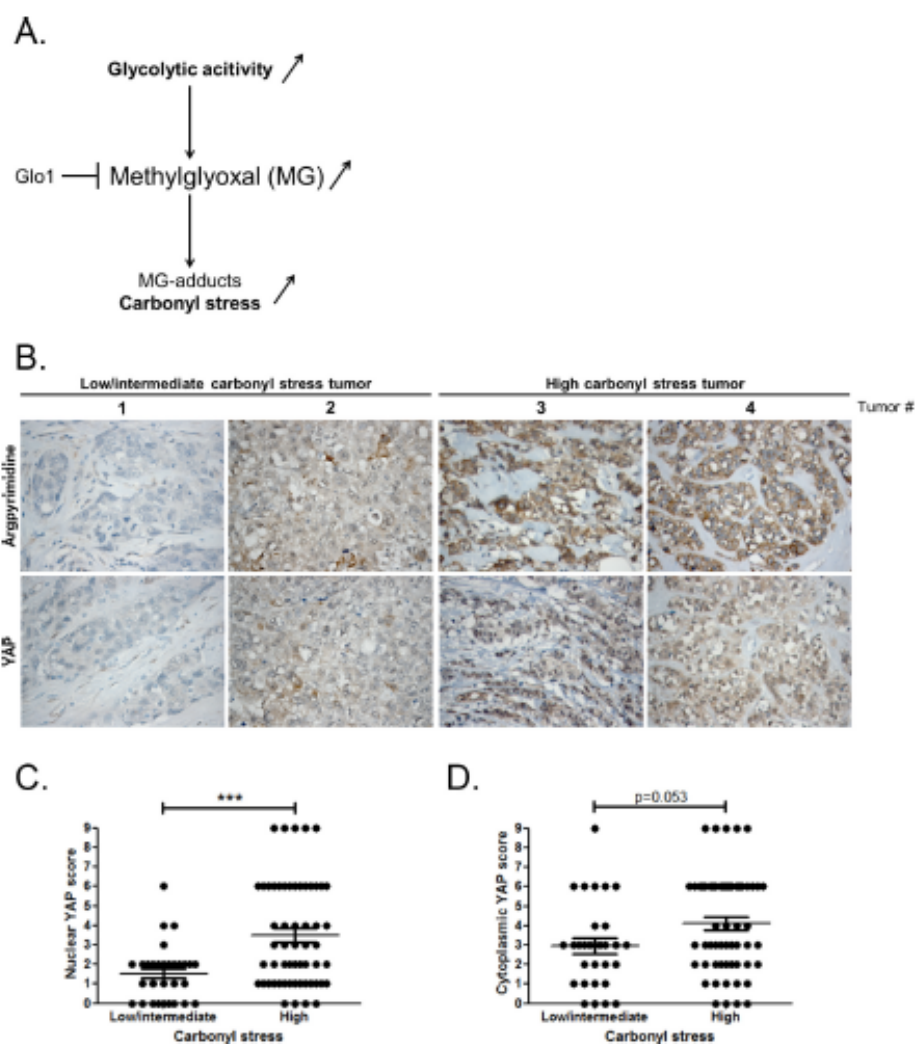


Figure 33. Un haut stress dicarbone et la présence de YAP dans le noyau sont associés positivement dans le cancer du sein. (A) Dans les cellules cancéreuses, un métabolisme glycolytique élevé, couplé ou non à une diminution de l'activité de détoxification Glo1 mène à un niveau élevé de MG et à l'établissement d'un stress dicarbone. (B) Image représentative de l'immunomarquage YAP au niveau de tumeurs mammaires humaines de faible/haut stress dicarbone comme déterminé par l'intensité du marquage Argpyrimidine. Quantification du score immunohistochimique du marquage YAP au niveau du noyau (C) et du cytoplasme (D) au niveau d'une série de cancers du sein (n=87).

Nous avons ensuite vérifié *in vitro* si l'induction d'un stress dicarbone pouvait récapituler l'accumulation nucléaire de YAP observée chez les patientes. Pour établir la localisation intracellulaire de YAP, il nous faut considérer que les cellules cancéreuses en culture sont soumises à un certain degré d'inhibition de contact bien qu'une évation de ce phénomène soit une caractéristique des cellules cancéreuses^{1,279}. Nous avons donc suivi un modèle d'acquisition de confluence au cours duquel les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de MG pendant 3 jours. A faible densité, les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 présentent une expression intense de YAP, principalement au niveau nucléaire. A confluence, l'abondance de YAP est

diminuée, indétectable dans le noyau, suggérant sa dégradation par le protéasome. Quand les cellules sont traitées au MG, YAP persiste dans le cytoplasme et le noyau malgré la confluence (Fig. 34). Puisque YAP est un co-facteur de transcription, son activité est régulée par sa localisation et il n'est efficace que lorsqu'il est présent dans le noyau. Nous ne considérerons donc comme pertinent que la localisation nucléaire de YAP. La quantification de l'abondance de YAP dans la cellule montre une rétention MG-dose dépendante de YAP dans le noyau (Fig. 34 B). Ces observations ont également été faites au niveau de 2 autres lignées de cellules cancéreuses mammaires, les cellules MCF7 et MDA-MB-468.

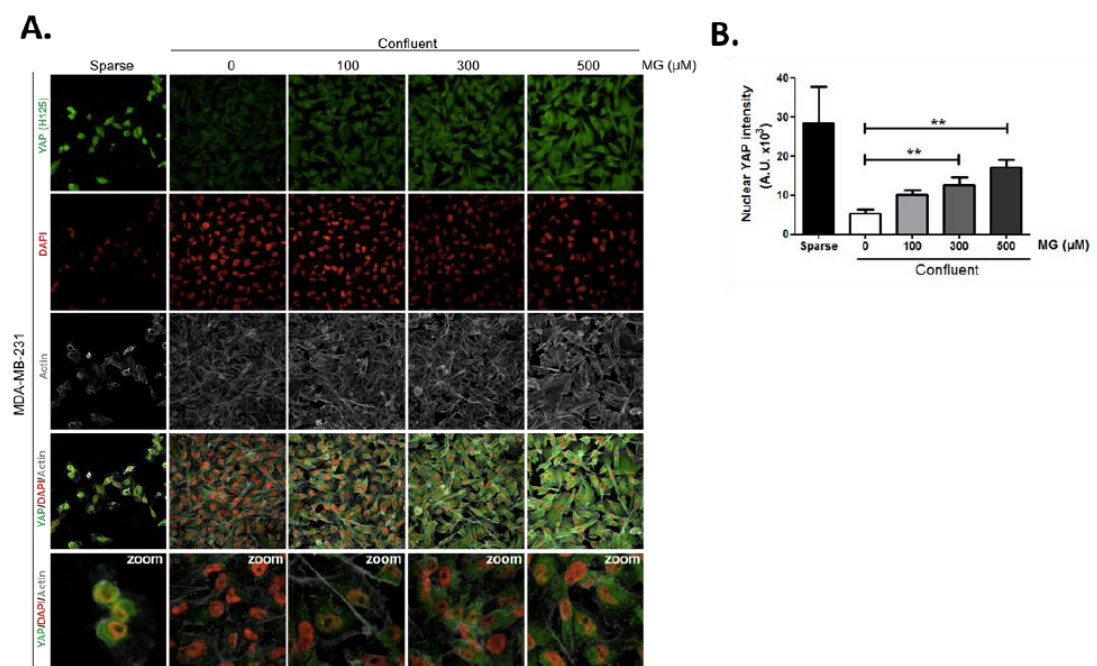


Figure 34. Le traitement au MG induit une rétention nucléaire de YAP au niveau des cellules cancéreuses mammaires confluentes. (A) Détection de YAP, en vert, par immunofluorescence au niveau de cellules MDA-MB-231 cultivées à faible densité (sparse) ou jusqu'à confluence (confluent) en présence de doses croissantes de MG. Le noyau des cellules est marqué au DAPI en bleu et leur cytosquelette d'actine en blanc. Des images à plus fort grossissement sont présentées (zoom). (B) Quantification de l'intensité du signal YAP au niveau du noyau des cellules.

De façon intéressante, le co-traitement des cellules MDA-MB-231 avec une molécule capable d'inhiber l'action du MG, la Carnosine, abolit la rétention de YAP dans le noyau à confluence (Fig. 35).

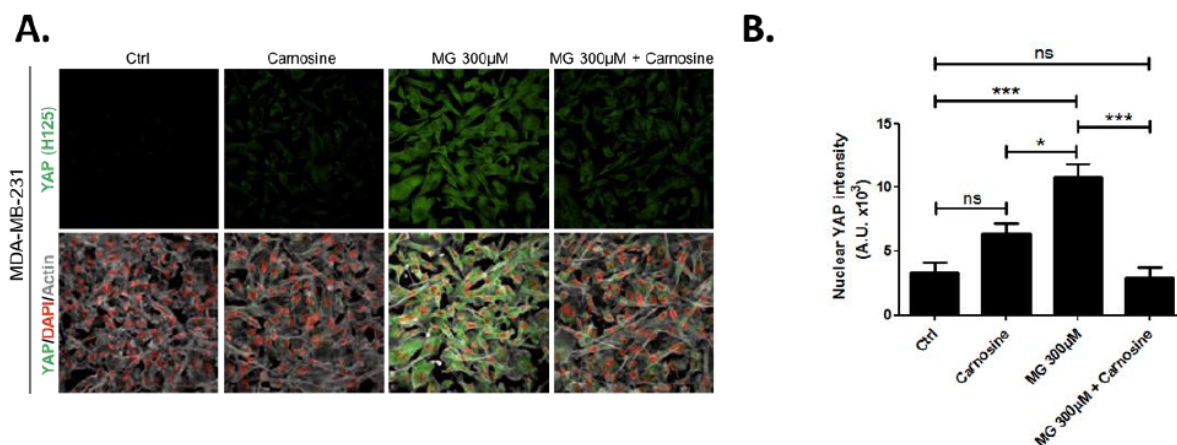


Figure 35. Le co-traitement à la carnosine empêche la rétention nucléaire de YAP au niveau des cellules cancéreuses mammaires confluentes sous traitement au MG. (A) Détection de YAP, en vert, par immunofluorescence au niveau de cellules MDA-MB-231 cultivées à faible densité (sparse) ou jusqu'à confluence (confluent) en présence de Carnosine, de MG ou de la combinaison des deux. Le noyau des cellules est marqué au DAPI en bleu et leur cytosquelette d'actine en blanc. (B) Quantification de l'intensité du signal YAP au niveau du noyau des cellules.

Ensuite, nous avons voulu reproduire la rétention nucléaire de YAP liée au stress dicarbone induit par du MG endogène. De façon à intensifier la production de MG par la cellule, nous avons cultivé les cellules en milieu riche glucose (*High glucose* ou HG). Comme discuté précédemment, parmi les lignées cancéreuses mammaires, les cellules MDA-MB-231 sont considérées comme glycolytiques alors que les cellules MCF7 sont considérées comme oxydatives. En cultivant ces 2 lignées dans un milieu riche en glucose, nous avons constaté une augmentation de la glycolyse par la mesure du L-Lactate (Fig. 36 A) et de la production de MG (Fig. 36 B-C), par rapport à un milieu de culture pauvre en glucose, uniquement au niveau des cellules glycolytiques MDA-MB-231. Ces effets de stimulation par le glucose ne sont pas retrouvés au niveau des cellules MCF7, indiquant que l'augmentation de la production de MG serait dépendante de la réponse cellulaire à un stimulus de glucose. Dans ces conditions de production plus élevée de MG, nous avons observé la rétention de YAP dans le noyau des cellules MDA-MB-231 (Fig. 36 D-E). Au niveau des cellules MCF7, comme le milieu de culture riche en glucose n'induit pas d'augmentation de la production de MG, il n'y a pas de rétention nucléaire de YAP (Fig. 36F-G). Il est intéressant de noter que le traitement avec du MG exogène était capable d'induire la rétention nucléaire de YAP au niveau des cellules MCF7, suggérant que ces cellules seraient capables de répondre à un stimulus de stress dicarbone extérieur comme la présence de haut taux de MG dans le microenvironnement, par exemple.

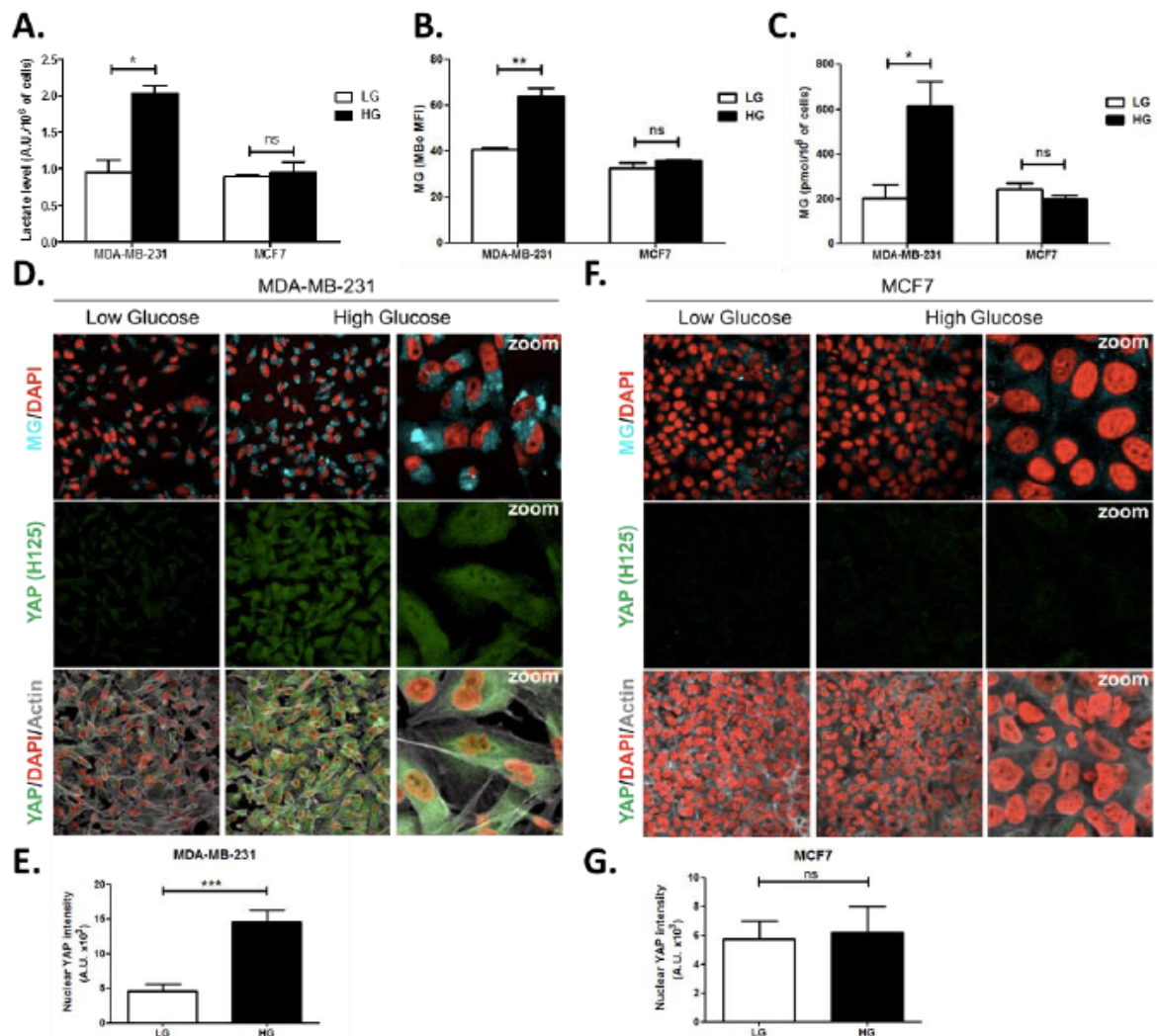


Figure 36. Rétention nucléaire de YAP liée à une production augmentée de MG endogène induite par un milieu riche en glucose. Comparaison des cellules MDA-MB-231 et MCF7 cultivées en milieu pauvre (LG) ou riche (HG) en glucose. (A) Mesure du L-Lactate, reflet de la glycolyse. (B) Mesure du MG intracellulaire par la sonde MBo. (C) Mesure du MG au niveau du milieu conditionné par les cellules par LC-MS/MS. (D) Détection du MG en bleu, des noyaux en rouge, de YAP en vert et du cytosquelette d'actine en blanc par immunofluorescence des cellules MDA-MB-231 en condition de culture LG ou HG. (E) Quantification du marquage nucléaire de YAP au niveau des cellules MDA-MB-231. (F) Détection du MG en bleu, des noyaux en rouge, de YAP en vert et du cytosquelette d'actine en blanc par immunofluorescence des cellules MDA-MB-231 en condition de culture LG ou HG. (G) Quantification du marquage nucléaire de YAP au niveau des cellules MDA-MB-231. Des images à plus fort grossissement sont montrées (zoom).

Le traitement des cellules MDA-MB-231 avec des molécules inhibitrices du MG, la Carnosine et l'Aminoguanidine, permet de d'empêcher la rétention nucléaire de YAP induite par l'augmentation de la production de MG en milieu riche en glucose (Fig. 37).

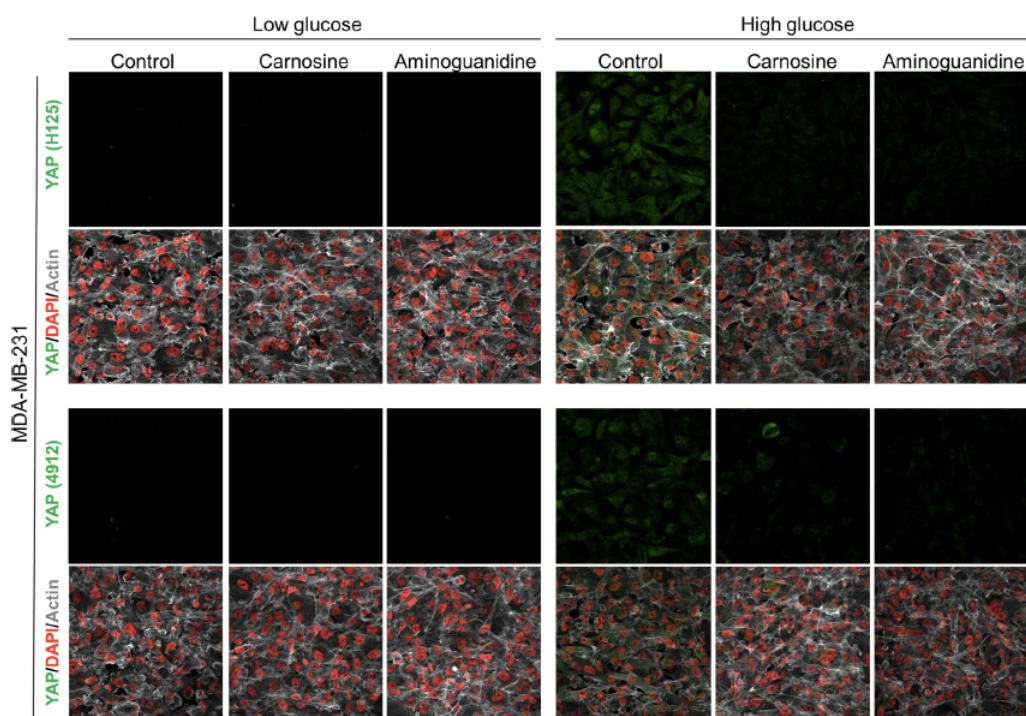


Figure 37. Inhibition de la rétention nucléaire de YAP en milieu riche en glucose en présence de scavengers du MG. Détection de YAP en vert, des noyaux en rouge et du cytosquelette d'actine en blanc par immunofluorescence au niveau des cellules MDA-MB-231 cultivées en milieu LG, HG et HG en présence des MG-scavengers Carnosine ou Aminoguanidine.

Dans l'objectif d'étudier plus en profondeur les conséquences des effets du stress dicarbonylé sur l'activité de YAP, nous avons établi une inhibition stable de Glo1 grâce à des shRNA (*short hairpin RNA*, shGLO1#1 et shGLO1#2) au niveau des cellules MDA-MB-231. L'inhibition de Glo1 dans ces clones a été vérifiée au niveau de l'ARNm (Fig. 38 A), de l'expression protéique (Fig. 38 B) et de l'activité de Glo1 (Fig. 38 C). Dans ces cellules déficientes en Glo1, nous avons observé une augmentation de la production de MG grâce à la sonde MBo ainsi que la rétention nucléaire de YAP (Fig. 38 D-E).

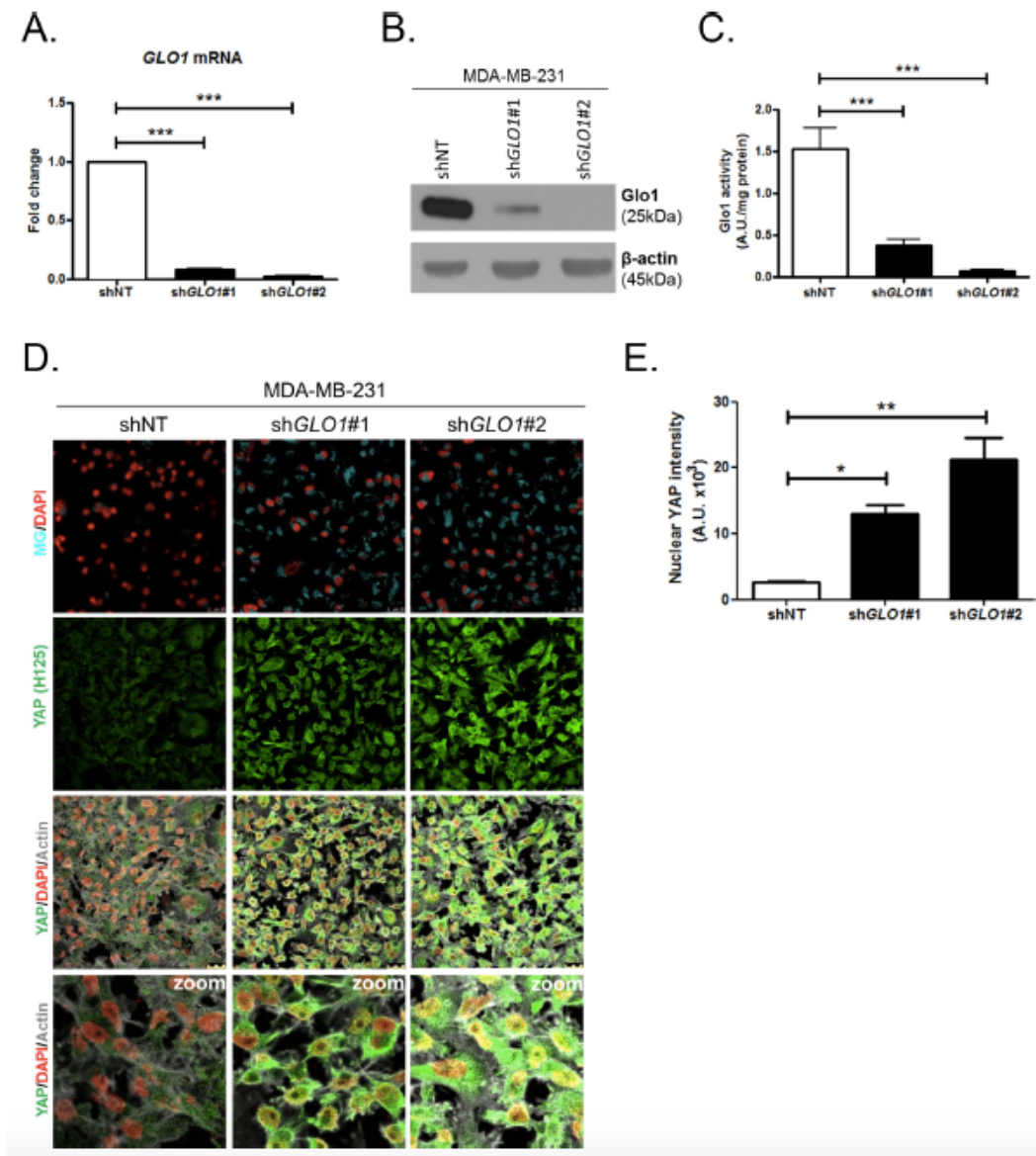


Figure 38. Rétention nucléaire de YAP au niveau de cellules MDA-MB-231 rendues déficientes en Glo1. Mise en évidence de la répression de Glo1 dans les cellules MDA-MB-231 shGLO1#1 et shGLO1#3 au niveau de l'ARNm (A), de l'expression protéique (B) et de l'activité (C). Détection du MG intracellulaire en bleu par la sonde MBo, de YAP en vert, des noyaux en rouge et du cytosquelette d'actine en blanc par immunofluorescence (D). Quantification du marquage nucléaire de YAP (E). Des images à plus fort grossissement sont montrées (zoom).

A nouveau, le traitement des cellules MDA-MB-231 déficientes en Glo1 à la Carnosine, un MG-scavenger, permet d'abolir la rétention nucléaire de YAP induite par le MG (Fig. 39).

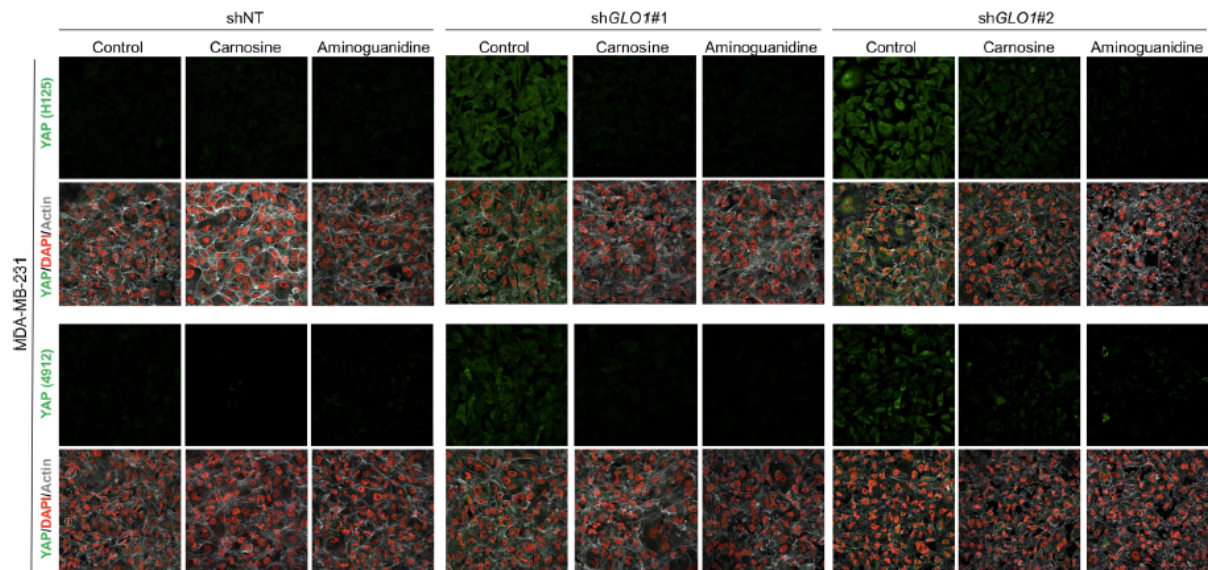


Figure 39. Rétention nucléaire de YAP au niveau de cellules MDA-MB-231 déficientes en Glo1. Détection de YAP en vert, des noyaux en rouge et du cytosquelette d'actine en blanc par immunofluorescence au niveau des cellules MDA-MB-231 déficientes en Glo1 (shGLO1#1 et shGLO1#2) et traitées avec les MG-scavengers Carnosine ou Aminoguanidine.

A présent qu'il est bien établi qu'un stress dicarboxyle induit par une production glycolytique élevée de MG permet la rétention nucléaire de YAP au niveau des cellules cancéreuses mammaires, il s'agit d'évaluer si le YAP présent dans le noyau dans ces conditions exerce bien son activité transcriptionnelle. Nous nous sommes intéressés à une des cibles connues de YAP, CTGF dont l'expression est corrélée avec la prolifération²⁸⁰ et la motilité²⁸¹ des cellules. Nous avons pu mettre en évidence que YAP est présent au niveau du promoteur du gène codant pour le CTGF par immunoprécipitation de chromatine. En effet, au niveau des cellules MDA-MB-231 cultivées à faible densité, YAP est présent dans le noyau et associé au promoteur de CTGF au niveau des sites de liaisons des facteurs de transcription TEAD. Quand les cellules atteignent la confluence, YAP est exclu du noyau et est donc dissocié du promoteur de son gène cible. Quand les cellules traitées au MG atteignent la confluence, YAP est retenu dans le noyau où il peut à nouveau se lier au promoteur de CTGF (Fig. 40).

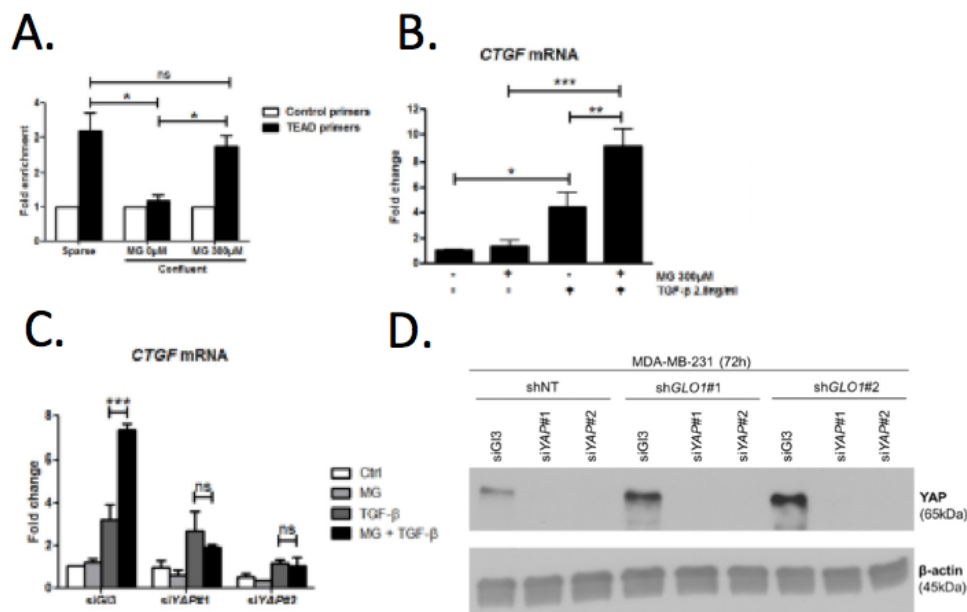


Figure 40. Induction de l'expression de CTGF sous stress dicarboneyle. (A) Immunoprécipitation de chromatine de YAP au promoteur de CTGF au niveau de sites de liaison des facteurs TEAD dans les cellules MD-MB-231 cultivées à faible densité (sparse) ou pendant 72h jusqu'à confluence (confluent) en présence ou non de MG300µM. (B) Détection de l'ARNm de CTGF par RT-qPCR au niveau de cellules MDA-MB-231 cultivées jusqu'à confluence en présence ou non de MG 300µM puis traitées pendant 2heures au TGFβ à 2,5ng/mL (C) et après répression de l'expression de YAP par siRNA (siYAP#1 et siYAP#2). (D) Validation par immunoblot de la répression de l'expression de YAP.

Enfin, pour démontrer que l'activité transcriptionnelle de YAP sous stress dicarboneyle a un effet biologique sur les cellules de cancer du sein. Nous avons évalué la prolifération des cellules MDA-MB-231 déficientes en Glo1 et nous avons constaté que l'absence d'expression de Glo1 favorisait la prolifération et que la répression de l'expression de YAP par siRNA réduisait, elle, significativement la capacité des cellules à se multiplier (Fig. 41). Ces observations montrent que le stress dicarboneyle induit la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, en accordance avec le rôle reconnu du CTGF²⁸⁰, et que cet effet nécessite la présence de YAP.

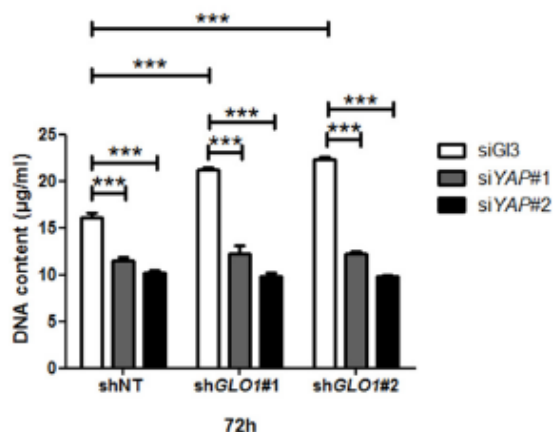


Figure 41. Stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires sous stress dicarbonyle. Evaluation de la prolifération par mesure de la quantité d'ADN après 72h au niveau des cellules MDA-MB-231 déficientes en Glo1 et après répression de l'expression de YAP par siRNA (siYAP#1 et siYAP#2).

Nous nous sommes ensuite interrogés sur les mécanismes par lesquels le stress dicarbonyle pouvait réguler la localisation cellulaire et donc l'activité de YAP. Nous avons d'abord envisagé la possibilité que YAP soit une cible directe de la glycation par le MG. Cependant, des expériences d'immunoprécipitation des adduits du MG n'ont pas révélé la présence de YAP parmi eux. LATS1, la kinase responsable de la phosphorylation inhibitrice de l'activité de YAP, n'est pas modifiée non plus mais n'avons pu constater que le traitement au MG diminuait l'abondance de LATS1 au niveau de cellules cancéreuses mammaires. Cette disparition de LATS1 est due à sa dégradation dans le protéasome (Fig. 42 A) comme démontré par l'équipe de He²⁸². En effet, le co-traitement des cellules avec l'inhibiteur de protéasome MG132 empêche la diminution de l'expression de LATS1 induite par le MG (Fig. 42 A). L'efficacité du traitement au MG132 a été vérifiée par la détection des protéines ubiquitinylées qui s'accumulent quand le protéasome est inhibé. De façon à prouver que la rétention de YAP sous stress dicarbonyle est liée à une diminution de l'expression de LATS1, nous avons induit la sur-expression de LATS1 au niveau des cellules MDA-MB-231 grâce à un plasmide. Dans ces conditions, nous avons observé que la rétention de YAP sous traitement au MG dans les cellules confluentes était abolie par la sur-expression de LATS1 (Fig. 42 B). Ces observations ont aussi été réalisées au niveau des cellules MDA-MB-468 et MCF7.

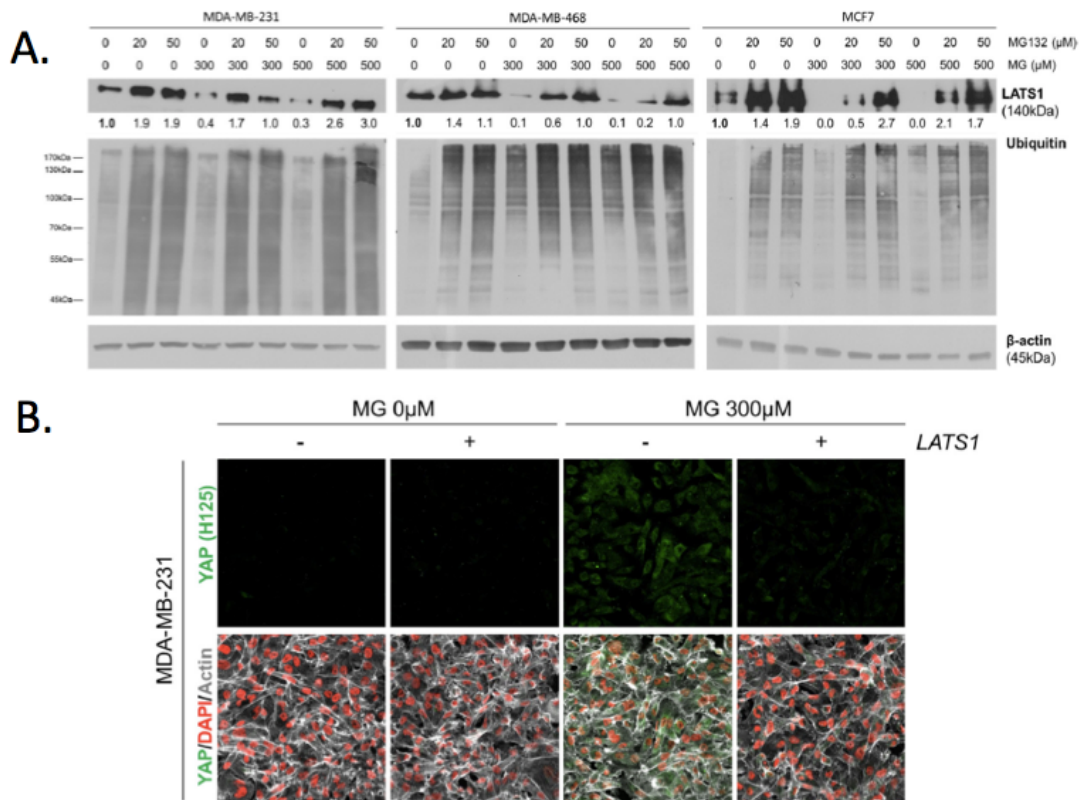


Figure 42. Le stress dicarbonyle induit la diminution de l'expression de LATS1 au niveau de cellules cancéreuses mammaires. (A) Détection par immunoblot de la diminution de l'expression de LATS1 sous traitement au MG, réversion par traitement à l'inhibiteur de protéasome MG132. Accumulation des protéines ubiquitinylées sous traitement au MG132. (B) Détection de YAP en vert, des noyaux en rouge et du cytosquelette d'actine en blanc par immunofluorescence au niveau de cellules MDA-MB-231 traitées jusqu'à confluence au MG300μM et où la sur-expression de LATS1 a été induite par un plasmide.

Nous avons ensuite voulu élucider la diminution de l'abondance de LATS1 au niveau des cellules cancéreuses mammaires en présence de MG. Comme indiqué dans la littérature, LATS1 est un des clients des protéines chaperonne HSP90²⁷² et l'inhibition de l'activité HSP90 réduit l'expression de LATS1. Comme discuté précédemment, les protéines chaperonnes semblent être particulièrement sensibles à la glycation par le MG. Nous avons donc évalué si HSP90 pouvait être modifiée par le MG. Nous avons réalisé une immunoprécipitation des adduits du MG dans les cellules MDA-MB-231 et y avons détecté la présence de HSP90. La proportion d'HSP90 modifiée étant augmentée au niveau des cellules traitées au MG (Fig. 43 A). La présence de ces extraits de la seule autre protéines cible du MG dans le contexte du cancer, la HSP27, confirme nos résultats. L'expérience inverse a été réalisée, immunoprécipitation de HSP90 est détection des adduits du MG, Argpyrimidine et MG-H1, et confirme nos observations (Fig. 43 B). Les immunoprécipitats des résidus Argpyrimidine ont ensuite été analysés

par spectrométrie de masse et la présence d'HSP90 modifiée sur plusieurs résidus a été détectée. La répartition des sites de glycation sur HSP90 est schématisée dans la Fig 43 C.

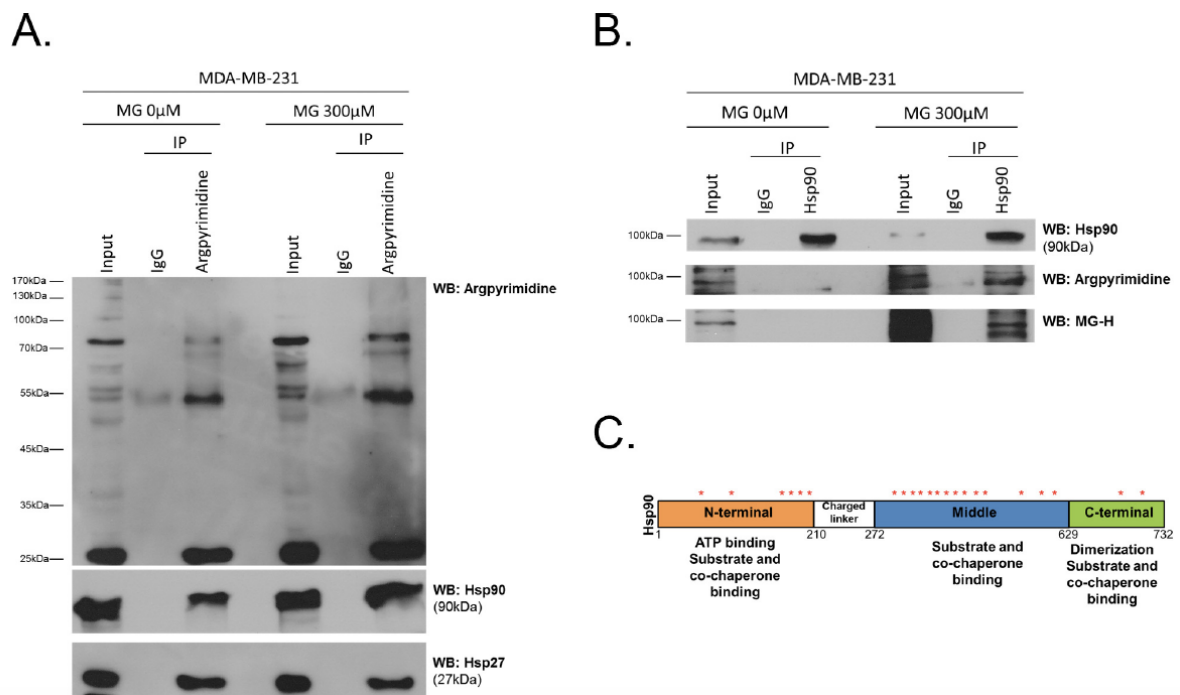


Figure 43. HSP90 est une cible de glycation du MG. (A) Immunoprécipitation des résidus Argpyrimidine au niveau des cellules MDA-MB-231 traitées au MG 300µM et détection de ces résidus, de HSP90 et de HSP27 par immunoblot. (B) Immunoprécipitation de HSP90 au niveau des cellules MDA-MB-231 traitées au MG 300µM et détection de HSP90, des adduits Argpyrimidine et MG-H1 par immunoblot. (C) Schéma représentatif des sites préférentiels de glycation de HSP90 par le MG, indiqués par les *.

La présence de sites de glycation au niveau des portions fonctionnelles de HSP90 impliquées dans la liaison au substrat et la liaison à l'ATP nous suggère que l'activité de HSP90 pourrait être perturbée par le MG. En effet, en incubant de la HSP90 recombinante en présence de MG, nous avons pu observer à la fois une glycation de la protéine et une diminution de son activité ATPase, comparable à celle obtenue par traitement avec l'inhibiteur de HSP90, le 17-AAG. Dans les deux cas, ces modifications ont pu être abolies par un co-traitement à la Carnosine (Fig. 44 A-B). L'activité réduite d'HSP90 en présence de MG pourrait expliquer la diminution de l'abondance de sa protéine cliente LATS1. En effet, la liaison de HSP90 à LATS1 évaluée par co-immunoprécipitation est interrompue en présence de MG300µM (Fig. 44 C).

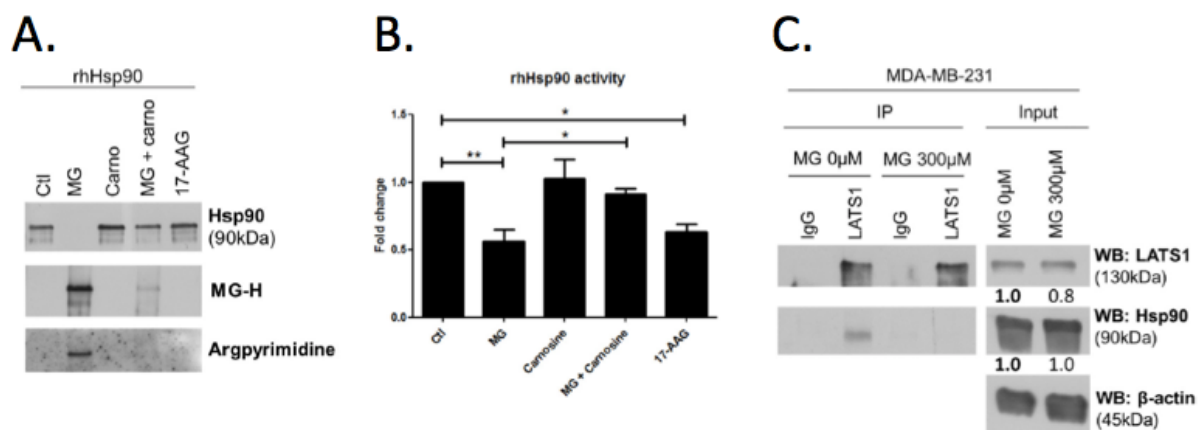


Figure 44. Diminution de l'activité chaperonne de HSP90 en présence de MG. Incubation d'HSP90 recombinante en présence de MG et/ou Carnosine ou de l'inhibiteur 17-AAG. (A) Détection de HSP90 et des adduits Argyrimidine et MG-H1. (B) Evaluation de l'activité ATPase. (C) Co-immunoprécipitation de LATS1 et HSP90 à partir de cellules MDA-MB-231 traitées au MG300μM pendant 24h et détection de LATS1 et HSP90 par immunoblot.

L'ensemble des résultats indiquent qu'en présence de stress dicarbone, l'activité chaperonne d'HSP90 est perturbée ce qui entraîne probablement le mauvais repliement de son client LATS1 qui est dégradé dans le protéasome. En absence de LATS1, YAP peut exercer son activité transcriptionnelle dans le noyau et favorise l'expression de CTGF et l'induction de l'EMT, deux événements liés à la prolifération et à la capacité migratoire des cellules cancéreuses mammaires. Nous avons ensuite voulu étudier l'importance biologique de ces observations dans un modèle *in vivo* de développement de tumeurs primaires et de métastases. Nous avons réalisé des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 déficientes en Glo1 au niveau du flanc de souris immunodéprimées *NOD-SCID*. Après 4 semaines, les tumeurs primaires ont été enlevées, mesurées et pesées. Les souris ont été gardées en observation pour 6 semaines de plus pour évaluer l'apparition de métastases pulmonaires (Fig. 45). La taille et le poids des tumeurs primaires développées à partir des cellules dépourvues de Glo1 sont plus élevés, de façon significative pour les shGLO1#2, que celles exprimant Glo1 (shNT) (Fig. 45 A). Nous avons réalisé un immunoblot à partir d'extraits protéiques issus de ces tumeurs et nous avons observé une augmentation de l'accumulation des adduits argyrimidine et de YAP au niveau des tumeurs où l'expression de Glo1 est inhibée (Fig. 45 B-C). Cette observation met en évidence un lien entre l'absence de Glo1, l'accumulation d'adduits du MG et l'augmentation de l'abondance de YAP.

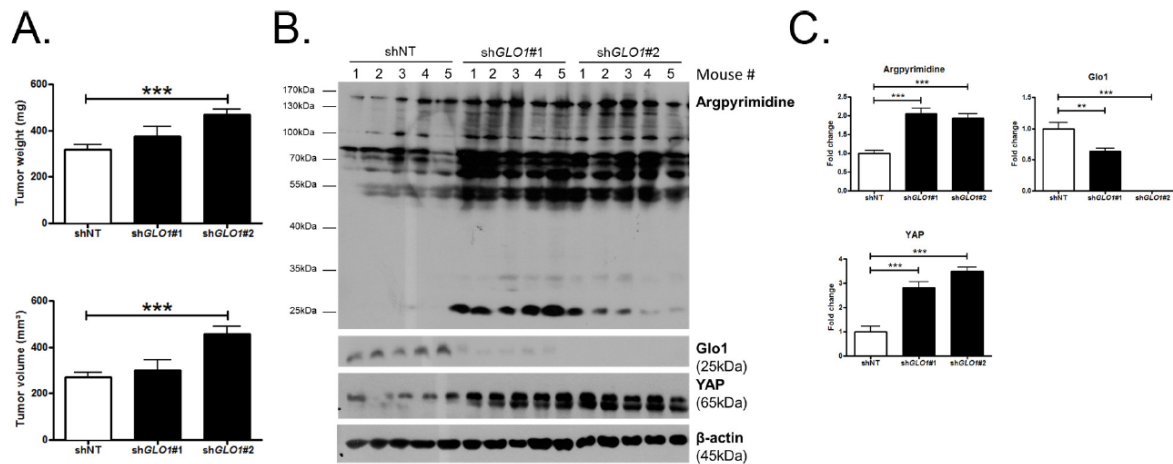


Figure 45. Les tumeurs cancéreuses mammaires dépourvues de Glo1 montrent un potentiel tumorigène augmenté *in vivo*. Les cellules MDA-MB-231 shNT, shGLO1#1 et shGLO1#2 ont été injectées sous la peau de souris *NOD-SCID* (15souris/groupe). Après 4 semaines, les tumeurs primaires ont été retirées, mesurées (mm³) et pesées (mg) (A). (B) Détection de l'accumulation des adduits argpyrimidine, de Glo1 et YAP au niveau de 5 tumeurs expérimentales représentatives par immunoblot et quantification (C).

Par détection immunohistochimique, nous avons observé une augmentation de YAP présent au niveau du noyau des cellules tumorales ainsi qu'une proportion plus élevée de cellules présentant le marqueur de prolifération Ki67 dans les tumeurs shGLO1 (Fig. 46). L'augmentation de la présence de YAP et Ki67 au niveau du noyau des cellules tumorales supporte la croissance plus importante des tumeurs primaires shGLO1.

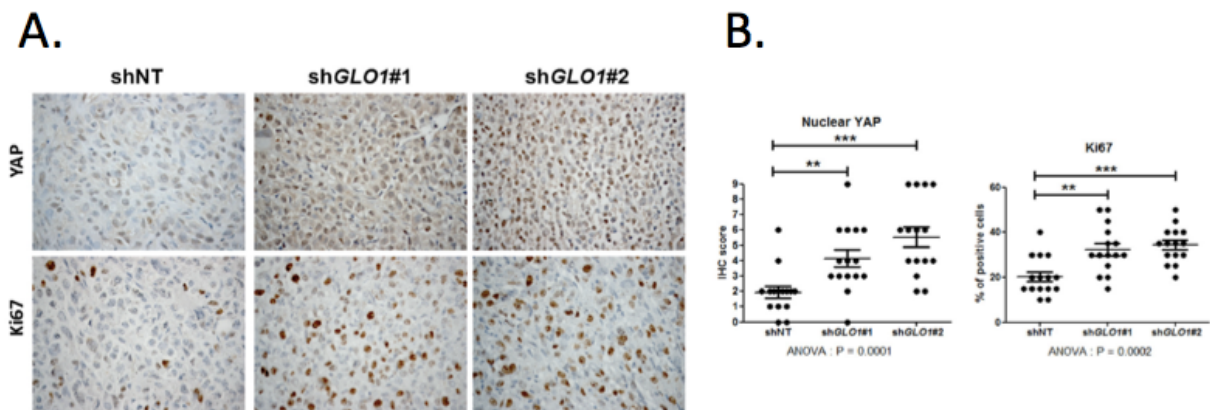


Figure 46. Les tumeurs primaires dépourvues de Glo1 montrent un capacité proliférative augmentée. (A) Détection par immunohistochimie de YAP et Ki67 au niveau des tumeurs expérimentales développées en souris à partir des cellules MD-MB-231 shNT, shGLO1#1 et shGLO1#2. (B) Evaluation du marquage YAP au niveau du noyau et de la proportion des cellules présentant le marquage Ki67 nucléaire.

Pour mieux mettre en évidence la relation entre le stress dicarbone, l'activité YAP et la croissance tumorale, nous avons implanté les cellules MDA-MB-231 dépourvues de Glo1 et après l'inhibition de l'expression de YAP par siRNA au niveau d'un modèle *in vivo* de croissance tumorale, la membrane chorio-allantoïque d'œuf de

poulet fécondé (*Chorio-allantoic membrane assay* ou CAM). 7 jours après implantation, les tumeurs ont été récoltées et mesurées. Les tumeurs n'exprimant pas Glo1 (shGlo1#2) montrent une augmentation de volume par rapport aux tumeurs shNT. Cette augmentation du volume tumorale est abolie par l'inhibition de l'expression de YAP (siYAP#1 et siYAP#2) (Fig. 47), ce qui montre que l'effet pro-tumoral du stress dicarbone est dépendant de YAP. Les tumeurs récoltées ont été analysées par immunohistochimie et la détection de YAP confirme sa présence au niveau du noyau de façon plus importante dans les cellules tumorales shGLO1#2. (Fig. 47 D).

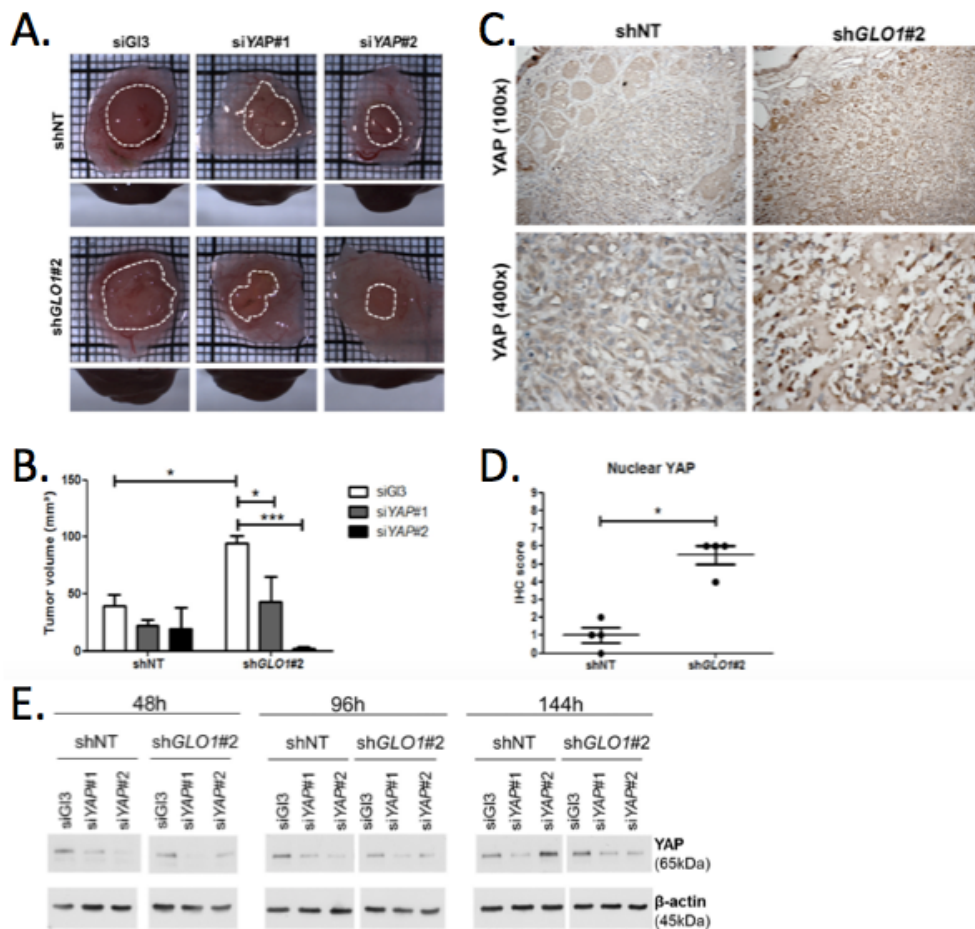


Figure 47. La croissance tumorale induite par le MG est dépendante de YAP. Les cellules MDA-MB-231 shNT, shGLO1#2 transfectées avec les siRNA siYAP#1 et siYAP#2 et implantées sur la membrane chorio-allantoïque d'œuf de poulet fécondé (CAM). Après 7 jours, les tumeurs ont été récoltées, photographiées (A) et mesurées (mm³, 4tumeurs/groupe) (B). Images représentatives (C) et quantification (D) du marquage nucléaire de YAP, détecté par immunohistochimie au niveau des tumeurs récoltées. (E) Validation de l'inhibition de l'expression de YAP (siYAP#1 et siYAP#2) par immunoblot, au cours de la durée totale de l'expérience.

Après avoir analysé l'effet du stress dicarbone sur la croissance tumorale, nous avons étudié sur impact sur le développement de métastases. Pour cela, nous avons suivi pendant 6 semaines les souris après résection chirurgicale des tumeurs

primaires shGLO1. En effet, les cellules MDA-MB-231 utilisées expriment l'enzyme luciférase ce qui permet le suivi d'apparition de métastases au niveau des poumons par luminescence après injection des souris par voie intrapéritonéale de luciférine. Le suivi des souris a permis la détection dès 3 semaines après la chirurgie de métastases pulmonaires au niveau des groupes shGLO1 mais pas au niveau du groupe contrôle (shNT). Après 6 semaines, des métastases ont pu être détectées au niveau de 68% des souris dont les tumeurs primaires étaient dépourvues de Glo1 alors que seulement 20% des souris contrôles ont développé des métastases. Les souris ont été sacrifiées, leurs poumons ont été récoltés et un marquage immunohistochimique de la vimentine humaine y a été réalisé pour détecter les cellules mammaires tumorales. Nous avons pu observé une augmentation du nombre et de la taille des foci métastatiques au niveau des poumons des souris des groupes shGLO1 par rapport au groupe shNT (Fig. 48). Nous avons également réalisé la détection de Glo1 au niveau de coupes sériées des poumons pour vérifier que l'expression de Glo1 était toujours inhibée dans les groupes shGlo1 (Fig. 48). Ces observations montrent un rôle pro-tumoral du stress dicarbylyle, non seulement au niveau de la croissance tumorale mais aussi au niveau de la dissémination métastatique.

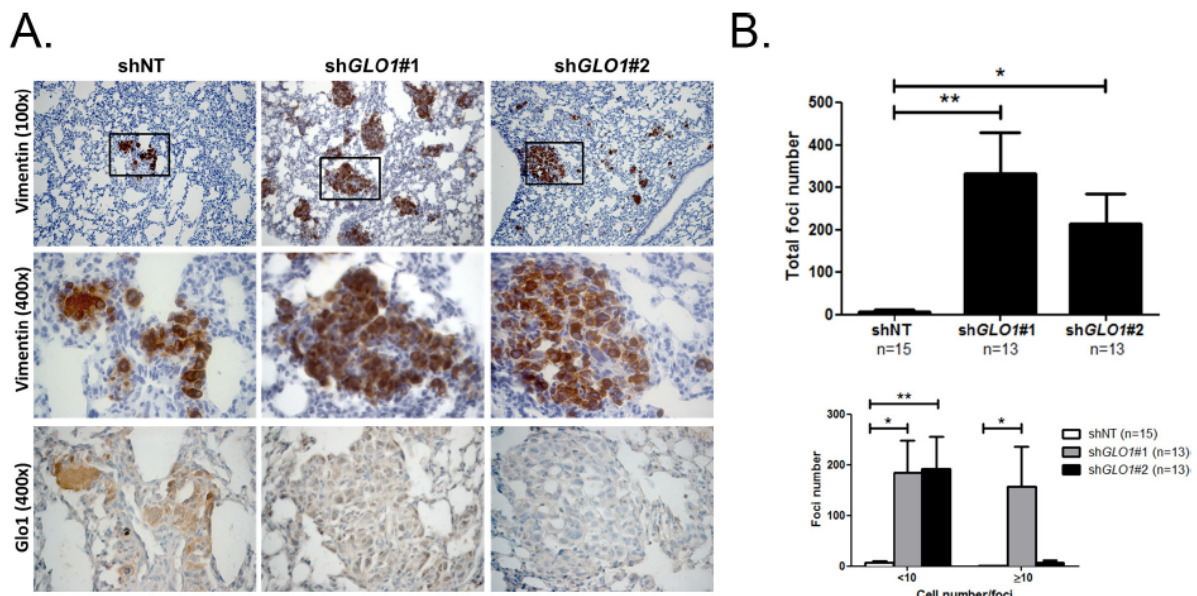


Figure 48. L'absence de Glo1 augmente la capacité métastatique de cellules cancéreuses mammaires *in vivo*. Des souris NOD-SCID ont subi une xénotransplantation de cellules MDA-MB-231 shNT, shGLO1#1 et #2. Après 4 semaines, les tumeurs primaires ont été retirées et les souris ont été suivies pendant 6 semaines pour l'apparition de métastases avant d'être sacrifiées. (A) Détection des foyers métastatiques au niveau des poumons par détection de la vimentine et validation de l'inhibition de l'expression de Glo1 par immunohistochimie. (B) Quantification du nombre de foci métastatiques et de leur taille.

Finalement, pour mieux démontrer l'implication du MG dans ces effets pro-métastatiques, les souris du groupe shGlo1#1 ont reçu de la Carnosine dans leur eau de boisson à partir de la résection de la tumeur primaire et jusqu'à la fin du modèle de développement de métastases. Nous avons constaté une diminution significative du nombre de foci métastatiques dans les poumons de souris traitées avec le MG-scavenger (Fig. 49), prouvant l'implication du stress dicarbylyle dans les effets observés précédemment.

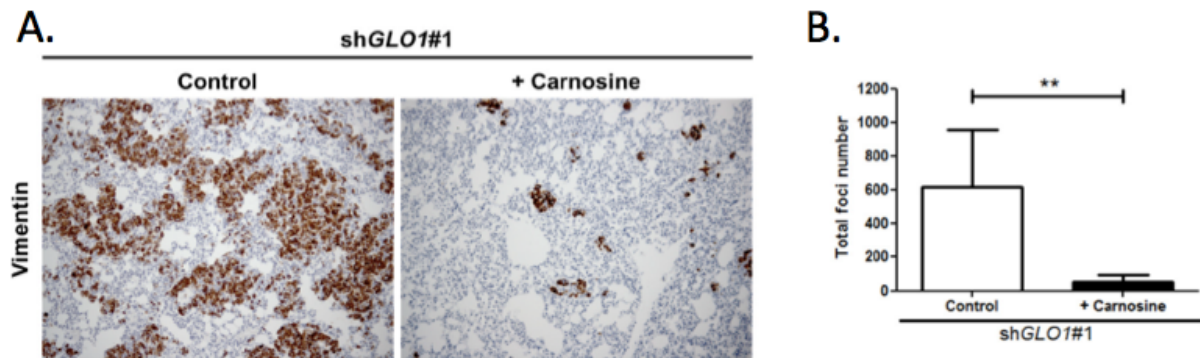


Figure 49. L'inhibition de stress dicarbylyl par la Carnosine empêche son effet pro-métastatique. Les souris du groupe shGLO1#1 ont reçu de la Carnosine 10mM dans leur eau de boisson à partir de la résection de la tumeur primaire. (A) Mise en évidence des foci métastatiques pulmonaire par détection immunohistochimique de la vimentine. (B) Quantification du nombre de foci.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus indiquent que les effets pro-tumorigènes du stress dicarbylyl sont associés à une augmentation de l'activité de YAP et peuvent être efficacement abolis par un traitement avec un scavenger du MG comme la Carnosine.

2.3. Conclusions

Nous avons montré avec cette étude le rôle pro-tumoral du stress dicarbylyl dans le cancer du sein. La modification de la protéine chaperonne HSP90, une nouvelle cible du MG, induit la dégradation protéasomale de LATS1. La disparition de cette kinase impliquée dans la voie suppresseur de tumeur Hippo permet la rétention nucléaire de YAP. Ainsi, ce co-facteur de transcription favorise l'activation de programmes pro-tumeur et pro-métastases comme l'expression de CTGF et le processus d'EMT. Nous démontrons donc pour la première fois un rôle pro-cancer du MG qui peut être contrecarré par le traitement avec une molécule inhibitrice du stress carbonyl, la Carnosine. Cette étude suggère que l'utilisation de MG-scavengers comme la Carnosine ou la Metformine serait une bonne stratégie de thérapie anti-cancéreuse.

Methylglyoxal, a glycolysis by-product, induces HSP90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis

Nokin MJ, **Durieux F**, Peixoto P, Chiavarina B, Peulen O, Blomme A, Turtoi A, Costanza B, Smargiasso N, Baiwir D, Leenders J, De Tullio P, Bianchi E, Thiry M, Uchida K, Spiegel DA, Cochrane JR, Hutton CA, DE Pauw E, Delvenne P, Castronovo V & Bellahcène A

eLife, 2016;5:e19375

Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis

Marie-Julie Nokin¹, Florence Durieux¹, Paul Peixoto¹, Barbara Chiavarina¹, Olivier Peulen¹, Arnaud Blomme¹, Andrei Turtoi¹, Brunella Costanza¹, Nicolas Smargiasso², Dominique Baiwir³, Jean L Scheijen⁴, Casper G Schalkwijk^{4,5}, Justine Leenders⁶, Pascal De Tullio⁶, Elettra Bianchi⁷, Marc Thiry⁸, Koji Uchida⁹, David A Spiegel¹⁰, James R Cochrane¹¹, Craig A Hutton¹¹, Edwin De Pauw², Philippe Delvenne⁷, Dominique Belpomme¹², Vincent Castronovo¹, Akeila Bellahcène^{1*}

¹Metastasis Research Laboratory, GIGA-CANCER, University of Liège, Liège, Belgium; ²Mass Spectrometry Laboratory, GIGA-Systems Biology and Chemical Biology, University of Liège, Liège, Belgium; ³GIGA Proteomic Facility, University of Liège, Liège, Belgium; ⁴Laboratory for Metabolism and Vascular Medicine, Department of Internal Medicine, Maastricht University, Maastricht, Netherlands; ⁵Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht, The Netherlands; ⁶Laboratory of Medicinal Chemistry - CIRM, University of Liège, Liège, Belgium; ⁷Department of Pathology, CHU, University of Liège, Liège, Belgium; ⁸Laboratory of Cellular and Tissular Biology, GIGA-Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium; ⁹Laboratory of Food and Biodynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences, University of Nagoya, Nagoya, Japan; ¹⁰Department of Chemistry, Yale University, New Haven, United States; ¹¹School of Chemistry and Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, University of Melbourne, Melbourne, Australia; ¹²Association for Research and Treatments Against Cancer, Paris, France

*For correspondence:
a.bellahcene@ulg.ac.be

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 26

Received: 04 July 2016
Accepted: 17 October 2016
Published: 19 October 2016

Reviewing editor: Ralph DeBerardinis, UT Southwestern Medical Center, United States

© Copyright Nokin et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Metabolic reprogramming toward aerobic glycolysis unavoidably induces methylglyoxal (MG) formation in cancer cells. MG mediates the glycation of proteins to form advanced glycation end products (AGEs). We have recently demonstrated that MG-induced AGEs are a common feature of breast cancer. Little is known regarding the impact of MG-mediated carbonyl stress on tumor progression. Breast tumors with MG stress presented with high nuclear YAP, a key transcriptional co-activator regulating tumor growth and invasion. Elevated MG levels resulted in sustained YAP nuclear localization/activity that could be reverted using Carnosine, a scavenger for MG. MG treatment affected Hsp90 chaperone activity and decreased its binding to LATS1, a key kinase of the Hippo pathway. Cancer cells with high MG stress showed enhanced growth and metastatic potential in vivo. These findings reinforce the cumulative evidence pointing to hyperglycemia as a risk factor for cancer incidence and bring renewed interest in MG scavengers for cancer treatment.

DOI: [10.7554/eLife.19375.001](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.001)

Introduction

Unlike normal cells, cancer cells mainly rely on glycolysis to generate energy needed for cellular processes even in normoxia conditions. This process referred to aerobic glycolysis or the 'Warburg

effect' is considered as a hallmark of cancer cells (*Ward and Thompson, 2012*). Although aerobic glycolysis is less efficient than respiration to generate ATP, we know now that it effectively supports the anabolic requirements associated with cancer cell growth and proliferation. One underestimated consequence of increased glucose uptake and glycolytic flux is the accumulation of potent toxic metabolites such as reactive carbonyl species. Among those, methylglyoxal (MG) is a highly reactive α -oxoaldehyde that is primarily formed in cells by the spontaneous degradation of triose phosphate intermediates of glycolysis, dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate (*Richard, 1993*). Alpha-oxoaldehydes are up to 20,000-fold more reactive than glucose in glycation processes (*Turk, 2010*), and it is expected that 1% to 5% of proteins in cells are modified by MG (*Rabbani and Thornalley, 2014*). MG leads to chemical modification of proteins, lipids and nucleotides that result in cellular dysfunction and mutagenicity. MG interaction with amino groups of proteins notably leads to the formation of advanced glycation end products (AGEs) called hydroimidazolones (MG-H) and argpyrimidines (*Thornalley, 1996*). All mammalian cells possess a detoxifying system constituted of glyoxalases 1 and 2 (Glo1 and Glo2, respectively), which catalyze the conversion of MG to D-lactate (*Thornalley, 2005*). The disturbance in the balance between endogenous reactive carbonyl species generation and the ability to counteract their harmful effects is defined as the carbonyl stress.

At the molecular level, carbonyl stress is a common feature of the metabolic dysfunction associated with diabetes and cancer. MG-related AGEs have been found to be increased two- to fivefold and have been mainly identified in the context of diabetes. For example, MG post-translational modification of vascular basement membrane type IV collagen (*Dobler et al., 2006*) and of voltage-gated sodium channel Nav1.8 (*Bierhaus et al., 2012*) have been associated with long-term diabetic complications.

Although the link between oxidative stress, cancer development, progression and response to therapy is clearly established, carbonyl stress and cancer connection remains largely unexplored and has never been envisaged as potentially interconnected. To the best of our knowledge, only one study has reported MG-derived AGEs detection in malignant tumors (*van Heijst et al., 2005*). Using immunohistochemistry, we have recently reported the accumulation of argpyrimidine MG adducts in breast cancer tumors (*Chiavarina et al., 2014*). Remarkably, MG-mediated glycation of specific target proteins happens to be beneficial to cancer progression. For example, the formation of argpyrimidine on heat-shock protein 27 (Hsp27) prevented cancer cell apoptosis in lung (*van Heijst et al., 2006*) and gastrointestinal (*Oya-Ito et al., 2011*) cancers. Moreover, inhibition of MG modification on Hsp27 caused sensitization of cancer cells to antitumoral drugs (*Sakamoto et al., 2002*).

MG has been shown to down regulate Hsp90 and Hsc70 expression levels in human retinal pigment epithelial cells (*Bento et al., 2010*). Hsp90 is a molecular chaperone that gained great interest over the last 20 years as a druggable target for cancer treatment. Hsp90 stabilizes and activates more than 400 proteins, referred to as Hsp90 'clients', many of which are oncoproteins including transcription factors and kinases that are essential for cellular signal transduction pathways and adaptive responses to stress (*Trepel et al., 2010*). One such client protein is the large tumor suppressor 1 (LATS1) (*Huntoon et al., 2010*), a key kinase that relays anti-proliferative signals in the Hippo pathway through Yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) phosphorylation and inactivation (*Pan, 2010*). Consistent with its fundamental role in the control of organ growth and size in vertebrates, the dysfunction of the Hippo signalization triggers tumorigenesis in human (*Harvey et al., 2013*). As a co-activator of TEAD family of transcription factors (*Zhao et al., 2008*), YAP has been notably shown to enhance cancer progression through transcriptional activation of proliferation promoting genes such as c-myc and CTGF (*Moroishi et al., 2015*). Recent studies established a link between glucose deprivation stress, aerobic glycolysis and YAP activation in cancer (*DeRan et al., 2014; Enzo et al., 2015; Mulvihill et al., 2014*). Thus, reinforcing the increasing evidence indicating that metabolic pathways play causative roles in conferring an aggressive phenotype upon cancer cells. Because spontaneous MG accumulation results from the glycolytic flux, we hypothesized that MG stress might couple glycolysis to YAP activity. In this study, we show that MG induces YAP nuclear persistence and activity in breast cancer cells and we validate a molecular mechanism implicating MG-mediated Hsp90 inactivation and subsequent LATS1 kinase decrease. Our study establishes for the first time the functional significance of endogenous MG stress and reveals its unexpected connection with cancer cells propensity to grow and metastasize.

Results

Methylglyoxal adducts and nuclear YAP are positively correlated in human breast cancer

At the molecular level, a predictable consequence of the glycolytic switch in cancer cells is the induction of carbonyl stress (**Figure 1A**). We have previously reported MG-mediated carbonyl stress, assessed by argpyrimidine adducts detection, in a series of breast cancer lesions (**Chiavarina et al., 2014**). Recent reports highlighted the importance of glucose metabolism for the regulation of YAP activity in cancer cells (**DeRan et al., 2014; Enzo et al., 2015; Mulvihill et al., 2014**). To explore

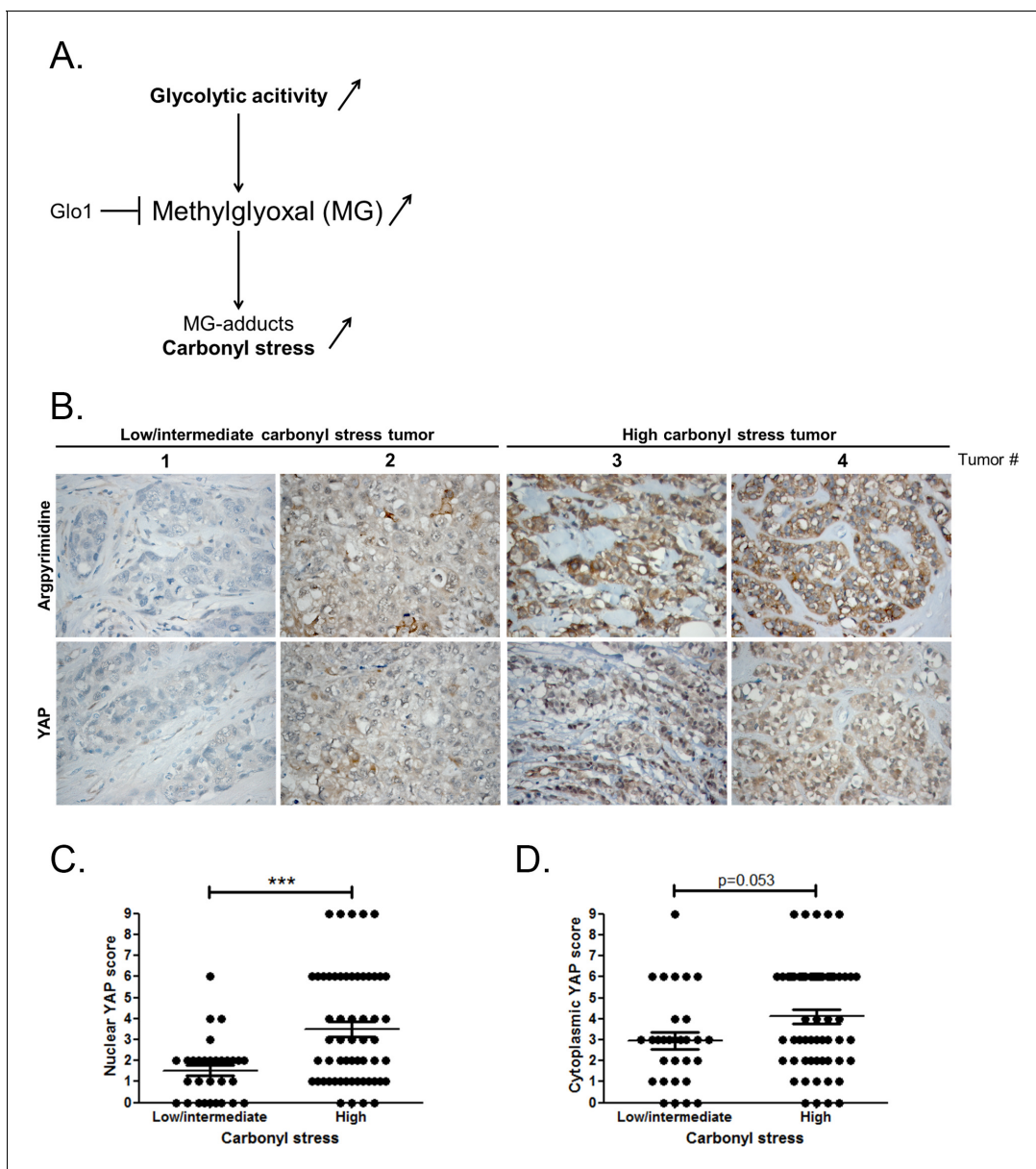


Figure 1. High carbonyl stress and nuclear YAP are positively associated in human breast cancer. (A) In cancer cells, a high glycolytic metabolism and/or a decrease of the MG-detoxifying activity of Glyoxalase 1 (Glo1) lead to high MG level thus establishing a carbonyl stress. (B) YAP IHC staining in representative low/intermediate and high carbonyl stress human breast tumors as assessed by their argpyrimidine level. (C) Quantification of nuclear and (D) cytoplasmic YAP IHC staining in a series of human breast cancer (n = 87). Each dot represents one case and bars represent mean ± SEM. Data were analyzed using Mann Whitney U and Wilcoxon Rank Sum tests and *** represents p<0.001.

DOI: [10.7554/eLife.19375.002](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.002)

possible links between YAP activity and carbonyl stress, we performed immunohistochemistry staining of YAP on a series of 87 breast tumors categorized as high and low-to-intermediate carbonyl stress tumors based on their endogenous argpyrimidine level. Remarkably, breast cancer lesions with high carbonyl stress also showed high YAP expression (**Figure 1B**). YAP was scored for nuclear and cytoplasmic staining. Statistical analysis revealed a significant difference between nuclear YAP staining in low/intermediate and high carbonyl stress tumors (**Figure 1C**). We demonstrated a positive correlation ($R_{\text{spearman}} = 0.3975$, $p=0.0001$) between carbonyl stress intensity and nuclear YAP detection. Cytoplasmic YAP staining showed no significant difference between high and low/intermediate carbonyl stress breast tumors (**Figure 1D**).

Methylglyoxal induces YAP persistence in confluent breast cancer cells

Deficient contact inhibition is a hallmark of invasive cancer cells, yet unexpectedly the density at which cancer cells are cultured impacts on the Hippo pathway in commonly studied cancer cell lines. In order to explore further the potential connection existing between MG-induced carbonyl stress and YAP, we first examined cell-density-dependent YAP subcellular localization in MDA-MB-231, MDA-MB-468 and MCF7 breast cancer cell lines. YAP was mainly localized in the nucleus of low-density cultured cancer cells as detected by immunofluorescence. When breast cancer cells reached confluence, YAP was not detectable in the nucleus and became generally less visible suggesting that it underwent degradation (**Figure 2A** and **Figure 2—figure supplement 1A and D**). Upon MG treatment, MDA-MB-231 cells showed a concentration dependent persistence of YAP in both the cytoplasm and the nucleus despite the cells reached confluence (**Figure 2A**). As a transcriptional co-activator, YAP's function is strictly constrained by its subcellular localization, thus we will essentially focus on YAP nuclear localization thereafter. Quantification supported that nuclear YAP immunodetection was dose dependently higher in MG treated cells when compared to untreated cells in high-density cultures (**Figure 2B**). Nuclear YAP accumulation was also found to be significant in MDA-MB-468 and MCF7 breast cancer cells upon 300 and 500 μM MG treatments (**Figure 2—figure supplement 1A,B,D, and E**). We obtained similar results in all three cell lines using a second antibody specifically directed against YAP (**Figure 2—figure supplement 2A,B and C**). We next showed that TAZ, the YAP paralog in mammalian cells, was modulated in the same way in breast cancer cells under MG treatment (**Figure 2—figure supplement 3**). Analysis of total YAP and TAZ expression using Western blot further demonstrated their increase in MG-treated cancer cells (**Figure 2C** and **Figure 2—figure supplement 1C and F**). A decreased or a stable cytoplasmic P-YAP (S127 and S381) level was observed and was consistent with nuclear YAP accumulation upon MG treatment (**Figure 2C** and **Figure 2—figure supplement 1C and F**). YAP mRNA levels were not significantly changed upon MG treatment in the three breast cancer cell lines (**Figure 2—figure supplement 1G**).

Data gathered so far indicates that MG favors YAP persistence in cancer cells. Next, we asked whether the blockade of MG-mediated carbonyl stress using carnosine, a known MG scavenger (**Hipkiss and Chana, 1998**), could abolish these effects. When MDA-MB-231 cells were concomitantly treated with MG and carnosine, YAP cellular accumulation in high-density cultures was significantly returned to untreated cells basal level (**Figure 2D and E**) indicating that YAP persistence in confluent cells directly or indirectly resulted from MG-mediated carbonyl stress. Carnosine alone did not affect significantly cellular YAP immunodetection. After we have validated exogenous MG effects, we used 2 strategies in order to assess high endogenous MG impact on YAP in breast cancer cells: (a) inhibition of *GLO1*, the main MG-detoxifying enzyme and (b) high-glucose culture condition.

High endogenous methylglyoxal induces nuclear YAP accumulation in breast cancer cells

First, *GLO1* inhibition was achieved by the use of siRNAs on one hand and the use of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC), an effective *Glo1* inhibitor on the other hand (**Tikellis et al., 2014**). MBo, a specific fluorescent sensor for MG in live cells (**Wang et al., 2013**), demonstrated endogenous MG increase upon *Glo1* expression inhibition and BBGC treatment in MDA-MB-231 cells (**Figure 3A**). Consistent with exogenous MG treatment experiments, both *GLO1*-depleted and BBGC-treated MDA-MB-231 cells (**Figure 3A and B**) displayed nuclear YAP

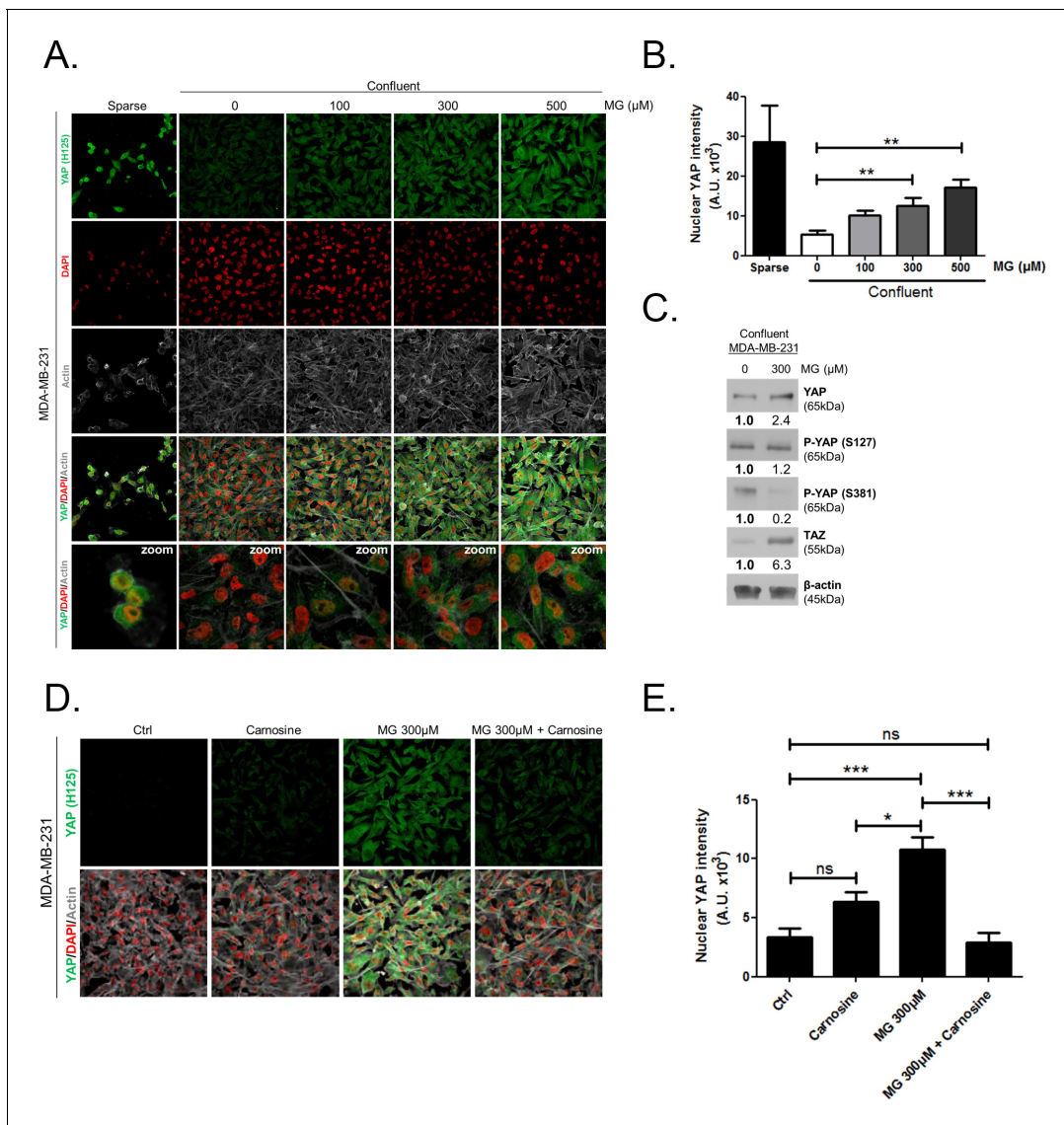


Figure 2. Methylglyoxal induces YAP persistence in confluent breast cancer cells. (A) Immunofluorescence (IF) staining shows that YAP (Santa Cruz antibody, H125) is mainly localized in the nucleus at low cellular density (Sparse) and is weakly detectable at high cellular density (Confluent) in MDA-MB-231 cells. In contrast, cells treated with increasing doses of MG until they reach confluence showed significant YAP cellular accumulation. Zoomed pictures are shown where indicated. Magnification 630x. Data are representative of three independent experiments. (B) Quantification of panel A experiment reports the intensity of YAP staining that colocalized with DAPI staining as described in 'Materials and methods' section. Nuclear YAP IF staining intensity shows a significant dose-dependent increase in presence of MG. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test and shown as the mean values \pm SEM of three independent experiments. (C) YAP, P-YAP (S127 and S381) and TAZ expression in MDA-MB-231 cells treated with MG (300 μM) until they reached confluence using western blot. Immunoblot data were quantified by densitometric analysis and normalized for β -actin. Numbers represent fold increase relative to the condition shown with bold number. (D) MDA-MB-231 cells cultured until they reached high density and treated concomitantly with MG (300 μM) and carnosine (10 mM), a MG scavenger, impeded cellular accumulation of YAP. Magnification 630x. Data are representative of three independent experiments. (E) Quantification of panel D experiment. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test and are shown as the mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and ns = not significant.

DOI: [10.7554/eLife.19375.003](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.003)

The following figure supplements are available for figure 2:

Figure supplement 1. Methylglyoxal induces YAP accumulation in confluent breast cancer cells.

DOI: [10.7554/eLife.19375.004](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.004)

Figure supplement 2. Methylglyoxal induces YAP accumulation in confluent breast cancer cells.

DOI: [10.7554/eLife.19375.005](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.005)

Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

Figure supplement 3. Methylglyoxal induces TAZ accumulation in confluent breast cancer cells.

DOI: 10.7554/eLife.19375.006

persistence in high-density cultures. Similar results were obtained under both conditions in MDA-MB-468 cells (**Figure 3—figure supplement 1A and B**). Efficient *GLO1* silencing in breast cancer cells was assessed by Glo1 immunoblotting (**Figure 3—figure supplement 1C and D**). Altogether, these results showed that MG stress maintained detectable YAP nuclear levels in confluent breast cancer cells.

Second, we cultured MDA-MB-231 (highly glycolytic) and MCF7 (low glycolytic) cells in low- and high-glucose medium. Lactate measurement using $^1\text{H-NMR}$ showed that MDA-MB-231 cells significantly increased their glycolytic activity when cultured in high glucose compared to low glucose (**Figure 3C**). In these cells, high-glucose culture induced elevated endogenous MG level that was assessed using both FACS detection of MBo fluorescent probe (**Figure 3D**) and LC-MS/MS quantification (**Figure 3E**). Similar results were observed in the other highly glycolytic breast cancer cell line, MDA-MB-468 (**Figure 3—figure supplement 1E–G**). As expected, low glycolytic MCF7 cells used for comparison did not react to high-glucose culture condition and kept stable lactate (**Figure 3C**). More importantly, MCF7 cells showed stable MG levels (**Figure 3D and E**) thus pointing for the first time to MG increase as a specific response of glycolytic cancer cells to glucose stimulus. After having validated the response of breast cancer cells to high glucose, we next asked whether YAP and TAZ nuclear persistence occurred under glucose-induced elevated endogenous MG levels. MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells cultured to confluence in high glucose demonstrated positive nuclear YAP and TAZ staining (**Figure 3F and G** and **Figure 3—figure supplement 1H and I**; and **Figure 3—figure supplement 2**) when compared with cells cultured in low glucose. Next, we reasoned that the inhibition of the glycolytic flux using the glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose (2-DG) would reverse this effect. We first validated the decrease of lactate and MG production upon 2-DG treatment using $^1\text{H-NMR}$ and FACS detection of MBo fluorescent probe, respectively (**Figure 3—figure supplement 3A and B**). As expected, YAP accumulation was not detectable in high-glucose MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells treated with 2-DG just like in low-glucose cultured cells (**Figure 3—figure supplement 3C and D**).

As expected from their stable glycolytic rate and unaffected MG level (**Figure 3C,D and E**), we did not observe any significant persistence of YAP and TAZ in MCF7 breast cancer cells (**Figure 3H and I** and **Figure 3—figure supplement 2**). It is noteworthy that MCF7 cells are able to induce YAP accumulation in response to an exogenous MG supply (**Figure 2—figure supplement 1**) suggesting that low glycolytic cells could be stimulated in a high MG environment created by neighboring cells for example and this, independently of their own glycolytic flux.

Finally, the observed effects of endogenous high MG levels on YAP were significantly reversed using 2 MG scavengers, carnosine and aminoguanidine in MDA-MB-231 cells (**Figure 3—figure supplement 4**). Altogether, these data demonstrate that the glycolytic switch in cancer cells is accompanied by high MG levels and YAP nuclear persistence thus establishing a new link between glucose utilization, MG stress and YAP regulation in cancer cells.

MG induces YAP co-transcriptional activity in breast cancer cells

We next explored the functional relevance of MG-mediated nuclear accumulation of YAP in breast cancer cells. For this purpose, we used two shRNAs specifically directed against *GLO1* to stably induce high endogenous MG stress in MDA-MB-231 breast cancer cells. Efficient *GLO1* silencing (shRNAs #1 and #2) at the mRNA and protein levels and decreased Glo1 activity were validated in stably depleted clones (**Figure 4A,B and C**, respectively). As expected, *GLO1*-depleted MDA-MB-231 cells showed YAP and TAZ accumulation in high-cell-density cultures when compared to control cells (**Figure 4D and E** and **Figure 4—figure supplement 1A**). Consistently, this effect was significantly reversed using carnosine and aminoguanidine MG scavengers (**Figure 4—figure supplement 1B**). Stably depleted *GLO1* MDA-MB-231 cells were used to assess YAP target genes expression based on a previously established gene signature denoting YAP/TAZ activity (Zhao et al., 2008; Cordenonsi et al., 2011; Dupont et al., 2011; Zhang et al., 2009). Among the 14 targets tested

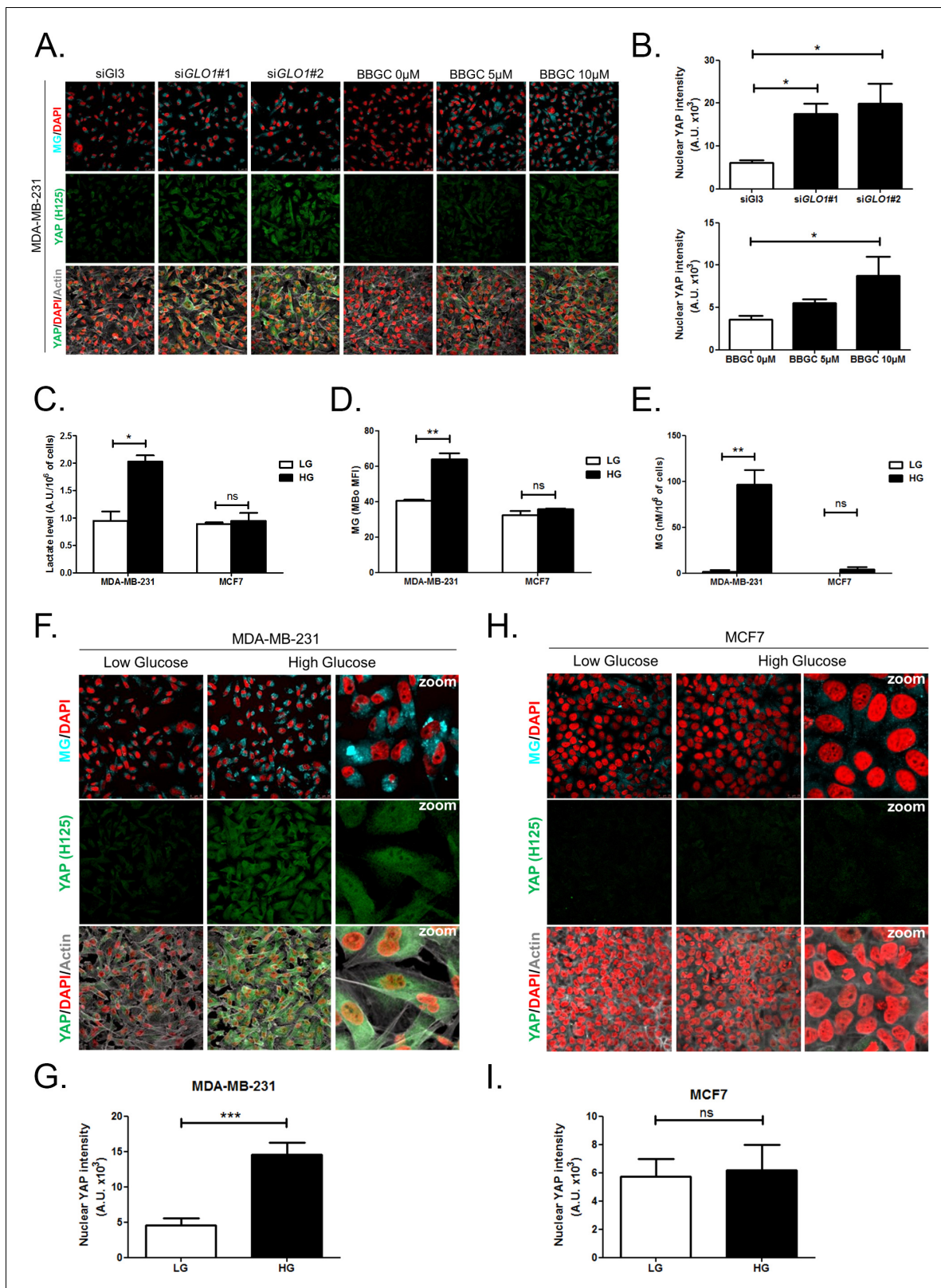


Figure 3. High endogenous MG induces YAP nuclear accumulation in breast cancer cells. (A) Detection of MG was performed using MBo specific fluorescent probe, as described in Materials and Methods section, and showed MG cellular increase in MDA-MB-231 cells that were *GLO1*-depleted using siRNAs (siGLO1#1 and #2) or treated with BBGC *Glo1* activity inhibitor. Upon *GLO1* silencing/inhibition, MDA-MB-231 cells displayed more YAP (Santa Cruz antibody, H125) than control cells (siGI3 and BBGC 0 μ M, respectively). Magnification 630x. Data are representative of three independent experiments. *Figure 3 continued on next page*

Figure 3 continued

experiments. (B) Quantification of panel A experiment reports the intensity of YAP staining that colocalized with DAPI staining as described in Materials and Methods section for *GLO1* silencing and BBGC conditions. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test and shown as the mean values \pm SEM of three independent experiments. (C) Lactate level measured using $^1\text{H-NMR}$ increased in highly glycolytic MDA-MB-231 cells cultured in high glucose (HG) compared to low glucose (LG) while MCF7 low glycolytic cells did not. (D and E) MG quantification using both FACS MBo mean fluorescence intensity (MFI) and LC-MS/MS analysis on conditioned medium in the indicated conditions as described under 'Materials and methods' section. MDA-MB-231 cells significantly increased their MG production in HG when compared to MCF7. (F and H) MG detection and YAP immunofluorescence staining (Santa Cruz antibody, H125) in the indicated breast cancer cell line cultured in low- and high-glucose medium. Magnification 630x. Zoomed pictures are shown for high-glucose condition. Data are representative of three independent experiments. (G and I) Quantification of F and H panels, respectively. Data shown in C, D, E, G, and I. were analyzed using unpaired Student's t test for each cell line independently and shown as the mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and ns = not significant.

DOI: [10.7554/eLife.19375.007](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.007)

The following figure supplements are available for figure 3:

Figure supplement 1. High endogenous MG induces YAP localization in breast cancer cells.

DOI: [10.7554/eLife.19375.008](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.008)

Figure supplement 2. High endogenous MG induces TAZ localization in breast cancer cells.

DOI: [10.7554/eLife.19375.009](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.009)

Figure supplement 3. Inhibition of glycolysis by treatment with 2-Deoxyglucose (2-DG) reverses YAP accumulation in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells cultured in high-glucose medium.

DOI: [10.7554/eLife.19375.010](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.010)

Figure supplement 4. Carnosine and aminoguanidine MG scavengers reverse YAP accumulation in MDA-MB-231 cells cultured in high-glucose medium.

DOI: [10.7554/eLife.19375.011](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.011)

and known to be regulated positively by YAP, we found that 8 genes, including CTGF gene, showed a significant increase at the mRNA level in *GLO1* depleted cells when compared to control (**Figure 5A**). Importantly, knock-down of YAP using siRNA transfection reversed, at least in part, the expression of all the evaluated genes thus establishing the link between YAP target genes expression and *GLO1* status in cancer cells. Efficient YAP silencing in *GLO1*-depleted MDA-MB-231 is shown in **Figure 5—figure supplement 1A**. This result led us to search for a statistical association between YAP and *GLO1* expression levels using a gene expression dataset of 103 primary mammary tumors (*Iwamoto et al., 2011*). However, global YAP expression did not show any significant correlation with *GLO1*. We reasoned that YAP activity, rather than its total expression level, would better reflect YAP nuclear accumulation related to MG stress. Indeed, we found that the expression of YAP target genes and *GLO1* showed a significant inverse correlation in breast cancer patients. Top 12 genes that displayed the highest Rp Pearson correlation coefficient are reported in **Figure 5—figure supplement 1B**. These data indicate that high carbonyl stress driven by low *GLO1* expression in human malignant mammary tumors is significantly associated with an elevated YAP activity.

Data gathered so far indicate that MG favors YAP activity in cancer cells. In order to assess more concretely the impact of MG stress on breast cancer cells through YAP activation, we next focused on CTGF gene expression, a well-described YAP transcriptional target (*Zhao et al., 2008*) that has been linked to YAP pro-growth and tumorigenic functions. We performed chromatin IP assays to assess the presence of YAP at CTGF promoter in both sparse and confluent MDA-MB-231 cells. In low-density cultured cells, YAP was bound to CTGF promoter, whereas in confluent cells, YAP was not detectable which is consistent with YAP absence in the nucleus of high-density cells. In contrast, YAP was found at CTGF promoter in MG-treated confluent cells at a comparable level to that in sparse cells (**Figure 5B**). Immunoblot of YAP IP loading is shown in **Figure 5—figure supplement 2A** CTGF mRNA level was not significantly affected by MG treatment in MDA-MB-231 cells (**Figure 5C**). Smad2/3 collaborate with TEAD and YAP to form an active transcriptional complex at CTGF promoter in breast cancer cells (*Hiemer et al., 2014; Fujii et al., 2012*). MDA-MB-231 cells cultured in presence of MG and treated with TGF- β (2.5 ng/ml) responded by a two-fold increase of CTGF mRNA level compared to TGF- β alone confirming the requirement of TGF- β pathway activation for MG-mediated induction of CTGF expression (**Figure 5C**). Smad2 and Smad3 phosphorylation following TGF- β treatment in MDA-MB-231 cells was not affected by MG treatment (**Figure 5—figure supplement 2B**) indicating that CTGF up-regulation was linked to YAP accumulation in

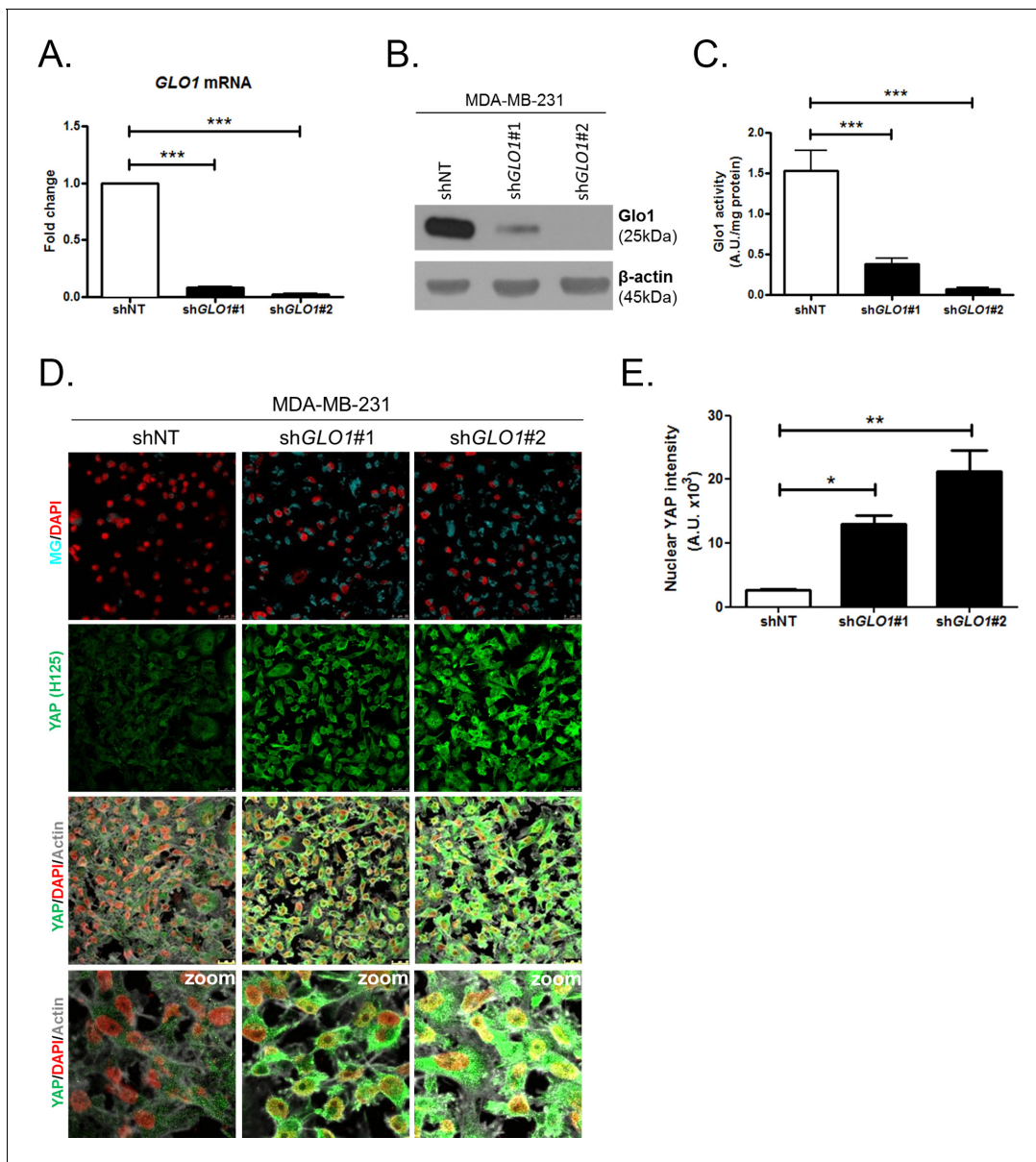


Figure 4. YAP cellular accumulation in shGLO1 MDA-MB-231 clones. (A) *GLO1* mRNA, (B) protein and (C) activity level in MDA-MB-231 shNT control and shGLO1#1 and #2. (D) YAP immunofluorescence (Santa Cruz antibody, H125) in MDA-MB-231 silenced for *GLO1* (shGLO1#1 and #2) cultured from low to high density. Detection of MG was performed using MBo-specific fluorescent probe. Data are representative of three independent experiments. Magnification 630x. Zoomed pictures are shown when indicated. (E) Quantification of nuclear YAP corresponding to D experiment. All data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test and shown as the mean values \pm SEM of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

DOI: [10.7554/eLife.19375.012](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.012)

The following figure supplement is available for figure 4:

Figure supplement 1. Carnosine and aminoguanidine MG scavengers reverse YAP accumulation in *GLO1*-depleted MDA-MB-231.

DOI: [10.7554/eLife.19375.013](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.013)

presence of active TGF- β pathway effectors. In agreement with this deduction, we showed that YAP silencing prevented MG-mediated CTGF mRNA induction in presence of TGF- β in confluent MDA-MB-231 cells (Figure 5D). Efficient YAP silencing was shown at the mRNA (Figure 5—figure supplement 2C) and protein (Figure 5—figure supplement 2D) levels.

Association with TEAD transcription factors is essential in mediating YAP-dependent gene expression (Zhao *et al.*, 2008). As shown in Figure 5E and Figure 5—figure supplement 2E, YAP

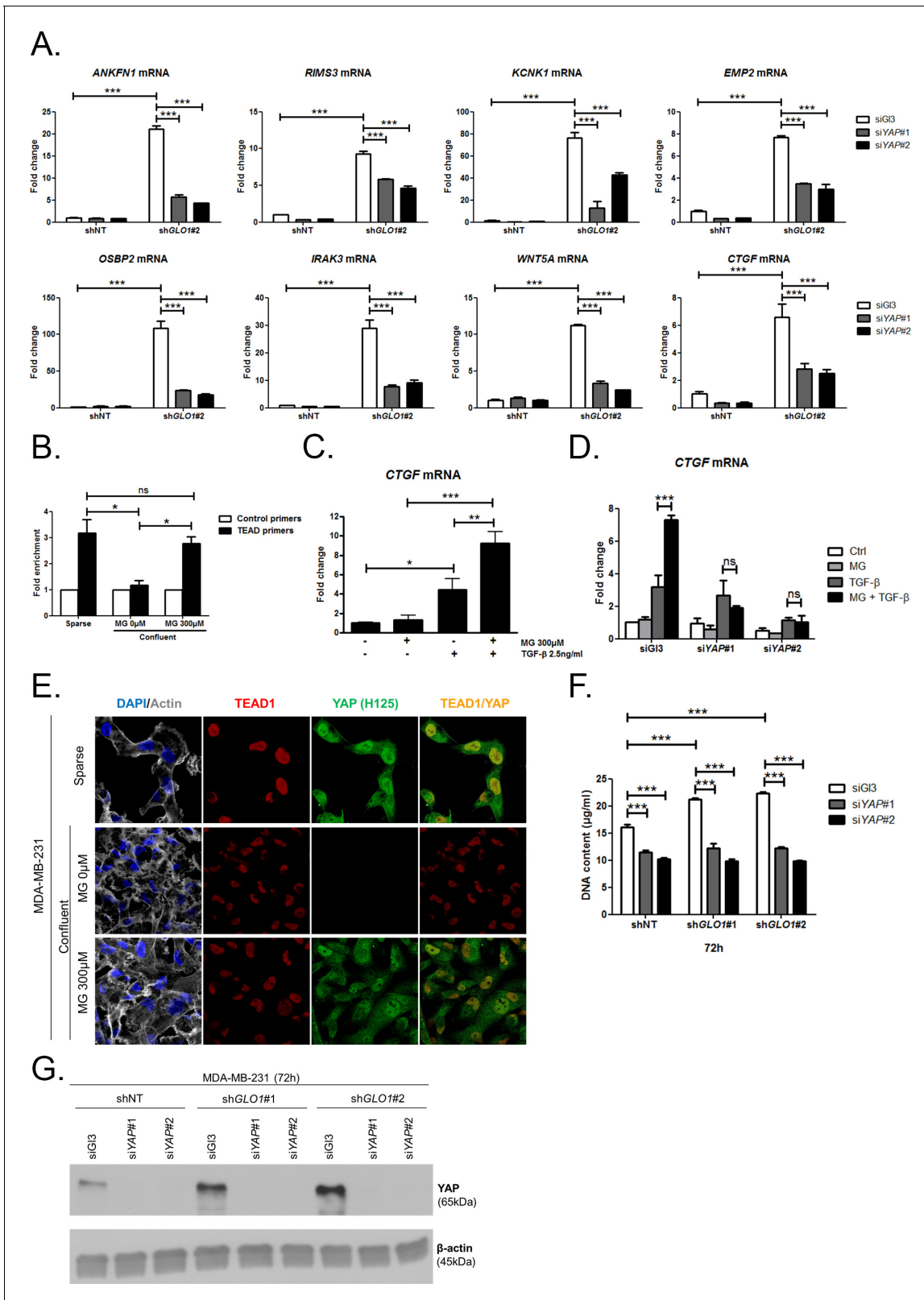


Figure 5. MG induces YAP co-transcriptional activity in breast cancer cells. (A) Stable knockdown of *GLO1* (shGLO1#2) in MDA-MB-231 results in upregulation of several YAP target genes (ANKFN1, RIMS3, KCNK1, EMP2, OSBP2, IRAK3, WTN5A and CTGF) at the mRNA level as assessed by qRT-PCR. Silencing of YAP using two independent siRNAs (siYAP#1 and #2, 48 hr post-transfection) significantly reversed YAP target genes induction in *GLO1* depleted cells. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test and shown as the mean values \pm SD of one *Figure 5 continued on next page*

Figure 5 continued

representative experiment (n = 4). (B) Chromatin immunoprecipitation of YAP at the CTGF promoter in sparse and confluent MDA-MB-231 cells treated or not with MG. TEAD PCR primers, and not control primers, target TEAD binding site on CTGF promoter (see sequences under 'Materials and methods' section). The use of TEAD primers indicated that YAP was present at the CTGF promoter in sparse cells (positive control) and in confluent MG-treated cells when compared to untreated confluent cells. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test and shown as the mean values \pm SEM of three independent experiments. (C) CTGF mRNA level assessed by qRT-PCR in MDA-MB-231 cells treated with MG 300 μ M until confluence and then with TGF β 2.5 ng/ml during 2 hr. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test and shown as the mean values \pm SEM of five independent experiments. (D) MG-mediated CTGF induction in presence of TGF β is not observed upon YAP silencing (siYAP#1 and #2) when compared to control (siG13) cells. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test and shown as the mean values \pm SEM of three independent experiments. (E) YAP (Santa Cruz antibody, H125) and TEAD1 IF co-localization in MDA-MB-231 cells cultured under low (Sparse) density used as positive control and in high-density cultured cells (Confluent) in presence of MG. Magnification 630x. Data are representative of three independent experiments. (F) DNA quantification assay showing an increased proliferation of *GLO1*-silenced MDA-MB-231 (sh*GLO1*#1 and #2) compared to control (shNT) at 72 hr. Silencing of YAP (siYAP#1 and #2) reversed this effect. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test and shown as the mean values \pm SEM of four independent experiments. (G) Validation of YAP silencing by Western blot in MDA-MB-231 sh*GLO1* cells after 72 hr related to panel F and **Figure 5—figure supplement 2F**. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and ns = not significant.

DOI: [10.7554/eLife.19375.014](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.014)

The following figure supplements are available for figure 5:

Figure supplement 1. Inverse correlation between *GLO1* and YAP target genes expression.

DOI: [10.7554/eLife.19375.015](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.015)

Figure supplement 2. MG induces YAP co-transcriptional activity in breast cancer cells.

DOI: [10.7554/eLife.19375.016](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.016)

Figure supplement 3. MG increases YAP-mediated migratory potential in breast cancer cells.

DOI: [10.7554/eLife.19375.017](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.017)

and TEAD1 co-localized in MG-treated confluent MDA-MB-231 cells, and in sparse cultured cells used as positive control, whereas this co-localization was not detected in untreated confluent cells. YAP activation stimulates cancer cell growth. We next challenged cell proliferation induced by MG stress in *GLO1* depleted MDA-MB-231 cells. The time course of *GLO1*-depleted cells proliferation showed a marked difference compared to control cells (**Figure 5—figure supplement 2F**). At 72 hr, this increase in cell proliferation was significantly abrogated upon YAP silencing indicating that it is required to sustain MG-induced pro-growth effect (**Figure 5F**). Western blotting demonstrated both YAP increase upon *GLO1* silencing and efficient YAP silencing (**Figure 5G**).

YAP/TAZ have been previously reported to promote EMT in human breast epithelial cells (*Lei et al., 2008; Overholtzer et al., 2006*). To test whether MG-induced YAP activation launched EMT in breast cancer cells, immunoblotting was performed to examine the expression of well-characterized EMT markers. We observed an increase of vimentin and a decrease of E-cadherin expression, attesting of an EMT process in MDA-MB-468 cells treated with MG (**Figure 5—figure supplement 3A**). Next, we observed by immunofluorescence that E-cadherin network was disrupted in MG-treated cells (**Figure 5—figure supplement 3B**). Consistent with EMT induction, MG-treated MDA-MB-468 cells showed an enhanced migration potential that was efficiently reversed to basal level upon YAP silencing (**Figure 5—figure supplement 3C and D**).

MG favors LATS1 kinase degradation through the proteasome in breast cancer cells

To gain insight into possible mechanisms by which MG regulates YAP activity, we first considered that YAP could be a direct target of MG glycation. However, MG-adducts immunoprecipitation in MDA-MB-231 treated with MG did not allow western blot detection of YAP (data not shown). LATS1/2 are the main upstream Hippo pathway kinases that phosphorylate YAP, thus preventing its nuclear translocation and oncogenic activity (**Figure 6A**). We hypothesized that MG-mediated sustained YAP nuclear localization could be related to a relaxed LATS1/2 control notably due to its decreased expression. We demonstrated by Western blotting that LATS1, and not LATS2, was significantly decreased upon MG treatment (300 and 500 μ M) in both glycolytic MDA-MB-231 and MDA-MB-468 and non-glycolytic MCF7 breast cancer cells (**Figure 6B**). LATS1 mRNA levels were not affected by MG in the three breast cancer cell lines (**Figure 6—figure supplement 1A**). A previous study has shown that LATS1 kinase degradation occurs through polyubiquitination and the

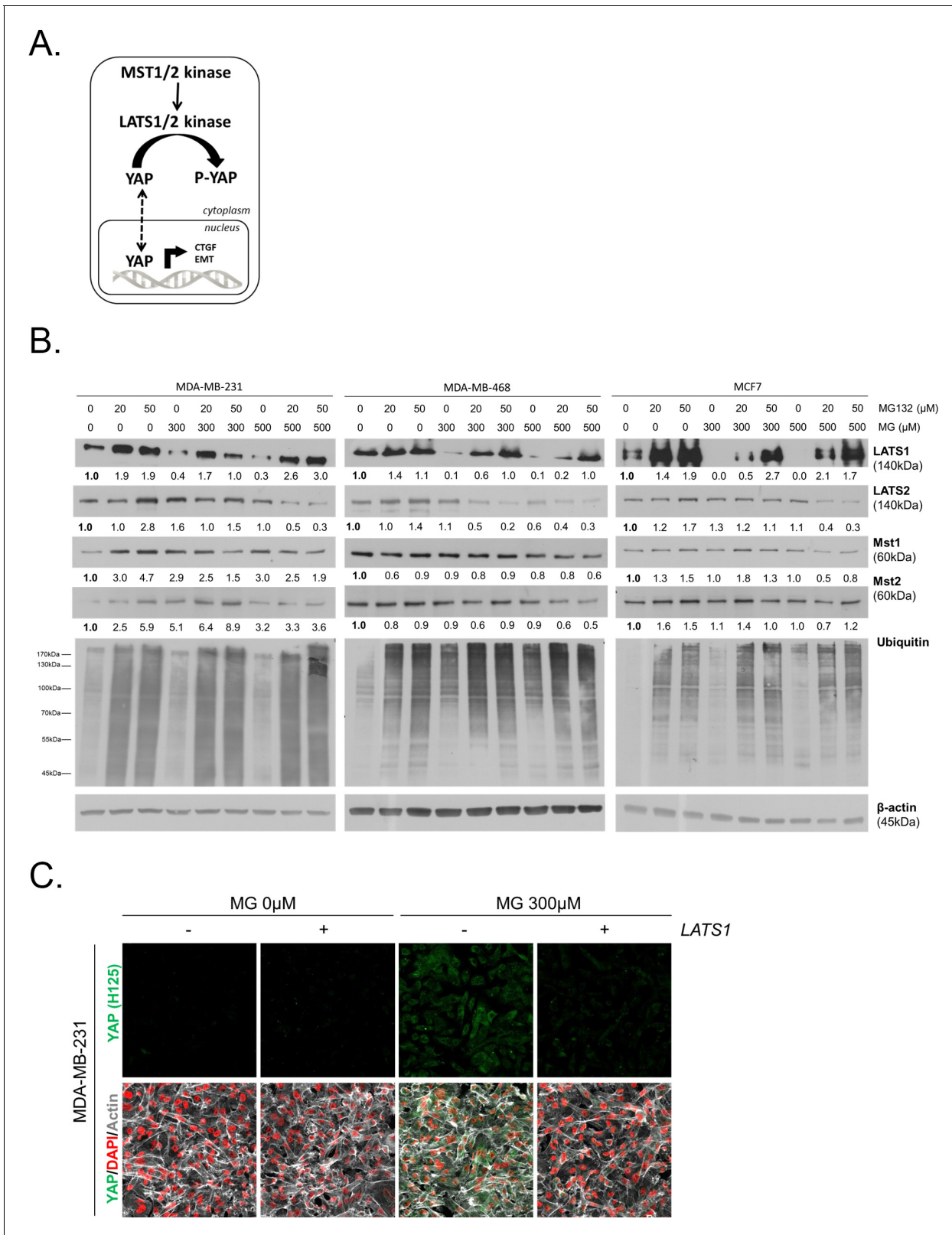


Figure 6. MG induces LATS1 kinase decrease in breast cancer cells. (A) Schematic representation of the Hippo pathway focused on MST1/2 and LATS1/2 kinases control of nuclear-cytoplasmic shuttling of YAP co-transcription factor. (B) LATS1, LATS2, MST1 and MST2 expression in MDA-MB-231, MDA-MB468 and MCF7 cells treated with MG (300 and 500 μ M) in presence of increasing concentrations of MG132 proteasome inhibitor during 6 hr using Western blot. Ubiquitin immunoblot were performed to validate proteasome inhibition by MG132. Immunoblot data were quantified by *Figure 6 continued on next page*

Figure 6 continued

densitometric analysis and normalized for β -actin. Numbers represent fold increase relative to the condition shown with bold number. (C) YAP immunofluorescence (Santa Cruz antibody, H125) in MDA-MB-231 cells transiently transfected with LATS1 expression vector (+) or empty vector used as control (-) and then treated with MG (300 μ M) until confluence. All data are representative of three independent experiments.

DOI: [10.7554/eLife.19375.018](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.018)

The following figure supplement is available for figure 6:

Figure supplement 1. MG leads to YAP cellular accumulation through LATS1 expression decrease.

DOI: [10.7554/eLife.19375.019](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.019)

proteasome pathway in breast cancer cells (He et al., 2016). In good accordance, the treatment of breast cancer cells with MG132 proteasome inhibitor induced LATS1 increase (Figure 6B). Next, we verified whether MG favored LATS1 decrease through proteasome degradation. As shown in Figure 6B, the use of MG132 proteasome inhibitor reverted MG-induced LATS1 decrease. Next, we explored whether LATS1 decrease could explain, at least in part, the sustained YAP nuclear localization induced by MG. Accordingly, when we overexpressed LATS1, we were able to revert MG effects on YAP accumulation as assessed by immunofluorescence using two anti-YAP antibodies in MDA-MB-231 cells (Figure 6C and Figure 6—figure supplement 1B), and in the other breast cancer cell lines analyzed (Figure 6—figure supplement 1C and D). LATS1 overexpression is shown using anti-Flag and anti-LATS1 antibodies (Figure 6—figure supplement 1E). Data gathered so far indicate that MG decreases LATS1 expression in breast cancer cells, through the proteasome, which leads to sustained activity of YAP in the nucleus.

MG induces post-translational glycation of Hsp90 and affects its chaperone activity on LATS1

To explore further MG mechanism of action on LATS1, we first excluded the possibility of (a) an interference of MG with the expression of Mst1/2 kinases directly upstream of LATS1 along the Hippo pathway (Figure 6B) and (b) a direct glycation of LATS1 by MG using immunoprecipitation technique (data not shown). Then, we got interested in LATS1 as a client of Hsp90 chaperone protein (Huntoon et al., 2010). Indeed, LATS1 kinase expression level and activity are dependent on its stabilization by Hsp90. 17-AAG, a potent Hsp90 inhibitor, disrupts LATS1 tumor suppressor activity in human cancer cells (Huntoon et al., 2010). HSP90 mRNA level was not modulated by MG treatment in breast cancer cells (Figure 7—figure supplement 1A). Therefore, we sought to explore whether MG could modify Hsp90, thus indirectly impacting on LATS1 stability and degradation. The incubation of human recombinant Hsp90 with MG followed by MS analysis revealed the modification of several lysine and arginine residues notably yielding to the formation of carboxyethyllysine (CEL) and argpyrimidine/hydroimidazolone adducts, respectively (Figure 7—source data 1). Next, we examined whether endogenous MG-modified Hsp90 could be detected in MG-treated MDA-MB-231 cells. Immunoprecipitation of MG-treated MDA-MB-231 extracts using anti-argpyrimidine MG adducts and followed by Hsp90 immunoblot analysis allowed us to detect a basal level of glycated Hsp90 in MDA-MB-231 glycolytic cells that was further enhanced upon MG treatment (Figure 7A). Hsp27, which is recognized as a major MG target in cancer cells, was also efficiently detected in argpyrimidine immunoprecipitates (Figure 7A). Consistently, the reverse IP experiment using an anti-Hsp90 antibody allowed the detection of both argpyrimidine and hydroimidazolone MG-adducts of the expected molecular weight in MG treated cells (Figure 7B). Argpyrimidine immunoprecipitates subjected to MS analysis revealed the presence of modified Hsp90 on several residues (Figure 7—source data 2). Glycation hot spots observed on exogenous and/or endogenous Hsp90 are summarized in Figure 7C and detailed amino acid sequence is provided in Figure 7—figure supplement 1B. The mapping of MG modifications on Hsp90 amino-acid sequence indicated that functionally important domains involved in both substrate/co-chaperone and ATP binding showed several glycated residues (Figure 7C) suggesting that Hsp90 activity could be affected. Recombinant human Hsp90 (rhHsp90) was effectively modified by MG and was protected by carnosine MG-scavenger as assessed using both anti-argpyrimidine and anti-hydroimidazolone antibodies in Western blot experiments (Figure 7D). Using an in vitro enzymatic assay, MG decreased rhHsp90 activity to an extent that was comparable to that seen using 17-AAG (Figure 7E). Incubation of rhHsp90 with MG in presence of carnosine efficiently reversed this effect indicating for the first time that direct MG

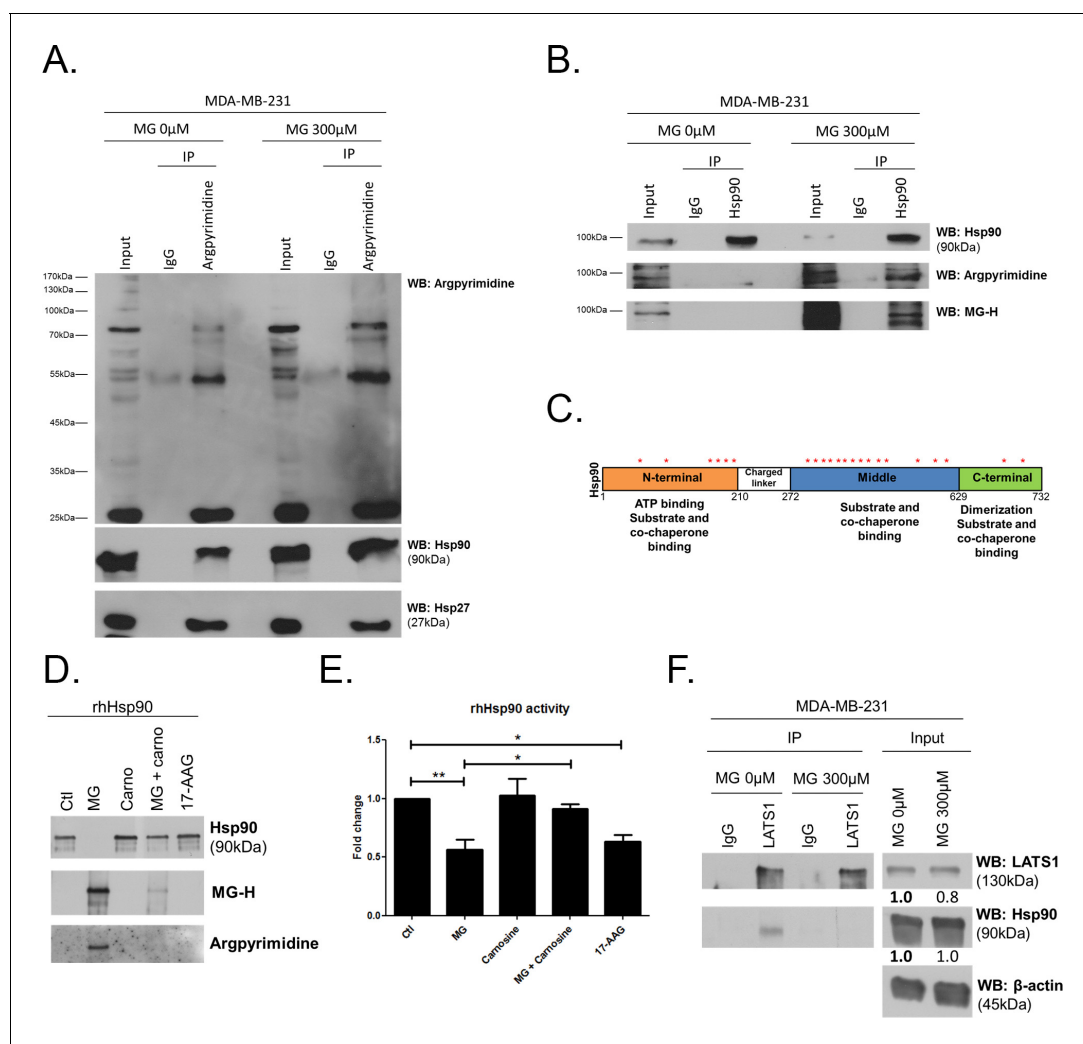


Figure 7. MG induces Hsp90 post-translational glycation in breast cancer cells. (A) Immunoprecipitation of MG adducts on MG-treated MDA-MB-231 cells (300 μM, 6 hr) using a specific anti-argpyrimidine monoclonal antibody. Mouse immunoglobulins (IgG) were used as control. Total cell lysates (Input) and immunoprecipitates (IP) were immunoblotted for argpyrimidine, Hsp90 and Hsp27. (B) Under the same conditions as in A, MDA-MB-231 cell lysates were immunoprecipitated using anti-Hsp90. Inputs and IPs were immunoblotted using Hsp90 antibody and two specific antibodies directed against MG-adducts (argpyrimidine and hydroimidazolone MG-H). (C) Schematic representation of Hsp90 protein domains where hot spots (*) of endogenously and/or exogenously MG-modified residues are indicated. See also detailed amino acid sequence in **Figure 7—figure supplement 1B**. (D) Western blot analysis using the indicated antibodies on recombinant human Hsp90 (rhHsp90) incubated in presence of MG ± carnosine (10 mM) or 17-AAG Hsp90 inhibitor (1 μM) during 24 hr. (E) Hsp90 ATPase activity was decreased after incubation with MG or 17-AAG. This effect is efficiently blocked in presence of carnosine MG scavenger. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test and shown as the mean values ± SEM of five independent experiments. *p < 0.05 and **p < 0.01. (F) Co-immunoprecipitation of LATS1 and Hsp90 from MDA-MB-231 cells treated with MG 300 μM during 24 hr reveals a decreased interaction between the two proteins. Immunoblot data were quantified by densitometric analysis and normalized for β-actin. Numbers represent fold increase relative to the condition shown with bold number. All data are representative of three independent experiments.

DOI: [10.7554/eLife.19375.020](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.020)

The following source data and figure supplement are available for figure 7:

Source data 1. MG modifications on human recombinant Hsp90.

DOI: [10.7554/eLife.19375.021](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.021)

Source data 2. MG modifications on endogenous Hsp90.

DOI: [10.7554/eLife.19375.022](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.022)

Figure supplement 1. MG induces Hsp90 post-translational glycation.

DOI: [10.7554/eLife.19375.023](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.023)

glycation of Hsp90 affects its ATPase activity (**Figure 7E**). Furthermore, both MG and 17-AAG decreased LATS1 expression in the three breast cancer cell lines under study (**Figure 7—figure supplement 1C**). Next, we further documented LATS1 binding to Hsp90 in the context of MG treatment. LATS1 immunoprecipitates contained detectable Hsp90 however this interaction was disrupted in presence of MG in MDA-MB-231 cells (**Figure 7F**). Collectively, our findings show that MG relieves LATS1 control on YAP nuclear localization through a mechanism identifying for the first time MG-mediated post-translational glycation and inactivation of Hsp90 in cancer cells.

GLO1-depleted breast cancer cells show an increased tumorigenic and metastatic potential in a mouse xenograft model

Data gathered so far indicate that MG stress favors sustained YAP pro-proliferative and pro-migratory activity in breast cancer cells. Next, we explored the biological relevance of this observation for tumor growth and metastases development. Stably *GLO1*-depleted MDA-MB-231 cells that were grafted subcutaneously in mice showed an increased tumor weight and volume that reached significance for sh*GLO1*#2-silenced clones (**Figure 8A**). Further exploration of sh*GLO1* experimental tumors using immunoblotting revealed the effective in vivo induction of argpyrimidine adducts and a strong inverse relationship between *GLO1* silencing and total YAP expression (**Figure 8B and C**). In *GLO1*-silenced experimental tumors, we further demonstrated a specific increase of YAP in the nucleus of tumor cells using immunohistochemistry (**Figure 8D and E**). Elevated proportion of Ki67 positive cells in sh*GLO1* tumors sustained the observed increased tumor growth, as shown and scored in **Figure 8D and E**, respectively. In order to explore further the association between high MG, YAP activity and tumor growth, we used the in vivo chicken chorioallantoic membrane assay (CAM). Grafted *GLO1*-depleted cells on the CAM showed increased growth as assessed by the measure of tumor volume and compared to control cells (**Figure 8F and G**). Remarkably, YAP knock-down with two independent siRNAs further demonstrated the causative role of YAP in MG-induced tumor growth. Indeed, YAP silencing in sh*GLO1* cells efficiently reverted tumor growth to control levels (**Figure 8F and G**). As shown on mice experimental tumors, we observed significant YAP nuclear localization in CAM sh*GLO1* tumors (**Figure 8H and I**). YAP silencing was maintained for the entire duration of the CAM assay experiment (**Figure 8—figure supplement 1**).

Following the assessment of *GLO1*-silencing impact on tumor growth, we next evaluated the metastatic behavior of *GLO1*-depleted breast cancer cells. After surgical removal of the primary tumors, the mice were followed for metastases development during an additional period of 6 weeks. The follow-up of the mice showed that lung metastases were detectable already after 3 weeks in *GLO1*-depleted conditions but not in control condition. After 6 weeks post-tumor removal, metastasized tumors were observed in the lungs of *GLO1*-depleted mice (68%) when compared to control (20%). To evaluate further lung colonization, we performed human vimentin immunohistochemical detection that revealed a significant increase of both number and size of metastatic foci in *GLO1*-depleted condition (**Figure 9A**), as quantified in **Figure 9B**. Using serial sections, we assessed efficient *GLO1* depletion on the same metastatic foci (**Figure 9A**). These data demonstrate that breast cancer cells undergoing a carbonyl stress show enhanced growth and metastatic capacity thus highlighting an unexpected pro-tumoral role for MG endogenous accumulation. Finally, to better assess the importance of MG stress on metastatic dissemination, sh*GLO1* mice received carnosine (10 mM) in drinking water from the day of primary tumor removal until the end of the experiment (during 6 weeks). We observed a significant decrease of lung colonization in sh*GLO1* mice treated with carnosine when compared with control mice (**Figure 9C and D**). Collectively, our data indicate that the pro-cancer effects of carbonyl stress unveiled here are tightly associated with YAP enhanced activity and can be efficiently blocked using a MG scavenger.

Discussion

Cancer cell metabolism is characterized by an enhanced uptake and utilization of glucose through aerobic glycolysis. This overactive metabolism switch leads unavoidably to the formation of potent glyating agents such as MG. However, the concept of a causal relationship between non-enzymatic glycation and cancer progression is still in its early days. Here, we demonstrate that MG-mediated carbonyl stress interferes with LATS1 kinase, without affecting LATS2 and Mst1/2 kinases, to induce sustained YAP and TAZ nuclear localization. The hypermethylation of the promoter region of LATS1

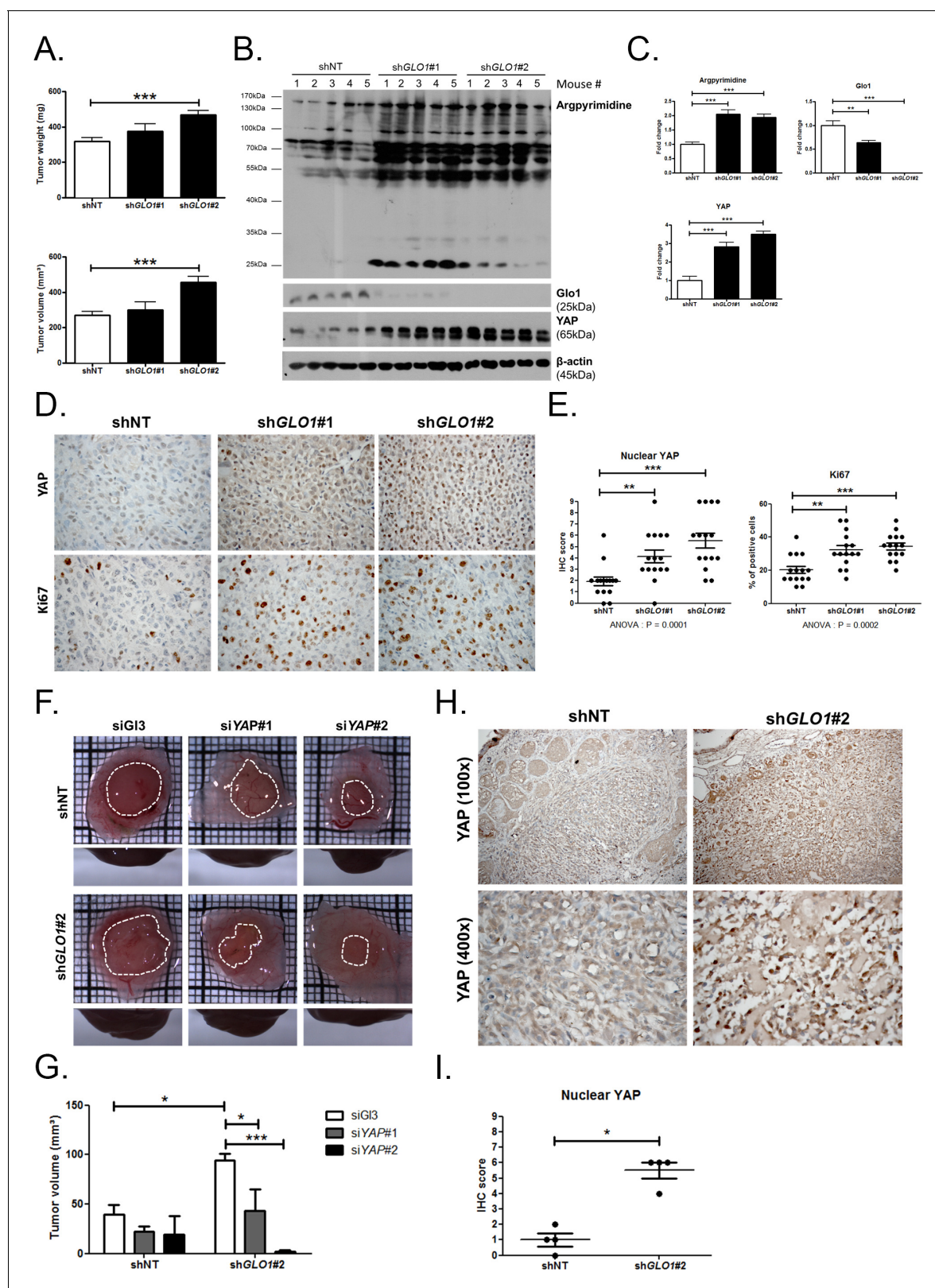


Figure 8. GLO1-depleted breast cancer cells show an increased tumorigenic potential in vivo. (A) MDA-MB-231 shGLO1#1 and #2 and control shNT cells were injected subcutaneously in NOD-SCID mice (15 mice/group). After 4 weeks, primary tumors were surgically removed and weighed. Tumor weight (mg) and volume (mm³) were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test and shown as the mean values ± SEM. (B) Western blot detection of argpyrimidine, Glo1 and YAP in five representative experimental primary tumors. β-actin is used for normalization. (C) Quantification Figure 8 continued on next page

Figure 8 continued

of the western blot shown in panel B. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test and shown as the mean values \pm SEM. (D) Representative YAP and Ki67 IHC staining in experimental primary tumors. (E) Quantification of IHC shown in panel D. Each dot represents one case and bars represent mean \pm SEM. Data were analyzed using one-way ANOVA Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test (YAP) and one-way ANOVA followed by Dunnett post-test (Ki67). (F) *GLO1*-depleted MDA-MB-231 (shGLO1#2) and control shNT cells were transfected with YAP siRNAs (siYAP#1 and 2) and grown on the chicken chorioallantoic membrane (CAM). After 7 days, tumors were collected and measured. Top and profile views of representative experimental CAM tumors are shown. (G) Tumor volumes (4 tumors/condition) were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test and shown as the mean values \pm SEM. (H) Representative YAP immunostaining on *GLO1*-depleted CAM experimental tumors. (I) Quantification of nuclear YAP IHC shown in panel F. Each dot represents one case and bars represent mean \pm SEM. Data were analyzed using Mann Whitney t test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

DOI: 10.7554/eLife.19375.024

The following figure supplement is available for figure 8:

Figure supplement 1. *GLO1*-depleted breast cancer cells show an increased tumorigenic potential in vivo.

DOI: 10.7554/eLife.19375.025

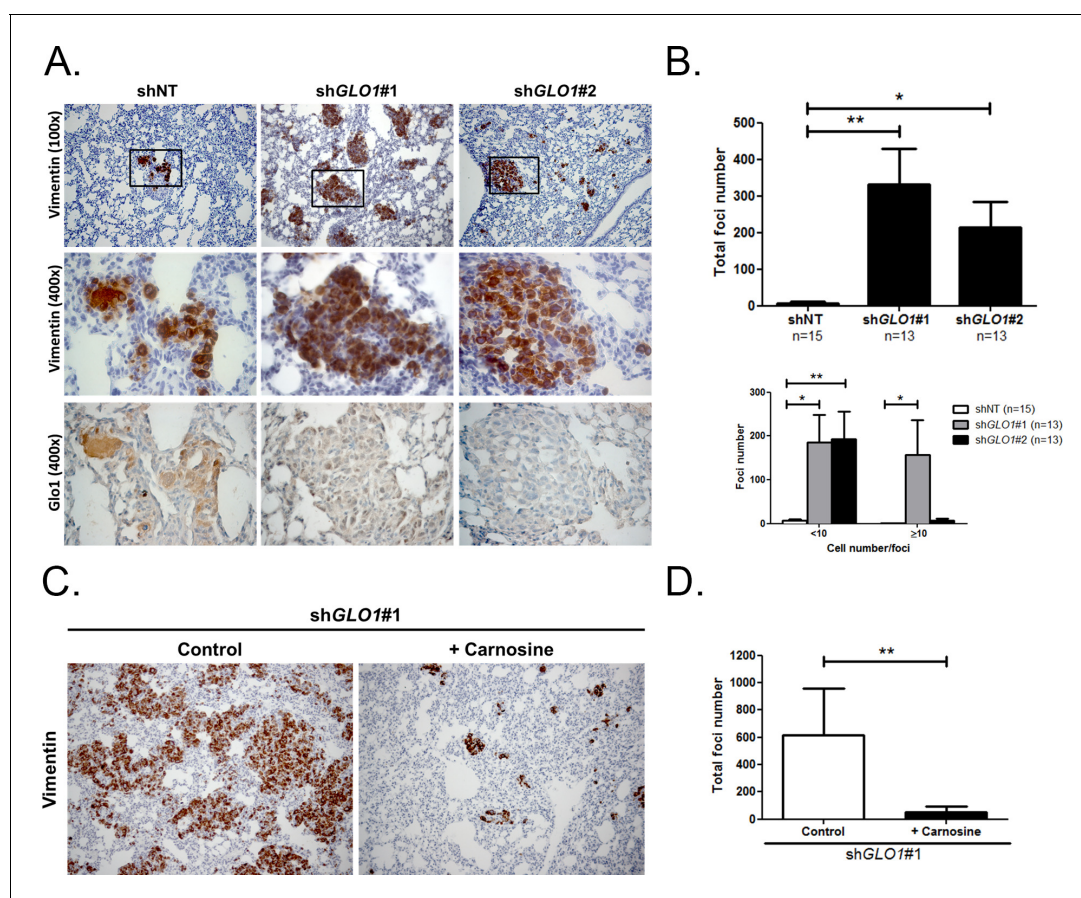


Figure 9. *GLO1*-depleted breast cancer cells show an increased metastatic potential in a mouse xenograft model. (A) MDA-MB-231 shGLO1#1 and #2 and control shNT cells were injected subcutaneously in NOD-SCID mice. After 4 weeks, primary tumors were surgically removed. Six weeks after tumor removal, mice were sacrificed and lungs were collected. We had to ethically sacrifice two mice in both shGLO1#1 and #2 groups before the end of the experiment. Representative human vimentin IHC highlights lung metastatic tumor lesions. Adjacent serial sections were used to perform Glo1 IHC staining. (B) Quantification of number and size of vimentin positive foci on whole lung sections. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Newman Keuls or Bonferroni post-test and shown as the mean values \pm SEM. The number of mice per group is indicated on the graph. (C) MDA-MB-231 shGLO1#1 cells were injected subcutaneously in NOD-SCID mice (5 mice/group). After 4 weeks, primary tumors were surgically removed and mice were treated with carnosine (10 mM) in drinking water. Six weeks after tumor removal, mice were sacrificed and lungs were collected. Human vimentin IHC staining of whole lung sections highlights metastatic tumor lesions. Magnification 100x. (D) Quantification of vimentin-positive foci on whole lung sections. Data were analyzed using unpaired student's t test and shown as the mean values \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

DOI: 10.7554/eLife.19375.026

gene (50% of breast tumors) is associated with an aggressive breast cancer phenotype and poor survival (*Takahashi et al., 2005*). We show in this study that LATS1 proteasomal degradation is favored in presence of MG thus bringing to light a new concept according to which MG stress could directly and/or indirectly participate to the control of tumor suppressor genes in cancer cells without affecting their transcriptional rate.

YAP is regulated by diverse mechanisms including microenvironmental factors (cell crowding and ECM stiffness) and extracellular signaling (G-coupled receptors) (for review [*Moroishi et al., 2015*]). Our study meets a new trend of thoughts proposing that energy metabolism is an additional upstream signal that regulates YAP oncogenic activity. Three independent studies recently established a link between the Hippo-YAP pathway and cellular energy stress using a glucose deprivation strategy (*DeRan et al., 2014; Mo et al., 2015; Wang et al., 2015*). These studies are in agreement that under low-glucose condition an AMPK-LATS1 axis inhibits YAP activity. Enzo and collaborators (*Enzo et al., 2015*) have recently demonstrated that aerobic glycolysis impacts on YAP/TAZ transcriptional activity through a mechanism involving phosphofructokinase 1 binding to TEAD transcription factors. A recent metabolic profiling study using breast cancer progression cellular models reported the induction of several glycolytic enzymes upon constitutive activation of YAP/TAZ factors (*Mulvihill et al., 2014*). Therefore, it is tempting to speculate that MG could regulate key glycolytic enzymes expression in a YAP-dependent manner thus creating a mutual regulatory loop where glycolysis-induced MG stress favors YAP activity, which in turn activates glycolysis. Considering that glucose metabolism inevitably leads to MG formation, one might speculate that any signaling pathway favoring the Warburg effect, e.g the Wnt signaling (*Pate et al., 2014*), will ultimately feed MG carbonyl stress in cancer cells.

We show for the first time that Hsp90 is post-translationally glycosylated by MG. Although several post-translational modifications have been previously reported to affect Hsp90 stability and chaperone function, our study importantly uncovers that a natural metabolite derived from glycolysis is involved in regulating Hsp90 in cancer cells. Quantitative glycation studies will help to determine the proportion of Hsp90 molecules that are glycosylated by MG, the degree of glycation of specific residues per molecule and to what extent Hsp90 activity is likely to be inhibited in cancer cells. Decreasing Hsp90 client binding has been considered as an attractive anti-cancer therapy because of its role in stabilizing the active form of a wide range of client oncoproteins and several synthetic Hsp90 inhibitors are now in clinical trials (*Neckers and Workman, 2012*). Nevertheless, cumulative evidence tends to prove that Hsp90-directed therapy also induces pro-cancer effects. For example, Hsp90 inhibition promotes prostate cancer growth through Src kinase activation (*Yano et al., 2008*) and favors breast cancer bone metastases formation (*Price et al., 2005*). It is generally estimated that over sixty percent of all cancers are glycolytic. This study showing that a glycolysis metabolite interferes with Hsp90 activity even more crucially raises significant concerns about the use of Hsp90 inhibitors as cancer treatment. The above-mentioned tumor-promoting effects related to Hsp90 inhibition could be potentially recapitulated under MG-mediated carbonyl stress condition in cancer cells. Consistent with this hypothesis and our data, LATS1 signalization in the Hippo pathway is rendered ineffective in ovarian cancer xenograft tumors from mice treated with an Hsp90 inhibitor (*Huntoon et al., 2010*).

MG is a potent cytotoxic compound and was first viewed as a potential therapeutic agent in cancer (*Kang et al., 1996*). However, the recent identification of MG-modified proteins with pro-tumorigenic potential indicated that MG could also support tumor progression. Three independent groups have shown that Hsp27 heat-shock protein is switched from a pro-apoptotic to an anti-apoptotic factor upon MG glycation and facilitates cancer cell evasion from caspase-dependent cell apoptosis (*van Heijst et al., 2006; Oya-Ito et al., 2011; Sakamoto et al., 2002*). These data and ours point to an important regulatory role of MG stress on Hsps which have been particularly shown to be overexpressed in a wide range of tumors and are associated with a poor prognosis and resistance to therapy (*Calderwood et al., 2006*).

GLO1 appears to be a dual mediator for growth regulation in cancer as it has been described both as an oncogene and a tumor suppressor. On one hand, the search for copy number changes on a large set of cancer cell lines revealed that *GLO1* is amplified in many types of human cancer with breast tumors (22%) and sarcomas (17%) showing the highest rates (*Santarius et al., 2010*). Most of the recent studies aimed at the inhibition of *GLO1* to induce a toxic MG accumulation effectively showed a decreased tumor growth. These studies generally depicted *GLO1* as an amplified

and/or overexpressed oncogene and as a bad prognosis marker in different types of malignant tumors (Zhang *et al.*, 2014; Cheng, 2012; Hosoda *et al.*, 2015; Antognelli *et al.*, 2013; Fonseca-Sánchez *et al.*, 2012). On the other hand, a study aimed at functionally identifying tumor suppressor genes in liver cancer identified and validated *GLO1* as a tumor suppressor gene which knockdown using shRNAs increased tumor growth in a mouse model (Zender *et al.*, 2008). Using stably depleted *GLO1* xenografts in vivo, we have also demonstrated the pro-tumorigenic and pro-metastatic role of endogenous MG accumulation in breast cancer cells. These results are consistent with (a) enhanced nuclear YAP and increased Ki67-positive proliferating cells in vivo, (b) increased YAP oncogenic activity including the induction of growth factors expression such as CTGF and the initiation of EMT process observed in vitro and (c) the positive correlation between high MG-adducts detection and nuclear YAP in human primary mammary tumors, thus supporting the clinical relevance of our findings.

Therefore, it can be expected that different cancer types, with different backgrounds and for instance different MG detoxification rates would react differently to MG stress. Remarkably, cell lines with *GLO1* amplification (Santarius *et al.*, 2010) or high *Glo1* expression (Sakamoto *et al.*, 2001) are reported to be much more sensitive to *Glo1* inhibitors such as BBGC than those without. Thus, suggesting that a high *Glo1* activity, putatively associated with high MG production, is necessary for their survival. In our hands, *GLO1* knockdown or inhibition using BBGC did not induce any significant cell apoptosis and hence conferred pro-growth and pro-metastatic advantages to breast cancer cells. These apparently controversial results could be potentially ascribed to differences in the cell lines and animal models used. No doubt that the validation of *GLO1* as a target for cancer therapy will need a better characterization of those breast tumors that are more likely to be sensitive.

Many chemotherapeutic drugs used to treat cancer have been shown to exert their biologic activity through induction of oxidative stress. However, compelling experimental and clinical evidence indicates that this latter is diverted by cancer cells to promote their growth and resistance to apoptosis. Such promoting effect of carbonyl stress in cancer is inferred for the first time from our data and certainly awaits more comprehensive studies before confirmation. In a non-tumoral context, MG dual effect has been shown recently for neurons where MG is favorable to neurons development and activity while high MG levels are toxic (Radu *et al.*, 2012).

Elevated blood concentrations of MG have been reported in type 2 diabetic patients (Nakayama *et al.*, 2008) and plasma MG-derived hydroimidazolone was higher in type 1 diabetics as compared with non diabetics (Han *et al.*, 2009). Future studies will have to assess the potential use of circulating MG and/or specific MG adducts as cancer biomarkers. Recent studies indicated that cancer in diabetic patients presents with a higher incidence and a poorer prognosis than in non-diabetic persons (Ryu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). Our study hereby provides with a potential molecular mechanism for cancer-diabetes connection. A better understanding of MG pro-cancer effects could lead to the development of preventive and therapeutic strategies based on the scavenging of MG. Interestingly, both MG scavengers metformin and carnosine have been shown to exert anti-tumoral effects (Shen *et al.*, 2014; Giovannucci *et al.*, 2010) and metformin proved efficient to reduce systemic MG levels in diabetic patients (Beisswenger *et al.*, 1999). DeRan and collaborators (DeRan *et al.*, 2014) reported that metformin, and its more potent analog phenformin, inhibited YAP activity through AMPK signaling. Metformin is better known as a mitochondrial complex I inhibitor and a potent AMPK inducer, and it is somehow overlooked for its MG scavenging capacities. Accordingly, it is not excluded that metformin could have also exerted, at least in part, its inhibitory activity on YAP function through its MG scavenging properties. In support of this hypothesis, we have shown that high MG stress-tumor xenografts showed a significantly lower propensity to metastasize in animals supplemented with carnosine in their drinking water. The crucial role of glucose metabolism in aggressive tumors has logically directed cancer therapy research towards the use of anti-diabetic drugs as effective anti-cancer agents and metformin is actually tested in several anti-cancer clinical trials (Quinn *et al.*, 2013).

Studies using mass spectrometry and antibodies directed against MG specific AGEs are currently underway in our laboratory in order to identify other targets of MG that will hopefully contribute to bring to light the critical position of MG-mediated carbonyl stress in cancer.

Materials and methods

Cell culture and reagents

Human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF7 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Human breast cancer cell line MDA-MB-468 was kindly provided by Dr. C. Gilles (Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, Belgium). All cell lines were authenticated by STR profiling at the Leibniz-Institute DSMZ (Braunschweig, Germany) and were regularly checked for mycoplasma contamination using MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Basel, Switzerland). Cells were either cultured in high-glucose DMEM (standard glucose concentration of 4.5 g/L, Lonza) or in DMEM medium with a glucose concentration of 1 g/l (low-glucose medium) both containing 10% fetal bovine serum (FBS, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 2 mM L-glutamine (Lonza). One g/l glucose level is physiological and reflects the *in vivo* concentrations in human serum. Conversely, the routine culture media concentration of 4.5 g/l (high-glucose medium) corresponds to a diabetic condition. In our experimental model, sparse cells are defined as low-glucose cultured cells seeded at low density (for example, for a 6-well plate: MDA-MB-231, MCF7 and MDA-MB-468 were seeded at 2×10^5 cells/well). Confluent cells were obtained by seeding the same number of cells as indicated above and cultured for 3 days until they reached confluence. During these 3 days, cells were treated where indicated with methylglyoxal (MG, cat#M0252, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) at micromolar concentrations every day. We excluded the presence of significant formaldehyde contamination (<3%) in MG (lot: BCBF6939V) by NMR analysis. The natural anti-glycation dipeptide L-carnosine (C9625), the MG scavenger aminoguanidine (396494), the proteasome inhibitor MG132 (C2211), the Hsp90 inhibitor 17-AAG (A8476) and the glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose (2-DG, D8375) were obtained from Sigma-Aldrich. TGF- β was obtained from Roche (Mannheim, Germany). Human recombinant Hsp90 α (rhHsp90) was obtained from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA). S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC), a cell-permeable inhibitor of Glo1, was synthesized as previously described (*Thornalley et al., 1996*). Anti-argpyrimidine antibody (mAb6B) specificity has been previously confirmed by competitive ELISA and it has been shown to not react with other MG-arginine adducts such as 5-hydro-5-methylimidazolone and tetrahydropyrimidine (*Oya et al., 1999*).

Clinical tumor samples

Human breast tumor tissues (n = 87) were obtained from the Pathology Department of the University Hospital of Liège in agreement with ethical guidelines of the University of Liège (Belgium).

Immunohistochemistry (IHC)

Formalin-fixed paraffin embedded sections were dewaxed and rehydrated. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was performed in 10 mM sodium citrate buffer pH6 at 95°C for 40 min. To block non-specific binding sites, tissues were incubated with 1.5% normal serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 30 min. Next, they were incubated with mouse anti-Argpyrimidine (mAb6B, 1:2000), rabbit anti-YAP (Santa Cruz (Dallas, TX, USA), H125, 1:100), mouse anti-Ki67 (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 1:100), mouse anti-Glo1 (BioMac (Leipzig, Germany), 1:100) and mouse anti-vimentin (Ventana, Roche, 1:4) antibodies overnight at 4°C followed by incubation with an anti-mouse or anti-rabbit biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories) for 30 min at room temperature (RT). Sections were then stained with avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) for 30 min followed by staining with 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). Slides were finally counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted with DPX (Sigma-Aldrich). Tissue sections incubated without primary antibody showed no detectable immunoreactivity.

Evaluation of immunohistochemical staining

The immunostaining was reviewed and scored by two examiners including an anatomopathologist (E.B). As we previously described (*Waltregny et al., 1998*), scoring of the staining was done according to the intensity of the staining (0, 1+, 2+, 3+) and the percentage of positive cancer cells within the tumor (0–25%, 25–50%, 50–75%, 75–100%). The results obtained with the two scales were

multiplied together, yielding a single score with steps of 0, 1, 2, 3, 4, 6 and 9. For argpyrimidine staining, scores of 0 to 2 were considered as low to intermediate staining (low/intermediate carbonyl stress) and scores from 3 to 9 were considered as high staining (high carbonyl stress). Expression status of YAP in tumor cells was assessed using the same scoring as described above according to YAP cellular compartment (nucleus and cytoplasmic). Ki67 immunostaining was evaluated as the percentage of nucleus positive cells present in experimental tumor tissue sections. Human vimentin detection was used to quantify (a) the total number of positive foci and (b) the number of cells per foci categorized as follows: < 10 and ≥ 10 vimentin positive cells. Metastatic foci number and size were counted in one whole lung section per mice.

Immunofluorescence (IF) and evaluation of nuclear YAP staining

MDA-MB-231, MDA-MB-468 and MCF7 cells were plated on coverslips in 24-well plates. Sparse cells were seeded at 4×10^4 cells/well. Confluent cells were obtained by seeding the same number of cells as indicated above and treated for 3 days with MG until they reached confluence. For YAP, TAZ and/or TEAD1 staining, cells were fixed with 3% paraformaldehyde (PAF) for 20 min and then permeabilized with 1% Triton X-100. After blocking (3% BSA for 30 min), slides were incubated with rabbit anti-YAP (Santa Cruz, H125 or Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 4912, 1:100), mouse anti-TAZ (BD Biosciences Franklin, Lakes, NJ, USA), 1:50 (MCF7 cells) – 1:100 (MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells) and/or mouse anti-TEAD1/TEF1 (BD Biosciences, 1:100) antibodies diluted in 1% BSA overnight at 4°C. After washing with PBS, slides were incubated with anti-rabbit IgG AlexaFluor488, anti-mouse IgG AlexaFluor 488 or anti-mouse IgG AlexaFluor633 conjugated secondary antibodies (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1:1000 for 1 hr at RT. AlexaFluor568 Phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to stain actin filaments. For E-cadherin and YAP co-staining, cells were fixed in cold methanol for 10 min at -20°C . After rehydration in PBS, slides were blocked in 3% BSA for 30 min and stained with mouse E-cadherin antibody (BD Biosciences, 1:200) and/or YAP antibody (Santa Cruz, H125, 1:100) diluted in 1% BSA for 1 hr at RT. After a washing step, slides were incubated with anti-mouse IgG AlexaFluor488 and/or anti-rabbit IgG AlexaFluor546 (Invitrogen). Nuclei were stained using DAPI (EMD Chemicals, San Diego, CA, USA). Coverslips were mounted on glass slides using Mowiol (Sigma-Aldrich) and observed using confocal microscope (Leica SP5). All microscope settings were kept the same for sparse and confluent cells imaging. To quantify the intensity of YAP nuclear staining, at least 5 pictures/condition (magnification 630x) were used. Using ImageJ software (RRID:SCR_003070) ([Schneider et al., 2012](#)) the intensity of YAP staining that colocalized with DAPI staining was measured. A mean of YAP staining intensity per nucleus was obtained. All the data are presented as the mean \pm SEM of three independent experiments.

Western blot

Cells were extracted in SDS 1% buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche). Tissues samples were extracted in RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Na⁺-deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH7.5 and protease/phosphatase inhibitors). After incubation under rotation at 4°C during 30 min, tissues lysates were centrifuged at 14000 g for 15 min at 4°C. Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Twenty or 30 μg of proteins were separated by 7.5 to 12.5% SDS-PAGE and transferred to PVDF or nitrocellulose membranes. After blocking in TBS-Tween 0.1% containing 5% nonfat dried milk (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Antibodies are listed in [Supplementary file 1](#). Then, the membranes were exposed to appropriate secondary antibody at RT for 1 hr. The immunoreactive bands were visualized using ECL Western Blotting substrate (Pierce). Immunoblots were quantified by densitometric analysis and normalized for β -actin using ImageJ software. A representative western blot of three independent biological replicates is shown.

siRNA transfection

YAP and *GLO1* small interfering RNAs (siRNA) and siGI3 irrelevant used as control were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium). Sequences are detailed in [Supplementary file 2](#). Calcium phosphate-mediated transfections were performed using 20 nM of each siRNA.

shRNA transfection

Lentiviral vectors (rLV) were generated with the help of the GIGA Viral Vectors platform (University of Liège). Briefly, Lenti-X 293T cells (Clontech, Mountain View, CA, USA) were co-transfected with a pSPAX2 (a gift of Dr D. Trono, Addgene plasmid #12260) and a VSV-G encoding vector (*Emi et al., 1991*) along with a shRNA transfer lentiviral plasmid (*GLO1* shRNAs plasmids : Sigma-Aldrich, TRCN0000118627 (#1) and TRCN0000118631 (#2) or non-target (NT, anti-eGFP) shRNA plasmid (Sigma-Aldrich, SHC005)). Forty-eight, 72 and 96 hr post-transfection, viral supernatants were collected, filtrated and concentrated 100x by ultracentrifugation. The lentiviral vectors were then titrated with qPCR Lentivirus Titration Kit (ABM, Richmond, Canada). MDA-MB-231 cells were stably transduced with sh*GLO1*#1, sh*GLO1*#2 and shNT and selected with puromycin (0.5 µg/ml, Sigma-Aldrich).

RNA isolation and quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

RNA extraction was performed according to the manufacturer's protocol (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel, Duren, Germany). Reverse transcription was done using the Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Hundred ng of cDNA were mixed with primers, probe (Universal ProbeLibrary System, Roche) and 2x FastStart Universal Probe Master Mix (Roche) or Fast Start SYBR Green Master Mix (Roche). Q-PCR were performed using the 7300 Real Time PCR System and the corresponding manufacturer's software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Relative gene expression was normalized to 18S rRNA. Primers were synthesized by IDT (Leuven, Belgium) and their sequences are detailed in **Supplementary file 3**. Three technical replicates of each sample have been performed and data are presented as mean ± SEM or ± SD (as indicated in figure legends) of minimum 3 biological replicates.

Cellular MG quantification

MBo (Methyl diaminobenzene-BODIPY) was used to detect endogenous MG in different conditions. The cells were treated with 5 µM MBo in complete medium as previously described (*Wang et al., 2013*). After 1 hr, the cells were washed with PBS and incubated in low- or high-glucose medium for 6 (FACS) and 24 hr (confocal microscopy). Cells were either trypsinized and analyzed by flow cytometry (BD Biosciences FACSCanto), or fixed with PAF and prepared for confocal microscope visualization as described above.

Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis

Five hundred microliters of conditioned culture media (24 hr) were supplemented with 100 µl of deuterated phosphate buffer (pH7.4), 100 µl of a 35 mM solution of maleic acid 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 Noesy presat experiment used a RD-90°-t1-90°-tm-90°-acquire sequence with a relaxation delay of 4 s, a mixing time tm of 10msec and a fixed t1 delay of 4 µs. Water suppression pulse was placed during the relaxation delay (RD). The number of transient is 32 (64K data points) and a number of 4 dummy scans is chosen. Acquisition time is fixed to 3.2769001 s. Lactate dosages were achieved by integrations of the lactate signal at 1.34ppm using maleic acid as internal standard. Deuterium oxide (99.96% D) and trimethylsilyl-3-propionic acid-d4 (TMSP) were purchased from Eurisotop (St-Aubin, France), phosphate buffer powder 0.1M and maleic acid were purchased from Sigma-Aldrich. 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 cryo-probe. Deuterated water was used as the internal lock. The data have been processed with Bruker TOSPIN 3.0 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 0ppm using the internal standard TMSP.

Methylglyoxal measurement in breast cancer cell culture media and pellets

MDA-MB-231 cells were cultured in low and high glucose conditions or were depleted for *GLO1* expression using siRNAs as described above. Forty-eight hours culture media were collected and the corresponding attached cells were scraped and counted to normalize methylglyoxal (MG)

measurements. Supernatants and cell pellets were snap-frozen and kept at -80°C until analysis. Levels of MG were determined in conditioned medium and cells by derivatization with O-phenylenediamine (oPD) and analyzed by stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as described previously (*Scheijen and Schalkwijk, 2014*). Briefly, 30 μl of culture medium or cell lysate were mixed with 90 μl oPD (10 mg oPD in 10 ml 1.6 mol/l perchloric acid) in an Eppendorf cup. After an overnight (20 hr) reaction at room temperature and shielded from light, 10 μl of internal standard solution was added. Samples were mixed and subsequently centrifuged for 20 min at 21,000 g at a temperature of 4°C ; 10 μl were injected for UPLC/MS/MS analysis.

Glo1 activity assay

The activity of Glo1 was performed as previously described [*Chiavarina et al., 2014*]. Briefly, proteins were extracted with RIPA buffer, quantified and mixed with a pre-incubated (15 min at 25°C) equimolar (1 mM) mixture of MG and GSH (Sigma-Aldrich) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH6.8. S-D-lactoylglutathione formation was followed spectrophotometrically by the increase of absorbance at 240 nm at 25°C . Glo1 activity data are expressed as arbitrary units (A.U.) of enzyme per mg of proteins. Three technical replicates of each sample have been performed and data are presented as mean \pm SEM of five biological replicates.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Formaldehyde was added directly to cell culture media to a final concentration of 1% at RT. Ten minutes later, glycine was added to a final concentration of 0.125M for 5 min at RT. The cells were then washed with ice-cold PBS, scraped, and collected in cold PBS followed by extraction in cell lysis buffer (20 mM Tris/HCl pH8, 85 mM KCl, 0.5% NP-40, protease inhibitor). Nuclei were pelleted by centrifugation at 2600g for 5 min at 4°C , suspended in nuclei lysis buffer (50 mM Tris/HCl pH8, 10 mM EDTA, 1% SDS, protease inhibitor) and sonicated with Bioruptor (Diagenode, Liège, Belgium). Samples were centrifuged at 14000 g for 15 min at 4°C . Supernatant were diluted in ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH8, 167 mM NaCl, protease inhibitor) to obtain a SDS final concentration of 0.2% and incubated with anti-YAP antibody (Santa Cruz, H125) or rabbit control IgG (Zymed Laboratories, ThermoFisher Scientific) overnight at 4°C . Protein G magnetic beads were blocked with BSA 0.1 mg/ml and salmon sperm DNA 0.1 mg/ml overnight at 4°C and then washed with ChIP dilution buffer. Beads were added to the lysate and incubated under rotation at 4°C . Four hours later, the beads were washed with low (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH8, 150 mM NaCl), high (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH8, 450 mM NaCl) salt wash buffer and LiCl wash buffer (0.5M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 20 mM Tris/HCl pH8). Next, the beads were incubated in elution buffer (50 mM NaHCO_3 , 1% SDS) during 20 min under agitation. NaCl was added to a final concentration of 0.2M and samples were heated at 67°C overnight to reverse crosslinking. DNA was purified by phenol/chloroform extraction. The ChIP-enriched DNA was subjected to qPCR using connective tissue growth factor (CTGF) promoter TEAD binding-site-specific primers sense, 5'-ATATGAATCAGGAGTGGTGCG-3' and antisense, 5'-CAACTCACACCGGATTGATCC-3' (*Fujii et al., 2012*). Primers (sens, 5'-AGACAAACCAAATCCAATCCACA-3', antisens, 5'-CTGTGTTGGGTAGGTAGGGG-3') targeting a more distal region on CTGF promoter were used as negative control. All qPCR data are normalized to Input and IgG controls and are presented as mean \pm SEM of three biological replicates.

Wound closure migration assay

MDA-MB-468 cells were transfected with 2 siRNAs against YAP and were grown to high density with MG 300 μM treatment. Multiple uniform streaks were made on the monolayer culture with 10 μl pipette tips. The cells were then washed to remove detached cells. Immediately after wounding and 16 hr later, each wound was photographed under a phase-contrast microscope. The distance between the wound edges was measured. Mean wound width was determined and a wound closure percentage was calculated for each condition. Sixteen wounds were measured per condition and the experiment was repeated twice. Data are expressed as the mean \pm SEM.

Cell growth assay

Equal numbers of cells were seeded, transfected with two siRNAs targeting YAP and treated with MG until confluence. Cell number was indirectly assessed using Hoechst incorporation at the indicated time period and cell growth was expressed based on cellular DNA content ($\mu\text{g/ml}$). Three technical replicates of each samples have been performed and data are presented as mean \pm SEM of four biological replicates.

Mass spectrometry – MG adducts localization

As previously described (Dobler *et al.*, 2006; Ahmed and Thornalley, 2005; Lund *et al.*, 2011), 5 μg of human recombinant Hsp90 α (rhHsp90, Enzo Life Sciences, ADI-SPP-76D) were minimally modified with MG 500 μM in PBS 100 mM pH7.4 at 37°C during 24 hr. Proteins were reduced and alkylated, placed in 50 mM ammonium bicarbonate (buffer exchange was performed using an Amicon-3k from Millipore, Darmstadt, Germany) and then digested using a protease mixture. Peptides (15 pmoles injected) were separated by reverse phase chromatography (UPLC Waters nanoAcquity) in one dimension on a BEH C18 analytical column (25 cm length, 75 μM ID) with an increasing ratio of acetonitrile/water (5–40% in 85 min) at a 250 nl/min flow rate. The chromatography system was coupled to a hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Q Exactive, ThermoFisher Scientific), operated in data-dependent acquisition mode. Survey scans were acquired at 70,000 resolving power (full width at half maximum, FWHM). Mass range was set from 400 to 1750 m/z in MS mode, and 1E6 ions were accumulated for the survey scans. After each survey scan, the 10 most intense ions were selected to do MS/MS experiments. Higher energy Collision Dissociation (HCD) fragmentation was performed at NCE 25 after isolation of ions within 2amu isolation windows. A dynamic exclusion of 10 s was enabled. Database searches were performed using Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) in a Swissprot database (2014–05, 20339 human sequences) restricted to human taxonomy. MS and MS/MS tolerances were respectively set at 5 ppm and 20 mmu. Argpyrimidine (+80.026 Da, R), hydroimidazolone (+54.010 Da, R), dihydroxyimidazolidine (+72.021 Da, R) and carboxyethyllysine (+72.021 Da, K) were set as variable modifications while carbamidomethylation (+57.021 Da, C) was set as fixed modification.

Mass spectrometry – MG adducts detection on endogenous Hsp90

Based on the experiments conducted using rhHsp90, a targeted method was set up to reach enough sensitivity to detect endogenous Hsp90 adducts in MDA-MB-231 MG-treated cells. Modified rhHsp90 as described above was first digested using Lys-C protease (in Tris-HCl 25 mM, pH8.5, 1 mM EDTA overnight at 37°C; first step at 1/40 sample/protease and then addition of 1/50 sample/protease in 50% acetonitrile for 4 hr). Resulting peptides were separated by reverse phase chromatography (UPLC Waters M Class) in one dimension on a HSS T3 C18 analytical column (25 cm length, 75 μM ID) with an increasing ratio of acetonitrile/water (2–40% in 32 min) at a 600 nL/min flow rate. The system was coupled to the mass spectrometer described above. A shortlist of 54 peptides were manually selected and used in further targeted experiments. Two 'Parallel Reaction Monitoring' or PRM (i.e. targeted full MS/MS) methods were set up in order to obtain at least 12 data points in chromatographic peaks and they were run consecutively for each sample. Data were then analyzed using Skyline 3.1 and were manually validated. For these experiments, protein extract from MDA-MB-231 treated or not with MG 300 μM during 6 hr were immunoprecipitated with argpyrimidine antibody. These samples were prepared in a slightly different way than rhHsp90: whole samples were reduced, alkylated and then purified using the 2D Clean-up kit (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). The samples were then resuspended in the proteolysis buffer and the digestion was performed assuming an amount of 5 μg to be digested. The following steps were the same as for the recombinant protein.

Immunoprecipitation and co-immunoprecipitation

MDA-MB-231 were treated with MG 300 μM during 6 hr. Then, argpyrimidine (mAb6B) and Hsp90 (anti-Hsp90 antibody, ab13492, Abcam, Cambridge, UK) and mouse IgG (Zymed Laboratories) immunoprecipitations were performed using the 'Crosslink IP' kit (#26147, ThermoFischer Scientific) according to manufacturer instructions. For LATS1/Hsp90 co-immunoprecipitation, MDA-MB-231 were treated with MG 300 μM during 24 hr. Proteins were extracted in Tris-HCl pH8 20 mM, NaCl

137 mM, NP-40 1%, EDTA 2 mM and protease inhibitors. After incubation under rotation at 4°C during 30 min, cell lysates were centrifuged at 14,000g for 15 min at 4°C. Five hundred µg of proteins were incubated with 2 µg of LATS1 (Bethyl, Montgomery, TX, USA) or rabbit IgG (Zymed Laboratories) antibodies overnight and then 2 hr with Protein G magnetic beads at 4°C. After several washes, proteins were eluted and analyzed by Western blot. A representative western blot of three independent biological replicates is shown.

Plasmids

pcDNA3.1-LATS-3xFlag and pcDNA3.1-3xFlag (empty vector) were kindly provided by Prof. Xiaolong Yang, Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University, Kingston, Ontario K7L 3N6, Canada (*Hao et al., 2008*). Cell transfection was performed using Lipofectamine (ThermoFisher Scientific) according to manufacturer's instructions.

Hsp90 ATPase activity

Hsp90 ATPase activity assay was performed as previously described (*Rowlands et al., 2010*) using Transcreeper ADP² FI assay (BellBrook Labs, Fitchburg, WI, USA). Briefly, 1 µM of rhHsp90 was pre-incubated with MG 500 µM ± carnosine 10 mM or 17-AAG 1 µM during 24 hr at 37°C in Hepes pH7.4 50 mM, KCl 20 mM, EGTA 2 mM, MgCl₂ 4 mM and Brij-35 0.01%. ATP was added at a final concentration of 100 µM and incubated 3 hr at 37°C. The reaction was stopped and ADP was detected by adding ADP² Antibody-IRDye QC-1 at a final concentration of 93.7 µg/ml and ADP Alexa594 Tracer at a final concentration of 4 nM. This mix was incubated 1 hr at RT in a 96-well black half area plates (Greiner, Vilvorde, Belgium, #675076). Readings were performed on a Filter Max F5 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Three technical replicates of each sample have been performed and data are presented as mean ± SEM of five biological replicates.

In vivo mice experiments

All animal experimental procedures were performed according to the Federation of European Laboratory Animal Sciences Associations (FELASA) and were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Ethics Committee of the University of Liege (Belgium). Animals were housed in the GIGA-accredited animal facility of the University of Liege. For human xenografts, MDA-MB-231 shNT, shGLO1#1 and shGLO1#2 cells were suspended in 10% FBS supplemented medium and Matrigel (BD Biosciences) (50% v/v). Cell suspensions (10⁶ cells/100 µl) were inoculated subcutaneously in one flank of 5-week-old female NOD-SCID mice (n = 15 per condition). After 4 weeks, tumors were surgically removed, weighted and measured with a caliper. Tumor volume (V) was assessed using the formula $V = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{H}{2} \times \frac{L}{2} \times \frac{W}{2}$ where H, L and W denote height, length and width, respectively. One piece was collected and embedded in paraffin for IHC and the rest was frozen in liquid nitrogen for total protein extraction. The animals were sutured, allowed to recover and further monitored for 6 weeks for metastases development. Due to animal ethics protocol, we had to sacrifice two mice in both shGLO1#1 and shGLO1#2 groups before the end of the experiment. A parallel experiment was conducted on shGLO1#1 mice (n = 10) where they received carnosine (10 mM) in drinking water refreshed every 3 days from the day of primary tumor removal until the end of the experiment (for 6 weeks). Drinking volume was monitored and found to be similar between treated and non-treated mice. The mice were sacrificed and lung metastases were collected and processed as described for the primary tumors.

Chicken chorioallantoic membrane (CAM) tumor assay

GLO1-depleted MDA-MB-231 cells were transfected with 2 different siRNAs directed against YAP (siYAP#1 and #2). On chicken embryonic day 11, 100 µl of a suspension of 2 × 10⁶ (*Thornalley, 2005*) of MDA-MB-231 cells in culture medium mixed (1:1) with Matrigel (BD Biosciences) were deposited in the center of a plastic ring on the chicken embryo chorioallantoic membrane (n = 5). Tumors were harvested on embryonic day 18 and were fixed in 4% paraformaldehyde solution (30 min) for IHC analysis. Tumor volume was measured using a caliper and assessed using the formula described above. Parallel cultures of transfected cells were used to assess by Western blot that YAP silencing was maintained for the entire duration of the CAM assay experiment.

Correlation analysis using YAP activity signature

The signature of YAP-modulated genes was described in previous studies (Zhao *et al.*, 2008; Cordenonsi *et al.*, 2011; Dupont *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009) and their mRNA levels were correlated to *GLO1* gene expression using publicly available GDS4057 dataset of 103 breast cancer patients (Iwamoto *et al.*, 2011).

Statistical analysis

Both technical and biological replicates were performed where indicated in figure legends. Technical replicates are considered as taking one sample and analyzing it several times in the same experiment. Biological replicates represent the analysis of samples from independent experiments. All results were reported as means with standard deviation (SD) or Standard Error Mean (SEM) as indicated in figure legends. Two group comparisons were performed using unpaired student's t-test with or without Welsch's correction according to homoscedasticity. When an experiment required comparisons between more than two groups, statistical analysis was performed using one-way or two-way ANOVA depending on the number of grouping factors. Dunnett's test was applied for simple comparisons while Student-Newman-Keul's (one-way ANOVA) or Bonferroni's (two-way ANOVA) tests were used for multiple comparisons. In the case of discrete variables (IHC scores) or non-normally distributed variables, the comparison between groups was performed by Mann-Whitney's U test, Wilcoxon Rank Sum test or a Kruskal-Wallis ANOVA followed by a Dunn's test according to the number of groups. Correlation between scores was assessed by the Spearman's rank correlation coefficient (R_{spearman}) and correlation between continuous variables was assessed by a Pearson correlation coefficient (R_p). Outliers were detected using whisker box plots. In all cases, a bilateral $p < 0.05$ was considered as statistically significant with a 95% confidence interval. All experiments were performed as several independent biological replicates.

Acknowledgements

MJN, FD and BCo are Télévie Fellows, BCh, ABI and AT are Télévie Post-Doctoral Fellows, PDT and ABe are Senior Research Associates, all from the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium). This work was also supported by the Centre Anti-Cancéreux, University of Liège, Belgium. The authors are thankful to Mrs. N Maloujahmoum and Mr. V Hennequière for expert technical assistance. We acknowledge the technology platforms of the GIGA at University of Liège: proteomic, animal, imaging and flow cytometry, viral vector and immunohistology facilities. We thank the Tissue Bank of the University of Liège/University Hospital of Liège for providing human tumor samples.

Additional information

Funding

Funder	Author
Université de Liège	Akeila Bellahcène

MJN, FD and BCo are Télévie Fellows, BCh, ABI and AT are Télévie Post-Doctoral Fellows, PDT and ABe are Senior Research Associates, all from the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium). This work was also supported by the Centre Anti-Cancéreux, University of Liège, Belgium. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

M-JN, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; FD, PP, BCh, OP, ABI, AT, BCo, NS, DBa, JLS, CGS, JL, PDT, EB, MT, EDP, PD, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; KU, DAS, JRC, CAH, DBe, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article, Contributed unpublished essential data or reagents; VC, ABe, Conception and design, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article

Author ORCIDsJames R Cochrane,  <http://orcid.org/0000-0002-8796-2143>**Ethics**

Human subjects: Human breast tumor tissues were obtained from the Pathology Department of the University Hospital of Liege in agreement with ethical guidelines of the University of Liege, Belgium (#2015-155).

Animal experimentation: All animal experimental procedures were performed according to the Federation of European Laboratory Animal Sciences Associations (FELASA) and were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Ethics Committee of the University of Liege, Belgium (#14-1714). All surgery was performed under ketamin/xylazine anesthesia, and every effort was made to minimize suffering.

Additional files**Supplementary files**

- Supplementary file 1. Antibodies and dilutions used for Western Blot experiments.

DOI: [10.7554/eLife.19375.027](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.027)

- Supplementary file 2. siRNA sequences.

DOI: [10.7554/eLife.19375.028](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.028)

- Supplementary file 3. Primer sequences and probes used for quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR).

DOI: [10.7554/eLife.19375.029](https://doi.org/10.7554/eLife.19375.029)**Major datasets**

The following previously published dataset was used:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database, license, and accessibility information
Iwamoto T, Bianchini G, Booser D, Qi Y, Coutant C, Shiang CY, Santarpia L, Matsuoka J, Hortobagyi GN, Symmans WF, Holmes FA, O'Shaughnessy J, Hellerstedt B, Pippen J, Andre F, Simon R, Pusztai L	2011	ER-positive/HER2-negative and ER-negative/HER2-negative breast cancer biopsies (MDACC/IGR cohort)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS4057	Publicly available at the NCBI Gene Expression Omnibus (accession no: GDS4057)

References

- Ahmed N, Thornalley PJ. 2005. Peptide mapping of human serum albumin modified minimally by methylglyoxal in vitro and in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**:260–266. doi: [10.1196/annals.1333.031](https://doi.org/10.1196/annals.1333.031)
- Antognelli C, Mezzasoma L, Fettucciari K, Mearini E, Talesa VN. 2013. Role of glyoxalase I in the proliferation and apoptosis control of human LNCaP and PC3 prostate cancer cells. *The Prostate* **73**:121–132. doi: [10.1002/pros.22547](https://doi.org/10.1002/pros.22547)
- Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwegold BS. 1999. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* **48**:198–202. doi: [10.2337/diabetes.48.1.198](https://doi.org/10.2337/diabetes.48.1.198)
- Bento CF, Marques F, Fernandes R, Pereira P. 2010. Methylglyoxal alters the function and stability of critical components of the protein quality control. *PLoS One* **5**:e13007. doi: [10.1371/journal.pone.0013007](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013007)
- Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, Babes A, Neacsu C, Sauer SK, Eberhardt M, Schnölzer M, Lasitschka F, Lasitschka F, Neuhuber WL, Kichko TI, Konrade I, Elvert R, Mier W, Pirags V, Lukic IK, Morcos M, Dehmer T, et al. 2012. Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nature Medicine* **18**:926–933. doi: [10.1038/nm.2750](https://doi.org/10.1038/nm.2750)
- Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. 2006. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences* **31**:164–172. doi: [10.1016/j.tibs.2006.01.006](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.006)

- Cheng WL**, Tsai MM, Tsai CY, Huang YH, Chen CY, Chi HC, Tseng YH, Chao IW, Lin WC, Wu SM, Liang Y, Liao CJ, Lin YH, Chung IH, Chen WJ, Lin PY, Wang CS, Lin KH. 2012. Glyoxalase-I is a novel prognosis factor associated with gastric cancer progression. *PLoS One* **7**: e34352. doi: [10.1371/journal.pone.0034352](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034352)
- Chiavarina B**, Nokin MJ, Durieux F, Bianchi E, Turtoi A, Peulen O, Peixoto P, Irigaray P, Uchida K, Belpomme D, Delvenne P, Castronovo V, Bellahcène A. 2014. Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. *Oncotarget* **5**:5472–5482. doi: [10.18632/oncotarget.2121](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2121)
- Cordenonsi M**, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, Inui M, Montagner M, Parenti AR, Poletti A, Daidone MG, Dupont S, Basso G, Bicciato S, Piccolo S. 2011. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* **147**:759–772. doi: [10.1016/j.cell.2011.09.048](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048)
- DeRan M**, Yang J, Shen CH, Peters EC, Fitamant J, Chan P, Hsieh M, Zhu S, Asara JM, Zheng B, Bardeesy N, Liu J, Wu X. 2014. Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomin-like 1 protein. *Cell Reports* **9**:495–503. doi: [10.1016/j.celrep.2014.09.036](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.036)
- Dobler D**, Ahmed N, Song L, Eboigbodin KE, Thornalley PJ. 2006. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. *Diabetes* **55**:1961–1969. doi: [10.2337/db05-1634](https://doi.org/10.2337/db05-1634)
- Dupont S**, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**:179–183. doi: [10.1038/nature10137](https://doi.org/10.1038/nature10137)
- Emi N**, Friedmann T, Yee JK. 1991. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **65**:1202–1207.
- Enzo E**, Santinon G, Pocaterra A, Aragona M, Bresolin S, Forcato M, Grifoni D, Pession A, Zanconato F, Guzzo G, Bicciato S, Dupont S. 2015. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *The EMBO Journal* **34**:1349–1370. doi: [10.15252/embj.201490379](https://doi.org/10.15252/embj.201490379)
- Fonseca-Sánchez MA**, Rodríguez Cuevas S, Mendoza-Hernández G, Bautista-Piña V, Arechaga Ocampo E, Hidalgo Miranda A, Quintanar Jurado V, Marchat LA, Alvarez-Sánchez E, Pérez Plasencia C, López-Camarillo C. 2012. Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase 1 expression and high tumor grade. *International Journal of Oncology* **41**:670–680. doi: [10.3892/ijo.2012.1478](https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1478)
- Fujii M**, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y. 2012. TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *The Journal of Experimental Medicine* **209**:479–494. doi: [10.1084/jem.20111653](https://doi.org/10.1084/jem.20111653)
- Giovannucci E**, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. 2010. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* **33**:1674–1685. doi: [10.2337/dc10-0666](https://doi.org/10.2337/dc10-0666)
- Han Y**, Randell E, Vasdev S, Gill V, Curran M, Newhook LA, Grant M, Hagerty D, Schneider C. 2009. Plasma advanced glycation endproduct, methylglyoxal-derived hydroimidazolone is elevated in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Clinical Biochemistry* **42**:562–569. doi: [10.1016/j.clinbiochem.2008.12.016](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.12.016)
- Hao Y**, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang X. 2008. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *Journal of Biological Chemistry* **283**:5496–5509. doi: [10.1074/jbc.M709037200](https://doi.org/10.1074/jbc.M709037200)
- Harvey KF**, Zhang X, Thomas DM. 2013. The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer* **13**:246–257. doi: [10.1038/nrc3458](https://doi.org/10.1038/nrc3458)
- He M**, Zhou Z, Shah AA, Hong Y, Chen Q, Wan Y. 2016. New insights into posttranslational modifications of Hippo pathway in carcinogenesis and therapeutics. *Cell Division* **11**:4. doi: [10.1186/s13008-016-0013-6](https://doi.org/10.1186/s13008-016-0013-6)
- Hiemer SE**, Szymaniak AD, Varelas X. 2014. The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor β -induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **289**:13461–13474. doi: [10.1074/jbc.M113.529115](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529115)
- Hipkiss AR**, Chana H. 1998. Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **248**:28–32. doi: [10.1006/bbrc.1998.8806](https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8806)
- Hosoda F**, Arai Y, Okada N, Shimizu H, Miyamoto M, Kitagawa N, Katai H, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Ohki M, Shibata T. 2015. Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. *Oncogene* **34**:1196–1206. doi: [10.1038/onc.2014.57](https://doi.org/10.1038/onc.2014.57)
- Huntoon CJ**, Nye MD, Geng L, Peterson KL, Flatten KS, Haluska P, Kaufmann SH, Karnitz LM. 2010. Heat shock protein 90 inhibition depletes LATS1 and LATS2, two regulators of the mammalian hippo tumor suppressor pathway. *Cancer Research* **70**:8642–8650. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-10-1345](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1345)
- Iwamoto T**, Bianchini G, Booser D, Qi Y, Coutant C, Shiang CY, Santarpia L, Matsuoka J, Hortobagyi GN, Symmans WF, Holmes FA, O’Shaughnessy J, Hellerstedt B, Pippin J, Andre F, Simon R, Pusztai L, Ya-Hui Shiang C. 2011. Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **103**:264–272. doi: [10.1093/jnci/djq524](https://doi.org/10.1093/jnci/djq524)
- Kang Y**, Edwards LG, Thornalley PJ. 1996. Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leukemia Research* **20**:397–405. doi: [10.1016/0145-2126\(95\)00162-X](https://doi.org/10.1016/0145-2126(95)00162-X)
- Lei QY**, Zhang H, Zhao B, Zha ZY, Bai F, Pei XH, Zhao S, Xiong Y, Guan KL. 2008. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Molecular and Cellular Biology* **28**:2426–2436. doi: [10.1128/MCB.01874-07](https://doi.org/10.1128/MCB.01874-07)
- Lund T**, Svindland A, Pepaj M, Jensen AB, Berg JP, Kilhovd B, Hanssen KF. 2011. Fibrin(ogen) may be an important target for methylglyoxal-derived AGE modification in elastic arteries of humans. *Diabetes and Vascular Disease Research* **8**:284–294. doi: [10.1177/1479164111416831](https://doi.org/10.1177/1479164111416831)

- Mo JS**, Meng Z, Kim YC, Park HW, Hansen CG, Kim S, Lim DS, Guan KL. 2015. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nature Cell Biology* **17**:500–510. doi: [10.1038/ncb3111](https://doi.org/10.1038/ncb3111)
- Moroishi T**, Hansen CG, Guan KL. 2015. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nature Reviews Cancer* **15**:73–79. doi: [10.1038/nrc3876](https://doi.org/10.1038/nrc3876)
- Mulvihill MM**, Benjamin DI, Ji X, Le Scolan E, Louie SM, Shieh A, Green M, Narasimhalu T, Morris PJ, Luo K, Nomura DK. 2014. Metabolic profiling reveals PFAH1B3 as a critical driver of breast cancer pathogenicity. *Chemistry & Biology* **21**:831–840. doi: [10.1016/j.chembiol.2014.05.008](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.05.008)
- Nakayama K**, Nakayama M, Iwabuchi M, Terawaki H, Sato T, Kohno M, Ito S. 2008. Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients. *American Journal of Nephrology* **28**:871–878. doi: [10.1159/000139653](https://doi.org/10.1159/000139653)
- Neckers L**, Workman P. 2012. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clinical Cancer Research* **18**:64–76. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-11-1000](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1000)
- Overholtzer M**, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, Deng C-X, Brugge JS, Haber DA. 2006. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *PNAS* **103**:12405–12410. doi: [10.1073/pnas.0605579103](https://doi.org/10.1073/pnas.0605579103)
- Oya T**, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K. 1999. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:18492–18502. doi: [10.1074/jbc.274.26.18492](https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18492)
- Oya-Ito T**, Naito Y, Takagi T, Handa O, Matsui H, Yamada M, Shima K, Yoshikawa T. 2011. Heat-shock protein 27 (Hsp27) as a target of methylglyoxal in gastrointestinal cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1812**:769–781. doi: [10.1016/j.bbadis.2011.03.017](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.017)
- Pan D**. 2010. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell* **19**:491–505. doi: [10.1016/j.devcel.2010.09.011](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011)
- Pate KT**, Stringari C, Sprowl-Tanio S, Wang K, TeSlaa T, Hoverter NP, McQuade MM, Garner C, Digman MA, Teitell MA, Edwards RA, Gratton E, Waterman ML. 2014. Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *The EMBO Journal* **33**:1454–1473. doi: [10.15252/embj.201488598](https://doi.org/10.15252/embj.201488598)
- Price JT**, Quinn JM, Sims NA, Vieusseux J, Waldeck K, Docherty SE, Myers D, Nakamura A, Waltham MC, Gillespie MT, Thompson EW. 2005. The heat shock protein 90 inhibitor, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, enhances osteoclast formation and potentiates bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer Research* **65**:4929–4938. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-04-4458](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4458)
- Quinn BJ**, Kitagawa H, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA. 2013. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **24**:469–480. doi: [10.1016/j.tem.2013.05.004](https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.004)
- Rabbani N**, Thornalley PJ. 2014. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nature Protocols* **9**:1969–1979. doi: [10.1038/nprot.2014.129](https://doi.org/10.1038/nprot.2014.129)
- Radu BM**, Dumitrescu DI, Mustaciosu CC, Radu M. 2012. Dual effect of methylglyoxal on the intracellular Ca²⁺-signaling and neurite outgrowth in mouse sensory neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology* **32**:1047–1057. doi: [10.1007/s10571-012-9823-5](https://doi.org/10.1007/s10571-012-9823-5)
- Richard JP**. 1993. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochemical Society Transactions* **21**:549–553. doi: [10.1042/bst0210549](https://doi.org/10.1042/bst0210549)
- Rowlands M**, McAndrew C, Prodromou C, Pearl L, Kalusa A, Jones K, Workman P, Aherne W. 2010. Detection of the ATPase activity of the molecular chaperones Hsp90 and Hsp72 using the Transcreeper™ ADP assay kit. *Journal of Biomolecular Screening* **15**:279–286. doi: [10.1177/1087057109360253](https://doi.org/10.1177/1087057109360253)
- Ryu TY**, Park J, Scherer PE. 2014. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes & Metabolism Journal* **38**:330–336. doi: [10.4093/dmj.2014.38.5.330](https://doi.org/10.4093/dmj.2014.38.5.330)
- Sakamoto H**, Mashima T, Sato S, Hashimoto Y, Yamori T, Tsuruo T. 2001. Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells. *Clinical Cancer Research* **7**:2513–2518.
- Sakamoto H**, Mashima T, Yamamoto K, Tsuruo T. 2002. Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *Journal of Biological Chemistry* **277**:45770–45775. doi: [10.1074/jbc.M207485200](https://doi.org/10.1074/jbc.M207485200)
- Santarius T**, Bignell GR, Greenman CD, Widaa S, Chen L, Mahoney CL, Butler A, Edkins S, Waris S, Thornalley PJ, Futreal PA, Stratton MR. 2010. GLO1-A novel amplified gene in human cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* **49**:711–725. doi: [10.1002/gcc.20784](https://doi.org/10.1002/gcc.20784)
- Scheijen JL**, Schalkwijk CG. 2014. Quantification of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in blood and plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: evaluation of blood specimen. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **52**:85–91. doi: [10.1515/cclm-2012-0878](https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0878)
- Schneider CA**, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**:671–675. doi: [10.1038/nmeth.2089](https://doi.org/10.1038/nmeth.2089)
- Shen Y**, Yang J, Li J, Shi X, Ouyang L, Tian Y, Lu J. 2014. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and Glycolysis pathways. *PLoS One* **9**:e104632. doi: [10.1371/journal.pone.0104632](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104632)
- Takahashi Y**, Miyoshi Y, Takahata C, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. 2005. Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clinical Cancer Research* **11**:1380–1385. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-04-1773](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1773)

- Thornalley PJ**, Edwards LG, Kang Y, Wyatt C, Davies N, Ladan MJ, Double J. 1996. Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochemical Pharmacology* **51**:1365–1372. doi: [10.1016/0006-2952\(96\)00059-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00059-7)
- Thornalley PJ**. 1996. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General Pharmacology* **27**: 565–573. doi: [10.1016/0306-3623\(95\)02054-3](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02054-3)
- Thornalley PJ**. 2005. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**:111–117. doi: [10.1196/annals.1333.014](https://doi.org/10.1196/annals.1333.014)
- Tikellis C**, Pickering RJ, Tsorotes D, Huet O, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, Thomas MC. 2014. Dicarbonyl stress in the absence of hyperglycemia increases endothelial inflammation and atherogenesis similar to that observed in diabetes. *Diabetes* **63**:3915–3925. doi: [10.2337/db13-0932](https://doi.org/10.2337/db13-0932)
- Trepel J**, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L. 2010. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nature Reviews Cancer* **10**:537–549. doi: [10.1038/nrc2887](https://doi.org/10.1038/nrc2887)
- Turk Z**. 2010. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiological Research* **59**:147–156.
- van Heijst JW**, Niessen HW, Hoekman K, Schalkwijk CG. 2005. Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**:725–733. doi: [10.1196/annals.1333.084](https://doi.org/10.1196/annals.1333.084)
- van Heijst JW**, Niessen HW, Musters RJ, van Hinsbergh VW, Hoekman K, Schalkwijk CG. 2006. Argpyrimidine-modified Heat shock protein 27 in human non-small cell lung cancer: a possible mechanism for evasion of apoptosis. *Cancer Letters* **241**:309–319. doi: [10.1016/j.canlet.2005.10.042](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.042)
- Waltregny D**, Bellahcène A, Van Riet I, Fisher LW, Young M, Fernandez P, Dewé W, de Leval J, Castronovo V. 1998. Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **90**:1000–1008. doi: [10.1093/jnci/90.13.1000](https://doi.org/10.1093/jnci/90.13.1000)
- Wang T**, Douglass EF, Fitzgerald KJ, Spiegel DA. 2013. A "turn-on" fluorescent sensor for methylglyoxal. *Journal of the American Chemical Society* **135**:12429–12433. doi: [10.1021/ja406077j](https://doi.org/10.1021/ja406077j)
- Wang W**, Xiao ZD, Li X, Aziz KE, Gan B, Johnson RL, Chen J. 2015. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nature Cell Biology* **17**:490–499. doi: [10.1038/ncb3113](https://doi.org/10.1038/ncb3113)
- Ward PS**, Thompson CB. 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* **21**:297–308. doi: [10.1016/j.ccr.2012.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014)
- Xu CX**, Zhu HH, Zhu YM. 2014. Diabetes and cancer: Associations, mechanisms, and implications for medical practice. *World Journal of Diabetes* **5**:372–380. doi: [10.4239/wjd.v5.i3.372](https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i3.372)
- Yano A**, Tsutsumi S, Soga S, Lee MJ, Trepel J, Osada H, Neckers L. 2008. Inhibition of Hsp90 activates osteoclast c-Src signaling and promotes growth of prostate carcinoma cells in bone. *PNAS* **105**:15541–15546. doi: [10.1073/pnas.0805354105](https://doi.org/10.1073/pnas.0805354105)
- Zender L**, Xue W, Zuber J, Semighini CP, Krasnitz A, Ma B, Zender P, Kubicka S, Luk JM, Schirmacher P, McCombie WR, Wigler M, Hicks J, Hannon GJ, Powers S, Lowe SW. 2008. An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* **135**:852–864. doi: [10.1016/j.cell.2008.09.061](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.061)
- Zhang H**, Liu CY, Zha ZY, Zhao B, Yao J, Zhao S, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. 2009. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry* **284**:13355–13362. doi: [10.1074/jbc.M900843200](https://doi.org/10.1074/jbc.M900843200)
- Zhang S**, Liang X, Zheng X, Huang H, Chen X, Wu K, Wang B, Ma S. 2014. Glo1 genetic amplification as a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **7**:2079–2090.
- Zhao B**, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, Guan KL. 2008. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Development* **22**:1962–1971. doi: [10.1101/gad.1664408](https://doi.org/10.1101/gad.1664408)

3. Potentiel hormétique du méthylglyoxal, un produit dérivé de la glycolyse, dans la transition des tumeurs de la progression à la mort

3.1 Introduction

Les études précédentes menées au Laboratoire indiquent un rôle pro-tumoral du MG alors que de nombreuses publications font état d'un rôle anti-tumoral. Les recherches au sein du laboratoire ont mis en évidence l'accumulation de résidus argpyrimidine au niveau de tumeurs mammaires par rapport au tissu sain²⁶⁷ et ont démontré un rôle pro-tumoral et pro-métastatique du stress dicarbone²⁸³. Une autre étude au laboratoire a mis en évidence un lien entre le stress dicarbone et la progression du cancer colorectal²⁸⁴. Nous avons montré une corrélation positive entre l'accumulation des résidus argpyrimidine et le stade tumoral. De plus, l'activité Glo1 est inversement corrélée au stade, indiquant bien l'aspect pro-tumoral du stress dicarbone dans le cancer colorectal.

Cependant, dès les années 70, le MG a été envisagé comme une molécule toxique potentiellement intéressante dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse. Ces études ont montré que le traitement de souris avec du MG induisant inhibition de la croissance tumorale¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. D'autres études plus récentes démontrent également un effet anti-tumoral du stress dicarbone. Par exemple, He et collègues ont observé une réduction de la croissance tumorale de cancer du colon *in vivo* qu'ils ont relié à une inhibition de la glycolyse sous traitement au MG¹⁷⁹. L'équipe de Sakamoto a développé une autre approche pour induire une toxicité du MG au niveau des cellules tumorales : l'inhibition de la détoxification de ce dernier par Glo1 avec le *S-p*-bromobenzylglutathion Cyclopentyl Diester (BBGC). Le traitement de cellules cancéreuses pulmonaires avec le BBGC induit leur apoptose et ce plus efficacement au niveau des cellules présentant des niveaux élevés de Glo1¹⁹⁵.

3.2 Résultats

Dans cette étude, nous avons adressé le rôle ambivalent du MG dans le cancer. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser 4 lignées cellulaires cancéreuses, 2 lignées de glioblastome (GBM, U87-MG et U251) et 2 lignées de carcinome mammaire (MDA-MB-231 et MCF7). Etant donné que la production de MG est étroitement liée au métabolisme du glucose, nous avons commencé par évaluer le profil métabolique de ces

4 lignés cancéreuses en utilisant la technologie Seahorse. Les cellules ont été cultivées en milieu pauvre en glucose (1g/L, LG) ou riche en glucose (4,5g/L, HG). En LG, les cellules MCF7 se distinguent par une utilisation plus importante de la respiration mitochondriale, comme indiqué par la consommation d'oxygène (OCR, *Oxygen consumption rate*) plus élevée que pour les autres lignées. En présence d'une haute concentration de glucose, seules les cellules MDA-MB-231 et U87-MG adaptent leur métabolisme en augmentant leur glycolyse, comme indiqué par l'acidification de leur milieu extérieur (ECAR, *extracellular acidification rate*), un reflet de la glycolyse (Fig. 50 A). Ces observations confirment, en tout cas pour les lignées cancéreuses mammaires, les phénotypes métaboliques reportés dans la littérature où les cellules MDA-MB-231 sont considérées comme glycolytiques alors que les cellules MCF7 sont considérées comme plus oxydatives¹². Pour confirmer ces profils glycolytiques, nous avons mesuré le L-Lactate accumulé dans le milieu conditionné par ces cellules. Nous avons constaté une augmentation de la production de L-Lactate au niveau des cellules MDA-MB-231 et U87-MG sous stimulus de glucose, signant l'élévation de leur glycolyse (Fig. 50 B). L'augmentation du flux glycolytique dans ces cellules s'accompagne logiquement d'une production plus élevée de MG (Fig. 50 C) comme détecté par cytométrie en flux grâce à la sonde MBo. L'induction du stress dicarbone au niveau des cellules MDA-MB-231 et U87-MG provoque une stimulation de la détoxification du MG par le système des glyoxalases et indiqué par l'augmentation de la production de D-Lactate, le produit de cette réaction (Fig. 50 D).

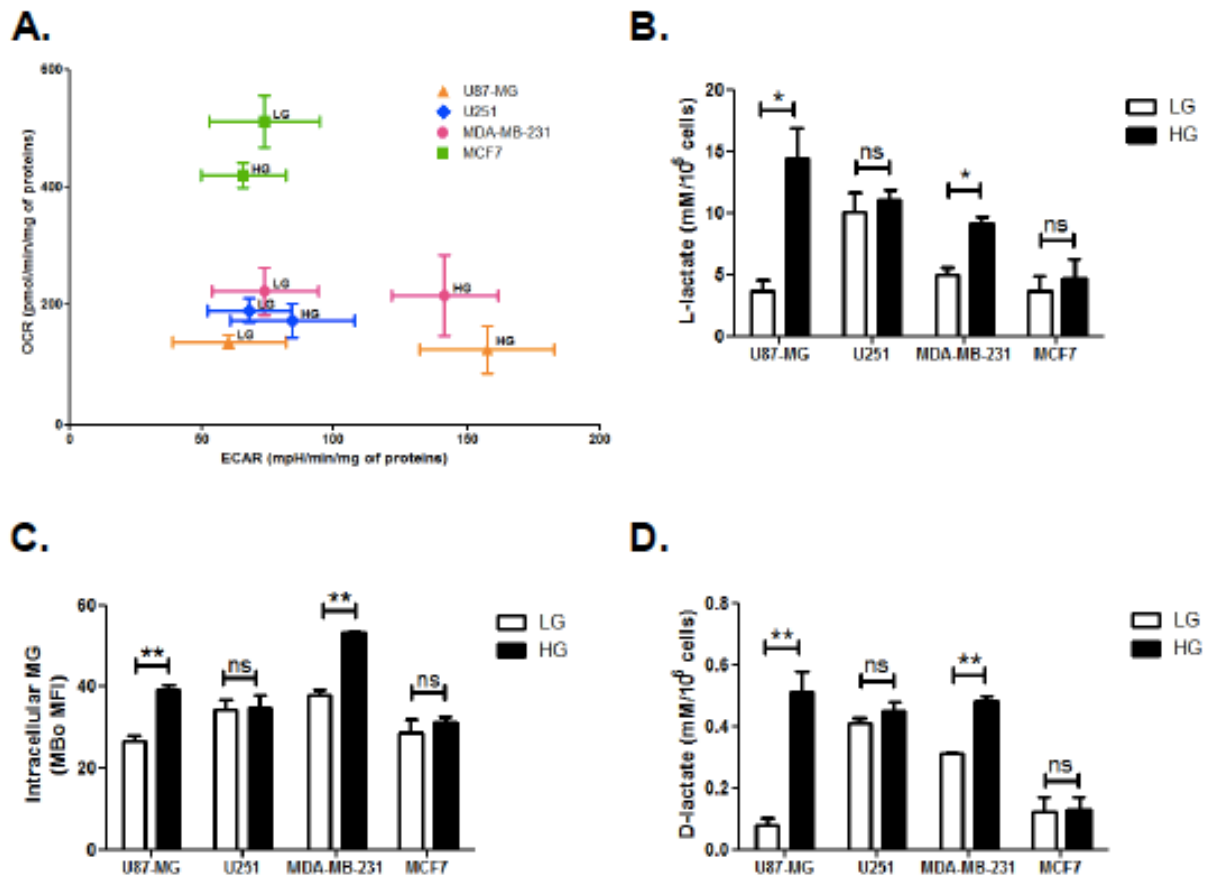


Figure 50. Evaluation du profil métabolique et du stress dicarboxyle. Les cellules U87-MG, U251, MDA-MB-231 et MCF7 ont été cultivées en milieu à faible (LG) ou haute (HG) teneur en glucose. (A) Profil métabolique établi par mesure de la consommation d'oxygène (OCR) et du taux d'acidification du milieu extérieur (ECAR) sur le Seahorse. (B) Mesure du L-Lactate au niveau du milieu conditionné 48h par les cellules. (C) Evaluation du MG intracellulaire en cytométrie en flux en utilisant la sonde Mbo. (D) Mesure du D-Lactate au niveau du milieu conditionné 48h par les cellules cancéreuses.

Les effets du stress dicarboxyle ont été en général attribués au stress oxydatif induit par le MG. Nous avons donc évalué le statut rédox dans les 4 lignées cellulaires d'intérêt. Le milieu riche en glucose induit une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) uniquement au niveau des cellules U87-MG qui en présentent un niveau de base plus élevé par rapport aux autres lignées considérées (Fig. 51 A). La mesure du rapport du glutathion réduit et oxydé (GSH/GSSG), un autre marqueur du statut rédox, ne révèle pas de perturbation suite à l'exposition au milieu riche en glucose. Il est intéressant de noter que les cellules MDA-MB-231 présentent le rapport GSH/GSSG le plus élevé par rapport aux autres cellules cancéreuses (Fig. 51 B).

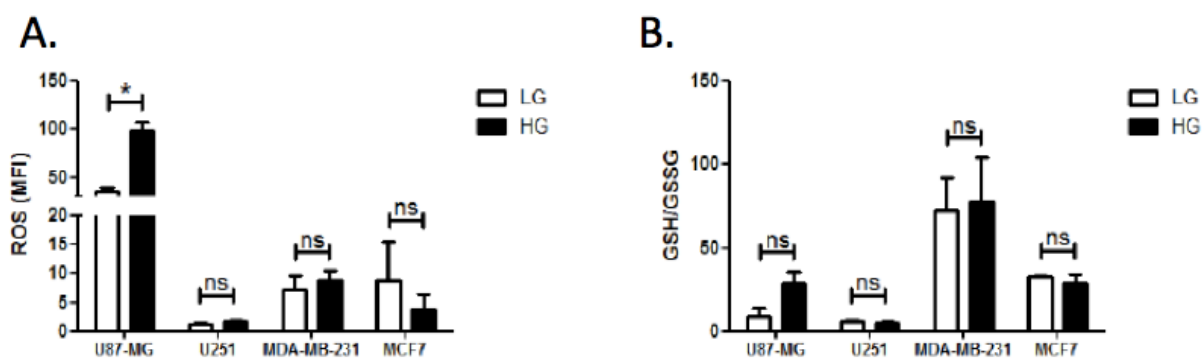


Figure 51. Evaluation du statut rédox. Les cellules U87-MG, U251, MDA-MB-231 et MCF7 ont été cultivées en milieu à faible (LG) ou haute (HG) teneur en glucose. (A) Mesure de l'accumulation des ROS avec la sonde CM-DCFDA par cytométrie en flux. (B) Mesure du rapport GSH/GSSG.

De façon à mieux caractériser la réponse des cellules tumorales au stress dicarbone, nous avons traité les cellules cultivées en milieu LG avec des doses croissantes de MG. Pour ce faire, nous avons d'abord déterminé la dose de MG induisant une diminution de viabilité cellulaire de moitié (IC50). Nous avons comparé les 4 lignées cancéreuses à une lignée de cellules normales, les cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) pour lesquelles des études concernant le MG ont déjà été réalisées dans le domaine du diabète^{200,285}. Il est intéressant de noter que les valeurs d'IC50 (Fig. 52) des cellules cancéreuses sont plus élevées que dans les cellules normales HUVEC, indiquant une plus grande résistance des cellules tumorales à la toxicité liée au stress dicarbone. De façon surprenante, les cellules se montrant les plus résistantes sont les cellules cancéreuses mammaires MCF7, alors que d'après nos résultats précédents, nous nous serions attendu à une plus grande résistance des cellules glycolytiques MDA-MB-231.

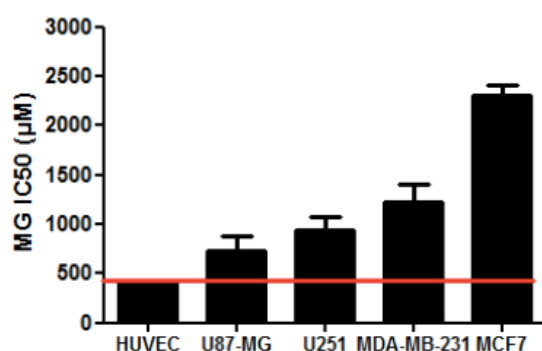


Figure 52. Détermination de l'IC50 du MG au niveau de cellules humaines normales et tumorales. Les cellules ont été traitées pendant 24h avec des doses croissantes de MG. L'IC50 a été calculée comme la concentration de MG nécessaire pour réduire de moitié la quantité d'ADN des cellules.

Nous nous sommes ensuite demandé si les cellules cancéreuses présentaient un potentiel de détoxification du MG différent en présence de doses exogènes de ce dicarbone. Nous avons confirmé l'induction d'un stress dicarbone dans les cellules traitées 6 et 24h au MG par la mise en évidence de l'accumulation augmentée des adduits MG-H1 et argpyrimidines (Fig. 53 A). Ensuite, nous avons constaté l'élévation du taux de MG intracellulaire par FACS au niveau des cellules traitées avec du MG exogène (Fig. 53 B). Il est intéressant de noter que pour une même dose de MG, les cellules glycolytiques U87-MG et MDA-MB-231 présentent un niveau de MG intracellulaire significativement plus élevé que les cellules U251 et MCF7 (environ 60 fois contre 20-30 fois), ce qui pourrait en partie expliquer la résistance inattendue des cellules MCF7 à la toxicité du MG. Cependant après 24h, le niveau de MG intracellulaire revient à un niveau comparable dans toutes les lignées testées. Cette égalisation des taux de MG au niveau des cellules glycolytiques U87-MG et MDA-MB-231 pourrait être la conséquence d'un système de détoxification plus efficace au niveau des cellules glycolytiques. En effet, sous traitement au MG, les cellules U87-MG et MDA-MB-231 sont capables d'augmenter significativement l'activité maximale de l'enzyme Glo1 (Fig. 53 C).

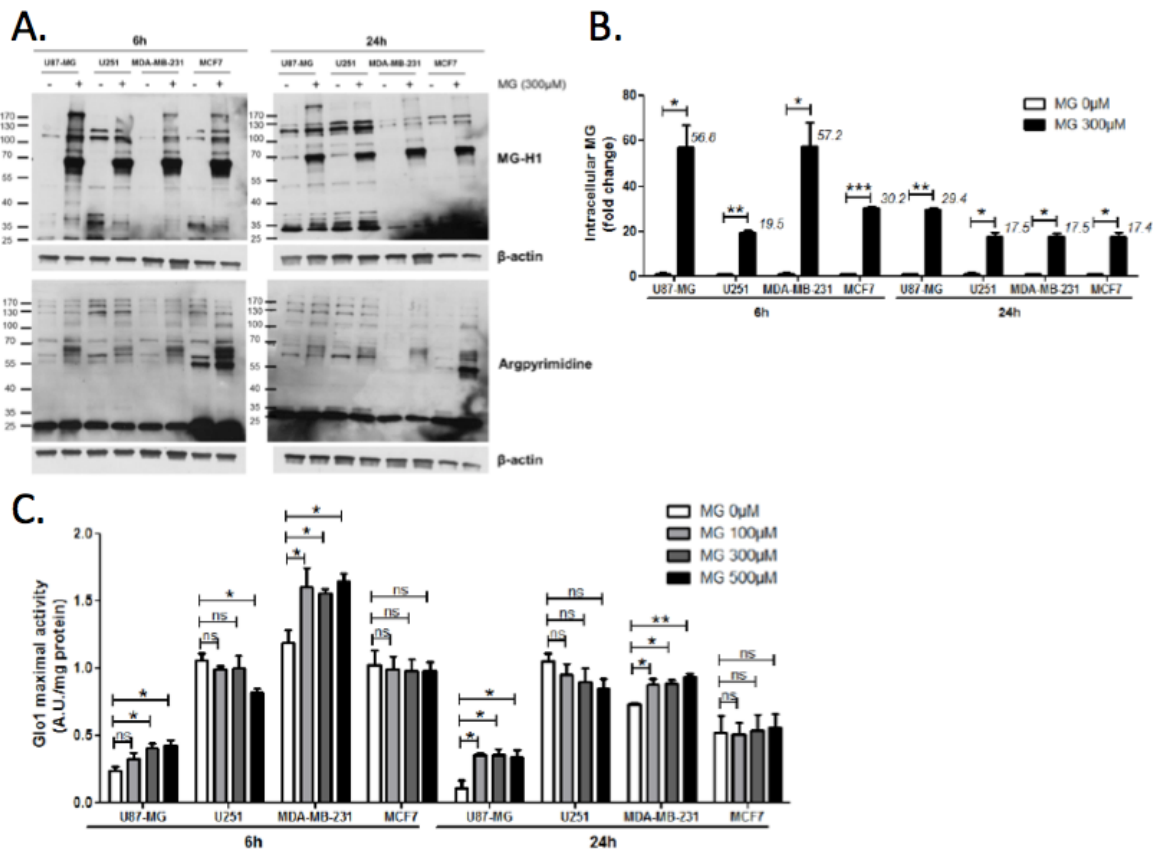


Figure 53. Evaluation du stress dicarbonyl induit par traitement au MG au niveau de cellules cancéreuses. Les cellules U87-MG, U251, MDA-MB-231 et MCF7 ont été traitées pendant 6 et 24h aux doses de MG indiquées. (A) Détection de l'accumulation des adduits MG-H1 et argpyrimidines par immunoblot. (B) Mesure du MG intracellulaire par FACS avec la sonde MBo. (C) Mesure de l'activité maximale Glo1.

Jusqu'à présent, les résultats montrent que les cellules glycolytiques, U87-MG et MDA-MB-231, sont capables d'une détoxification du MG plus efficace que les cellules non-glycolytiques comme les cellules U251 et MCF7. L'évaluation des niveaux d'ARNm et protéiques de Glo1 et NRF2, son régulateur au niveau transcriptionnel, confirment la réponse des cellules glycolytiques au stress dicarbonyl. En effet, à la fois au niveau génique et protéique, le traitement au MG induit l'expression de Glo1 (Fig. 54 A, C) et Nrf2 (Fig. 54 B, C) au niveau des cellules glycolytiques. Ces observations confirment l'adaptation de ces cellules au stress dicarbonyl par une régulation *de novo* de la détoxification via le système Glo1.

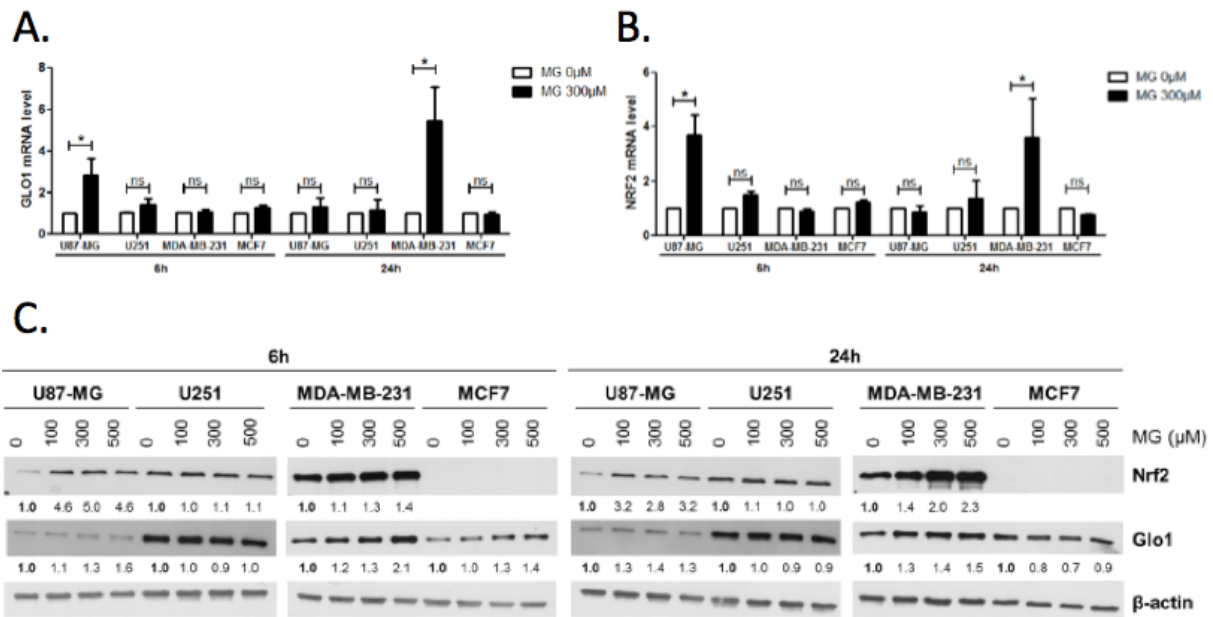


Figure 54. Réponse des cellules glycolytiques au stress dicarbonyl exogène. Les cellules U87-MG, U251, MDA-MB-231 et MCF7 ont été traitées pendant 6 et 24h aux doses de MG indiquées. Détection des niveaux d'ARNm par RT-qPCR de (A) GLO1 et (B) NRF2. (C) Détection des niveaux protéiques de Nrf2 et Glo1 par immunoblot.

La littérature fait état d'une induction de la quantité de ROS dans des cellules traitées au MG²⁸⁶ ce qui pourrait être à l'origine de l'augmentation de observée de Nrf2 puisque ce facteur de transcription est activé par le stress oxydant²⁸⁷. Nous avons donc évalué l'accumulation des ROS au niveau des cellules traitées au MG et dans ces conditions, nous n'observons pas d'élévation des ROS (Fig. 55). Ceci indique que la stimulation de Nrf2 sous traitement au MG est probablement indépendante du stress oxydatif et a lieu mais bel et bien en réponse au stress dicarbonyl.

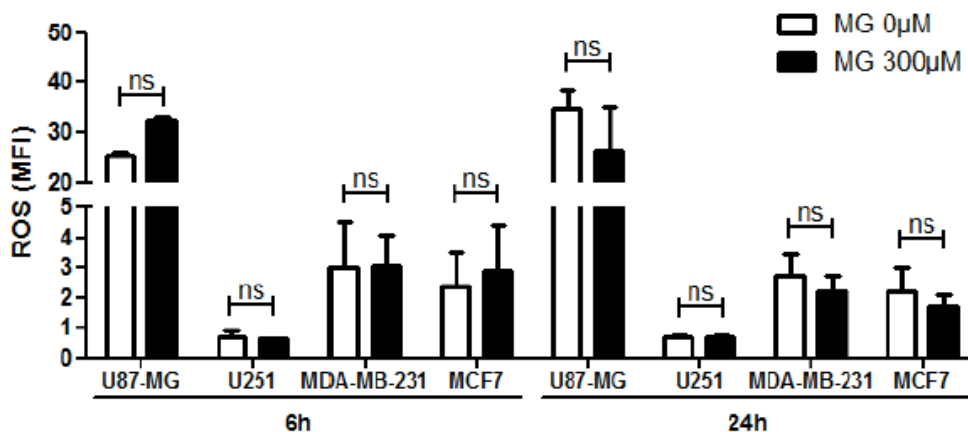


Figure 55. Evaluation des ROS au niveau des cellules cancéreuses traitées au MG. Mesure de l'accumulation des ROS avec la sonde CM-DCFDA par FACS au niveau des cellules U87-MG, U251, MDA-MB231 et MCF7 traitées au MG300µM pendant 6 et 24h.

Vu la capacité des cellules glycolytiques à augmenter l'activité maximale de Glo1 en milieu riche en glucose, nous nous sommes demandés si le même effet serait produit par un traitement avec du MG exogène. Après 6h de traitement, toutes les lignées testées montrent une augmentation de la production de D-Lactate (Fig. 56). Les cellules MDA-MB-231 détournent le plus efficacement le MG en D-Lactate. Après 24h de traitement, la quantité de D-Lactate produite devient comparable pour les 4 lignées mais reste augmentée de 5 fois par rapport au niveau basal (MG 0 μ M).

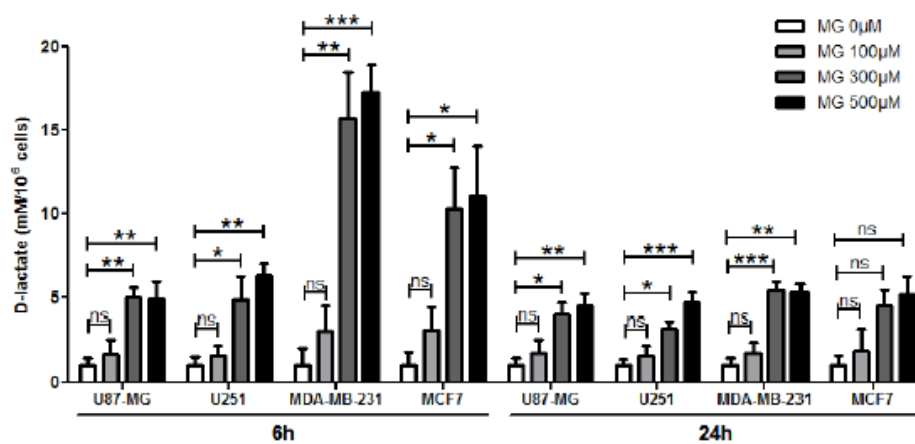


Figure 56. Evaluation de la détournement du MG par Glo1 au niveau des cellules cancéreuses traitées au MG. Mesure du D-Lactate au niveau des cellules U87-MG, U251, MDA-MB231 et MCF7 traitées au MG300 μ M pendant 6 et 24h.

Bien que les cellules U87-MG et MDA-MB-231 augmentent l'expression et l'activité de Glo1 sous traitement au MG, nous avons remarqué que les cellules U87-MG ne produisent pas autant de D-Lactate que les cellules cancéreuses mammaires. Un facteur limitant de l'activité Glo1 au niveau de ces cellules de GBM pourrait être la disponibilité faible de GSH, le cofacteur de Glo1, par rapport aux cellules MDA-MB-231 (Fig. 51 B). Ces observations nous ont mené à envisager la possibilité selon laquelle les cellules U87-MG utilisent un système alternatif de détournement comme les enzymes aldo-kéto réductases (AKRs). Cette famille d'enzymes a déjà été étudiée dans le contexte du cancer et certains membres tels que AKR1B10, AKR1C1 et AKR1C3 ont été associés à la prolifération et à la résistance à la chimiothérapie dans le glioblastome et le cancer du sein^{288,289}. Nous avons donc évalué le niveau d'expression génique de cette famille d'enzymes au niveau des 4 lignées étudiées. De façon intéressante, les cellules U87-MG présentent les niveaux d'ARNm les plus élevés pour ces enzymes (Fig. 57 A). L'activité globale des AKR est en effet la plus importante au niveau des cellules U87-MG (Fig. 57 B).

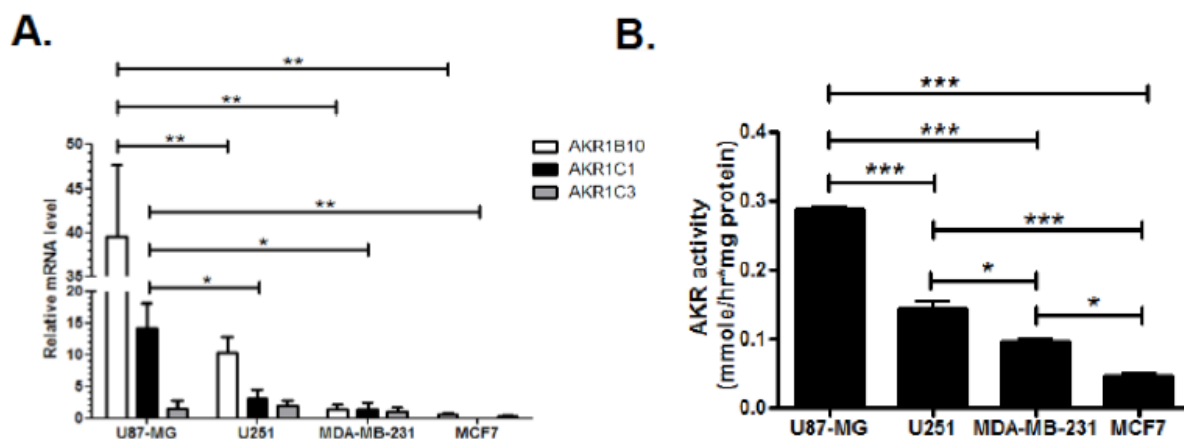


Figure 57. Les AKR, système alternatif de détoxification du MG. (A) Détection par RT-qPCR des niveaux d'ARNm de AKR1B10, AKR1C1 et AKR1C3 au niveau des cellules U87-MG, U251, MDA-MB-231 et MCF7. (B) Mesure de l'activité globale AKR par la quantification de la conversion de NADPH (mmole/hr*mg protein).

Pour vérifier si ce mécanisme alternatif de détoxification du MG pouvait aussi être stimulé par le stress dicarbyloyle, nous avons traité les cellules au MG et nous avons pu constater une augmentation de l'activité globale des AKR au niveau des cellules MDA-MB-231 traitées pendant 24h au MG 300µM (Fig. 58). L'activité AKR sous stimulus de MG exogène reste stable au niveau des cellules U87-MG qui présentent déjà une activité basale élevée et donc potentiellement suffisante pour gérer le stress dicarbyloyle induit par le traitement au MG.

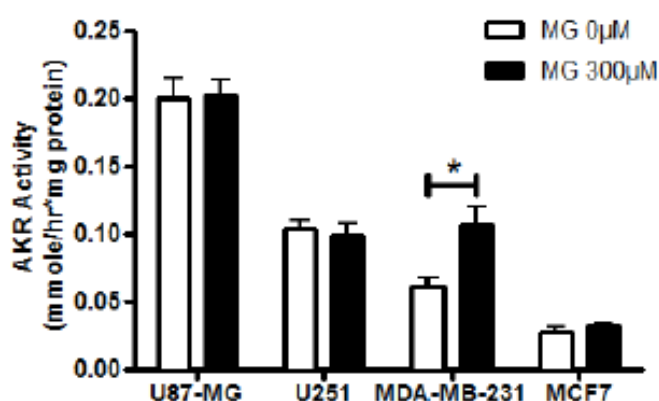


Figure 58. Augmentation de l'activité globale AKR au niveau des cellules MDA-MB-231 sous traitement au MG. Après un traitement de 24h au MG 300µM, mesure de l'activité globale AKR au niveau des cellules U87-MG, U251, MDA-MB-231 et MCF7 cultivées en milieu LG.

Pour explorer l'hypothèse selon laquelle les cellules cancéreuses puissent utiliser un mécanisme compensatoire de détoxification du MG, comme récemment rapporté dans une publication utilisant des cellules de Schwann murines

immortalisées²⁹⁰, nous avons inhibé l'activité Glo1 par un traitement au BBGC. Ce traitement induit une augmentation du MG intracellulaire au niveau des 4 lignées testées (Fig. 59 A). Dans ces conditions, l'expression d'AKR1B10 est induite au niveau de l'ARNm dans les cellules U87-MG et MDA-MB-231 (Fig. 59 B), démontrant encore la capacité de ces cellules glycolytiques à mieux gérer le stress dicarbone et une adaptation à la perte de Glo1. Nous avons également évalué l'activité globale des AKR après traitement au BBGC et seules les cellules U87-MG montrent une augmentation significative de cette activité compensatoire (Fig. 59 C). Les cellules U87-MG, ayant une expression et une activité basale de Glo1 plus faible que dans les 3 autres lignées, auraient recours au système alternatif des AKR pour détoxifier le MG, ce qui peut expliquer leur meilleure réponse en cas d'inhibition de Glo1.

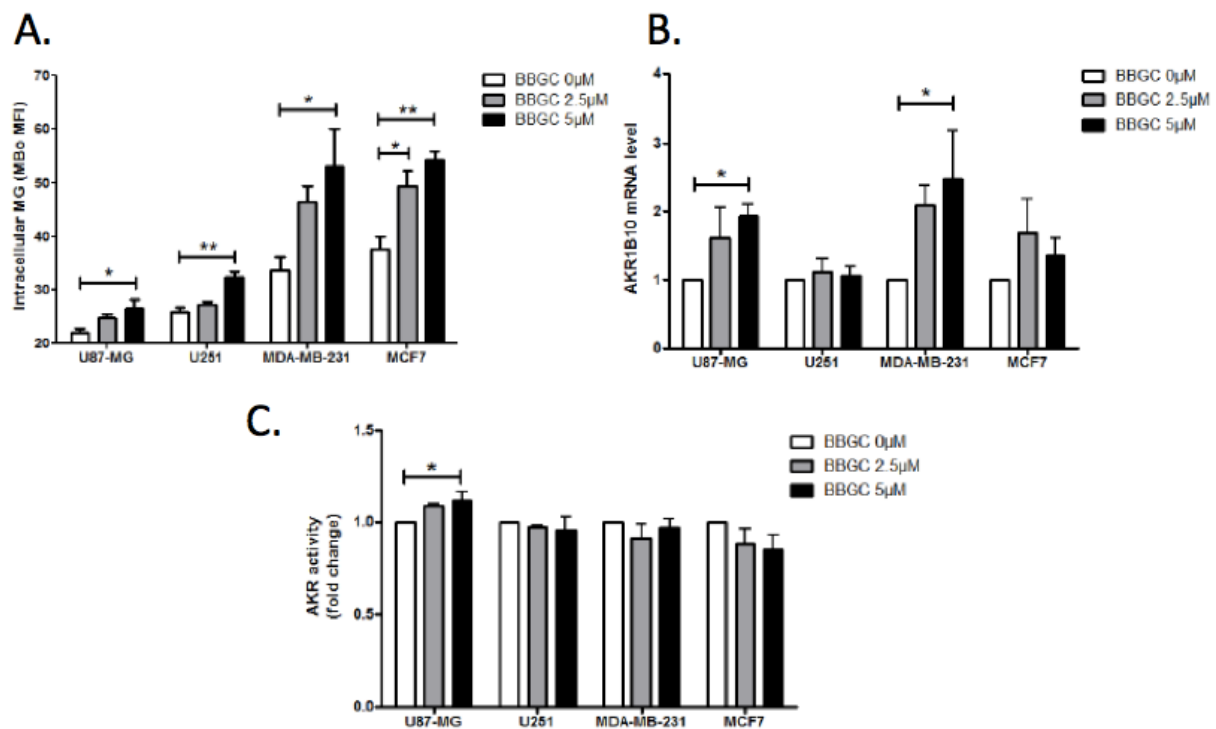


Figure 59. AKR, un mécanisme alternatif et compensatoire de détoxification du MG dans les cellules cancéreuses. Les cellules U87-MG, U251, MDA-MB-231 et MCF7 sont traitées 48h au BBGC pour inhiber l'activité Glo1. (A) Mesure du MG intracellulaire avec la sonde MBo par cytométrie en flux. (B) Détection par RT-qPCR de l'ARNm AKR1B10. (C) Mesure de l'activité relative globale des AKR.

L'ensemble de ces résultats met en lumière le fait que toutes les cellules cancéreuses ne sont pas égales face au MG. En effet, différents paramètres sont à considérer pour évaluer la réponse des cellules tumorales au stress dicarbone. Tout d'abord, le métabolisme énergétique : les cellules glycolytiques produisent spontanément plus de MG et seraient donc mieux adaptées à vivre dans cet

environnement de stress dicarbone. De telles cellules sont donc à priori mieux équipées pour faire face à la toxicité du MG. Le statut rédox des cellules est aussi à considérer. La littérature fait état d'un lien entre stress oxydant et stress dicarbone, l'un entraînant l'autre^{200,291-294}. Un autre point commun de ces 2 stress est le glutathion réduit. En effet le GSH est une molécule majeure dans la défense anti-oxydante mais aussi le cofacteur de Glo1 dans la détoxification du MG. Enfin, Nrf2, facteur de transcription associé à la réponse au stress, est non seulement responsable de l'activation de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la défense contre les ROS²⁸⁷ mais aussi des enzymes de détoxification du MG, Glo1 et les AKR. Nous avons démontré que les cellules cancéreuses glycolytiques ont une activité Glo1 et AKR basale ou inductible par le stress carbonyle plus élevée que les cellules non glycolytiques. Les niveaux d'expression et d'activité de ces deux systèmes de détoxification sont donc aussi des paramètres importants pour déterminer l'impact du MG sur les cellules cancéreuses.

Finalement, pour adresser le rôle ambivalent du MG dans les tumeurs, nous avons implanté des cellules U87-MG en modèle de croissance tumorale CAM. Les tumeurs ont été traitées quotidiennement avec des doses croissantes de MG puis récoltées après 7 jours. De façon intéressante, nous avons observé une augmentation du volume tumoral en présence de faibles doses de MG tandis qu'à plus hautes doses, la croissance tumorale était réduite (Fig. 60 A). Ce profil biphasique de la croissance tumorale sous traitement au MG met en évidence un rôle hormétique du MG sur les tumeurs et a aussi été observé en utilisant les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Fig. 60 B). L'hormésis est définie comme « un processus dans lequel l'exposition à de faibles doses d'un agent chimique ou facteur environnemental, qui est toxique à plus fortes doses, induit un bénéfice adaptatif sur la cellule ou l'organisme »²⁹⁵.

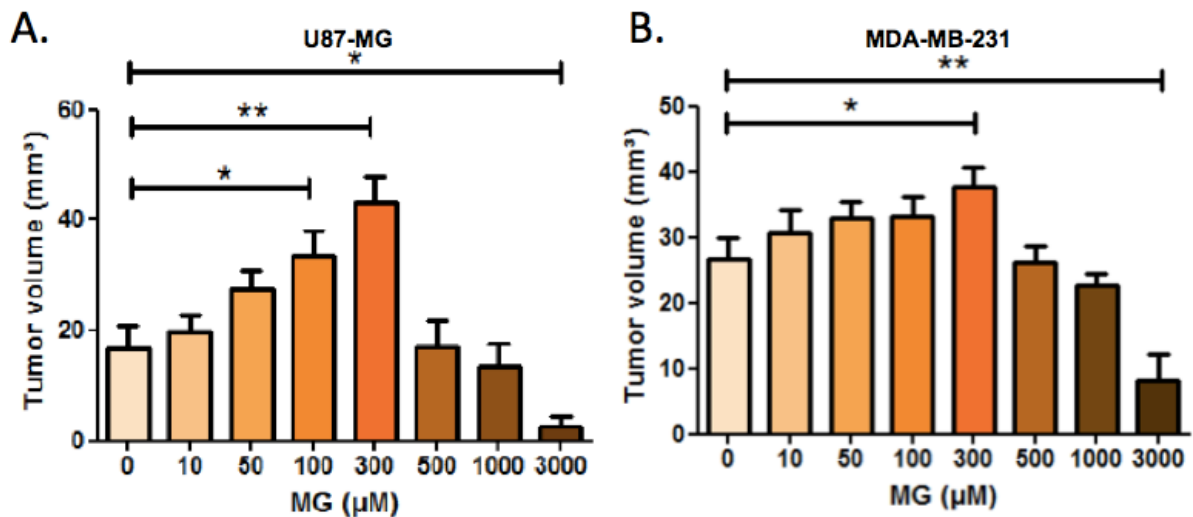


Figure 60. Effet hormétique du MG sur la croissance de tumeurs sur CAM. Des cellules U87-MG (A) ou MDA-MB-231 (B) ont été implantées sur la CAM et traitées pendant 7 jours avec des doses croissantes de MG.

Ensuite, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle les effets du MG pourraient être contrecarrés par un traitement avec la Carnosine, un puissant inhibiteur du MG. En effet, le co-traitement à la Carnosine des tumeurs U87-MG inverse le profil hormétique induit par le MG, à la fois aux doses pro-tumorales et aux doses anti-tumorales de MG (Fig. 61).

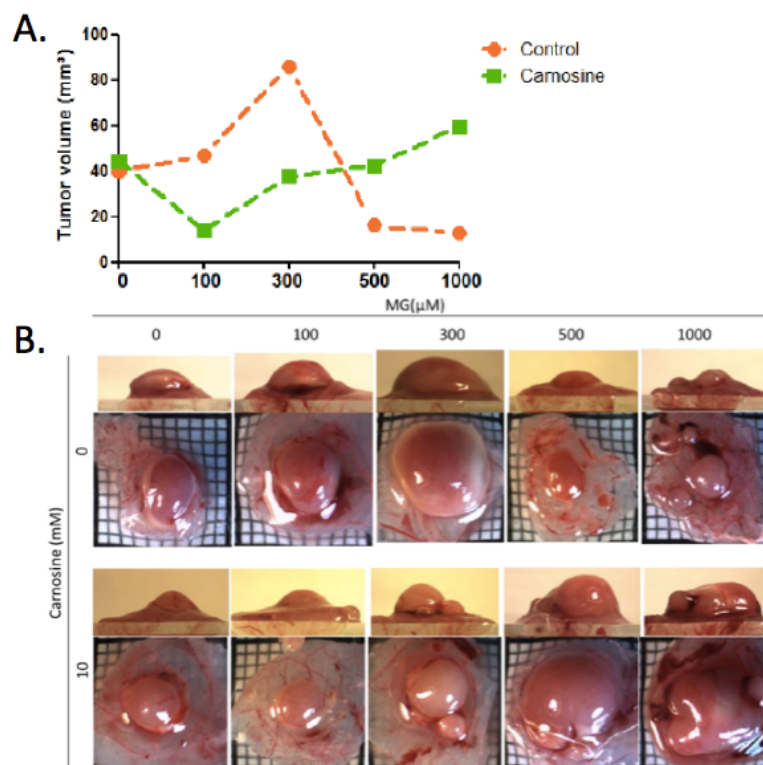


Figure 61. Inversion du profil hormétique du MG par la Carnosine. (A) Volume des tumeurs U87-MG récoltées sur la CAM après 7 jours de traitement MG seul ou avec Carnosine. (B) Images représentatives des tumeurs de l'expérience décrite en A.

Nous avons ensuite analysé les tumeurs récoltées sur la CAM et avons procédé à des marquages immunohistochimiques. D'abord, l'augmentation du volume tumorale sous traitement à faibles doses de MG correspond à une augmentation de la proportion des cellules présentant un marquage nucléaire du marqueur de prolifération Ki67. Le co-traitement des tumeurs à la Carnosine inverse cette tendance (Fig. 62).

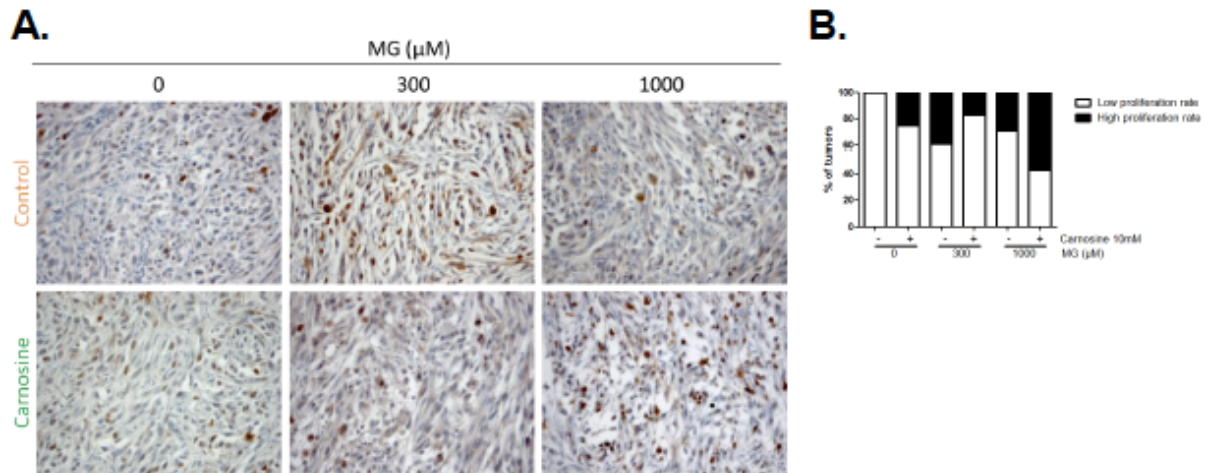


Figure 62. Induction de la prolifération par le MG et inversion par la Carnosine dans les tumeurs CAM. (A) Images représentatives du marquage Ki67 au niveau des tumeurs U87-MG développées sur CAM avec traitement au MG seul ou avec la Carnosine. Quantification de la proportion des tumeurs présentant un taux prolifératif faible (quand maximum 30% des cellules sont positives pour Ki67) ou élevé (quand plus de 30% des cellules sont pour Ki67).

Pour tenter d'élucider le(s) mécanisme(s) lié(s) à la diminution du volume des tumeurs traitées à hautes doses de MG, nous avons évalué l'apoptose au niveau de cellules U87-MG traitées à des doses croissantes de MG. Aux doses les plus élevées, le traitement au MG induit l'apoptose des cellules de glioblastome. Cette mort cellulaire peut être empêchée par co-traitement à la Carnosine (Fig. 63).

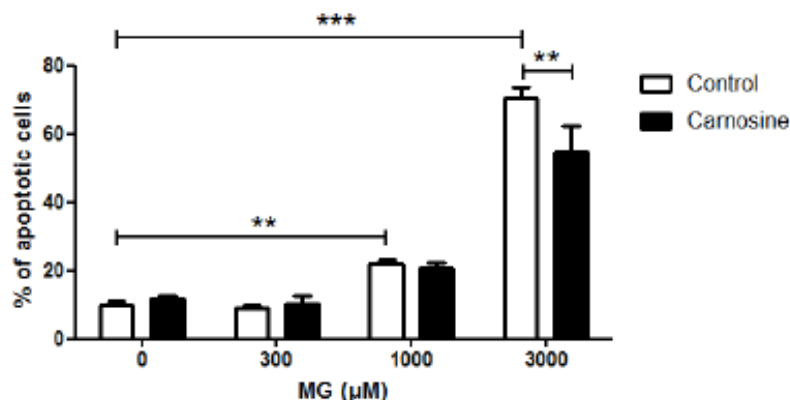


Figure 63. Induction de l'apoptose des cellules U87-MG par traitement avec des doses élevées de MG. Evaluation de l'apoptose par cytométrie en flux au niveau de cellules U87-MG traitées aux doses indiquées de MG et de Carnosine.

Pour finir, nous avons évalué l'induction du stress carbonyle au niveau des tumeurs développées sur la CAM. Nous avons détecté la présence des adduits protéiques du MG, MG-H1 (Fig. 64 A) et Argpyrimidine (Fig. 64 C), par immunohistochimie. Nous avons observé une augmentation dose-dépendante de l'accumulation des adduits qui est inhibée par le co-traitement des tumeurs à la Carnosine (Fig. 64 B, D).

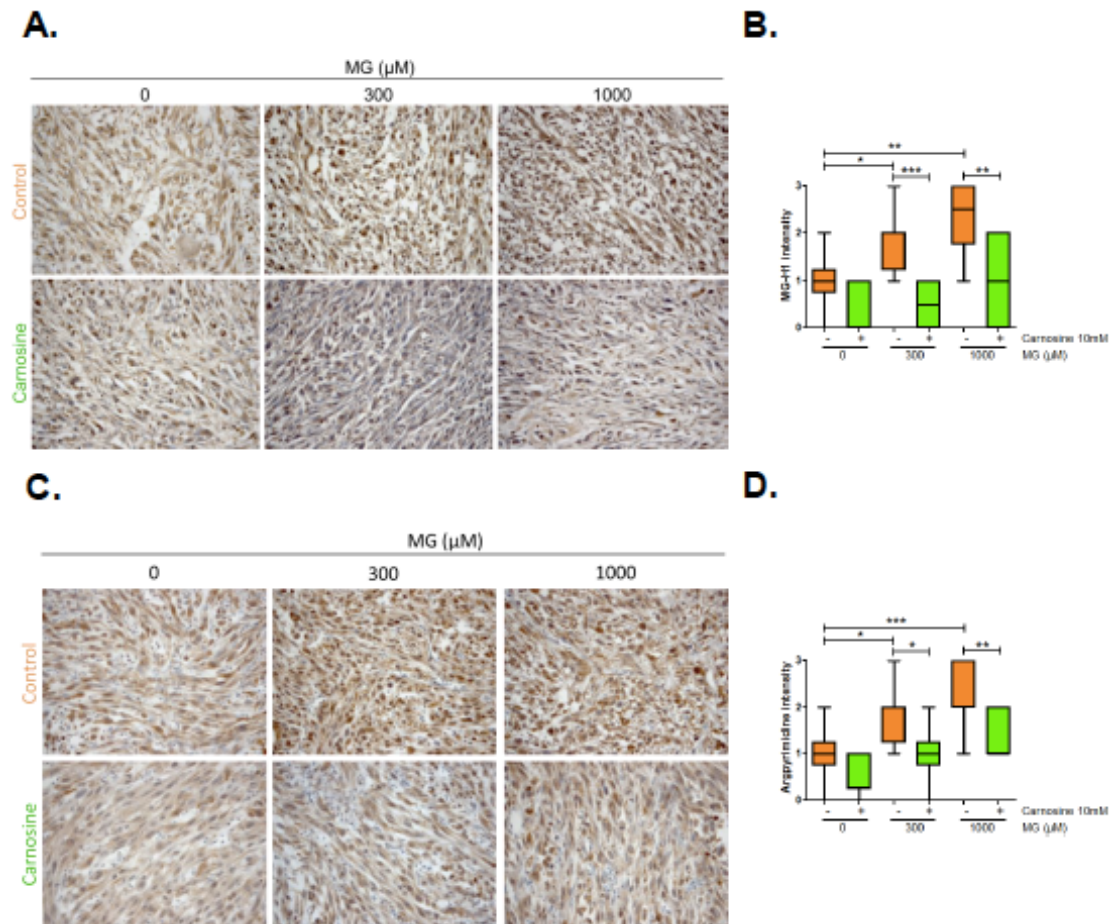


Figure 64. Evaluation du stress dicarbonyle au niveau des tumeurs expérimentales de CAM. Détection immunohistochimique des adduits MG-H1 et Argpyrimidine au niveau des tumeurs développées sur la CAM à partir des cellules U87-MG, traitées au MG et à la Carnosine aux doses indiquées. Images représentatives et quantification du marquage des adduits MG-H1 (A et B) et Argpyrimidine (C et D).

3.3 Conclusions

Collectivement, nos résultats démontrent pour la première fois un effet hormétique du MG. Cet effet dose-dépendant pourrait expliquer, avec la différence de gestion du stress carbonyle par les cellules cancéreuses, le rôle ambivalent du MG reporté dans la littérature. De plus, nous avons montré que le traitement à la Carnosine pouvait inverser les effets pro et anti-tumoraux du MG dans un modèle de croissance tumorale *in vivo*.

Hormetic potential of Methylglyoxal in switching cancer cells from growth to death

Nokin MJ*, **Durieux F***, Bellier J, Peulen O, Uchida K, Spiegel DA, Cochrane JR, Hutton CA, Castronovo V and Bellahcène A

**Accepted under minor review at
Scientific Reports (August 2017)**

**Hormetic potential of methylglyoxal, a side-product of glycolysis,
in switching tumours from growth to death**

Marie-Julie Nokin^{1#}, Florence Durieux^{1#}, Justine Bellier¹, Olivier Peulen¹, Koji Uchida², David A. Spiegel³, James R. Cochrane⁴, Craig A. Hutton⁴, Vincent Castronovo¹ and Akeila Bellahcène^{1*}

[#] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author

¹Metastasis Research Laboratory, GIGA-CANCER, University of Liège, Liège, Belgium

²Laboratory of Food Chemistry, Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

³Department of Chemistry, Yale University, 225 Prospect Street, New Haven, Connecticut, USA

⁴School of Chemistry and Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, University of Melbourne, Australia

***Corresponding author:**

Akeila BELLAHCENE

University of Liège, GIGA-CANCER

Metastasis Research Laboratory

Pathology Tour, +4 level, Building 23

4000 Liège, BELGIUM

Tel. +32 4 366 25 57

Fax +32 4 366 29 75

a.bellahcene@ulg.ac.be

ABSTRACT

Metabolic reprogramming toward aerobic glycolysis unavoidably favours methylglyoxal (MG) and advanced glycation end products (AGEs) formation in cancer cells. MG was initially considered as a highly cytotoxic molecule with potential anti-cancer value. However, we have recently demonstrated that MG enhanced tumour growth and metastasis. In an attempt to understand this dual role, we explored MG-mediated dicarbonyl stress status in four breast and glioblastoma cancer cell lines in relation with their glycolytic phenotype and MG detoxifying capacity. In glycolytic cancer cells cultured in high glucose, we observed a significant increase of the conversion of MG to D-lactate through the glyoxalase system. Moreover, upon exogenous MG challenge, glycolytic cells showed elevated amounts of intracellular MG and induced *de novo* Nrf2 and GLO1 expression. Thus, supporting the adaptive nature of glycolytic cancer cells to MG dicarbonyl stress when compared to non-glycolytic ones. Finally and consistent with the pro-tumoural role of MG, we showed that low doses of MG induced AGEs formation and tumour growth *in vivo*, both of which can be reversed using a MG scavenger. Our study represents the first demonstration of a hormetic effect of MG defined by a low-dose stimulation and a high-dose inhibition of tumour growth.

INTRODUCTION

Most of the cancer cells favour glucose uptake and process it to lactate to generate their energy. This metabolic switch from oxidative respiration to aerobic glycolysis is commonly known as the Warburg effect¹. Although described since more than 50 years, it is only in this last decade that intense research efforts attempted to understand how the Warburg effect benefits to cancer cells. It is actually considered that enhanced glycolytic flux in cancer cells notably contributes to rapid ATP production, biosynthesis of building blocks and cell signalling, a set of processes essential for long term uncontrolled cancer cell proliferation and survival². One underestimated consequence of such favoured use of glycolysis by cancer cells is the formation of reactive dicarbonyl species such as methylglyoxal (MG).

MG is a metabolic side-product that is mainly produced following the fifth reaction of the glycolysis through the spontaneous dephosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP). Other cellular sources of MG include sugars, amino acids and acetone (for review, ³). As a highly reactive dicarbonyl molecule, MG interacts with the side chain amino group of arginine and lysine and the thiol group of cysteine residues to form advanced glycation end products (AGEs) such as the hydroimidazolones (MG-Hs) and argpyrimidines. MG also glycates lipids and nucleic acids and thus induces major cell dysfunction at proteomic and genomic levels that is referred to as dicarbonyl stress. Glyoxalases 1 and 2 (GLO1 and GLO2) are MG detoxifying enzymes that contribute to control MG level and cytotoxicity by efficiently converting MG to D-lactate in the presence of reduced glutathione (GSH). GLO1 overexpression has been reported in several cancer types among which breast⁴, melanoma⁵ and colon cancers⁶. Other enzymes that have been reported to convert MG into non-toxic compounds include

aldo-keto reductase family (AKRs)⁷. Although their activity has been considered negligible compared to the glyoxalase system^{8,9}, a recent study has highlighted AKR activity induction as a compensatory mechanism upon GLO1 loss in immortalized murine Schwann cells¹⁰.

Based on its potent cytotoxic effects, MG has been tested in preclinical settings as a potential therapeutic agent against cancer in the early '70s. MG intra-peritoneal or intra-venous injection to tumour-bearing mice showed a significant reduction of tumour size¹¹⁻¹³. However, the high toxicity of MG to normal cells excluded any potential development in human therapy. Other strategies to induce high MG stress in cancer cells included the use of cell permeable GLO1 inhibitors such as S-*p*-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC)^{14,15}. Sakamoto and collaborators demonstrated that BBGC selectively induced apoptosis in human lung cancer cells that overexpressed GLO1¹⁶. Since then, other studies have confirmed the positive correlation between high cellular GLO1 activity and BBGC sensitivity¹⁷.

Our group is among the first to study dicarbonyl stress in cancer. We have reported the consistent accumulation of MG adducts in breast and colon cancer tumours compared to their normal counterparts^{18,19}. More recently, we have demonstrated that GLO1 inhibition in MDA-MB-231 breast cancer cells favours tumour growth and metastases in a xenograft mouse model²⁰ thus establishing a functional link between MG stress and tumour progression. Previous to our studies, MG was essentially considered for its pro-apoptotic effects in cancer cells. Accordingly, we have recently proposed the view of a dual role for MG in cancer²¹.

We designed this study in order to explore further the effect of MG stress on cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Our data demonstrated that cancer cells responded to both endogenous and exogenous MG by increasing their D-lactate secretion, an

indicator of GLO1 detoxification. We report for the first time that glycolytic cancer cells present a specific response to MG challenge notably consisting of *de novo* expression of GLO1 and Nrf2 at the mRNA and protein levels. Finally, using an *in vivo* tumour model we demonstrated the tumour pro-growth effect of MG at low concentration and its pro-apoptotic effect at high concentration.

RESULTS AND DISCUSSION

Energetic metabolism characterization of cancer cell lines in relation with endogenous MG level and detoxification potential. The Warburg effect through which most cancer cells preferentially use glycolysis is expected to have a major impact on the amount of intracellular MG. To our knowledge, the potential relationship between the two has not been thoroughly explored. We first undertook the characterization of the energetic metabolism in GBM (U87-MG and U251) and breast cancer (MDA-MB-231 and MCF7) cell lines cultured under low (LG) and high glucose (HG) conditions. On the metabolic profile diagram generated using the Seahorse extracellular flux analyzer (Figure 1A), MCF7 cells consistently showed a higher oxygen consumption rate (OCR), the indicator of mitochondrial respiration, when compared to MDA-MB-231 that is typically considered as a glycolytic cancer cell line. No major differences were observed in term of OCR between LG and HG cultured cancer cell lines. Upon LG culture condition, all the cell lines showed similar extracellular acidification rate (ECAR), which reflects the glycolytic function of the cells. However, when cultured in HG medium only MDA-MB-231 and U87-MG cells increased their glycolytic potential as indicated by the right shift on ECAR axis (Figure 1A). L-lactate accumulation in the conditioned medium, further confirmed an increased glycolysis flux observed in U87-MG and MDA-MB-231 cells cultured in HG condition (Figure 1B). Furthermore, L-lactate increase was associated with enhanced intracellular MG levels as detected by FACS using MBo probe, a MG-specific fluorescent sensor in living cells²², in both glycolytic cell lines (Figure 1C).

The measure of D-lactate accumulation in cancer cell conditioned media, as a readout of cellular MG detoxification capacity by GLO1, demonstrated a significant increase of D-lactate production uniquely in U87-MG and MDA-MB-231 glycolytic

cells cultured in HG (Figure 1D). These results are in accordance with the increased glycolytic flux and MG production evidenced in these cells when cultured in HG.

As it has been demonstrated that MG induces oxidative stress in normal and cancer cells²³⁻²⁷, we next evaluated redox status in the 4 cancer cells lines cultured in LG and HG. U87-MG cells displayed an elevated basal ROS level when compared to the other cell lines and this level was significantly increased under HG culture condition (Figure 1E). When considering GSH/GSSG ratio, an indicator of the redox status, MDA-MB-231 had the highest basal content but HG culture did not affect GSH/GSSG ratio, in all the cell lines under study (Figure 1F).

MG stress status and GLO1 detoxification capacity of cancer cells in response to MG treatment. In order to better characterize the response of cancer cells to MG stress, we have next challenged them with increasing doses of exogenous MG. For this purpose, we first determined the half maximal inhibitory concentration values (IC50) of MG on cancer cell viability. We used human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a normal cell reference which sensitivity to MG has been previously reported^{28,29}. Interestingly, IC50 values revealed to be higher in cancer cells when compared to normal cells (Figure 2A), pointing to a superior resistance of cancer cells to MG cytotoxicity. MG IC50 values ranged below 1000 μ M for GBM cells and were slightly higher for breast cancer cells with MCF7 cells showing the highest IC50 (Figure 2A). Based on the results obtained under HG culture condition, we would have expected that glycolytic cancer cells might present with the more resistant phenotype toward exogenous MG challenge. One possible explanation for this apparent difference could be that these cells are, in fact, in the presence of higher amounts of free MG than non-glycolytic cells.

To test this hypothesis, we assessed MG intracellular concentrations using MBo specific probe (Figure 2B). Intracellular MG was significantly elevated in all cancer cells 6h and 24h after treatment with increasing doses of MG. Consistent with this effect was the detection of increased amounts of argpyrimidine and MG-H1 specific MG-adducts using western blot in all cancer cells after 6h of MG treatment (Figure 2C). While all cancer cells dose-dependently increased their intracellular MG level, it is noteworthy that U87-MG and MDA-MB-231 glycolytic cells showed a major MG increase of up to 60-fold (Figure 2B). Whereas MCF7 and U251 cells showed a less marked increase, that reached 20 and 30-fold over their respective basal levels (Figure 2B). These data establish that glycolytic cells accumulate more intracellular MG, when they are in the presence of exogenous MG than non-glycolytic cells. This observation could explain the low MG IC50 values determined for glycolytic cells. Actually, MG IC50 estimation in those cells probably does not accurately reflect their tolerance to exogenous supply of MG. Altogether, these results let us propose that glycolytic cancer cells either had up taken more exogenous MG and/or had produced more MG upon MG stimulus. Because MG freely equilibrates across the cytoplasmic membrane³⁰, high intracellular MG levels in glycolytic cells more likely result from an effect of MG on glycolytic flux. MG has been previously shown to inhibit GAPDH activity *in vitro*³¹ thus potentially favouring the accumulation of triose phosphate intermediates and subsequent accumulation of MG. Interestingly, Beisswenger and collaborators reported an inverse relationship between GAPDH activity and MG production in type 1 and 2 diabetic patients³². Considering that the expression/activity status of GAPDH is deregulated in cancer cells³³, it would be interesting to evaluate MG stress in this context.

After 24h of treatment, intracellular amounts of MG were equilibrated in all cell lines to 17 to 30-fold over their basal levels (Figure 2B). We reasoned that glycolytic cells might present with a more efficient detoxification capacity than non-glycolytic cancer cells. To evaluate this possibility, we next measured GLO1 maximal activity in these cells. We found that MDA-MB-231 and U87-MG cells significantly adapted their GLO1 detoxification capacity in the first 6 hours after exposure to MG when compared with MCF7 and U251 cells. For the latter cell lines, GLO1 maximal activity stayed constant and even decreased in the presence of the highest concentration of MG tested (Figure 2D).

Glycolytic cancer cells express increased amounts of GLO1 and Nrf2 in the presence of exogenous MG. Data gathered so far indicate that exogenous MG rapidly induces the accumulation of detectable protein adducts and support the hypothesis according to which glycolytic cancer cells present with a more efficient MG detoxification capability than non-glycolytic ones. Validating further this hypothesis, we found that increased GLO1 activity was accompanied by *de novo* expression of GLO1 mRNA (Figure 3A) and protein (Figure 3C) only in U87-MG and MDA-MB-231 cells. Thus, supporting the adaptive nature of glycolytic cancer cells to high MG stress when compared to non-glycolytic ones. Nrf2 stress-responsive transcription factor has been shown to exert a positive transcriptional control on *GLO1* gene expression³⁴. We next showed that Nrf2 expression was also increased at both the mRNA (Figure 3B) and protein (Figure 3C) levels upon MG treatment in U87-MG and MDA-MB-231 cells. This observation is compatible with an Nrf2-induced *de novo* regulation of GLO1 expression in glycolytic cancer cells upon MG stress. MG has been previously reported to induce reactive oxygen species (ROS) formation in cancer cells²⁶ and ROS can trigger Nrf2 expression³⁵. Therefore, we evaluated

ROS levels in parallel treatment experiments. MG treatment conditions did not influence ROS basal levels in all cells under study as measured using oxidized DCFDA detection by flow cytometry (Supplementary Figure 2).

We have observed an enhanced ability of glycolytic cancer cells to convert MG into D-lactate when cultured in HG medium (Figure 1D). Next, we asked whether increased GLO1 detoxification capacity would be associated with augmented D-lactate production upon MG treatment. Six hours after MG challenge, all cell lines showed an increased D-lactate production with the highest one (15-fold above basal level) observed in MDA-MB-231 cells. After 24h, D-lactate production was comparable in all cell lines and maintained at maximum 5-fold above the corresponding basal levels. Altogether these data indicate that increased MG production, associated with elevated glycolytic flux, is efficiently detoxified by GLO1 into D-lactate in cancer cells. Glycolytic cancer cells showed an enhanced GLO1 detoxifying capacity notably through the induction of GLO1 and Nrf2 expression. It is remarkable that glycolytic cells in the presence of endogenous MG (HG condition) are challenged with at least 10-fold less MG than under exogenous treatment. Increased MG detoxification to D-Lactate occurs in both cases but was not accompanied by an increase of GLO1 activity/ expression under low MG (Supplementary Figure 1). Thus suggesting for the first time that glycolytic cancer cells might be able to sense MG stress level and to adapt their detoxification capacity accordingly.

Other MG detoxifying enzymes are expressed in cancer cells and compensate for the loss of GLO1 activity. Although both U87-MG and MDA-MB-231 cells responded to high MG stress by increasing their GLO1 expression and activity, we noticed that U87-MG cells did not produce as much D-lactate as MDA-MB-231 cells.

As a cofactor of GLO1 enzyme, GSH cellular content might be limiting for GLO1 activity rate upon MG stress. U87-MG cells have a significantly lower GSH/GSSG basal level when compared with MDA-MB-231 cells (Figure 1F). Altogether, these observations let us envisage the possibility that U87-MG cells may use other MG detoxification enzymes such as aldo-keto reductases (AKRs). AKR family members such as AKR1B and AKR1C have been previously associated with cancer cell proliferation and resistance to chemotherapy in GBM and breast cancer^{36,37}. In order to explore this hypothesis, we first assessed AKR gene expression in the cancer cell lines under study. Basal levels of AKR1B10 and AKR1C1 mRNA were higher in GBM cells than in breast cancer cells, with U87-MG cells significantly displaying the highest amounts (Figure 4A). Global AKR activity assessed in these cells was consistent with their mRNA expression levels (Figure 4B). Interestingly, AKR activity increased in MDA-MB-231 cells in response to MG treatment while it remained stable in U87-MG cells which displayed high basal expression levels of AKRs (Figure 4C).

To further explore the possibility of a compensatory mechanism based on AKR enzymes expression in cancer cells, we induced GLO1 activity deficit in these cells using increasing concentrations of BBGC inhibitor. Whereas basal intracellular MG levels were lower in GBM than in breast cancer cells, they increased significantly in all cell lines in the presence of 5 μ M BBGC (Figure 4D). Finally, AKR1B10 mRNA levels showed a significant increase in both U87-MG and MDA-MB-231 cells upon BBGC treatment thus suggesting an adaptation to GLO1 activity loss in these cells (Figure 4E).

This part of the study let us demonstrate for the first time that glycolytic cancer cells are able to induce Nrf2 and GLO1 expression upon MG stress. Menegon and collaborators³⁸ have recently reviewed the dual roles of Nrf2 in cancer. The main

function of this transcription factor is to activate the antioxidant cellular response to protect cells from oxidative stress. However, Nrf2 not only protects normal cells from stress but also cancer cells, supporting the idea that it could be an oncogene. It is remarkable that GLO1 also plays a dual role in cancer. On the one hand, others³⁹ and we²⁰ have shown that GLO1 acts as a tumour suppressor and its loss has been linked with tumour growth and metastasis development *in vivo*. On the other hand, GLO1 is overexpressed and/or amplified in tumours and its loss has been associated with MG-induced cytotoxicity and apoptosis^{16,40-45}. In fact, Nrf2 and GLO1 favour the survival of cancer cells by protecting them from excessive dicarbonyl and/or oxidative stress, both of which have been implicated in cancer initiation and progression. We have demonstrated that glycolytic cancer cells are more prone to respond to MG challenge through increased Nrf2 and MG-detoxifying enzymes expression. Therefore, we next envisaged that low doses of MG might be beneficial to tumour growth while high concentrations would be cytotoxic.

Cancer cells display a characteristic biphasic dose response growth curve upon MG treatment. In order to test the possibility that MG could exert a dual effect on tumour growth, we have challenged U87-MG human glioblastoma cancer cells engrafted on the chicken chorioallantoic membrane (CAM) with increasing concentrations of MG. We observed an increase of tumour volume in the presence of low doses of MG that reached significance for 100 and 300 μ M when compared to untreated tumours (Figure 5A), as shown for representative tumours in Figure 5C. At higher doses (from 500 to 3000 μ M), tumour volume showed a significant decrease (Figures 5A and C). The biphasic profile of the graph shown in Figure 5B highlighted a hormetic dose effect of MG on tumour growth. Similar results were obtained with

MDA-MB-231 breast cancer cells using the same *in vivo* CAM model (Supplementary Figure 2).

We next reasoned that both pro and anti-growth MG effects on tumours should be reversed using MG scavenger molecules. Using the same *in vivo* tumour growth model, the co-treatment with MG and carnosine, a potent natural MG scavenger, significantly reversed cancer cell response to MG (2-way anova, $p < 0.001$) (Figure 5B), and as shown for representative tumours in Figure 5C. In good accordance with the observed increase of tumour volume, we found a higher proportion of tumours displaying Ki67 proliferation marker positive cells in CAM tumours treated with 300 μ M MG when compared with either untreated tumours or tumours treated with 1000 μ M MG (Figures 6A and B). Apoptotic rates estimated under the same conditions showed that apoptosis is significantly induced at 1000 μ M MG in U87-MG cells. MG pro-apoptotic effect is reversed under carnosine treatment at 3000 μ M MG (Figure 6C and D). Using immunohistochemistry, we further confirmed the dose-dependent increase of argpyrimidine (Figures 7A and B) and MG-H1 (Figures 7C and D) MG-adducts in the experimental CAM tumours. Carnosine treatment efficiently inhibited argpyrimidine and MG-H1 adducts accumulation (Figures 7A and B and Figures 7C and D, respectively).

Altogether, these data demonstrate for the first time that, in a specific hormetic window, MG favours tumour growth *in vivo*. It is noteworthy, that carnosine treatment potently reversed both pro- and anti-growth effects exerted by MG on malignant tumours *in vivo*. We believe that these observations bear a significant interest for the development of future preventive or therapeutic anti-cancer strategies.

CONCLUDING REMARKS

Hormesis is defined as “a process in which exposure to a low dose of a chemical agent or environmental factor, that is damaging at higher doses, induces an adaptive beneficial effect on the cell or organism”⁴⁶. We demonstrate for the first time the hormetic effect of MG on cancer cell growth and reconcile seemingly contrasting earlier data accumulated on MG. In a non-tumoural context, a dual role has been previously demonstrated for MG that was favourable to neurons viability and excitability at low levels while high levels were cytotoxic⁴⁷. Importantly, our data demonstrate that cancer cells are not equal when facing MG stress and this has probably contributed to the existing controversy around MG role in cancer. Glycolytic cancer cells cultured under high glucose condition produce MG and show an increased detoxification capacity when compared with cells cultured in low glucose medium. More remarkable is the induction of Nrf2 and GLO1 expression in the presence of high MG stress in glycolytic cells leading to efficient MG conversion to D-Lactate. We demonstrated that this adaptive behaviour favours tumour growth and survival of cancer cells that are both efficiently reversed by carnosine. This naturally occurring dipeptide has been previously shown to exert anti-cancer effects^{48,49} and ongoing studies in our laboratory examine its effects on glioblastoma and colon cancer tumour growth in mouse models. Next to carnosine, our results bring new interest in other MG scavengers such as metformin and aminoguanidine as anti-cancer agents.

As mentioned above, dicarbonyl stress is linked to oxidative stress by many aspects. One of them is that MG stress induces ROS production in normal and cancer cells. Another key common feature is Nrf2 transcription factor. Nrf2 is often referred to as the main activator of cellular antioxidant response but it is also the

main regulator of GLO1 and AKRs expression thus playing a central role in cell response to MG stress^{34,50}. We have shown that cancer cells express AKRs that represent a compensatory mechanism in case of GLO1 loss or decreased activity. Future studies addressing the role of MG dicarbonyl stress in cancer cells will have to assess energy metabolism and oxidative status in parallel with MG stress cellular adducts and detoxification capacity.

Metabolic reprogramming is an important hallmark of proliferating cancer cells. The preferential use of glycolysis unavoidably generates MG, which level must be strictly adjusted to be kept in a subtoxic range in glycolytic cancer cells. In this study, we demonstrate that maintaining tolerable MG stress turns out to be beneficial to cancer cells through both resistance to apoptosis and enhanced growth.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents. U87-MG, U251, MDA-MB-231 and MCF7 cancer cell lines were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and grown in DMEM medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS ; ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) and 2mM L-Glutamine (Lonza). Glucose concentration was either 4.5g/L (high glucose condition) or 1g/L (low glucose condition). HUVEC cells were isolated following a method described in Jaffe et al.⁵¹. HUVEC cells are grown in MCDB131 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20% FBS, 2mM L-Glutamine, 50µg/mL heparin (Sigma, St. Louis, MO), ECGS 50µg/mL (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and 50UI/50µg/mL penicilline/streptomycin (Lonza). For seeding of HUVEC cells, plates are coated with 0,2% gelatin (Sigma). Methylglyoxal (MG, Sigma) treatment was performed during 6 or 24h in low glucose medium. Methylglyoxal solution contamination by formaldehyde was assessed by NMR analysis and considered insignificant (<3%)²⁰. BBGC, S-*p*-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester, a cell-permeable GLO1 inhibitor, was synthesized as previously described¹⁴. BBGC treatment was performed for 48 h in high glucose medium. Anti-argpyrimidine antibody (mAb6B) specificity has been previously confirmed by competitive ELISA and it has been shown to not react with other MG-arginine adducts such as 5-hydro-5-methylimidazolone and tetrahydropyrimidine⁵². MBo (Methyl diaminobenzene-BODIPY) is a cell permeable MG specific probe, synthesized and validated as previously described²².

Seahorse analysis. Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) of U87-MG, U251, MDA-MB-231 and MCF7 cells cultured in low and high glucose medium were determined using Seahorse XFp bioenergetic analyzer

(Agilent) according to manufacturer's recommendations. Briefly, cells were plated in Seahorse microplates (15000, 5000, 15000 and 20000 cells/well for U87-MG, U251, MDA-MB-231 and MCF7 cells, respectively). Medium was replaced by DMEM without glucose supplemented with 2mM glutamine 1h before the measurements. D-glucose was added to a final concentration of 10mM and OCR and ECAR were measured. Data were normalized to protein quantity.

L- and D-Lactate dosage. L- and D-Lactate concentrations were assessed in conditioned medium, the number of cells in each condition was counted for normalization. Conditioned medium (diluted 3 times for L-Lactate measure) was incubated in the presence of NAD⁺, hydrazine and L- or D-Lactate dehydrogenase enzyme (Sigma). Lactate concentration was determined by comparing NADH formation measure at 320nm to the absorbance of a calibration curve. L- and D-Lactate concentrations were normalized per million cells.

Cellular MG quantification. MBo (Methyl diaminobenzene-BODIPY) was used to detect endogenous MG. The cells were treated with 5mM MBo in complete medium as previously described²². After 1h, the cells were washed with PBS and incubated in low- or high-glucose medium for 6h or treated in low-glucose medium with MG for 6 to 24h. For MG induction after BBGC treatment, cells were treated 48h with BBGC, then 1h with MBo. Then cells were washed and incubated for more 6h in the presence of BBGC. Cells were then trypsinized and analyzed by flow cytometry (FACSCanto, BD Biosciences). Data are represented as mean \pm SEM of at least 3 biological replicates.

ROS measurement by FACS. ROS production was measured using CM-H2DCFDA (Invitrogen) fluorescent probe according to the according to the manufacturer's

protocol. Briefly, cells were trypsinized and incubated with the CM-H2DCFDA probe (diluted 1/5000 in HBSS, Invitrogen) for 15min in the dark. After centrifugation, cells were incubated in culture medium during 15min at 37°C before FACS analysis.

Glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) levels. GSH/GSSG ratio were determined as described previously⁵³. Briefly, cell pellets were extracted in 0.1% Triton-X (Sigma) and 0.6% sulfosalicylic acid (Sigma) in KPE buffer (0.1M potassium phosphate buffer with 5mM EDTA disodium salt, pH 7.5) and sonicated in icy water for 3min. After 2 freeze-thaw cycles, lysates were centrifuged at 3000g for 4min and supernatants were collected. For total GSH measurement, supernatants were mixed with DTNB solution and glutathione reductase to convert GSSG to GSH and then β -NADPH was added. The rate of 2-nitro-5-thiobenzoic acid formation was followed spectrophotometrically at 412nm for 2min. Total GSH concentrations were determined based on the values obtained from the standard curve. For GSSG measurement, supernatants were mixed with 2-vinylpyridine to derivatize GSH for 1h and were then neutralized by adding triethanolamine for 10min. The derivatized samples were analyzed as described for total GSH dosage. GSH concentrations were calculated using the following formula: $[GSH] = [GSH_{total}] - 2*[GSSG]$ and allowed the determination of GSH/GSSG ratio.

Methylglyoxal inhibitory concentration 50 (IC50) determination. Cells were plated in 24-well plate and treated for 24h with increasing doses of MG. Cells were then washed, lysed by sonication and their DNA content was assessed using bisbenzimidazole (Sigma) incorporation. DNA content was detected spectrophotometrically by excitation at 360nm and fluorescence emission at 460nm. IC50 was determined as the concentration of MG able to decrease by half the quantity of DNA detected.

Western Blot. Cell extraction was performed in 1% SDS buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche, Penzberg, Germany). Protein concentration is determined using bicinchoninic acid assay (Pierce, Carlsbad, CA). Twenty μg of protein were separated on 10 or 12.5% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Roche). Blocking was performed in 5% non-fat dried milk (Biorad, Hercules, CA) in TBS-Tween 0.1% for 1 h. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies : Argpyrimidine (1/10,000, mAb6B), MG-H1 (1/1000, STA-011, Cell Biolabs), Nrf2 (1/1000, Ab62353, Abcam), GLO1 (1/1000, #02-14, BioMac, Leipzig, Germany), β -actin (1/5000, A5441, Sigma). Membranes were then incubated for 1 h in the presence of the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Immunoreactive bands were detected using ECL Western Blotting substrate (Pierce). Bands quantification by densitometry and normalization to β actin was performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

RNA isolation and quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). RNA extraction was done according to the manufacturer's protocol (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Reverse transcription was performed using the Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Hundred ng of cDNA were mixed with primers, probe (Universal ProbeLibrary System, Roche) and 2x Takyon Rox Probe MatserMix dTTP Blue (Eurogentec, Seraing, Belgium) or Fast Start SYBR Green Master Mix (Roche). Q-PCR were performed using the 7300 Real Time PCR System and the corresponding manufacturer's software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Relative gene expression was normalized to 18S rRNA. Primers were synthesized by IDT (Coralville, IA) and their sequences are detailed in Table 1.

GLO1 activity assay. Glo1 activity assessment was performed as previously described^{18,20}. Briefly, S-D-lactoylglutathion formation was followed at 240nm in a

reaction mixture composed of pre-incubated MG with reduced glutathion (Sigma) and protein extracted in RIPA buffer. Glo1 maximal activity measure is expressed as arbitrary units (A.U.) of enzyme per mg of proteins.

Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) tumour assay. On embryonic day 11, a suspension of 5×10^6 cells in culture medium alone for U87-MG cells or 2×10^6 cells mixed (1:1) with matrigel (BD Biosciences) for MDA-MB-231 cells was deposited in the center of a plastic ring on the chick chorioallantoic membrane. Treatment with methylglyoxal alone or combined with Carnosine (Sigma) in saline solution was performed daily from the day after cells implantation to the end of the experiment. Tumours were collected at embryonic day 18 and fixed in 4% paraformaldehyde for histology analysis. Tumour size was measured with a caliper and tumour volume was calculated with the formula $\frac{4}{3}\pi \times H/2 \times L/2 \times W/2$, with H, L and W standing for height, length and width, respectively.

Immunohistochemistry. Formalin-fixed paraffin embedded sections were deparaffinized and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was inhibited by a 30 min bath in methanol containing 3% hydrogen peroxide. Antigen retrieval was obtained by a 40 min bath in 10mM sodium citrate buffer pH6 at 95°C. Non-specific binding was avoided by incubation with 1,5% normal serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 min. Then, primary antibody, either mouse anti-Argpyrimidine (1/10.000), mouse anti-Ki67 (1/100, Dako) or rabbit anti-MG-H1 (1/500, STA-011 Cell Biolabs, San Diego, CA) was applied for the night. Sections were next incubated with anti-mouse or anti-rabbit biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories) for 30 min followed by staining with 3,3' diaminobenzine tetrachloride (DAB). After counterstaining with hematoxylin, slides were dehydrated and mounted with DPX

(Sigma). Control slides incubated without primary antibody showed no immunoreactivity.

Immunohistochemical staining evaluation. The immunostaining was assessed and scored by two independent examiners. Argpyrimidine and MG-H1 score were attributed according to the intensity of the staining (0, 1+, 2+, 3+). Ki67 immunostaining was evaluated as the percentage of positive nucleus present on the sections. Then two categories were distinguished, low proliferative rate for the cases presenting $\leq 30\%$ of positive nucleus and high proliferative rate for the cases presenting $>30\%$ of positive nucleus.

Apoptosis. Apoptosis was measured with the FITC-Annexin V apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) by FACS according to manufacturer's instructions.

Aldo-keto reductase activity assay. AKR activity was assayed based on previously reported protocol¹⁰ in PBS 100mM pH7.2 at 37°C. Protein extraction was performed with ice-cold cytosolic lysis buffer (Hepes 10mM, MgCl₂ 1.5mM, KCl 10mM, DTT 0.5mM, NP-40 0.05% with protease inhibitor (Roche)), followed by sonication and centrifugation. Protein concentration in the supernatant was quantified as explained above. Briefly, 100 μ g proteins were incubated with reaction buffer containing 0.1mM NADPH (Sigma) and 1mM MG. NADPH reduction was followed spectrophotometrically at 320nm for 1 h. NADPH quantity processed was calculated based on a calibration curve. Results were expressed as mmoles of NADPH transformed per hour by mg of protein extract.

Statistical analysis. Statistical analysis. All experiments were performed as several independent biological replicates. All results were reported as mean with Standard Error Mean (SEM) as indicated in figure legends. Two group comparisons were

performed using unpaired student's t-test with or without Welsch's correction according to homoscedasticity. When an experiment required comparisons between more than two groups, statistical analysis was performed using one-way or two-way ANOVA depending on the number of grouping factors. Dunnet's or Bonferroni's test were applied for simple or multiple comparisons, respectively. Outliers were detected using whisker box plots. In all cases, a bilateral $p < 0.05$ was considered as statistically significant with a 95% confidence interval.

REFERENCES

- 1 Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell* **21**, 297-308, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014 (2012).
- 2 Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences* **41**, 211-218, doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001 (2016).
- 3 Maessen, D. E., Stehouwer, C. D. & Schalkwijk, C. G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond)* **128**, 839-861, doi:10.1042/CS20140683 (2015).
- 4 Rulli, A. *et al.* Expression of glyoxalase I and II in normal and breast cancer tissues. *Breast cancer research and treatment* **66**, 67-72 (2001).
- 5 Bair, W. B., 3rd, Cabello, C. M., Uchida, K., Bause, A. S. & Wondrak, G. T. GLO1 overexpression in human malignant melanoma. *Melanoma research* **20**, 85-96, doi:10.1097/CMR.0b013e3283364903 (2010).
- 6 Ranganathan, S. & Tew, K. D. Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue from human colon. *Biochimica et biophysica acta* **1182**, 311-316 (1993).
- 7 Vander Jagt, D. L. & Hunsaker, L. A. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chemico-biological interactions* **143-144**, 341-351 (2003).
- 8 Nishimura, C., Furue, M., Ito, T., Omori, Y. & Tanimoto, T. Quantitative determination of human aldose reductase by enzyme-linked immunosorbent assay. Immunoassay of human aldose reductase. *Biochem Pharmacol* **46**, 21-28 (1993).
- 9 Rabbani, N., Xue, M. & Thornalley, P. J. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconjugate journal* **33**, 513-525, doi:10.1007/s10719-016-9705-z (2016).
- 10 Morgenstern, J. *et al.* Loss of glyoxalase 1 induces compensatory mechanism to achieve dicarbonyl detoxification in mammalian Schwann cells. *The Journal of biological chemistry*, doi:10.1074/jbc.M116.760132 (2016).
- 11 Apple, M. A. & Greenberg, D. M. Inhibition of cancer growth in mice by a normal metabolite. *Life sciences* **6**, 2157-2160 (1967).
- 12 Jerzykowski, T., Matuszewski, W., Otrzonek, N. & Winter, R. Antineoplastic action of methylglyoxal. *Neoplasma* **17**, 25-35 (1970).
- 13 Conroy, P. J. Carcinostatic activity of methylglyoxal and related substances in tumour-bearing mice. *Ciba Foundation symposium*, 271-300 (1978).
- 14 Thornalley, P. J. *et al.* Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochemical pharmacology* **51**, 1365-1372 (1996).
- 15 Lo, T. W. & Thornalley, P. J. Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by diethyl esters of glyoxalase inhibitors in vitro. *Biochemical pharmacology* **44**, 2357-2363 (1992).
- 16 Sakamoto, H. *et al.* Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 2513-2518 (2001).
- 17 Santarius, T. *et al.* GLO1-A novel amplified gene in human cancer. *Genes, chromosomes & cancer* **49**, 711-725, doi:10.1002/gcc.20784 (2010).

- 18 Chiavarina, B. *et al.* Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. *Oncotarget* (2014).
- 19 Chiavarina, B. *et al.* Methylglyoxal-Mediated Stress Correlates with High Metabolic Activity and Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences* **18**, doi:10.3390/ijms18010213 (2017).
- 20 Nokin, M. J. *et al.* Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis. *eLife* **5**, doi:10.7554/eLife.19375 (2016).
- 21 Bellahcene, A., Nokin, M. J., Castronovo, V. & Schalkwijk, C. Methylglyoxal-derived stress: an emerging biological factor involved in the onset and progression of cancer. *Seminars in cancer biology*, in the press (2017).
- 22 Wang, T., Douglass, E. F., Jr., Fitzgerald, K. J. & Spiegel, D. A. A "turn-on" fluorescent sensor for methylglyoxal. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 12429-12433, doi:10.1021/ja406077j (2013).
- 23 Sejersen, H. & Rattan, S. I. Dicarbonyl-induced accelerated aging in vitro in human skin fibroblasts. *Biogerontology* **10**, 203-211, doi:10.1007/s10522-008-9172-4 (2009).
- 24 Yao, D. & Brownlee, M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* **59**, 249-255, doi:10.2337/db09-0801 (2010).
- 25 Kalapos, M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-biological interactions* **171**, 251-271, doi:10.1016/j.cbi.2007.11.009 (2008).
- 26 Du, J. *et al.* Superoxide-mediated early oxidation and activation of ASK1 are important for initiating methylglyoxal-induced apoptosis process. *Free radical biology & medicine* **31**, 469-478 (2001).
- 27 Chang, T., Wang, R. & Wu, L. Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine* **38**, 286-293, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.034 (2005).
- 28 Figarola, J. L., Singhal, J., Rahbar, S., Awasthi, S. & Singhal, S. S. LR-90 prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in human endothelial cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **19**, 776-788, doi:10.1007/s10495-014-0974-3 (2014).
- 29 Yuan, J. *et al.* The role of cPLA2 in Methylglyoxal-induced cell apoptosis of HUVECs. *Toxicol Appl Pharmacol* **323**, 44-52, doi:10.1016/j.taap.2017.03.020 (2017).
- 30 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nature protocols* **9**, 1969-1979, doi:10.1038/nprot.2014.129 (2014).
- 31 Lee, H. J., Howell, S. K., Sanford, R. J. & Beisswenger, P. J. Methylglyoxal can modify GAPDH activity and structure. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**, 135-145, doi:10.1196/annals.1333.017 (2005).
- 32 Beisswenger, P. & Ruggiero-Lopez, D. Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes & metabolism* **29**, 6S95-103 (2003).
- 33 Zhang, J. Y. *et al.* Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med* **12**, 10-22, doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.0019 (2015).

- 34 Xue, M. *et al.* Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *The Biochemical journal* **443**, 213-222, doi:10.1042/BJ20111648 (2012).
- 35 Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**, 13291-13295, doi:10.1074/jbc.R900010200 (2009).
- 36 Le Calvé, B. *et al.* Long-term in vitro treatment of human glioblastoma cells with temozolomide increases resistance in vivo through up-regulation of GLUT transporter and aldo-keto reductase enzyme AKR1C expression. *Neoplasia* **12**, 727-739 (2010).
- 37 Zhong, T., Xu, F., Xu, J., Liu, L. & Chen, Y. Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) is associated with the doxorubicin resistance in human breast cancer via PTEN loss. *Biomed Pharmacother* **69**, 317-325, doi:10.1016/j.biopha.2014.12.022 (2015).
- 38 Menegon, S., Columbano, A. & Giordano, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends in molecular medicine* **22**, 578-593, doi:10.1016/j.molmed.2016.05.002 (2016).
- 39 Zender, L. *et al.* An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* **135**, 852-864, doi:10.1016/j.cell.2008.09.061 (2008).
- 40 Antognelli, C., Mezzasoma, L., Fettucciari, K. & Talesa, V. N. A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in prostate cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 836-844, doi:10.1016/j.biocel.2013.01.003 (2013).
- 41 Hutschenreuther, A. *et al.* Modulation of GLO1 Expression Affects Malignant Properties of Cells. *International journal of molecular sciences* **17**, doi:10.3390/ijms17122133 (2016).
- 42 Zhang, S. *et al.* Glo1 genetic amplification as a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology* **7**, 2079-2090 (2014).
- 43 Taniguchi, H. *et al.* Targeting the glyoxalase pathway enhances TRAIL efficacy in cancer cells by downregulating the expression of antiapoptotic molecules. *Molecular cancer therapeutics* **11**, 2294-2300, doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0031 (2012).
- 44 Hu, X., Yang, X., He, Q., Chen, Q. & Yu, L. Glyoxalase 1 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and is essential for HCC cell proliferation. *Biotechnology letters* **36**, 257-263, doi:10.1007/s10529-013-1372-6 (2014).
- 45 Hosoda, F. *et al.* Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. *Oncogene* **34**, 1196-1206, doi:10.1038/onc.2014.57 (2015).
- 46 Mattson, M. P. Hormesis defined. *Ageing research reviews* **7**, 1-7, doi:10.1016/j.arr.2007.08.007 (2008).
- 47 Radu, B. M., Dumitrescu, D. I., Mustaciosu, C. C. & Radu, M. Dual effect of methylglyoxal on the intracellular Ca²⁺ signaling and neurite outgrowth in mouse sensory neurons. *Cellular and molecular neurobiology* **32**, 1047-1057, doi:10.1007/s10571-012-9823-5 (2012).
- 48 Shen, Y. *et al.* Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS one* **9**, e104632, doi:10.1371/journal.pone.0104632 (2014).

- 49 lovine, B. *et al.* The anti-proliferative effect of L-carnosine correlates with a decreased expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in human colon cancer cells. *PLoS One* **9**, e96755, doi:10.1371/journal.pone.0096755 (2014).
- 50 Jung, K. A. *et al.* Identification of aldo-keto reductases as NRF2-target marker genes in human cells. *Toxicology letters* **218**, 39-49, doi:10.1016/j.toxlet.2012.12.026 (2013).
- 51 Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. & Minick, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**, 2745-2756, doi:10.1172/JCI1107470 (1973).
- 52 Oya, T. *et al.* Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *The Journal of biological chemistry* **274**, 18492-18502 (1999).
- 53 Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* **1**, 3159-3165, doi:10.1038/nprot.2006.378 (2006).

ACKNOWLEDGEMENTS

FD is a Télévie Fellow and AB is a Research Director from the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium). This work was also supported by grants from the Centre Anti-Cancéreux and Fonds Spéciaux (University of Liège, Belgium). The authors are particularly grateful to Miss S. Nüchtern for her valuable technical assistance with the experiments and are thankful to Mrs. N. Maloujahmoum and Mr. V. Hennequière for expert technical support. We acknowledge the Flow cytometry and Immunohistology technology platforms of the GIGA-Research at the University of Liège, Belgium.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.C originally formulated the idea. M-J.N, F.D, V.C and A.B conceived and designed the experiments. K.U, D.A.S, J.R.C and C.A.H contributed with essential reagents. M-J.N, F.D and J.B performed the experiments. M-J.N, F.D, J.B, O.P, V.C and A.B analysed the data. M-J.N, F.D and A.B wrote the main manuscript text. All authors critically reviewed the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Energetic metabolism characterization and dicarbonyl stress status in cancer cells. U87-MG, U251, MDA-MB-231 and MCF7 cancer cells were cultured in low (LG) or high-glucose (HG) medium. **(A)** Metabolic profiling of the indicated cancer cell lines using Seahorse analyzer showing ECAR (extracellular acidification rate) and OCR (oxygen consumption rate). **(B)** L-Lactate production in 48h conditioned-medium. **(C)** Intracellular MG was assessed by flow cytometry using MBo specific probe. **(D)** D-Lactate production in 48 h conditioned-medium. **(E).** Reactive oxygen species (ROS) accumulation was assessed by flow cytometry using CM-DCFDA probe. **(F)** GSH and GSSG concentrations were assessed in cell pellets and GSH/GSSG ratio are shown. Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and ns = not significant.

Figure 2. Intracellular MG, MG-adducts levels and GLO1 detoxification capacity in response to MG treatment. U87-MG, U251, MDA-MB-231 and MCF7 cancer cells cultured in low glucose medium were treated with the indicated doses MG **(A)** MG half maximum inhibitory concentration values (IC50) on cancer cell viability. HUVEC normal endothelial cells showed the highest sensitivity to MG compared with cancer cells. **(B)** Intracellular MG production was assessed by flow cytometry using MBo probe in cells treated with the indicated MG concentrations for 6 and 24h. **(C)** MG-adducts were detected by immunoblotting using specific antibodies against MG-H1 and argpyrimidine residues in cells exposed to MG 300 μ M for 6h, with β -actin as a loading control. Immunoblots are representative of three independent experiments. **(D)** GLO1 maximal activity was measured in cells treated with the indicated MG concentrations for 6 and 24 h, expressed as arbitrary units (A.U.) per mg of proteins. Data are shown as mean values \pm SEM three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and ns = not significant, compared with control. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 4.

Figure 3. Glycolytic cancer cells expressed increased amounts of GLO1 and Nrf2 upon MG treatment. U87-MG, U251, MDA-MB-231 and MCF7 cells cultured in low glucose medium were treated with the indicated doses of MG. **(A)** GLO1 and **(B)** NRF2 mRNA levels were assessed in response to MG treatment by RT-qPCR. **(C)** GLO1 and Nrf2 protein levels were quantified using immunoblotting, with β -actin as a loading control. Numbers represent fold increase relative to the control condition shown in bold. Immunoblots are representative of three independent experiments. **(D)** D-lactate production in conditioned-medium was assessed after 6 and 24h MG treatment. Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and ns = not significant, compared with control. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 5.

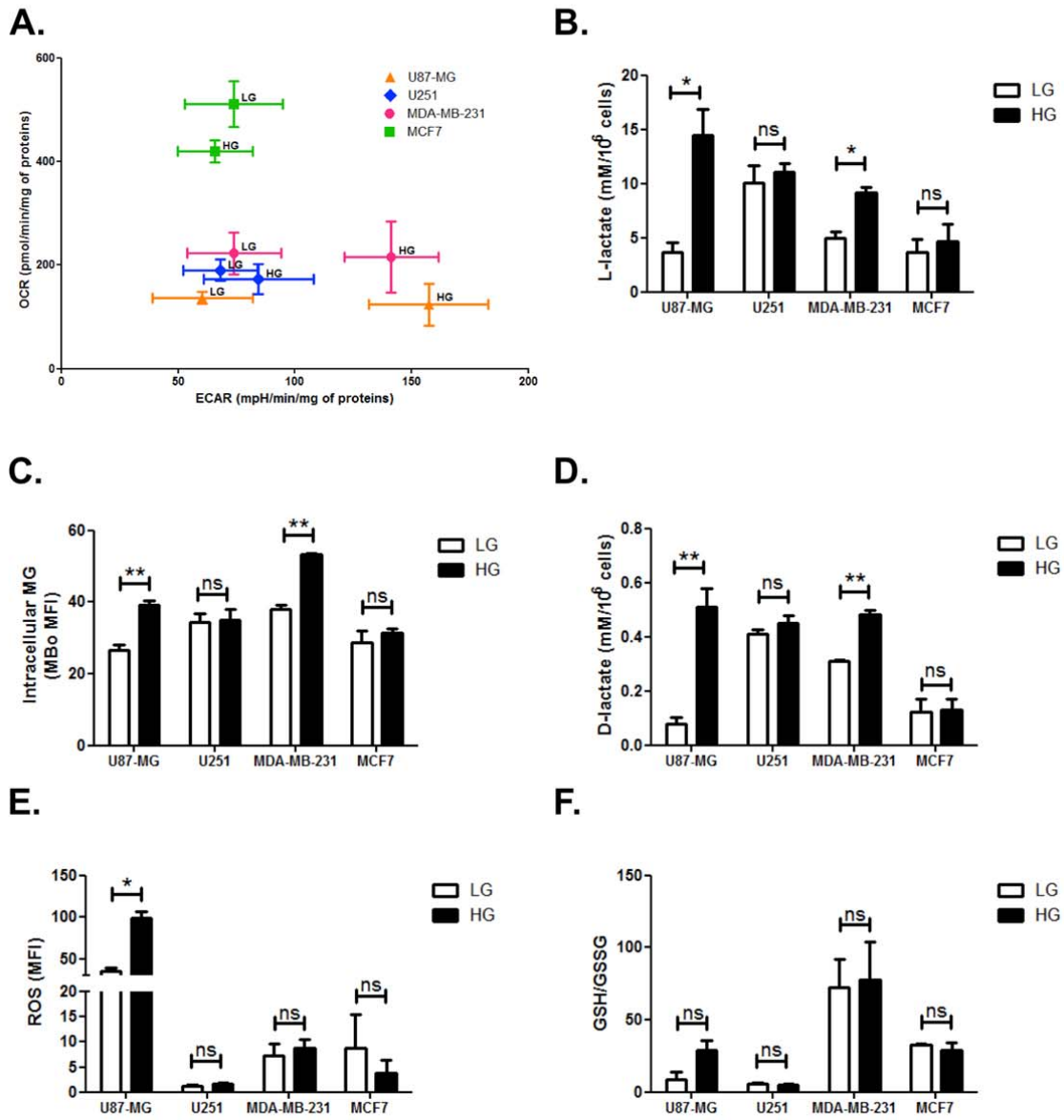
Figure 4. Aldo-keto reductases (AKRs) detoxifying enzymes are expressed in cancer cells and compensate for the loss of GLO1 activity. **(A)** U87-MG, U251, MDA-MB-231 and MCF7 cells were cultured in high-glucose medium and their mRNA levels for AKR1B10, AKR1C1 and AKR1C3 were evaluated by RT-qPCR. mRNA levels are shown as relative to MDA-MB-231 cells. **(B)** Basal AKR activity is shown as mmole of NADPH converted per h per mg of protein in the indicated cancer cells. **(C)** AKR activity was measured in the indicated cell lines treated with MG 300 μ M during 24h. **(D)** Intracellular MG was assessed by flow cytometry using MBo probe after 48h treatment with BBGC at the indicated doses. **(E)** AKR1B10 mRNA levels were assessed by RT-qPCR in BBGC treated cells. Data are presented as fold change relative to untreated cells. All data are shown as mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 5. Cancer cells display a biphasic dose response growth curve upon MG treatment. U87-MG cells were grown on the chicken chorioallantoic membrane (CAM) and treated daily with **(A)** the indicated doses of MG and/or **(B)** carnosine 10mM. After 7 days, tumour volumes were calculated. **(C)** Top and profile views of representative experimental CAM tumours. At least 10 eggs were collected for each experimental condition. Data are mean values \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 6. Proliferative and apoptotic effects of MG and carnosine treatment on CAM tumours. Experimental tumours shown in Figure 5 were subjected to immunohistochemical staining of Ki67 proliferation marker. A representative picture of Ki67 staining is shown in **(A)** and the proportion of tumours discriminated in low and high proliferation rate among the different conditions is represented in panel **(B)** Apoptosis analysis in cells treated with MG at the indicated doses with or without co-treatment with carnosine 10mM. Representative flow cytometry dot-plots are shown in **(C)** and annexin V positive cells are quantified in **(D)** Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

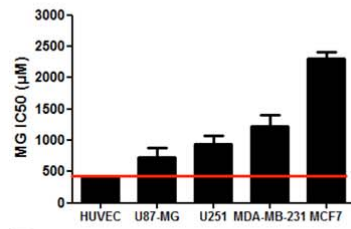
Figure 7. Accumulation of MG-adducts in CAM tumours. Experimental tumours shown in Figure 5 were subjected to immunohistochemical staining of MG-H1 and argpyrimidine MG-adducts. Representative pictures **(A, C)** and immunostaining quantification **(B, D)** of MG-H1 and argpyrimidine staining are shown, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nokin, Durieux et al., Figure 1.

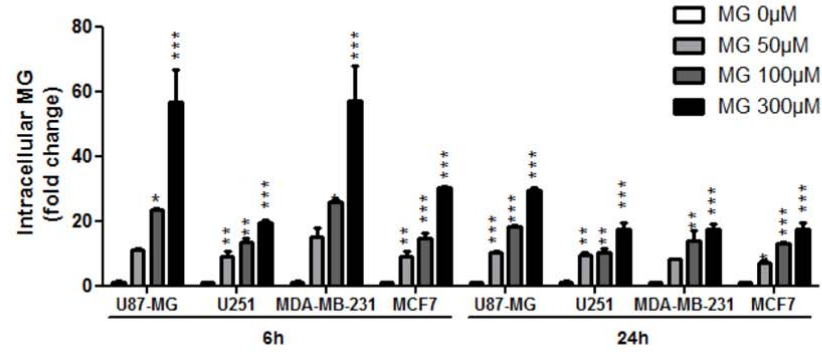


Nokin, Durieux et al., Figure 2.

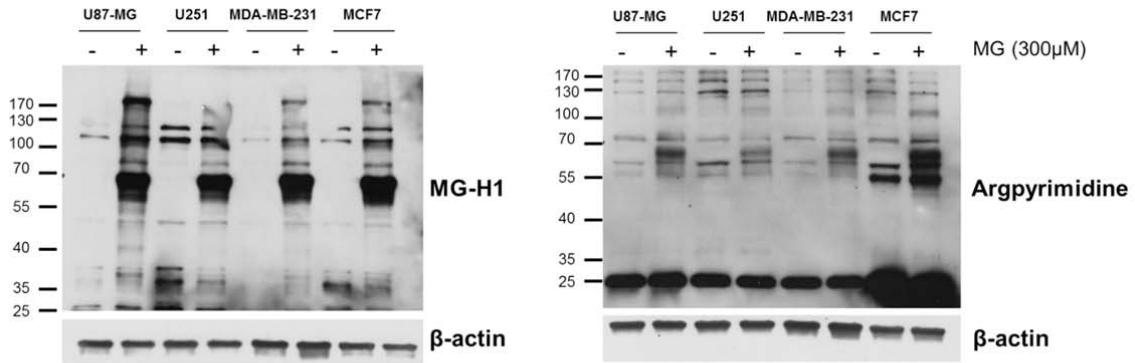
A.



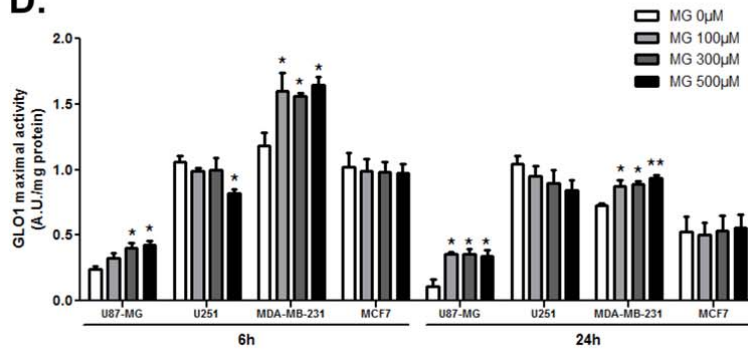
B.



C.

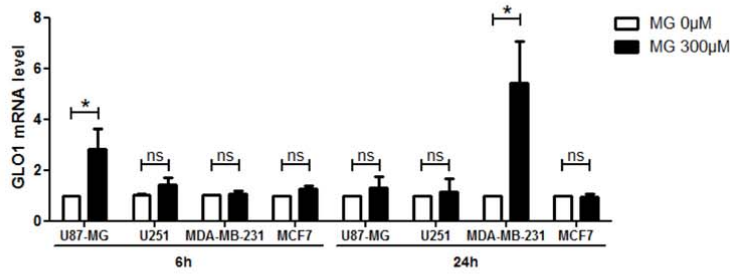


D.

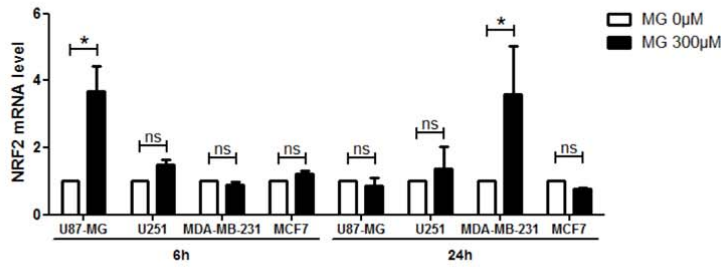


Nokin, Durieux et al., Figure 3.

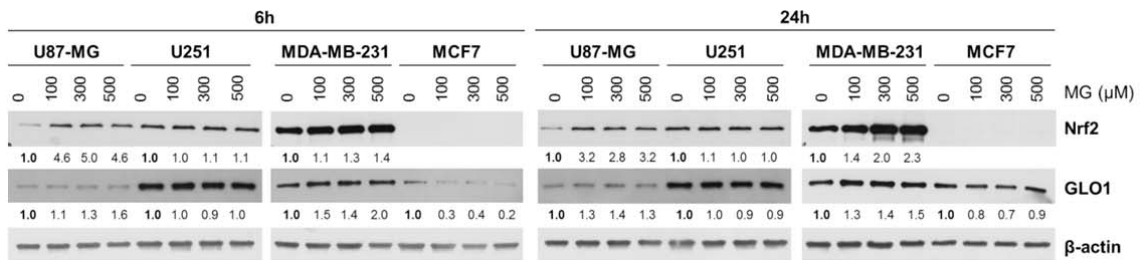
A.



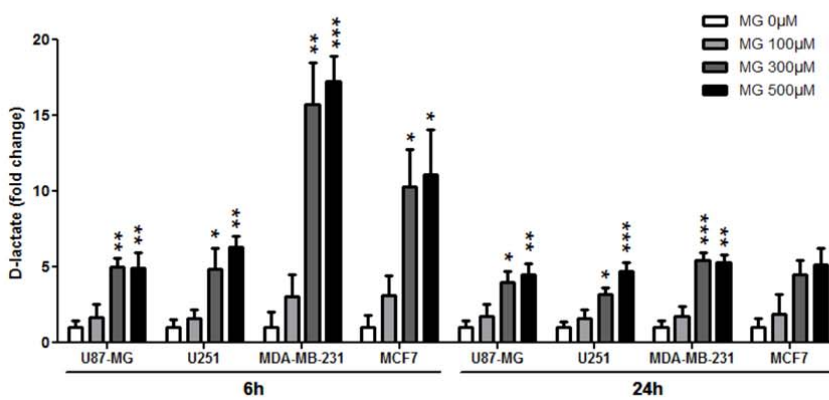
B.



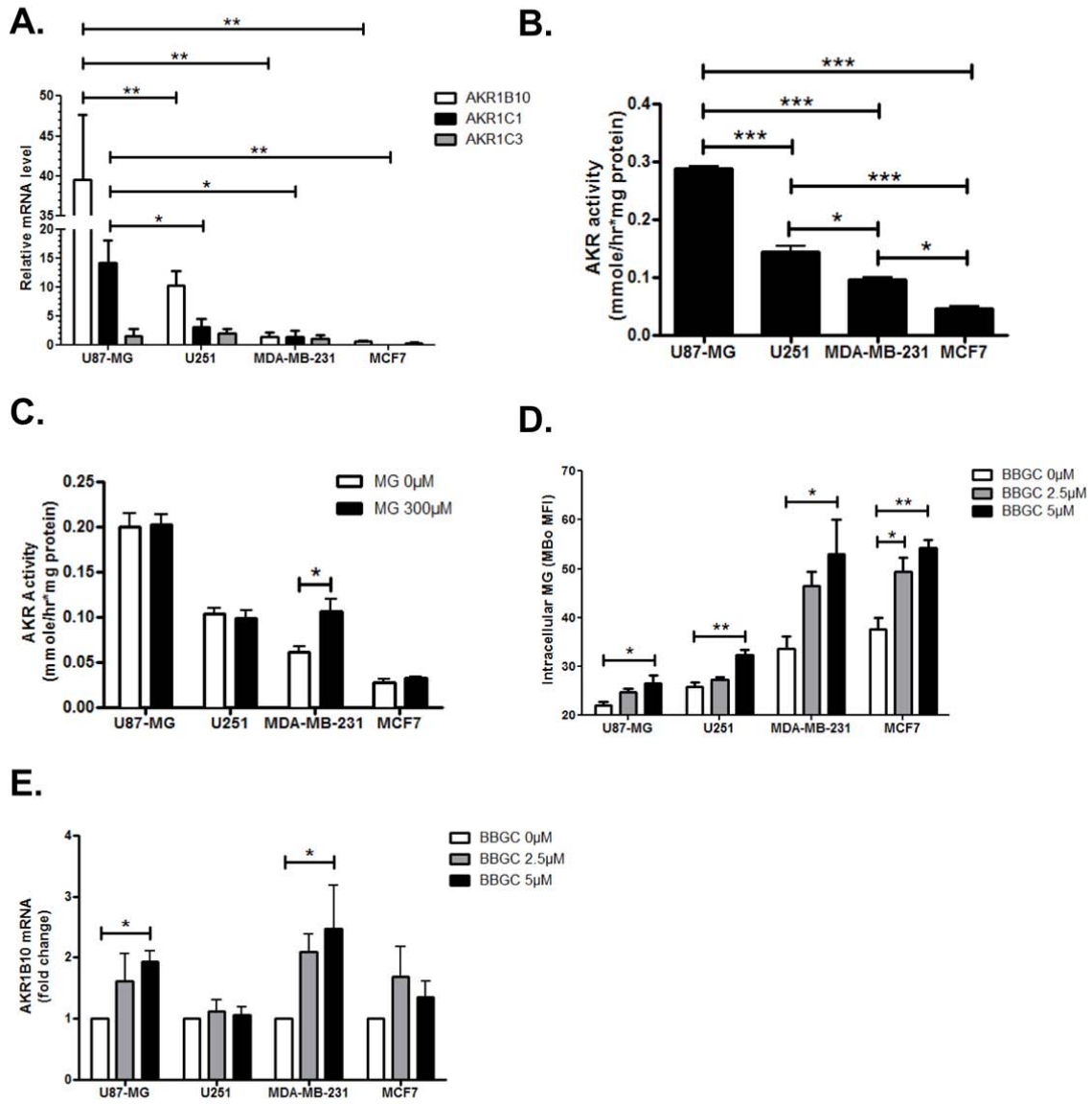
C.



D.

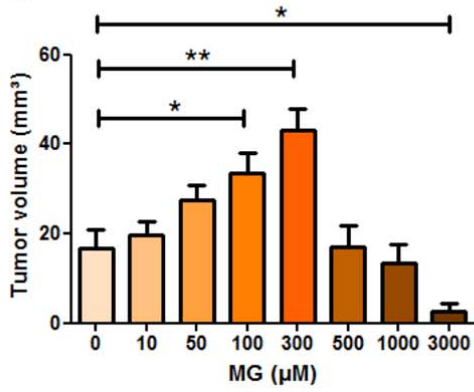


Nokin, Durieux et al., Figure 4.

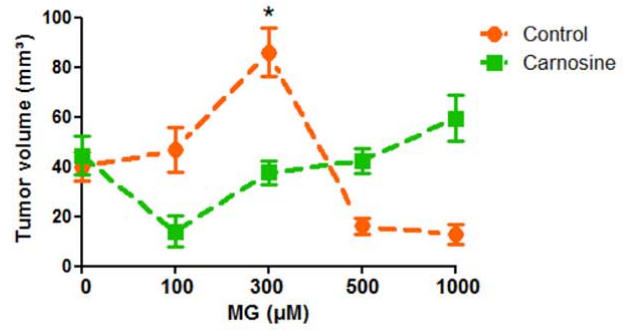


Nokin, Durieux et al., Figure 5.

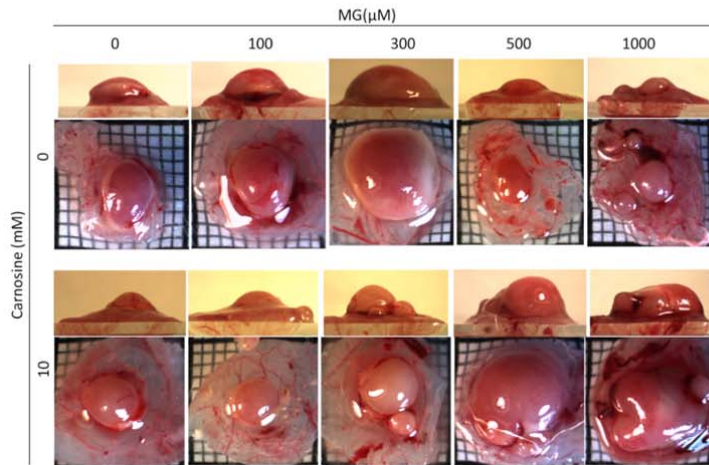
A.



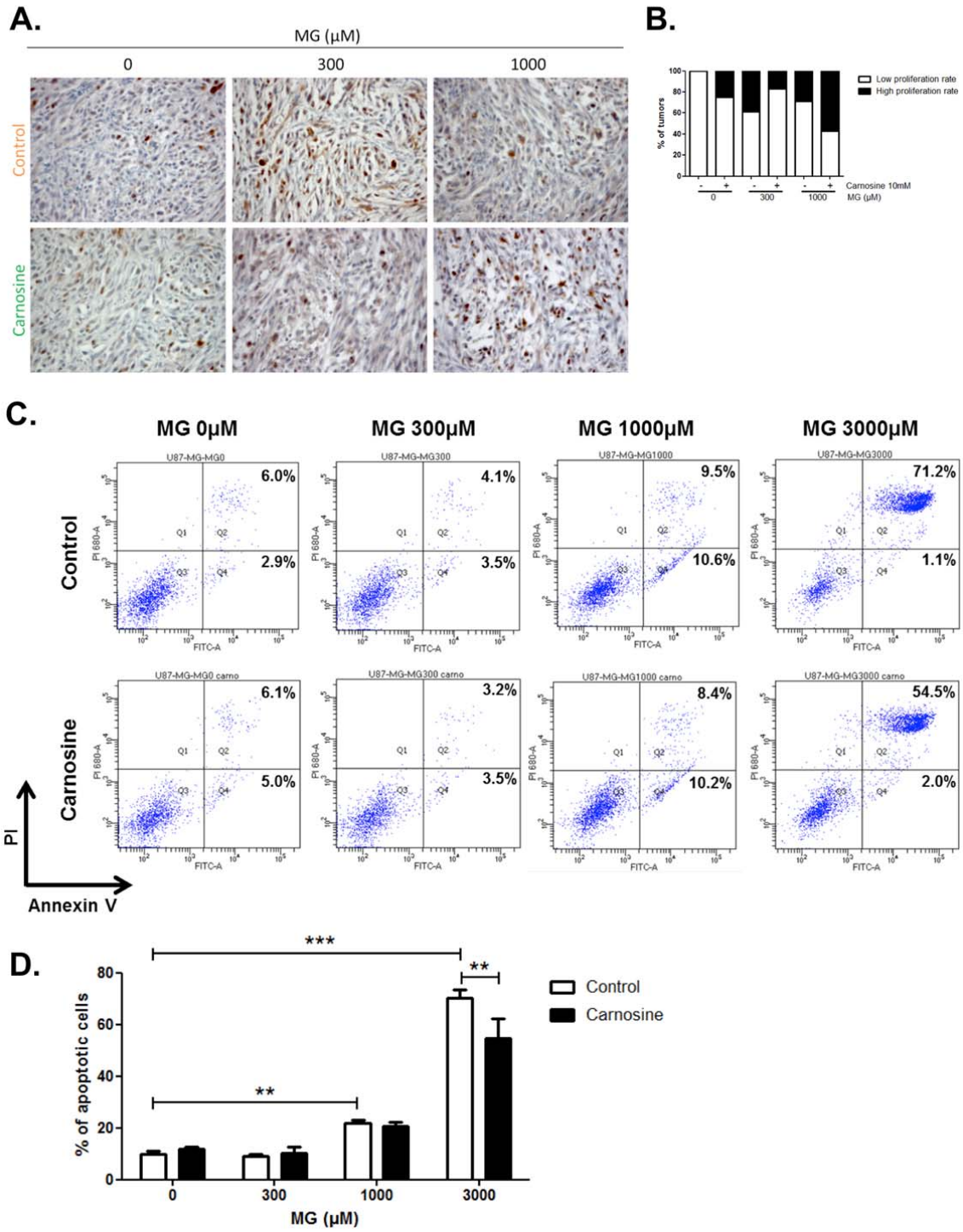
B.



C.

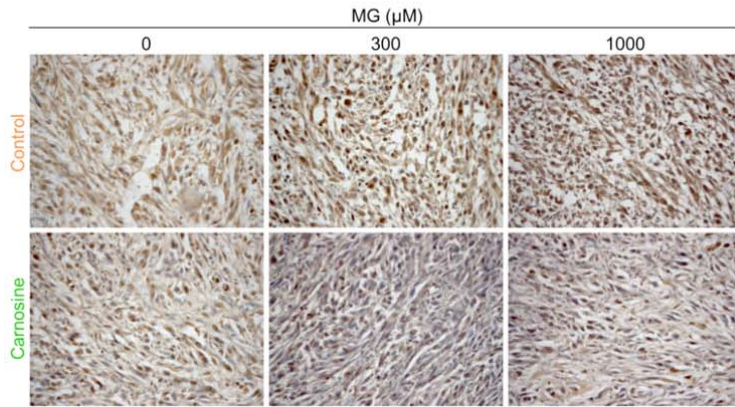


Nokin, Durieux et al., Figure 6.

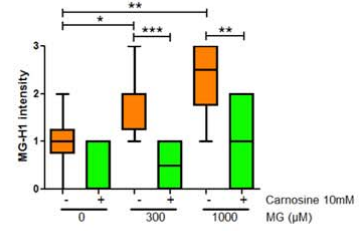


Nokin, Durieux et al., Figure 7.

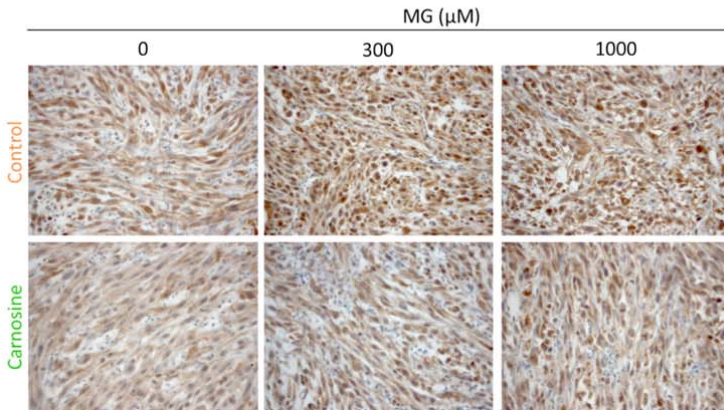
A.



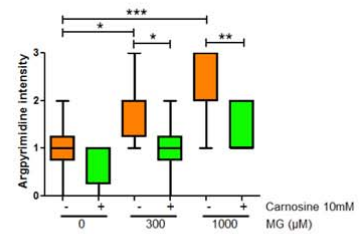
B.



C.



D.



4. Implication du méthylglyoxal dans la progression tumorale et le développement de la résistance à l'inhibition de BRAF dans le mélanome

4.1 Introduction

Le mélanome est un type de cancer de la peau se développant à partir des mélanocytes. Ces cellules, qui résident à la base de l'épiderme, sont responsables de la production de mélanine, un pigment protégeant la peau des UV. Le mélanome est le type de cancer cutané le plus rare mais le plus mortel quand il atteint le stade invasif. Plus de la moitié des patients atteints de mélanome présentent une mutation au niveau du gène BRAF dont la majorité est de type BRAF^{V600E}. La mutation de BRAF induit une activation de la voie RAS/MAPK. Avec d'autres mutations, environ 90% des patients montrent une hyper-activation de cette voie pro-proliférative et qui est associée à l'initiation et à la progression métastatique du mélanome²⁹⁶.

La mutation BRAF^{V600E} induit une reprogrammation du métabolisme du mélanome, favorisant l'utilisation de la glycolyse et donc un phénotype de type Warburg. En effet, l'équipe de Hall²⁹⁷ a montré en 2013 que les mélanocytes transformés présentent une augmentation de GAPDH (glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase) et G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase) qui mène à une augmentation de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphate. Ce lien entre la mutation BRAF^{V600E} et une augmentation du flux glycolytique a ensuite été confirmé par d'autres²⁹⁸⁻³⁰¹.

Le ciblage thérapeutique de BRAF^{V600E} par un inhibiteur spécifique appelé Vémurafenib a donné de bons résultats chez la plupart des patients. Malheureusement, la majorité d'entre eux développent rapidement (6-7mois) une résistance au traitement. L'acquisition de la résistance au Vémurafenib par les cellules de mélanome est liée à des mécanismes directement liés à la réactivation de la voie MAPK ou pas. Parmi les mécanismes de réactivation de la voie MAPK, des études ont notamment montré l'amplification de BRAF³⁰², l'épissage alternatif de BRAF³⁰³, la mutation de NRAS^{304,305}, la mutation de MEK³⁰⁶ et la perte de NRF-1³⁰⁷⁻³⁰⁹. Parmi les mécanismes de résistance indépendants de la voie MAPK, des études ont montré l'augmentation de récepteurs tyrosine kinase comme PDGFR β ³¹⁰ ou IGF-R1³¹¹, la surexpression de COT³¹² et le support par le microenvironnement tumoral qui sécrète le facteur de croissance HGF³¹³. Il est intéressant de noter que ces mécanismes de résistance s'accompagnent aussi d'adaptations du métabolisme énergétique des cellules de

mélanome. En effet, en inhibant BRAF, le Vémurafenib a comme effet d'inhiber la glycolyse en diminuant l'expression d'enzymes comme GAPDH, LDHA²⁹⁷ et Hexokinase 2 ou des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT3²⁹⁸. Certains font état d'une activation de la glutaminolyse³¹⁴ et de la respiration mitochondriale (OXPHOS) pour maintenir la production d'énergie^{299,315} et la survie des cellules cancéreuses. D'autres reportent une réactivation de la glycolyse au niveau des cellules résistantes à l'inhibiteur de BRAF²⁹⁷⁻²⁹⁹.

L'inefficacité à long terme des inhibiteurs de BRAF a ouvert la voie à une recherche de combinaison de traitements : inhiber BRAF et le métabolisme énergétique des cellules de mélanome. Différentes approches ont été considérées. La metformine, une molécule utilisée dans le traitement du diabète est connue pour son effet activateur du régulateur métabolique AMPK³¹⁶ et pour son effet inhibiteur du complexe I mitochondrial³¹⁷. Outre son activité scavenger du MG^{318,319}, la metformine est donc considérée comme un inhibiteur de l'OXPHOS et un activateur de la glycolyse. Nierh et collègues ont montré un effet synergique de la combinaison de metformine avec le Vémurafenib dans certaines lignées de mélanome indépendamment de leur statut génétique (mutation BRAF ou NRAS) et de l'activation des voies MAPK et AMPK alors que leur combinaison était favorable à la prolifération de cellules BRAF^{V600E} présentant une résistance au Vémurafenib³²⁰. Une autre équipe démontre un bénéfice de l'association du Vémurafenib avec la phenformine, un analogue de la metformine³²¹.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressé au rôle potentiel du MG, ce produit spontané de la glycolyse, dans la progression tumorale et le développement de la résistance aux inhibiteurs de BRAF et d'un phénotype invasif, deux caractéristiques qui sont corrélées au niveau du mélanome³²².

4.2 Résultats

Nous avons exploré le stress dicarbone au cours de la progression tumorale du mélanome en procédant à une étude immunohistochimique de l'accumulation des adduits argpyrimidine sur des échantillons de patients. Nous avons étudié la présence de cet adduit du MG au niveau de peaux saines, de lésions bénignes de type naevi et de collections de mélanomes primaires et de métastases. L'observation de ces échantillons a révélé un marquage intense de l'épiderme, en particulier au niveau cytoplasmique. Cette accumulation d'argpyrimidines dans les kératinocytes a déjà été

reportée dans la littérature et est en lien avec le vieillissement et l'exposition solaire de la peau³²³⁻³²⁶. De façon intéressante, nous avons pu constater un marquage argpyrimidine dans la majorité des tumeurs primaires de mélanome (Fig. 65 A-B). De plus nous avons observé une accumulation cytoplasmique des MG-AGEs significativement plus importante (Test U Mann-Whitney, $p=0,033$) au niveau des métastases dérivées de mélanomes présentant une épaisseur importante (Fig. 65 C-D). L'épaisseur (en mm) de la lésion primaire, indiquée par l'indice de Breslow est liée au diagnostic et au pronostic des patients³²⁷⁻³³⁰. Nous n'avons pas réalisé d'étude immunohistochimique de l'expression de Glo1 dans ces échantillons car nous avons établi précédemment que l'expression de Glo1 est peu informative pour l'évaluation du stress dicarbone chez les patients²⁶⁷.

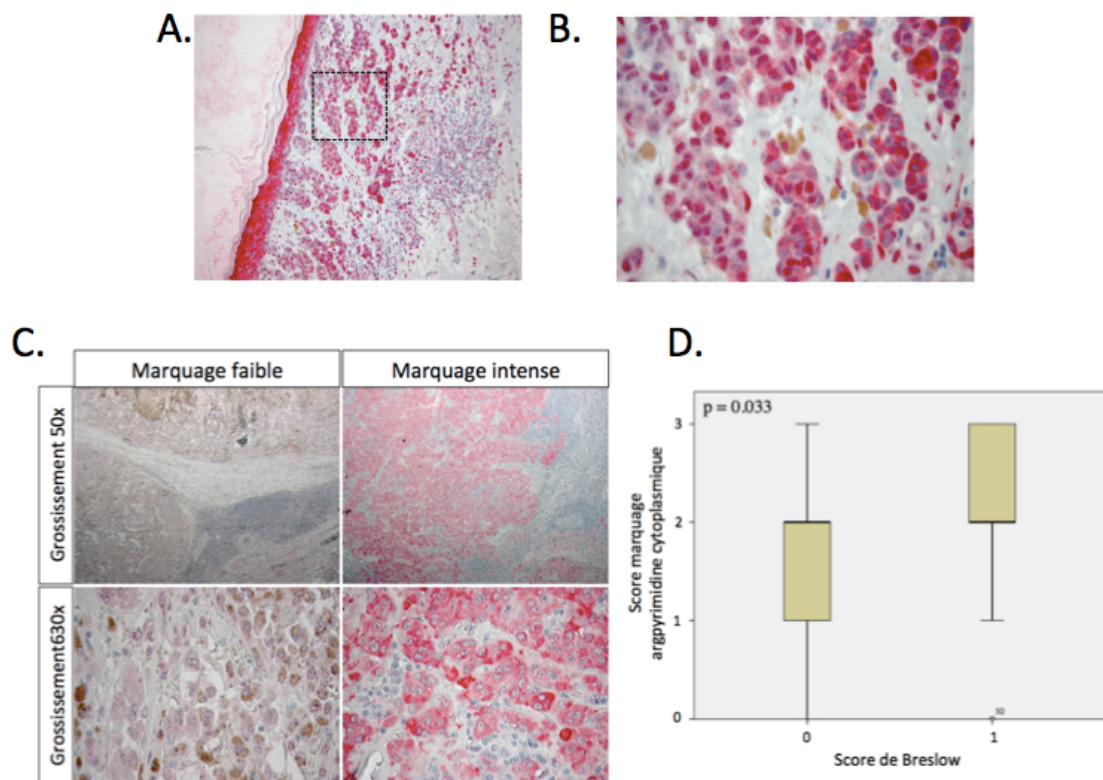


Figure 65. Etude immunohistochimique de l'accumulation des argpyrimidine au niveau de tumeurs primaires et de métastases de mélanomes humains. Détection des argpyrimidines par immunomarquage de 64 tumeurs primaires et 58 métastases de mélanome. Des images représentatives du marquage au niveau de mélanome primaire à grossissement 100x et 630x sont montrés en A et B, respectivement. (C) Images représentative de marquages argpyrimidine au niveau de métastases de mélanome d'intensité faible et intense aux grossissement indiqués. (D) Scores du marquage argpyrimidine cytoplasmique au niveau de métastases de mélanome (n=58). Représentation en box plot de la moyenne des scores par groupes de métastases issues de mélanomes primaires présentant un score Breslow bas (0 pour Breslow < 2 mm) ou haut (1 pour Breslow > 2 mm). Test U de Mann-Whitney, $p = 0,033$.

Nous nous sommes ensuite intéressé au lien entre le stress carbonyle et l'apparition de la résistance au Vémurafenib. Dans ce but, nous avons choisi d'étudier

trois modèles cellulaires de mélanome humain *in vitro*. Nous avons comparé 2 lignées cellulaires de mélanome mutées pour BRAF mais de fonds génétiques différents : les cellules A375 qui sont sensibles au PLX4032 et les cellules A2058 qui présentent une résistance intrinsèque à cet inhibiteur. Un deuxième couple comprend les lignées A375S et A375R qui dérivent de la même lignée parentale cellulaire A375. Les cellules A375R ont acquis leur résistance au Vémurafenib après un long traitement *in vitro* en présence de faibles doses de la drogue alors que les A375S n'ont pas été traitées au Vémurafenib. Le dernier couple MM074S et MM074R sont des cellules BRAF^{V600E} obtenues à partir d'une même biopsie et les cellules MM074R ont acquis la résistance de la même façon que les cellules A375R. La description de ces couples est présentée dans la Table 1.

Table 1 : Couples de lignées cellulaires de mélanome et leur sensibilité au Vémurafenib.

Lignée cellulaire	Sensibilité au Vémurafenib
1 A2058	Résistance intrinsèque
2 A375S	Sensible
A375R	Résistance acquise
3 MM074S	Sensible
MM074R	Résistance acquise

Tout d'abord, nous avons voulu vérifier l'augmentation de la glycolyse au niveau des cellules présentant une résistance à l'inhibiteur de BRAF par rapport aux cellules qui y sont sensibles, en accord avec l'hypothèse selon laquelle les cellules résistantes réactivent la glycolyse sous traitement au Vémurafenib. Pour cela, nous avons mesuré l'avidité des cellules pour le glucose. Au niveau des 3 couples, nous avons constaté une absorption du 2-désoxy-D-glucose plus élevée par les cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles (Fig. 66).

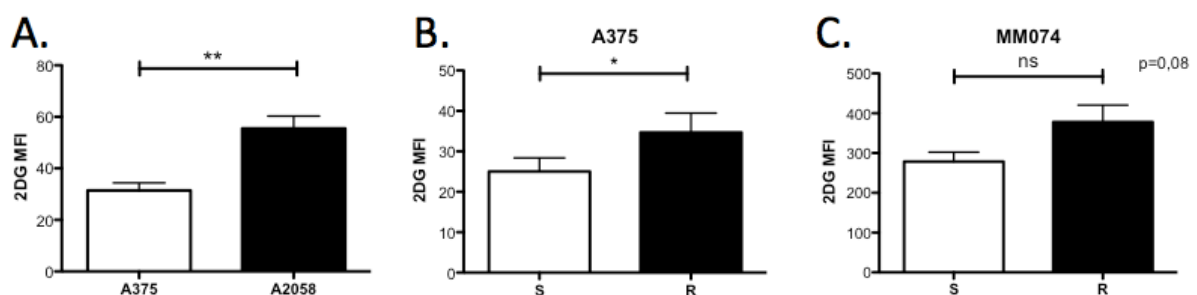


Figure 66. Les cellules de mélanome résistantes à l'inhibition de BRAF sont plus avides pour le glucose que les cellules sensibles. Evaluation de la prise de 2-désoxy-D-glucose (2DG) par cytométrie en flux au niveau des 3 couples de cellules : A375 et A2058 (A), A375S et A375R (B), MM074S et MM074R (C).

Cette différence d'utilisation du glucose est accompagnée par une production plus élevée de L-Lactate, marqueur de la glycolyse, au niveau du milieu conditionné par les cellules résistantes MM074R par rapport aux sensibles MM074S (Fig. 67).

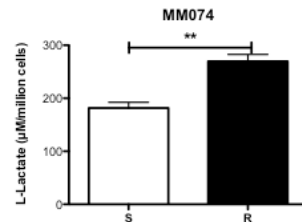


Figure 67. Les cellules de mélanome résistantes à l'inhibition de BRAF sont plus glycolytiques que les cellules sensibles. Dosage du L-Lactate au niveau du milieu conditionné 48h par le couple MM074S et MM074R.

La stimulation de la glycolyse dans ces cellules pourrait être liée à l'augmentation de l'expression génique de transporteurs du glucose et d'enzymes impliquées dans la glycolyse. En effet, nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'expression génique de certains de ces facteurs au niveau des cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles (Fig. 68). ALDOLASE et PKM2 sont plus exprimés alors que GLUT1, HK2 et ENOLASE montrent une tendance à être plus exprimés au niveau des cellules A2058 par rapport aux cellules A375 (Fig. 68 A). GLUT3, HK2 et ENOLASE sont plus exprimés et ALDOLASE et PKM2 montrent une tendance à être plus exprimés au niveau des cellules MM074R par rapport aux cellules MM074S (Fig. 68 B).

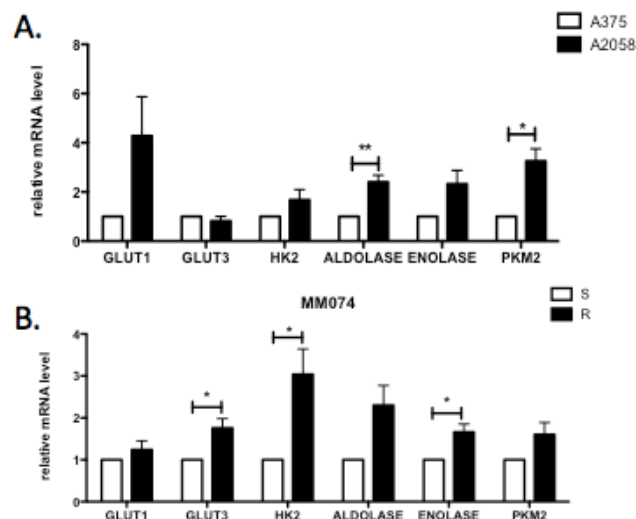


Figure 68. Les cellules de mélanome résistantes à l'inhibition de BRAF présentent des marqueurs de la glycolyse plus élevés que les cellules sensibles. Détection par RT-qPCR des niveaux d'ARNm de marqueurs de la glycolyse GLUT1, GLUT3, Hexokinase 2 (HK2), Aldolase, Enolase et PKM2 (*pyruvate kinase muscle*) au niveau des cellules A375 et A2058 (A) et des cellules MM074S et MM074R (B).

L'augmentation du flux glycolytique peut-il avoir comme conséquence une augmentation de la production de MG ? Nous avons détecté la présence de MG libre dans ces cellules en utilisant la sonde MBo par cytométrie en flux et n'avons pas mis en évidence une accumulation de MG dans les cellules résistantes (Fig. 69).

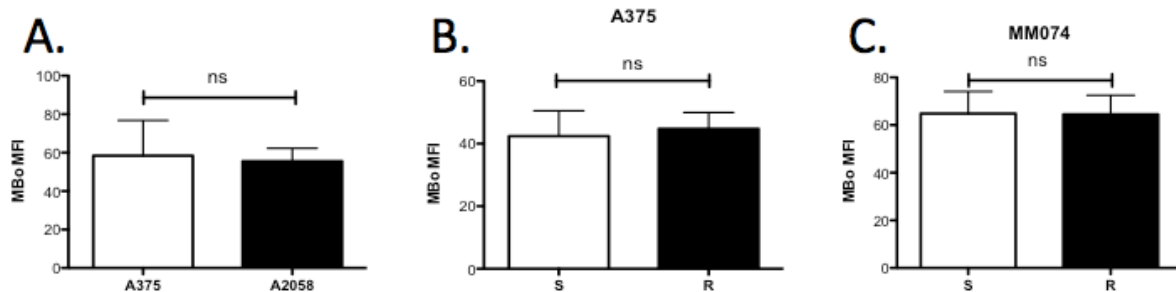


Figure 69. Les cellules de mélanomes résistantes à l'inhibition de BRAF n'accumulent pas plus de MG intracellulaire que les cellules sensibles. Détection du niveau intracellulaire de MG avec la sonde MBo par cytométrie en flux au niveau des 3 couples de cellules : A375 et A2058 (A), A375S et A375R (B), MM074S et MM074R (C).

Cette apparente inconsistance pourrait être expliquée par une plus grande efficacité du système majoritaire de détoxification du MG, le système des glyoxalases, au niveau de ces cellules. En effet, les cellules A2058 et MM074R présentent une activité Glo1 basale significativement plus importante que les cellules A375 et MM074S, respectivement (Fig. 70) et montre une légère tendance à la hausse, toutefois non significative, dans les cellules A375R par rapport aux cellules A375S.

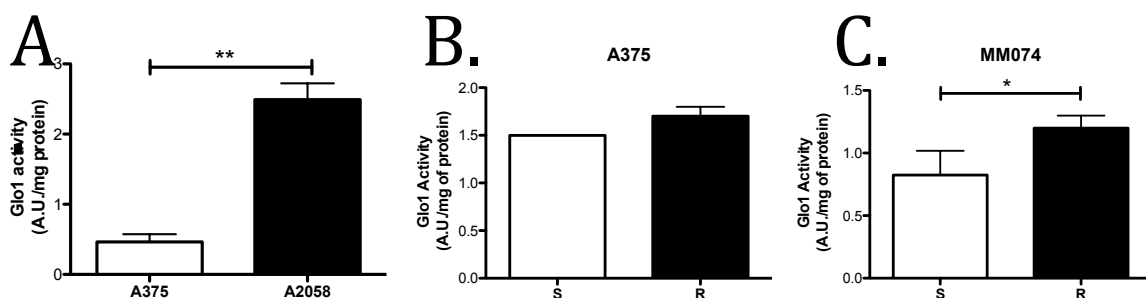


Figure 70. Les cellules de mélanome résistantes à l'inhibition de BRAF présentent activité Glo1 plus élevée que les cellules sensibles. Mesure de l'activité Glo1 au niveau des 3 couples de cellules : A375 et A2058 (A), A375S et A375R (B), MM074S et MM074R (C).

Nous avons aussi évalué le niveau basal d'expression des enzymes AKR, système alternatif de détoxification du MG. Les cellules MM074R présentent des niveaux d'ARNm significativement plus élevés que les cellules MM074 pour AKR1B10 et AKR1C1 (Fig. 71 C). Les cellules A2058 présentent un niveau plus élevée d'AKR1C1 que les cellules A375 (Fig. 71 A). Globalement (Fig. 71), les cellules résistantes présentent une

tendance à exprimer des niveaux plus élevés d'AKR que les cellules sensibles sauf pour AKR1C1 qui est faiblement exprimée au niveau des cellules A2058 (Fif. 71 A). Il serait intéressant de compléter ces observations par une mesure de l'activité AKR.

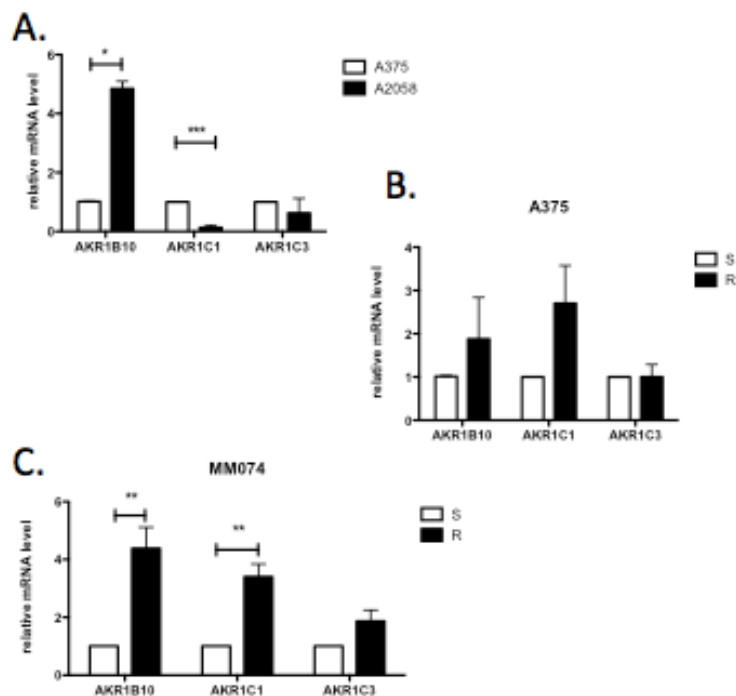


Figure 71. Augmentation de l'expression génique des enzymes AKRs au niveau des cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles. Détection par RT-qPCR des niveaux d'expression des ARNm de AKR1B10, AKR1C1, AKR1C3, ALDH1L1 et ALDH1A4 au niveau des cellules A375 et A2058 (A), A375S et A375R (B) et MM074S et MM074R (C).

De façon intéressante, nous avons pu observer qu'en traitement pendant 6h les cellules sensibles (A375 et MM074S) avec des doses croissantes de MG, leur activité Glo1 pouvait être induite (Fig. 72) alors que celle des cellules résistantes restait stable (A2058 et MM074R). Cette réponse suggère une certaine adaptabilité de ces cellules qui serait potentiellement liée à leur capacité à résister au Vémurafenib.

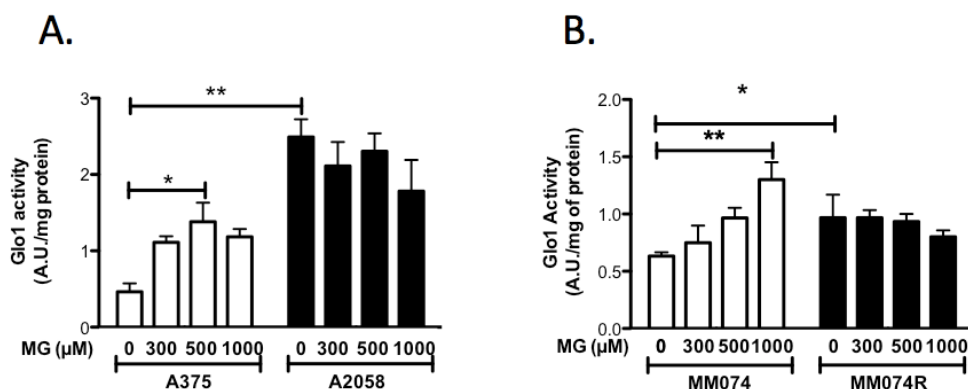


Figure 72. Augmentation de l'activité Glo1 en réponse au MG au niveau des cellules de mélanome sensibles à l'inhibition de BRAF. Mesure de l'activité Glo1 après un traitement aux doses indiquées de MG pendant 6h au niveau des 2 couples de cellules : A375 et A2058 (A), et MM074S et MM074R (B).

L'acquisition de la résistance a également été liée à un changement de statut transcriptionnel. La littérature fait état d'une association entre le facteur principal du contrôle de la différenciation mélanocytaire MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) et BRAF^{V600E} pour induire un phénotype prolifératif et de mauvais pronostic au mélanome³³¹⁻³³³. En 2014, Konieczkowski³³⁴ a montré qu'au niveau de cellules de mélanome présentant la mutation BRAF^{V600E}, l'acquisition de la résistance au Vémurafenib s'accompagnait d'un changement de phénotype des cellules cancéreuses. En effet, elles passent d'un statut prolifératif MITF^{élevé}/NFκB^{bas} à un statut invasif MITF^{bas}/NFκB^{élevé} avec activation de l'expression d'AXL. AXL étant un récepteur tyrosine kinase dont l'activité est liée à l'acquisition du caractère invasif et agressif des cellules de mélanome. Un tel changement de statut entre prolifératif et invasif avait déjà été mis en évidence chez les patients atteints de mélanome par Hoek^{335,336} en 2006 et 2008. La capacité invasive du mélanome a également été associée à la résistance au traitement^{322,337}. Il est intéressant de noter que dans plusieurs contextes, NFκB a été reporté comme étant activé par le stress dicarbone. En effet, El-Osta³³⁸ a montré que l'hyperglycémie induisait des modifications épigénétiques persistantes au niveau des cellules endothéliales menant à une activation de NFκB. La surexpression de Glo1, l'enzyme principale de détoxification du MG, empêche cette activation, indiquant un rôle du MG dans l'activation de NFκB³³⁸. Une autre étude démontre que le MG induit la translocation nucléaire de NFκB au niveau de cellules synoviales³³⁹. Il est donc pertinent de vérifier l'activité de NFκB au niveau des cellules résistantes et de considérer cette voie comme pouvant être activée dans les cellules de mélanome en présence d'un stress dicarbone (Fig. 73 A). Pour ce faire, nous avons réalisé des extractions différentielles des protéines cytoplasmiques et nucléaires au niveau des couples de cellules A375S et A375R et MM074S et MM074R. Par immunoblot, nous avons constaté une accumulation nucléaire plus importante de la forme phosphorylée et active (P-p65) de la sous-unité p65 de NFκB au niveau des cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles (Fig. 73 B). De plus, nous avons évalué l'abondance de PGC1α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), une protéine sous le contrôle transcriptionnel de MITF. L'expression de PGC1α est réduite au niveau des cellules résistantes, indiquant une diminution de l'activité de MITF. (Fig. 73B). Il est intéressant de noter que PGC1α est un régulateur de la fonction mitochondriale et favorise

l'OXPPOS^{299,340}. Le niveau d'expression plus bas de PGC1a au niveau des cellules résistantes est une validation supplémentaire de leur phénotype Warburg.

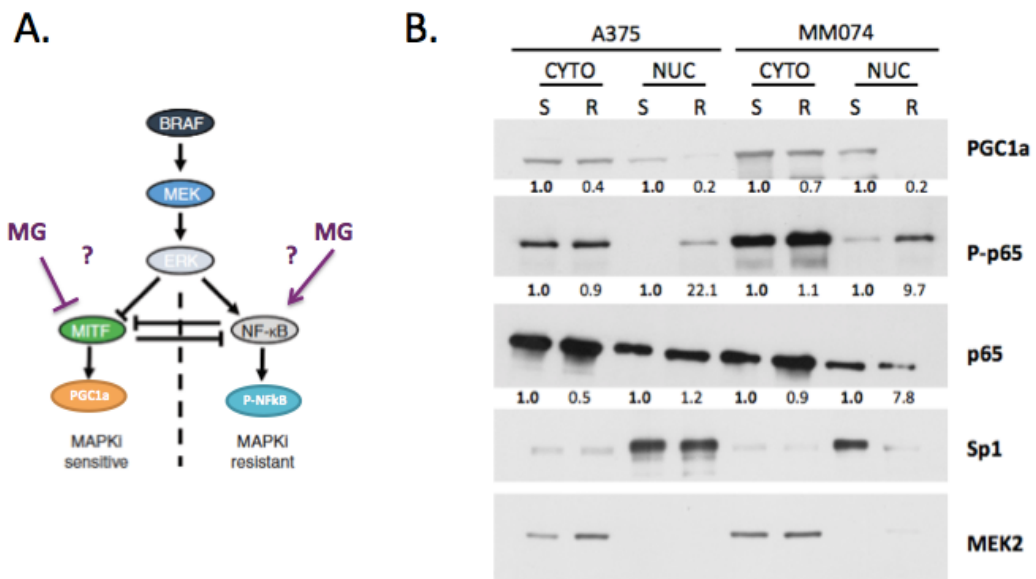


Figure 73. L'activité NFκB est plus importante et l'activité de MIF est diminuée au niveau des cellules de mélanome résistantes à l'inhibition de BRAF par rapport aux cellules sensibles. (A) Schéma de l'hypothèse inspirée par Konieczkowski et al. 2014³³⁴ (B) A partir de cellules A375S et A375R, MM074S et MM074R, nous avons procédé à une extraction avec enrichissement des fractions protéiques cytoplasmiques (CYTO) et nucléaires (NUC), les fractions ont été validées par la détection de MEK2 et Sp1, respectivement. Ces marqueurs ont servi de normalisateurs pour la quantification. Evaluation de l'activité de NFκB par détection de la forme phosphorylée sur la Ser536 de p65 (P-p65) et de la forme totale (p65) de la sous-unité p65. La quantification de P-p65 prend en compte la quantité de p65. PGC1a est détecté comme un reflet de l'activité de MIF.

De façon intéressante, en traitant les cellules MM074S et MM074R avec du MG pendant 24h, nous avons observé une induction de l'activation de NFκB (Fig. 74). Ces observations sont une première indication que le stress dicarbonyle pourrait être impliqué dans le changement de phénotype des cellules de mélanome avec acquisition de la résistance à l'inhibition de BRAF et potentiellement d'un caractère plus invasif.

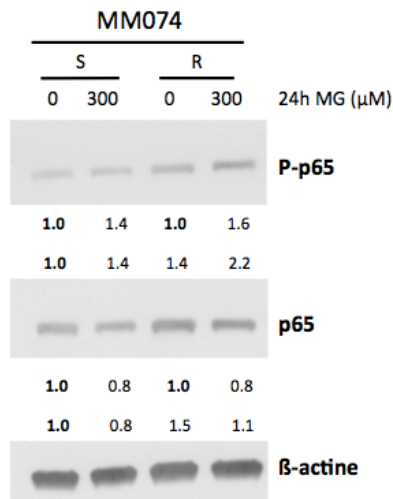


Figure 74. Induction de l'activation de NF κ B par le MG au niveau des cellules sensibles au Vémurafenib. Traitement pendant 24h des cellules MM074S et MM074R au MG 300 μ M puis détection de la sous-unité p65 de NF κ B et de sa forme phosphorylée active par immunoblot. La bêta-actine est utilisée comme normalisateur.

4.3 Conclusions

Nous avons mis en évidence le lien entre processus tumoral et stress dicarbone au niveau du mélanome. De plus, nos observations indiquent que l'acquisition de la résistance au Vémurafenib est liée à une meilleure gestion du stress dicarbone. Enfin, des résultats préliminaires lient le MG à l'activation de NF κ B et l'acquisition d'un phénotype résistant et potentiellement plus invasif dans les cellules de mélanome.

Methylglyoxal-mediated dicarbonyl stress in melanoma: impact on resistance to therapy

Durieux F et al.
Manuscript in construction

Methylglyoxal-mediated dicarbonyl stress in melanoma: impact on resistance to therapy

Florence Durieux et al.

Metastasis Research Laboratory, GIGA-CANCER, University of Liège, Liège, Belgium

Abstract. Metabolic reprogramming toward aerobic glycolysis unavoidably favours methylglyoxal (MG) and advanced glycation end products (AGEs) formation in cancer cells. We have recently demonstrated that MG-induced AGEs are a consistent feature of breast and colon cancers. In both cancer types, MG stress promoted *in vivo* tumor growth that could be reverted by the use of carnosine, an efficient MG scavenger.

In this study, we first aimed at the evaluation of dicarbonyl stress in melanoma primary and metastatic malignant lesions using immunohistochemistry. Argpyrimidine MG-adducts accumulation was detectable in most of the lesions examined. Importantly, cytoplasmic MG adducts level in metastatic correlated positively with the Breslow thickness measures in their corresponding primary lesions thus indicating a potential link between MG stress and disease progression.

It is well established that oncogenic BRAF regulates metabolic reprogramming in melanoma. Therefore, we used melanoma cell line models to explore the potential link between dicarbonyl stress and resistance to BRAF inhibition. First we confirmed that Vemurafenib resistant cells are able to reactivate glycolysis. Then, we observed an increased capacity for MG detoxification, by both Glo1 and AKRs systems, in resistant cells compare to sensitive ones. Finally, dicarbonyl stress seems to be linked to the activation of NFkB and potential resistance acquisition in melanoma cells.

INTRODUCTION

Melanoma is a form of skin cancer developing from melanocytes. Those cells, residing in the basal layer of epidermis, are responsible for the production of an UV-protective pigment, melanin. Melanoma is the less frequent but deadliest form of skin cancer when it reaches the invasive state¹. More than 50% of patients present with alteration on the BRAF gene with the majority displaying a BRAF^{V600E} mutation². Those mutations induce a constitutive activation of the RAS/MAPK pathway. Around 90% of melanoma patients present a hyper-activation of this pathway associated with tumor initiation and metastasis³.

BRAF^{V600E} mutation induces a metabolic reprogramming, favoring glycolysis rather than mitochondrial respiration. In fact, Hall et al. showed an increased GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) and G6PD

(glucose-6-phosphate dehydrogenase) expression in transformed melanocytes, leading to increased glycolysis and pentose phosphate pathway⁴. This link between BRAF^{V600E} mutation and increased glycolytic flux was confirmed by other studies⁵⁻⁸. Aerobic glycolysis favors spontaneous production of a reactive side-product, the dicarbonyl methylglyoxal (MG)^{9,10}. This metabolite glycates biological macromolecules and accumulation of these adducts induces dicarbonyl stress which has been implicated in diabetes complications and obesity¹¹. Among these adducts the modification of arginine residues in proteins forms argpyrimidine. Detoxification of MG by the 2 enzymes of the glyoxalase system, Glo1 and Glo2, allows its conversion to D-Lactate¹². Metformin, a first-line treatment for diabetes, is able to inhibit MG-mediated glycation by scavenging it^{13,14}.

Therapeutic targeting of BRAF^{V600E} by a specific inhibitor, Vemurafenib, yielded increased survival in most patients¹⁵. However, the majority of patients quickly developed resistance to therapy. Resistance acquisition in melanoma cells is triggered by mechanisms linked to MAPK pathway reactivation or independent of this pathway. Among MAPK-dependent mechanisms, studies have shown BRAF gene amplification¹⁶, BRAF alternative splicing¹⁷, NRAS mutation^{18,19}, MEK mutation²⁰ and NRF-1 loss of function²¹⁻²³. Among MAPK-independent mechanisms, increased of tyrosine kinase receptors expression like PDGFR β ²⁴ or IGF-R1²⁵, overexpression of COT²⁶ and HGF secretion by the microenvironment²⁷ have been shown. It is noteworthy that these resistance mechanisms can also be linked to energetic metabolism adaptations in melanoma cells. By inhibiting BRAF, Vemurafenib is also hindering glycolysis flux by decreasing GAPDH, LDHA (lactate dehydrogenase A)⁴ and hexokinase 2 enzymes or glucose transporters GLUT1 and GLUT3 expression⁵. Some studies reported glutaminolysis activation²⁸ or mitochondrial respiration (OXPHOS)^{6,29} increase to maintain energy production and melanoma cells survival under BRAF inhibition. Others reported glycolysis reactivation in Vemurafenib-resistant cells⁴⁻⁶.

The lack of long-term efficiency of BRAF inhibition has opened the way to new drug combination strategies for melanoma therapy: inhibition of both BRAF and energetic metabolism. Metformin is known for activating the metabolic regulator AMPK³⁰ and for inhibiting mitochondrial electron transport chain complex 1³¹. Metformin is thus considered an OXPHOS inhibitor and a glycolysis activator. Nierh et al. showed a synergic effect of metformin combined with Vemurafenib in some

melanoma cell lines independently of their genetic background (BRAF or NRAS mutations) or of the level of MAPK pathway and AMPK activation. However this combination was favorable to BRAF^{V600E} cells presenting resistance to Vemurafenib alone³². Another team showed a beneficial combination of Vemurafenib with Phenformin, a Metformin analogue³³.

In this context, we were interested in the potential role of MG in melanoma progression, the acquisition of resistance against BRAF inhibition and the transition to an invasive phenotype, these last two processes being correlated in melanoma patients.

RESULTS

Argpyrimidine accumulation in human melanoma lesions.

We evaluated the presence of argpyrimidine adducts using immunohistochemistry in a collection of 64 primary lesions and 58 metastases from human melanoma samples. We observed an intense staining in epidermis keratinocytes as it has been reported before in relation to ageing and sunlight exposure³⁴⁻³⁷. Interestingly, we noted that argpyrimidine staining was present in the vast majority of primary melanoma lesions (Fig. 1A-B). Furthermore, we observed a significantly higher cytoplasmic accumulation of argpyrimidine in metastases lesions for which the primary tumor presented with deep lesions as assessed by their Breslow index (Fig. 1C-D). As demonstrated in the literature, Breslow depth is associated to diagnosis and prognosis in melanoma patients³⁸⁻⁴². We chose not to perform a Glo1 expression investigation in patients as this endeavor proved to be non-informative of dicarboxylate stress in an earlier study in breast cancer⁴³.

Resistance to BRAF inhibition favors glycolysis in melanoma cells.

Next, we wanted to investigate the potential link between acquisition of resistance to BRAF inhibition and dicarbonyl stress. For this purpose, we used melanoma cell lines bearing the BRAF^{V600E} mutation and with different sensitivities to Vemurafenib. A2058 cells are intrinsically resistant whereas A375 and MM074 cells are sensitive to BRAF inhibition. We treated A375 and MM074 cells for 10 weeks with increasing doses of Vemurafenib in order to induce acquired resistance to the drug in these cells. At the end, we achieved 2 coupled cell lines A375S - A375R and MM074S-MM074R that are sensitive or resistant to Vemurafenib (Table 1). Considering that acquisition of resistance to Vemurafenib can be linked to a reactivation of glycolysis, we first wanted to confirm this event in our coupled cell lines model. For this we evaluated their avidity for glucose by flow cytometry. We observed a higher glucose uptake in resistant cells compared to sensitive cells (Fig. 2). This difference in glucose consumption is linked in MM074R cells to an increased production of L-Lactate, the end-product of glycolysis, in their conditioned medium compared to their sensitive counterpart (Fig. 3). Glycolysis stimulation in resistant cells could be linked to an unregulated gene expression of glucose transporters and glycolysis enzymes. Indeed, we observed a trend to increased mRNA expression of some of these factors in resistant cells compared to sensitive ones (Fig. 4). GLUT1, HK2, ALDOLASE and PKM2 mRNA levels are higher in A2058 resistant cells compared to A375 sensitive cells (Fig. 4A). HK2, ALDOLASE, ENOLASE and PKM2 are more expressed in MM074R cells than in MM074S (Fig. 4B). Thus in the cell lines investigated there seems to be a

reactivation of glycolysis alongside resistance to BRAF inhibition.

Increased glycolysis in resistant cells is assorted to a better MG management in melanoma cells.

Is increased glycolytic flux followed by an increased MG accumulation in resistant cells? To assess MG content in cells we used the MBo probe, a living-cell permeable molecule that gains fluorescence after reaction with free MG⁴⁴. In the 3 coupled cell lines we could not detect any modulation of MG accumulation (Fig. 5). The apparent inconsistency could be explained by a better MG detoxification in the resistant cells. We first measured Glo1 activity to assess the detoxification capacity of the melanoma cells with the major detoxification system. Indeed, we observed a higher Glo1 activity in A2058 and MM074R resistant cells compared with A375 and MM074S sensitive cells respectively (Fig. 6A, C). A slight trend to a more elevated Glo1 activity is also present in A375R cells compared to A375S cells (Fig. 6B). To further investigate MG detoxification in melanoma cells, we assessed an alternative detoxification pathway of MG, the aldo-keto reductases enzymes (AKRs). This family of enzymes is able to detoxify MG into acetol using NADPH. Their basal MG detoxification rate is considered to be lower than Glo1⁴⁵ but they can represent a compensatory mechanism in case of Glo1 deficiency⁴⁶. We evaluated the basal AKRs mRNA levels in the coupled sensitive and resistant cells (Fig. 7). We observed a global trend to a higher expression of AKRs in resistant cells compared to sensitive cells except for AKR1C1 that is faintly expressed in A2058 cells (Fig. 7A). In MM074R cells, AKR1B10 and AKR1C1 expression is significantly higher than in MM074S cells (Fig 7C). It would be of

interest to check for AKR activity in these cells in order to validate the increased ability of resistant cells to detoxify MG with both Glo1 and AKR systems.

Cells sensitive to BRAF inhibition are reactive to MG stress.

Interestingly, we observed that a 6hr treatment of melanoma cells with increasing doses of MG is able to increase Glo1 activity in A375 and MM074S sensitive cells (Fig. 8). Although basal Glo1 activity is higher in A2058 and MM074R resistant cells, MG treatment did not increase it further. The reactivity of sensitive melanoma cells to MG could be a sign of their adaptability and potentially to their capacity to gain resistance to BRAF inhibition.

Potential role of MG in resistance and invasiveness of melanoma cells.

Acquisition of resistance to BRAF inhibition has been linked in the literature to a differential transcriptional state. Differentiation process main transcription factor regulator MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) expression is associated in melanoma to a proliferative phenotype and poor prognosis when in combination with BRAF^{V600E} mutation⁴⁷⁻⁴⁹. In 2014, Konieczkowski and colleagues showed that Vemurafenib resistance acquisition was linked to a phenotype change in BRAF^{V600E} melanoma cells⁵⁰. Sensitive cells with high MITF and low NFkB signature switched to a low MITF and high NFkB state when acquiring resistance to BRAF inhibition. NFkB activation induced AKL receptor kinase expression that is associated to aggressive and invasive behavior in melanoma cells. This switch from a proliferative to an invasive state was already highlighted in melanoma patients by Hoek in 2006⁵¹ and 2008⁵².

Invasiveness is associated with resistance to therapy in melanoma^{53,54}. It is noteworthy that NFkB activity has been reported to be increased by carbonyl stress. El-Osta showed that transient hyperglycemia induced persistent epigenetic changes in endothelial cells leading to an activated NFkB⁵⁵. Glo1 overexpression impeded this activation suggesting a role of MG in this process. Another study demonstrated NFkB nuclear translocation upon MG treatment in synovial cells⁵⁶. It appears thus relevant to investigate NFkB activation in resistant melanoma cells and if dicarbonyl stress could have a hand in it. For this purpose, we performed a cytoplasmic and nuclear differential protein extraction on A375S-A375R and MM074S-MM074R cells. Our hypothesis was that in sensitive cells, MITF activity would be higher than in resistant ones, shown by increased PGC1a (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1a) expression, a target of MITF regulation⁶. Whereas in resistant cells, NFkB activation would be higher than in sensitive cells (Fig. 9A). Indeed, we observed a reduced level of PGC1a protein level in the nucleus of A375R and MM074R cells compared to their sensitive counterparts, suggesting a decreased transcriptional activity of MITF (Fig. 9B). Moreover, PGC1a is a known regulator of mitochondrial function, favoring OXPHOS⁶. Its lower level in resistant melanoma cells is a further evidence of a Warburg phenotype in these cells compared to sensitive ones. p65 NFkB subunit was more phosphorylated in the nuclear fractions of resistant cells compared to sensitive ones, confirming the switch from the MITF-high proliferative state to a NFkB high resistant state in these cells. In accordance with these observations, MM074R cells displayed a higher level of p65 phosphorylation in total protein

extract (Fig. 10). When treated for 24hr with MG300 μ M, P-p65 levels are increasing in both MM074S and MM074R suggesting that dicarbonyl stress is able to activate NF κ B in melanoma cells.

DISCUSSION

As for other cancer types, melanoma incidence is increased among the patients suffering from diabetes⁵⁷ and obesity⁵⁸. For example, adipocyte secretome is able to stimulate melanoma aggressiveness by inducing melanoma cells survival, adhesion, motility and plasticity. In vivo, melanoma growth is increased in obese mice compared to lean ones. Both diabetes and obesity are chronic disease with metabolic disorder and their ethiopathology is linked to dicarbonyl stress⁵⁹. Investigation of MG-adducts in melanoma primary tumors showed that argpyrimidine accumulation is a consistent feature of melanoma. Moreover, we evidenced a correlation between dicarbonyl stress and Breslow depth score in melanoma. This correlation might be an indicator of MG relation to melanoma prognosis. Our in vitro experiments showed a better management of MG in Vemurafenib resistant cells compared to sensitive ones. Indeed, increased glycolysis flux in resistant cells did not lead to elevated MG level in resistant cells probably thanks to a better detoxification of the dicarbonyl by both Glo1 and AKRs systems. Interestingly, Glo1 activity can be unregulated upon MG treatment in sensitive cells showing an adaptability of those cells. Moreover, dicarbonyl stress seems to be linked to the acquisition of resistance to Vemurafenib through activation of NF κ B. It would be of interest to see if NF κ B activation under MG treatment is abolished by treatment with MG scavengers. One of those scavengers, Metformin, has been studied in combination with Vemurafenib as a

potential new therapeutic strategy^{32,33}. However the authors did not explore the contribution of dicarbonyl stress in their experiments. Treatment of resistant melanoma cells with more potent MG-scavenger such as Carnosine or Aminoguanidine might have a synergic effect with Vemurafenib and resensitizes the cells to BRAF inhibition. More in-depth investigation of the role of MG in melanoma progression and resistance therapy is needed but our data indicate that melanoma treatment could benefit from MG level modulation.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and reagents. A2058, A375 cancer cell lines were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). A375R cells were generated from A375 cells by chronic treatment with increasing doses of Vemurafenib up to 2 μ M for 10weeks and are maintained in culture with 2 μ M Vemurafenib treatment. A2058, A375S and A375R cells are grown in DMEM medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) and 2mM L-Glutamine (Lonza). MM074S and MM074R cells were a kind gift of Pr. Ghanem (ULB) are grown in HAM-F10 medium supplemented with a mix of 5% fetal bovine serum and 5% new-born calf serum (FBS and FCS; ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) and 1mM L-Glutamine (Lonza). MM074R cells were maintained in culture with 2 μ M Vemurafenib treatment. Vemurafenib is dissolved in DMSO in a stock solution of 10mM (Selleckchem, Houston, TX). Methylglyoxal (MG, Sigma) treatment was performed during 24 hr. Methylglyoxal solution contamination by formaldehyde was assessed by NMR analysis and considered insignificant

(<3%)⁶⁰. Anti-argpyrimidine antibody (mAb6B) specificity has been previously confirmed by competitive ELISA and it has been shown to not react with other MG-arginine adducts such as 5-hydro-5-methylimidazolone and tetrahydropyrimidine⁶¹. MBo (Methyl diaminobenzene-BODIPY) is a cell permeable MG-probe, synthesized as previously described⁴⁴.

Clinical tumor samples. Human melanoma primary (n = 64) and metastatic (n = 58) lesions were obtained from the Pathology Department of the University Hospital of Liège and from Oncology and Experimental Surgery Laboratory at the Institute Jules Bordet, Bruxelles University (ULB) in agreement with ethical guidelines of the University of Liège (Belgium) and the University of Bruxelles (Belgium).

Immunohistochemistry. Formalin-fixed paraffin embedded sections were dewaxed and rehydrated. Endogenous alkaline phosphatase activity was inhibited by a 10 min incubation in Levamisole (Sigma). Antigen retrieval was obtained by a 40 min bath in 10mM sodium citrate buffer pH6 at 95°C. Non-specific binding was avoided by incubation with 1,5% normal serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 min. Then, primary antibody, either mouse anti-Argpyrimidine (1/1000, mAb6B) or rabbit anti-S100A4 (1/300, A5114 Dako, Carpinteria, CA) was applied for the night. Sections were next incubated with anti-mouse or anti-rabbit biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories) for 30 min followed by staining with Fast Red (Sigma). After counterstaining with hematoxylin, slides were mounted with Glycergel (Dako). Control slides incubated without primary antibody showed no immunoreactivity.

Immunohistochemical staining evaluation. The immunostaining was assessed and scored by two independent examiners. Argpyrimidine and S100A4 score were attributed according to the intensity of the staining (0, 1+, 2+, 3+) in the nuclear and in the cytoplasmic cellular compartments.

Glucose uptake. Cells were incubated 1hr in glucose free medium containing 200µM of 2NDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose, N13195 Life technologies, Waltham, MA). Cells were then trypsinized and analyzed by flow cytometry (FACSCanto, BD Biosciences). Data are represented as mean ± SEM of at least 3 biological replicates.

L-Lactate dosage. L-Lactate concentrations were assessed in conditioned-medium, the number of cells in each condition was counted for normalization. Conditioned-medium diluted 3 times was incubated in presence of NAD⁺, hydrazine and L-Lactate dehydrogenase enzyme (Sigma). Lactate concentration was determined by comparing NADH formation measure at 320nm to the absorbance of a calibration curve. L-Lactate measures are expressed as µM/million cells. Three technical replicates of each sample were performed and data are represented as mean ± SEM of at least 3 biological replicates.

RNA isolation and quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). RNA extraction was done according to the manufacturer's protocol (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Reverse transcription was performed using the Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Hundred ng of cDNA were mixed with primers, probe (Universal ProbeLibrary System, Roche) and 2x Takyon Rox Probe MasterMix

dTTP Blue (Eurogentec, Seraing, Belgium). Q-PCR were performed using the 7300 Real Time PCR System and the corresponding manufacturer's software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Relative gene expression was normalized to 18S rRNA. Primers were synthesized by IDT (Coralville, IA) and their sequences are detailed in Supplementary Table 1. Three technical replicates of each sample have been performed and data are presented as mean \pm SEM of 3 biological replicates.

Cellular MG quantification. MBo (Methyl diaminobenzene-BODIPY) was used to detect endogenous MG. The cells were treated with 5mM MBo in complete medium as previously described⁴⁴. After 1 hr, the cells were washed with PBS and incubated in medium for 6. Cells were then trypsinized and analyzed by flow cytometry (FACSCanto, BD Biosciences). Data are represented as mean \pm SEM of at least 3 biological replicates.

Glo1 activity assay. Glo1 activity assessment was performed as previously described^{43,60,62}. Briefly, S-D-lactoylglutathion formation was followed at 240nm in a reaction mixture composed of pre-incubated MG with reduced glutathion (Sigma) and protein extracted in RIPA buffer. Glo1 maximal activity measure is expressed as arbitrary units (A.U.) of enzyme per mg of proteins. Three technical replicates of each sample were performed and data are represented as mean \pm SEM of at least 3 biological replicates.

Cyto/Nuc differential protein extraction. Fresh cell pellets were first lysed for 30 sec in cytoplasmic lysis buffer (10mM Hepes pH7.4, 10mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, 0,2% NP-40, 1mM DTT) and centrifugated for 5min. Supernatant contained cytoplasmic protein fraction. After 5 cycles of

washing (10mM Hepes pH7.4, 20mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, 1mM DTT) and centrifugation, cell pellets were further lysed in nucleus lysis buffer (20mM Hepes pH7.4, 630mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 25% glycérol, 0.5M DTT) under agitation for 30min. Nuclear protein fraction was recollected after centrifugation for 15min. All buffers containing phosphatase and proteinase inhibitors (Roche, Penzberg, Germany).

Western Blot. Cell extraction was performed in 1% SDS buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche). Protein concentration is determined using bicinchoninic acid assay (Pierce, Carlsbad, CA). Twenty μ g of protein were separated on 10 or 12.5% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Roche). Blocking was performed in 5% non-fat dried milk (Biorad, Hercules, CA) in TBS-Tween 0.1% for 1 hr. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: PGC1a (1/1000, sc-13067 Santa Cruz, Dallas, TX), P(Ser536)-p65 (1/1000, #3031 Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), p65 (1/1000, #6956 Cell Signaling), Sp1 (1/1000, 07-645 Millipore, Billerica, MA), MEK2 (1/1000, #9125 Cell Signaling) and beta-actin (1/5000, A5441, Sigma). Membranes were then incubated for 1 hr in presence of the appropriated secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Immunoreactive bands were detected using ECL Western Blotting substrate (Pierce). Bands quantification by densitometry and normalization with β actine was performed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). A representative Western Blot of three independent biological replicates is shown and quantification is represented either in bar graph as mean \pm SEM of 3 biological replicates or written below the picture.

Statistical analysis. Both technical and biological replicates were performed where indicated in figure legends. Technical replicates are considered as taking one sample and analyzing it several times in the same experiment. Biological replicates represent the analysis of samples from independent experiments. All results were reported as means with Standard Error Mean (SEM). Two group comparisons were performed using unpaired student's t-test with or without Welsch's correction according to homoscedasticity. When an experiment required comparisons between more than two groups, statistical analysis was performed using Dunnet's test one-way ANOVA. In the case of discrete variables (IHC scores), significant differences between groups were assessed by Mann-Whitney *U* test. In all cases, a bilateral $p < 0.05$ was considered as statistically significant with a 95% confidence

REFERENCES

- 1 de Vries, E. & Coebergh, J. W. Cutaneous malignant melanoma in Europe. *Eur J Cancer* **40**, 2355-2366, doi:10.1016/j.ejca.2004.06.003 (2004).
- 2 Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954, doi:10.1038/nature00766 (2002).
- 3 Wellbrock, C. & Arozarena, I. The Complexity of the ERK/MAP-Kinase Pathway and the Treatment of Melanoma Skin Cancer. *Front Cell Dev Biol* **4**, 33, doi:10.3389/fcell.2016.00033 (2016).
- 4 Hall, A. *et al.* Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by

interval. All experiments were performed as several independent biological replicates.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Télévie, the Centre Anti-Cancéreux and the Fonds Léon Frederic (University of Liège, Belgium). The authors are thankful to Mrs. Maloujahmoum, Mrs. Nüchtern and Mr. Hennequière for their technical support. We also thank Mrs. Gofflot and the Biothèque of the University of Liège-CHU Liège providing human samples and patients data. The authors are also thankful to Pr. Ghanem (ULB-Bordet) for providing human samples. We also thank Pr. Uchida (Nagoya University, Japan) for providing the anti-argpyrimidine antibody and Dr. Spiegel (Yale University, USA) for providing the Mbo probe.

the (V600E)BRAF oncogene.

Oncotarget **4**, 584-599, doi:10.18632/oncotarget.965 (2013).

- 5 Parmenter, T. J. *et al.* Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer Discov* **4**, 423-433, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0440 (2014).
- 6 Haq, R. *et al.* Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* **23**, 302-315, doi:10.1016/j.ccr.2013.02.003 (2013).
- 7 Smith, L. K., Rao, A. D. & McArthur, G. A. Targeting metabolic reprogramming as a potential therapeutic strategy in melanoma. *Pharmacol Res* **107**, 42-47, doi:10.1016/j.phrs.2016.02.009 (2016).

- 8 Haq, R., Fisher, D. E. & Widlund, H. R. Molecular pathways: BRAF induces bioenergetic adaptation by attenuating oxidative phosphorylation. *Clin Cancer Res* **20**, 2257-2263, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0898 (2014).
- 9 Phillips, S. A. & Thornalley, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* **212**, 101-105 (1993).
- 10 Richard, J. P. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans* **21**, 549-553 (1993).
- 11 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun* **458**, 221-226, doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.140 (2015).
- 12 Sousa Silva, M., Gomes, R. A., Ferreira, A. E., Ponces Freire, A. & Cordeiro, C. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *Biochem J* **453**, 1-15, doi:10.1042/BJ20121743 (2013).
- 13 Ruggiero-Lopez, D. *et al.* Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol* **58**, 1765-1773 (1999).
- 14 Beisswenger, P. & Ruggiero-Lopez, D. Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes Metab* **29**, 6S95-103 (2003).
- 15 Sosman, J. A. *et al.* Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* **366**, 707-714, doi:10.1056/NEJMoa1112302 (2012).
- 16 Shi, H. *et al.* Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun* **3**, 724, doi:10.1038/ncomms1727 (2012).
- 17 Poulikakos, P. I. *et al.* RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **480**, 387-390, doi:10.1038/nature10662 (2011).
- 18 Heidorn, S. J. *et al.* Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* **140**, 209-221, doi:10.1016/j.cell.2009.12.040 (2010).
- 19 Lidsky, M. *et al.* Mitogen-activated protein kinase (MAPK) hyperactivation and enhanced NRAS expression drive acquired vemurafenib resistance in V600E BRAF melanoma cells. *J Biol Chem* **289**, 27714-27726, doi:10.1074/jbc.M113.532432 (2014).
- 20 Emery, C. M. *et al.* MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20411-20416, doi:10.1073/pnas.0905833106 (2009).
- 21 Maertens, O. *et al.* Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov* **3**, 338-349, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0313 (2013).
- 22 Whittaker, S. R. *et al.* A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov* **3**, 350-362, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0470 (2013).

- 23 Gibney, G. T. & Smalley, K. S. An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer Discov* **3**, 260-263, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0017 (2013).
- 24 Shi, H., Kong, X., Ribas, A. & Lo, R. S. Combinatorial treatments that overcome PDGFR β -driven resistance of melanoma cells to V600E-BRAF inhibition. *Cancer Res* **71**, 5067-5074, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0140 (2011).
- 25 Gopal, Y. N. *et al.* Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer Res* **70**, 8736-8747, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0902 (2010).
- 26 Manzano, J. L. *et al.* Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med* **4**, 237, doi:10.21037/atm.2016.06.07 (2016).
- 27 Straussman, R. *et al.* Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* **487**, 500-504, doi:10.1038/nature11183 (2012).
- 28 Baenke, F. *et al.* Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Mol Oncol* **10**, 73-84, doi:10.1016/j.molonc.2015.08.003 (2016).
- 29 Gopal, Y. N. *et al.* Inhibition of mTORC1/2 overcomes resistance to MAPK pathway inhibitors mediated by PGC1 α and oxidative phosphorylation in melanoma. *Cancer Res* **74**, 7037-7047, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1392 (2014).
- 30 Zhou, G. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**, 1167-1174, doi:10.1172/JCI13505 (2001).
- 31 Wheaton, W. W. *et al.* Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife* **3**, e02242 (2014).
- 32 Niehr, F. *et al.* Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations. *J Transl Med* **9**, 76, doi:10.1186/1479-5876-9-76 (2011).
- 33 Yuan, P. *et al.* Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18226-18231, doi:10.1073/pnas.1317577110 (2013).
- 34 Hashmi, F., Malone-Lee, J. & Hounsell, E. Plantar skin in type II diabetes: an investigation of protein glycation and biomechanical properties of plantar epidermis. *Eur J Dermatol* **16**, 23-32 (2006).
- 35 Pigeon, H. *et al.* Biological Effects Induced by Specific Advanced Glycation End Products in the Reconstructed Skin Model of Aging. *Biores Open Access* **4**, 54-64, doi:10.1089/biores.2014.0053 (2015).
- 36 Meerwaldt, R. *et al.* Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* **47**, 1324-1330, doi:10.1007/s00125-004-1451-2 (2004).
- 37 Corstjens, H. *et al.* Glycation associated skin autofluorescence

- and skin elasticity are related to chronological age and body mass index of healthy subjects. *Exp Gerontol* **43**, 663-667, doi:10.1016/j.exger.2008.01.012 (2008).
- 38 Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* **172**, 902-908 (1970).
- 39 Vollmer, R. T. & Seigler, H. F. Using a continuous transformation of the Breslow thickness for prognosis in cutaneous melanoma. *Am J Clin Pathol* **115**, 205-212, doi:10.1309/WAVR-560R-NU5E-4Q96 (2001).
- 40 Büttner, P. *et al.* Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* **75**, 2499-2506 (1995).
- 41 Balch, C. M. *et al.* Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* **19**, 3622-3634, doi:10.1200/JCO.2001.19.16.3622 (2001).
- 42 Rousseau, D. L. *et al.* Revised American Joint Committee on Cancer staging criteria accurately predict sentinel lymph node positivity in clinically node-negative melanoma patients. *Ann Surg Oncol* **10**, 569-574 (2003).
- 43 Chiavarina, B. *et al.* Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. *Oncotarget* (2014).
- 44 Wang, T., Douglass, E. F., Fitzgerald, K. J. & Spiegel, D. A. A "turn-on" fluorescent sensor for methylglyoxal. *J Am Chem Soc* **135**, 12429-12433, doi:10.1021/ja406077j (2013).
- 45 Baba, S. P. *et al.* Reductive metabolism of AGE precursors: a metabolic route for preventing AGE accumulation in cardiovascular tissue. *Diabetes* **58**, 2486-2497, doi:10.2337/db09-0375 (2009).
- 46 Morgenstern, J. *et al.* Loss of glyoxalase 1 induces compensatory mechanism to achieve dicarbonyl detoxification in mammalian Schwann cells. *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M116.760132 (2016).
- 47 Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T. & Fisher, D. E. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**, 298-301, doi:10.1038/34681 (1998).
- 48 Wu, M. *et al.* c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev* **14**, 301-312 (2000).
- 49 Wellbrock, C. *et al.* Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One* **3**, e2734, doi:10.1371/journal.pone.0002734 (2008).
- 50 Konieczkowski, D. J. *et al.* A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* **4**, 816-827, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0424 (2014).
- 51 Hoek, K. S. *et al.* Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* **19**, 290-302, doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00322.x (2006).

- 52 Hoek, K. S. *et al.* In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* **68**, 650-656, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2491 (2008).
- 53 Verfaillie, A. *et al.* Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* **6**, 6683, doi:10.1038/ncomms7683 (2015).
- 54 Müller, J. *et al.* Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* **5**, 5712, doi:10.1038/ncomms6712 (2014).
- 55 El-Osta, A. *et al.* Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* **205**, 2409-2417, doi:10.1084/jem.20081188 (2008).
- 56 Lin, C. C. *et al.* Methylglyoxal activates NF-kappaB nuclear translocation and induces COX-2 expression via a p38-dependent pathway in synovial cells. *Life Sci* **149**, 25-33, doi:10.1016/j.lfs.2016.02.060 (2016).
- 57 Qi, L. *et al.* Type 2 diabetes mellitus and risk of malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Iran J Public Health* **43**, 857-866 (2014).
- 58 Karimi, K., Lindgren, T. H., Koch, C. A. & Brodell, R. T. Obesity as a risk factor for malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Rev Endocr Metab Disord* **17**, 389-403, doi:10.1007/s11154-016-9393-9 (2016).
- 59 Rabbani, N., Xue, M. & Thornalley, P. J. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconj J* **33**, 513-525, doi:10.1007/s10719-016-9705-z (2016).
- 60 Nokin, M. J. *et al.* Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.19375 (2016).
- 61 Oya, T. *et al.* Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J Biol Chem* **274**, 18492-18502 (1999).
- 62 Chiavarina, B. *et al.* Methylglyoxal-Mediated Stress Correlates with High Metabolic Activity and Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18010213 (2017).

FIGURES

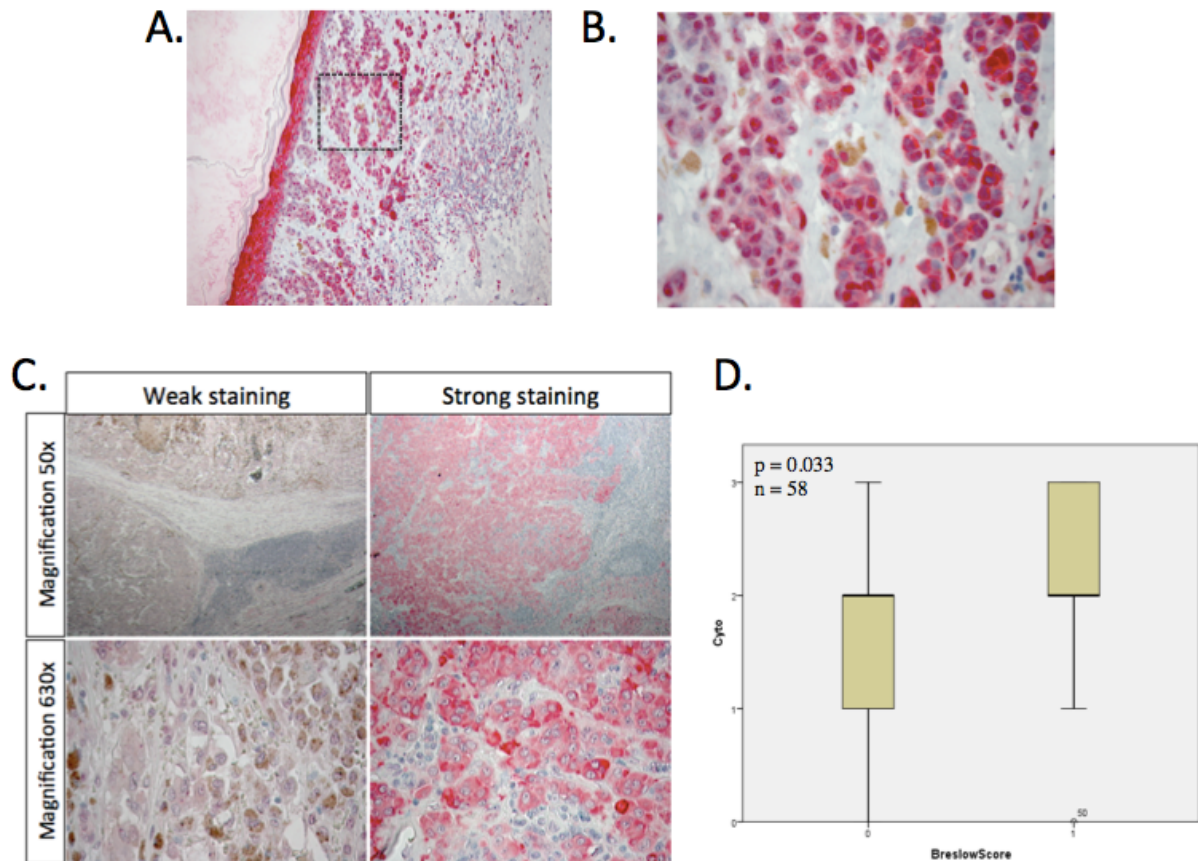


Figure 1. Immunohistochemistry study of argpyrimidine accumulation in melanoma primary and metastatic lesions. Immunostaining for argpyrimidine detection was performed on 64 primary and 58 metastatic lesions from melanoma patients. Representative picture of argpyrimidine staining in primary melanoma at 100x magnification (A), the black box indicates the zone of (B) at magnification 630x. (C) Representative pictures of argpyrimidine staining in metastatic melanoma lesions displaying Weak or strong staining at magnification 50x and 630x where indicated. (D) Box plot representing metastasis cytoplasmic argpyrimidine scores between samples with corresponding primary lesion presenting with low (0, for Breslow < 2mm) or high (1, for Breslow > 2mm) Breslow score. Mann-Whitney *U* test, $p = 0,033$.

Table 1: Cell lines couples and their sensitivity to Vemurafenib

	Cell lines	Sensitivity to Vemurafenib
1	A2058	Intrinsic resistance
2	A375S	Sensitive
	A375R	Acquired resistance
3	MM074S	Sensitive
	MM074R	Acquired resistance

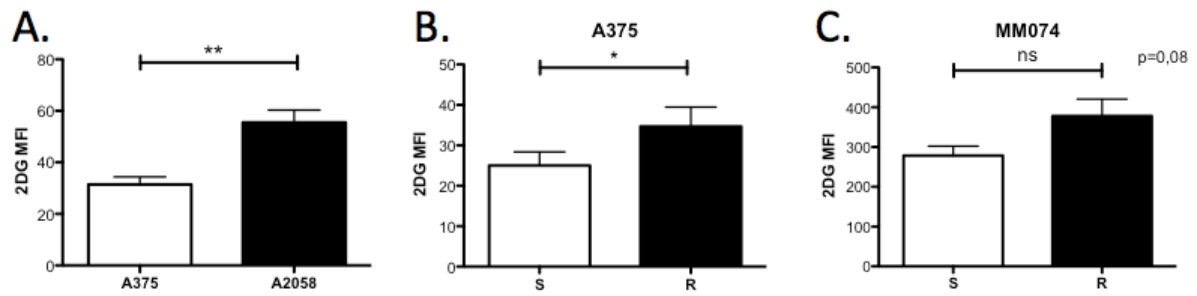


Figure 2. Glucose uptake is higher in resistant melanoma cells. Glucose uptake was assessed by flow cytometry in A375/A2058 (A), A375S/A365R (B) and MM074S/MM074R (C) coupled cell lines. Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and ns = not significant.

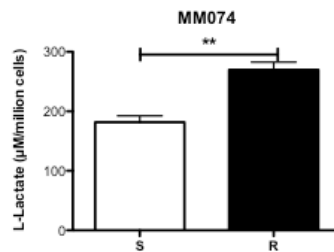


Figure 3. BRAF inhibition-resistant melanoma cells produce more L-Lactate than sensitive ones. L-Lactate was measured in conditioned medium from MM074S and MM074R after 48hr. Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$.

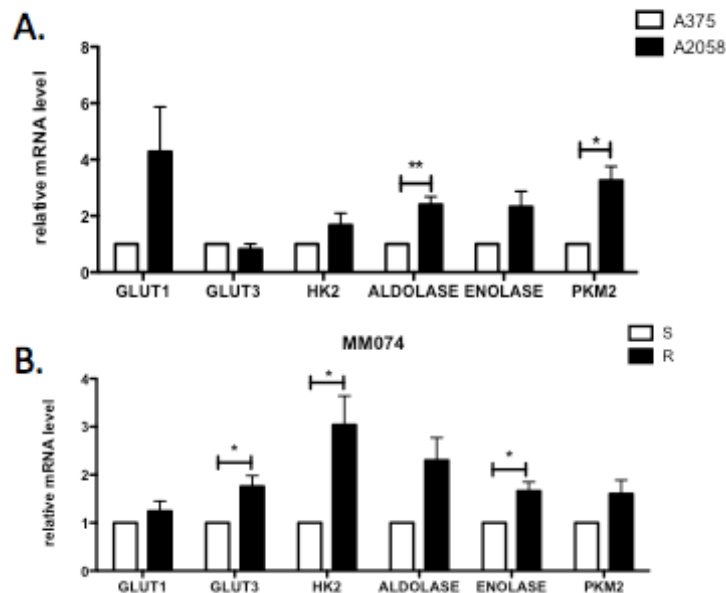


Figure 4. BRAF inhibition-resistant melanoma cells present higher levels of glycolysis contributors. Relative mRNA levels detection by RT-qPCR of GLUT1, GLUT3, HK2, ALDOLASE, ENOLASE and PKM2 in (A) A375/A2058 cells and (B) MM074S/MM074R cells. Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

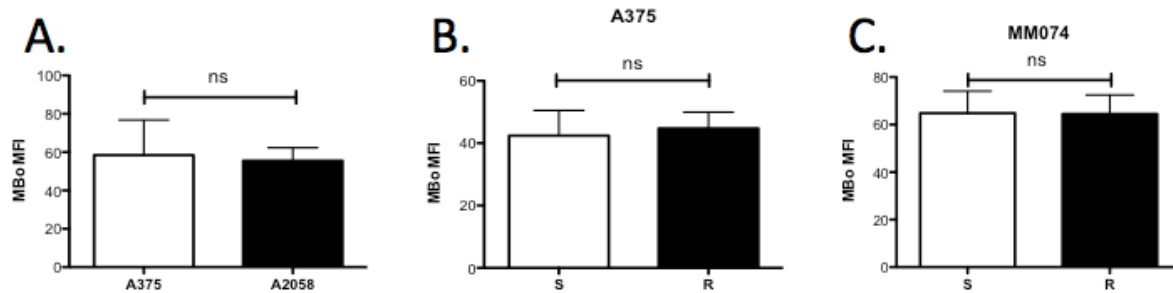


Figure 5. Vemurafenib-resistant cells do not accumulate more MG than sensitive cells MG accumulation in cells was assessed with the MBo probe using flow cytometry in (A) A375/2018, (B) A375S/A375R and (C) MM074S/MM074R cells. Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. ns = not significant.

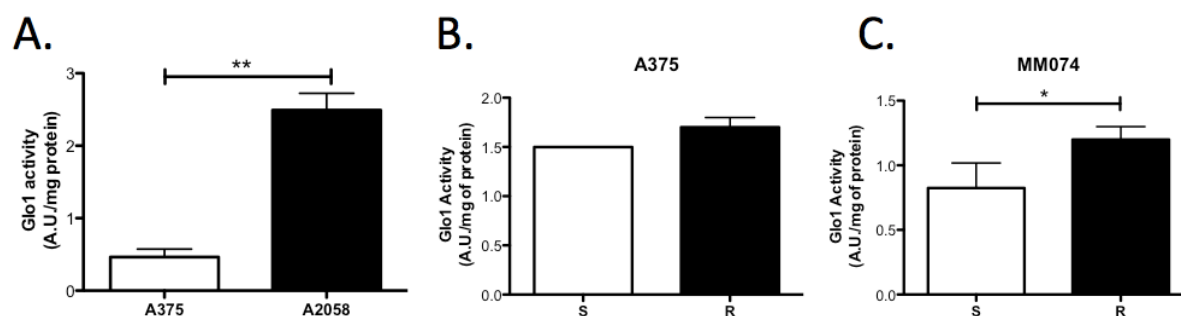


Figure 6. Vemurafenib resistant cells tend to have a higher basal Glo1 activity. Glo1 activity measured in (A) A375/2018, (B) A375S/A375R and (C) MM074S/MM074R cells. Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01.

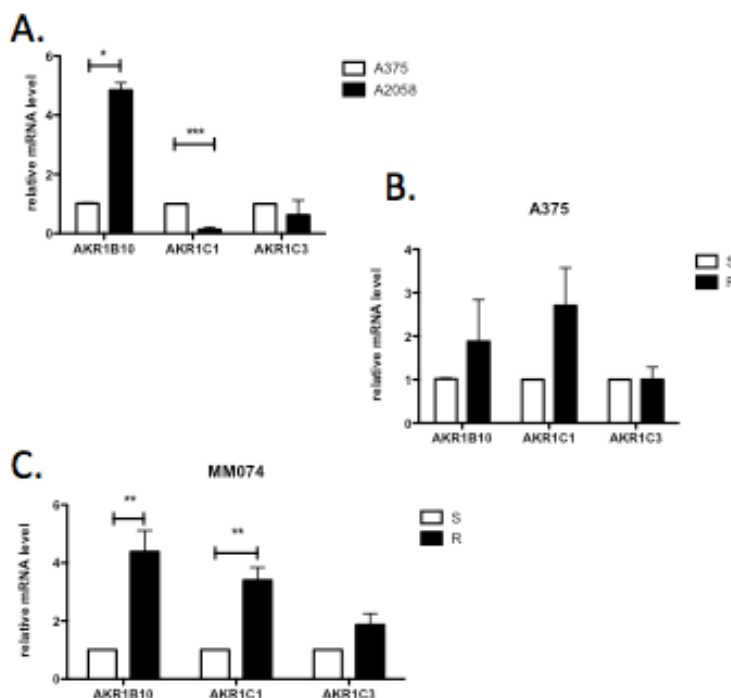


Figure 7. Resistant melanoma cells globally present higher levels of AKR enzymes. Relative mRNA levels of AKR1B10, AKR1C1 and AKR1C3 assessed by RT-qPCR in (A) A375/2018, (B) A375S/A375R and (C) MM074S/MM074R cells. Data are presented as mean values \pm SEM of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

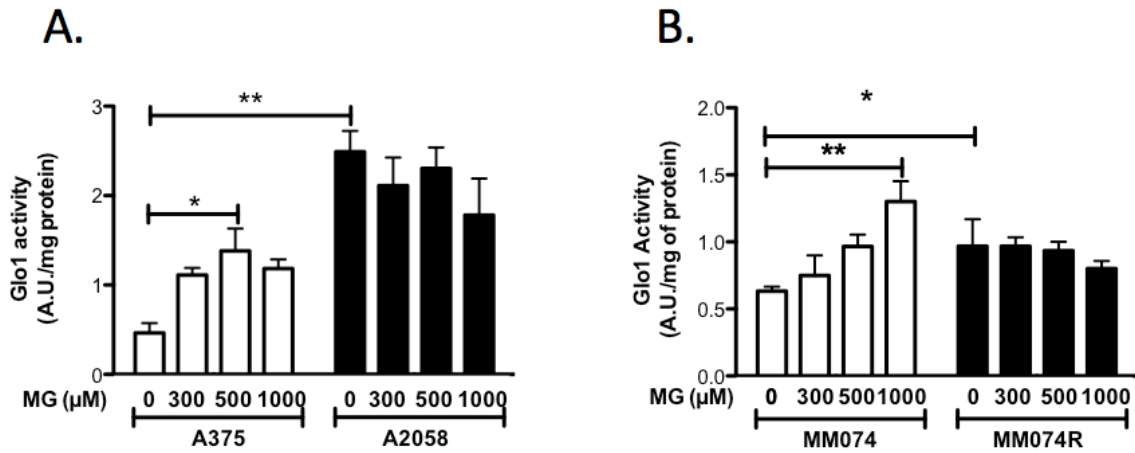


Figure 8. Glo1 activity is induced in sensitive melanoma cells upon MG treatment. Melanoma cells were treated for 6hr with MG 0, 300, 500 or 1000μM. Then Glo1 activity was measured in (A) A375/A2058 and (B) MM074S/MM074R cells. Data are presented as mean values ± SEM of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01.

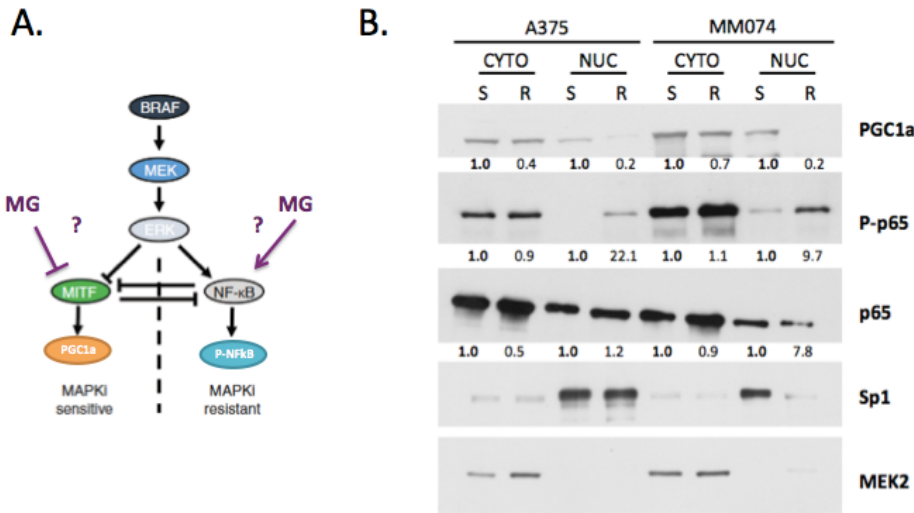


Figure 9. Vemurafenib-resistant melanoma cells present with a low MITF and high NFκB activity corresponding to a resistant phenotype. (A) Hypothesis of MG implication in the shift from a MITF/proliferative state to a NFκB/resistant state according to Konieczkowski et al. 2014⁵⁰. (B) Detection using Western Blot of PGC1a, P(Ser536)-p65 and P65 in CYTO/NUC protein fraction of A375S/A375R and MM074S/MM074R cells. Sp1 and MEK2 detection is validating, respectively, the nuclear (NUC) and cytoplasmic (CYTO) protein fractions enrichment and were considered as normalization for quantification. P-p65 quantification is also normalized on total p65 quantity. Representative western blot of three independent experiments.

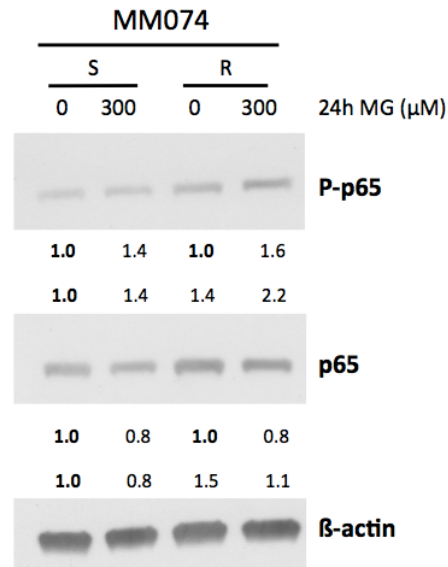


Figure 10. NFκB is more activated in resistant cells and can be stimulated by MG treatment in both sensitive and resistant melanoma cells. Detection of P(Ser536)-p65 and p65 in MM074S and MM074R cells treated with MG 300μM for 24hr. Bêta-actin is used as normalization and for protein quantification. The western blot is representative of three independent experiments.

Supplementary Table 1. Primers sequences used for qRT-PCR experiments

Target Gene	Primer	Sequence
GLUT1	Fw	5'-GGTTGTGCCATACTCATGACC-3'
	Rv	5'-CAGATAGGACATCCAGGGTAGC-3'
GLUT3	Fw	5'-GCCCTGAAAGTCCCAGATTT-3'
	Rv	5'-TTCATCTCCTGGATGTCTTGG-3'
HK2	Fw	5'-TCCCCTGCCACCAGACTA-3'
	Rv	5'-TGGACTTGAATCCCTTGGTC-3'
ALDOLASE	Fw	5'-CCGCGTTCTCTCCTTGAAT-3'
	Rv	5'-GGGCATGGTGCTGGTAGTAG-3'
ENOLASE	Fw	5'-TCCCAACATCCTGGAGAATAA-3'
	Rv	5'-ATGCCGATGACCACCTTATC-3'
PKM2	Fw	5'-CGTCTGAACCTCTCATGGAA-3'
	Rv	5'-ATGGGGTCAGAAGCAAAGC-3'
AKR1B10	Fw	5'-AAAGCAACGTTCTTGGATG-C3'
	Rv	5'-TGGAAGTGGCTGAAATTGG-3'
AKR1C1	Fw	5'-CATGCCTGTCCTGGGATTT-3'
	Rv	5'-AGAATCAATATGGCGGAAGC-3'
AKR1C3	Fw	5'-CATTGGGGTGTCAAACCTCA-3'
	Rv	5'-CCGTGGGGTGTCAAACCTCA-3'
18S	Fw	5'-CTTCCACAGGAGGCCTACAC-3'
	Rv	5'-CGCAAAATATGCTGGAACCTT-3'

IV. Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

L'utilisation préférentielle de la glycolyse par les cellules tumorales, le fameux effet Warburg, est un sujet de recherche intense depuis plusieurs années. De nombreuses publications ont mis en évidence les mécanismes d'initiation de ce phénotype métabolique ainsi que ses avantages pour la progression des cellules tumorales (pour revue Liberti et Locasale 2016¹⁷).

Le méthylglyoxal, lui-même, pourrait jouer un rôle dans le maintien du phénotype Warburg. En effet, une équipe a démontré la modification de protéines mitochondriales par le MG dans un modèle de diabète chez le rat. Les protéines glycosylées ainsi identifiées font partie des complexes 1 et 3 de la chaîne respiratoire mitochondriale. La modification de ces protéines entraîne une augmentation de la production de ROS²³⁸. Il serait intéressant de vérifier si une telle dysfonction mitochondriale induite par le MG³⁴¹ est aussi présente au niveau des cellules tumorales ce qui favoriserait l'inhibition de la respiration mitochondriale en faveur de l'utilisation de la glycolyse.

La croissance tumorale a lieu dans un microenvironnement hostile où l'approvisionnement en oxygène, glucose, nutriments et facteurs de croissance est inconstant et fait souvent défaut. Cet environnement carencé ainsi que l'instabilité génétique des cellules cancéreuses (qui peut être augmentée par le stress environnemental) avec l'activation d'oncogènes et la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs mènent à une dérégulation du métabolisme énergétique. Le métabolisme tumoral est différent de celui des cellules normales et possède une grande capacité d'adaptation ce qui permet la survie des tumeurs en milieu changeant et hostile. Pour faire face à cet environnement et pour continuer à proliférer, les cellules tumorales ont adapté leur métabolisme de façon à produire de l'énergie mais surtout à favoriser la synthèse d'intermédiaires anaboliques et d'agents réducteurs pour maintenir leur statut redox. L'augmentation du flux glycolytique permet de répondre à ces besoins cellulaires en favorisant une fourniture rapide et flexible d'énergie, la production d'intermédiaires pour la synthèse d'acides aminés, d'acides nucléiques et de lipides et la production de NADPH par la voie des pentoses phosphates pour maintenir la défense anti-oxydante. De plus, la réduction de la phosphorylation oxydative au sein

de la mitochondrie permet de mieux contrôler la production de ROS et protège les tumeurs de l'apoptose.

Une des conséquences de la croissance tumorale sur fond de métabolisme glycolytique est l'établissement d'un microenvironnement particulier. La glycolyse aérobie intense au niveau des cellules tumorales a pour effet la production de MG. Ce dicarbone étant capable de diffuser à travers les membranes cellulaires, il est intéressant de considérer que le stress dicarbone pourrait aussi moduler le microenvironnement tumoral. La glycolyse aérobie induit également l'apparition et le renforcement d'un environnement hypoxique et acide. Cet environnement est favorable à la croissance tumorale, à l'évasion face à la défense immunitaire, à l'invasion et à la dissémination métastatique mais aussi au développement de résistances à la chimiothérapie et à la radiothérapie.

Le méthylglyoxal produit au niveau des cellules tumorales est capable de modifier le microenvironnement tumoral. En effet, dans les contextes du diabète et du vieillissement, le MG a été largement étudié pour son effet sur le stroma. Le MG induit la formation des AGEs qui en se liant à leurs récepteurs RAGEs³⁴² mènent à l'activation des voies de signalisation comme NFκB au niveau des cellules endothéliales. Cette activation entraîne également la production de ROS qui en retour favorise l'expression des RAGEs et l'activation de NFκB. Ces phénomènes entraînent une boucle de réponse inflammatoire²⁹⁴. Au niveau des fibroblastes, le stress dicarbone induit le même type de réponse avec promotion de la production de ROS. L'inflammation chronique est bien connue pour son effet pro-tumoral³⁴³ et le méthylglyoxal pourrait contribuer à l'établissement d'un stroma inflammatoire favorable aux tumeurs.

Outre l'inflammation, le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la progression tumorale. Des études montrent en effet une coopération entre les cellules tumorales et les cellules stromales^{344,345}. La sénescence des fibroblastes induite par le MG peut être favorable au développement tumoral^{346,347}. En effet, les fibroblastes sénescents acquièrent la capacité de sécréter un ensemble de facteurs pro-inflammatoires appelé phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Parmi ces facteurs, on retrouve des cytokines (IL-6, IL-1) et des facteurs de croissance (VEGF, bFGF) (pour revue voir Coppé 2010³⁴⁸). Le sécrétome des fibroblastes sénescents est similaire à celui des fibroblastes associés au cancer (CAF) et favorise la croissance des cellules tumorales^{349,350}. La production de ce sécrétome est associée à l'activation de

NFκB au niveau des fibroblastes³⁵¹. Des résultats préliminaires au laboratoire montrent que l'exposition chronique de fibroblastes normaux au MG induit l'activation de NFκB dans ces cellules (Fig. 75) (Durieux et al. résultats non publiés).

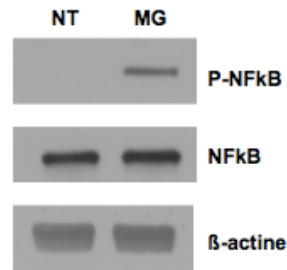


Figure 75. Activation de NFκB au niveau de fibroblastes normaux de peau après traitement au MG. Les fibroblastes normaux de peau ont été traités chroniquement pendant 1 mois avec 150μM de MG. Détection de NFκB (p65) et de sa forme phosphorylée active par immunoblot au niveau des fibroblastes traités chroniquement (MG) ou non (NT).

L'acidose du microenvironnement tumoral est la conséquence de la production de lactate et de protons par la glycolyse. De façon à éviter un pH acide délétère dans la cellule, celle-ci a développé des systèmes d'évacuation de cette acidité en augmentant l'expression ou l'activité de transporteurs de protons tels que les MCT^{352,353} ou les échangeurs Na/H^{354,355}. L'acidification du milieu extracellulaire par les cellules tumorales est un processus d'adaptation de leur environnement³⁵⁶ et la constitution de cette « niche » est considérée par certains comme une nouvelle caractéristique fondamentale des tumeurs^{357,358}. Cet environnement acide devient défavorable aux cellules avoisinantes qui ne sont pas équipées pour faire face au pH bas, favorise l'invasion des cellules tumorales et diminue l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale. L'acidose facilite la transition d'une lésion in situ à une lésion invasive dans le cancer cervical³⁵⁹ et dans le cancer de la prostate où cette transition peut être inhibée par injection de bicarbonate de sodium pour neutraliser le pH³⁶⁰. L'existence d'un pH alcalin intracellulaire et d'un pH acide extracellulaire³⁶¹⁻³⁶³ protège les cellules tumorales d'agents chimiothérapeutiques en diminuant leur efficacité et leur entrée dans les cellules³⁶⁴.

Un autre aspect protecteur de l'effet Warburg vis-à-vis des thérapies repose sur l'augmentation de l'expression de certaines enzymes impliquées dans la glycolyse. En plus de favoriser l'oxydation du glucose, ces enzymes sont capables d'apporter une protection contre l'apoptose aux cellules tumorales. Par exemple, HK2 est surexprimée au niveau de nombreuses malignités et sous l'activation d'Akt peut être localisée au

niveau de la membrane mitochondriale où elle peut empêcher la libération de facteurs pro-apoptotiques^{35,36}. Au niveau de cette localisation cellulaire, HK2 devient insensible au rétrocontrôle négatif de son produit de réaction le glucose-6-phosphate et active donc le flux glycolytique³⁶⁵. La GAPDH est capable de se lier à l'ADN télomérique pour le protéger de la dégradation induite par la chimiothérapie³⁶⁶. D'autres enzymes glycolytiques ont été liées à des phénomènes de résistance contre des agents chimiothérapeutiques comme PKM2 qui protège contre le cisplatine³⁶⁷, PDK contre le sorafenib³⁶⁸ et LDH contre le trastuzumab³⁶⁹. La surexpression des transporteurs du glucose est aussi liée à la résistance^{370,371}. L'inhibition de GLUT1 sensibilise les cellules au paclitaxel³⁷⁰ et celle de GLUT3 sensibilise les cellules de glioblastome au témozolomide²⁸⁸.

Puisque la glycolyse est une voie essentielle à la survie des cellules tumorales, des études ont exploré la possibilité d'utiliser des inhibiteurs de cette voie métabolique comme traitement anti-tumoral. Le 2-DG, analogue non métabolisable du glucose, montre de bons résultats *in vitro*³⁷², cependant son efficacité est réduite en cas d'hypoxie³⁷³. Les inhibiteurs des GLUT présentent des résultats prometteurs mais leur manque de spécificité rend difficile leur utilisation en clinique^{370,374}. Le Lonidamine est un inhibiteur de HK2 qui réduit la survie tumorale mais induit une toxicité sévère au niveau du foie et du pancréas³⁷⁵.

Une petite molécule qui montre une grande efficacité et une spécificité pour les cellules tumorales est le 3-bromopyruvate (3BP)³⁶⁵. Cet analogue de l'acide pyruvique entre dans les cellules par les transporteurs MCT^{376,377} et exerce son activité inhibitrice au niveau de 2 cibles. 3BP inhibe HK2 au niveau de la mitochondrie^{378,379} et GAPDH au niveau cytoplasmique^{380,381}. Cette action combinée a pour effet de réduire drastiquement la production d'ATP et de lever la protection établie par HK2 contre l'apoptose. De plus, l'inhibition de GAPDH empêche la production de NADH qui entre dans la défense anti-ROS et provoque l'accumulation des trioses phosphate³⁸². Ces trioses sont les précurseurs du MG dont les effets toxiques sont augmentés par le stress oxydant³⁸³.

Une conséquence importante du phénotype glycolytique des tumeurs est la production de MG. La formation spontanée de ce dicarbone réactif est encore peu considérée dans l'étiopathologie des cancers. Pourtant le stress dicarbone nous semble présenter un avantage pour les tumeurs. En effet, notre laboratoire a montré une

accumulation d'AGEs au niveau des tumeurs mammaires²⁶⁷ et colorectales²⁸⁴ par rapport au tissu normal, démontrant un lien entre stress dicarbone et processus tumoral. Au niveau du cancer du sein, l'abondance des adduits protéiques du MG dépend du sous-type de lésion en rapport avec l'activité Glo1. Nous avons démontré que des cellules cancéreuses mammaires de type triple-négatif sont capables de réagir au stress dicarbone en augmentant l'activité de Glo1²⁶⁷. Au niveau du cancer colorectal, nous avons mis en évidence une corrélation entre l'accumulation des argpyrimidines et le stade tumoral. Dans un modèle de croissance tumorale *in ovo*, nous avons démontré que l'inhibition de l'expression de Glo1 était favorable au développement de tumeurs à partir de cellules cancéreuses colorectales²⁸⁴ et que le traitement de ces tumeurs avec de la carnosine permettait d'en réduire le volume. De même, dans une autre étude, nous avons lié le stress dicarbone à une augmentation de la croissance tumorale et au développement de métastases en modèle murin. Nous avons également identifié une nouvelle cible protéique du MG, HSP90 dont la glycation favorise l'inhibition d'une voie de signalisation suppresseur de tumeur, la voie Hippo, et permet l'activité persistante de l'oncogène YAP²⁸³. Les effets tumorigéniques du MG ont pu être inhibés par un traitement avec la carnosine. Plus récemment, nous avons conduit une étude pour investiguer le rôle paradoxal du MG, pro- ou antitumeur (Nokin, Durieux et al. en révision). Nous avons mis en évidence une gestion différente du MG par les cellules tumorales en fonction de leur métabolisme, de leur contenu en GSH et de leur capacité à détoxifier le MG (soit via Glo1, soit via les AKR), ce qui pourrait expliquer les disparités de l'effet du MG sur les cellules cancéreuses décrites dans la littérature. De plus, nous avons démontré un effet dose-dépendant du MG. En effet, à faible dose, le MG favorise la croissance tumorale en modèle *in ovo* alors qu'à forte dose il devient toxique. Cet effet biphasique, ou hormétique, a pu être inversé par traitement à la carnosine. Enfin, dans une étude en cours au laboratoire, nous avons mis en évidence un lien entre la progression tumorale et le stress dicarbone au niveau du mélanome. De plus, l'acquisition de la résistance à l'inhibition de BRAF dans ces tumeurs semble être liée à une meilleure gestion du MG par ces cellules. Finalement, le stress dicarbone au niveau des cellules de mélanomes pourrait être impliqué dans la transition d'un état prolifératif à un état invasif (Durieux et al. manuscrit en préparation).

Il est donc notre conviction au laboratoire que le stress dicarbone induit par le MG représente un facteur promoteur du cancer au même titre que les ROS et le

stress oxydant. D'ailleurs ces 2 phénomènes sont étroitement liés et partagent des facteurs clés communs (GSH, NRF2,...). Nous proposons donc l'hypothèse selon laquelle le MG est un nouveau oncométabolite dont le contrôle adéquat par les tumeurs leur confèrerait en retour un avantage de croissance, de protection contre l'apoptose et d'invasivité. L'identification de cibles du MG, le protéome dicarbone, comme HSP27 et HSP90 permettra d'élucider plus en détails les effets du MG dans le cancer. D'autre part des données de la littérature et des résultats préliminaires au laboratoire indiquent que le MG, en plus de son effet direct sur le protéome, serait impliqué dans la régulation épigénétique. En effet, des modifications des histones^{234,235} ont été identifiées dans le contexte du diabète ce qui pourrait influencer le code histone et la compaction de la chromatine. Nos résultats préliminaires font état de la modification du niveau de méthylation de l'ADN au niveau de cellules cancéreuses dépourvues de Glo1. Ces modulations seraient notamment liées à une perturbation de l'expression de certaines enzymes de déméthylation de l'ADN.

Considérant les effets du MG sur le processus tumoral, il semble intéressant de moduler son accumulation au niveau des tumeurs. La modulation du stress dicarbone peut se faire dans les 2 sens. Soit augmenter le MG intracellulaire de façon à atteindre des concentrations toxiques pour tuer les cellules tumorales ou les sensibiliser à d'autres traitements chimiothérapeutiques³⁸⁴. Soit diminuer le stress dicarbone pour empêcher ses effets pro-tumoraux. La première stratégie peut être conduite en utilisant des inhibiteurs de la détoxification du MG. En particulier, l'inhibition de Glo1 par le BBGC¹⁹⁵, le methotrexate¹⁷¹ ou la curcumine¹⁶⁷ sont des traitements en cours d'investigation en laboratoire et en clinique. La seconde stratégie consiste en l'inhibition du stress dicarbone. Cette inhibition peut être atteinte par l'induction de la détoxification du MG. En effet, la promotion de l'activité Glo1 permet de réduire la charge en MG dans les cellules tumorales. Cette induction de Glo1 peut être provoquée par l'activation du facteur de transcription Nrf2. Des activateurs connus de Nrf2 comme le sulforaphane³⁸⁵ et les AITC (allyl isothiocyanate)³⁸⁶ ou comme la nouvelle combinaison trans-resveratrol-hesperetin (tRES-HESP)¹⁷³ sont des drogues en cours d'évaluation pour leur effet anti-tumoral. Une autre façon d'inhiber le stress dicarbone est l'utilisation d'agents bloquants du MG.

La metformine, traitement appliqué à la majorité de patients atteints de diabète de type 2, est aussi une molécule capable de capturer le MG^{164,387}. L'incidence de certains

cancers est augmentée au niveau de la population des diabétiques³⁸⁸ et le traitement de ceux-ci à la metformine permet de réduire l'incidence du cancer³⁸⁹. Un mécanisme d'action potentiel de la metformine est l'inhibition du complexe 1 de la chaîne de respiration mitochondriale avec diminution de la production d'ATP et activation d'AMPK. L'AMPK activée diminue les processus de lipogenèse, d'angiogenèse et de synthèse protéiques qui sont favorables à la croissance tumorale (pour revue, voir Morales et Morris 2015³⁹⁰). Outre ces effets, la metformine pourrait exercer son activité anti-tumorale par l'inhibition du MG^{318,391}.

L'aminoguanidine, autre molécule présentant une capacité de capture du MG³⁹², est aussi étudiée dans le contexte du diabète et permet l'inhibition de développement de ces complications³⁹³⁻³⁹⁵. Des études ont démontré un effet anti-tumoral de l'aminoguanidine au niveau du cancer pancréatique³⁹⁶ et du carcinome folliculaire de la thyroïde³⁹⁷ par induction de la production de NOS. Nos résultats indiquent que l'aminoguanidine pourrait aussi inhiber le processus cancéreux par la modulation du stress dicarbone²⁸³.

La carnosine est également un bloqueur du MG qui possède une activité anti-tumorale. L'équipe de Iovine³⁹⁸ a lié le rôle anti-cancer de la carnosine à l'inhibition de la production d'ATP par la mitochondrie et à l'inhibition des ROS au niveau de cellules cancéreuses colorectales mutées pour KRAS. Ils ont aussi montré que la carnosine inhibait l'activité de HIF1a ce qui diminuait la prolifération des cellules de cancer du colon³⁹⁹ et empêchait la résistance de ces cellules à l'agent chimiothérapeutique 5-fluorouracil⁴⁰⁰. La carnosine est capable d'inhiber la croissance tumorale *in vivo*⁴⁰¹ et les auteurs de cette étude proposent l'inhibition de la production d'ATP comme principal mécanisme⁴⁰². Notre laboratoire envisage la possibilité d'une activité anti-tumorale de la carnosine à travers son action de MG scavenger^{283,284} (Nokin, Durieux et al. en révision). Nos résultats préliminaires renforcent cette hypothèse car la carnosine présente une activité inhibitrice de la croissance tumorale de glioblastomes *in vivo* (Nokin et Durieux, résultats non publiés).

La carnosine est donc une molécule intéressante pour la thérapie anti-cancéreuse malheureusement sa stabilité dans le plasma humain est rapidement limitée par l'activité de la dipeptidase carnosinase. Il nous semble donc d'un grand intérêt de développer des analogues stables de la carnosine pour capturer le MG. Ces analogues permettraient d'améliorer la capacité MG-scavenger de la carnosine, sa biodisponibilité

et surtout sa stabilité dans le sérum. Le développement de tels analogues de la carnosine est en cours au laboratoire et est encouragé par des résultats préliminaires démontrant une meilleure activité de capture et une meilleure stabilité dans le sérum humain de certains dipeptides innovants (Durieux et al. résultats non publiés).

En conclusion, sur base des résultats présents dans la littérature et des recherches effectuées au laboratoire, il apparaît que l'étude du stress dicarbone dans le processus cancéreux est autant innovante que prometteuse. L'étude approfondie du rôle du MG dans le cancer permettra de mieux comprendre cette pathologie et de développer de nouvelles stratégies de prévention et de traitement.

V. Références

Références

- 1 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 3 Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**, 85-95, doi:10.1038/nrc2981 (2011).
- 4 Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**, 325-337, doi:10.1038/nrc3038 (2011).
- 5 Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* **21**, 297-308, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014 (2012).
- 6 Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033, doi:10.1126/science.1160809 (2009).
- 7 Hustinx, R., Bénard, F. & Alavi, A. Whole-body FDG-PET imaging in the management of patients with cancer. *Semin Nucl Med* **32**, 35-46, doi:10.1053/snuc.2002.29272 (2002).
- 8 Song, B. I. *et al.* Prognostic Value of Primary Tumor Uptake on F-18 FDG PET/CT in Patients with Invasive Ductal Breast Cancer. *Nucl Med Mol Imaging* **45**, 117-124, doi:10.1007/s13139-011-0081-0 (2011).
- 9 Mochiki, E. *et al.* Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer. *World J Surg* **28**, 247-253, doi:10.1007/s00268-003-7191-5 (2004).
- 10 Noda, Y. *et al.* F-18 FDG uptake on positron emission tomography as a predictor for lymphovascular invasion in patients with lung adenocarcinoma. *Ann Nucl Med* **30**, 11-17, doi:10.1007/s12149-015-1023-1 (2016).
- 11 Xia, Q. *et al.* Prognostic significance of (18)FDG PET/CT in colorectal cancer patients with liver metastases: a meta-analysis. *Cancer Imaging* **15**, 19, doi:10.1186/s40644-015-0055-z (2015).
- 12 Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**, 891-899, doi:10.1038/nrc1478 (2004).
- 13 Postovit, L. M., Adams, M. A., Lash, G. E., Heaton, J. P. & Graham, C. H. Oxygen-mediated regulation of tumor cell invasiveness. Involvement of a nitric oxide signaling pathway. *J Biol Chem* **277**, 35730-35737, doi:10.1074/jbc.M204529200 (2002).
- 14 Postovit, L. M., Adams, M. A., Lash, G. E., Heaton, J. P. & Graham, C. H. Nitric oxide-mediated regulation of hypoxia-induced B16F10 melanoma metastasis. *Int J Cancer* **108**, 47-53, doi:10.1002/ijc.11556 (2004).
- 15 Buchler, P. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas* **26**, 56-64 (2003).
- 16 He, X. *et al.* Hypoxia increases heparanase-dependent tumor cell invasion, which can be inhibited by antiheparanase antibodies. *Cancer Res* **64**, 3928-3933, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2718 (2004).
- 17 Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* **41**, 211-218, doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001 (2016).

- 18 Shestov, A. A. *et al.* Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife* **3**, doi:10.7554/eLife.03342 (2014).
- 19 Epstein, T., Xu, L., Gillies, R. J. & Gatenby, R. A. Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. *Cancer Metab* **2**, 7, doi:10.1186/2049-3002-2-7 (2014).
- 20 Lunt, S. Y. & Vander Heiden, M. G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 441-464, doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154237 (2011).
- 21 DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* **7**, 11-20, doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002 (2008).
- 22 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* **51**, 349-353 (2001).
- 23 Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. & Okumura, K. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* **268**, 297-305 (1992).
- 24 Park, H. J., Lyons, J. C., Ohtsubo, T. & Song, C. W. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer* **80**, 1892-1897, doi:10.1038/sj.bjc.6690617 (1999).
- 25 Williams, A. C., Collard, T. J. & Paraskeva, C. An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* **18**, 3199-3204, doi:10.1038/sj.onc.1202660 (1999).
- 26 Coller, H. A. Is cancer a metabolic disease? *Am J Pathol* **184**, 4-17, doi:10.1016/j.ajpath.2013.07.035 (2014).
- 27 Martínez-Zaguilán, R. *et al.* Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **14**, 176-186 (1996).
- 28 Montcourrier, P., Silver, I., Farnoud, R., Bird, I. & Rochefort, H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* **15**, 382-392 (1997).
- 29 Fischer, K. *et al.* Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**, 3812-3819, doi:10.1182/blood-2006-07-035972 (2007).
- 30 Sonveaux, P. *et al.* Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* **118**, 3930-3942, doi:10.1172/JCI36843 (2008).
- 31 Michelakis, E. D. *et al.* Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med* **2**, 31ra34, doi:10.1126/scitranslmed.3000677 (2010).
- 32 Pedersen, P. L. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 211-222, doi:10.1007/s10863-007-9094-x (2007).
- 33 Marín-Hernández, A. *et al.* Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* **273**, 1975-1988, doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05214.x (2006).
- 34 Bustamante, E. & Pedersen, P. L. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3735-3739 (1977).

- 35 Mathupala, S. P., Ko, Y. H. & Pedersen, P. L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol* **19**, 17-24, doi:10.1016/j.semcancer.2008.11.006 (2009).
- 36 Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* **10**, 1535-1551 (2003).
- 37 Altman, B. J., Stine, Z. E. & Dang, C. V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **16**, 619-634, doi:10.1038/nrc.2016.71 (2016).
- 38 Samudio, I. *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* **120**, 142-156, doi:10.1172/JCI38942 (2010).
- 39 MEDES, G., THOMAS, A. & WEINHOUSE, S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res* **13**, 27-29 (1953).
- 40 Santos, C. R. & Schulze, A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J* **279**, 2610-2623, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x (2012).
- 41 Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C. & Farese, R. V. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab* **18**, 153-161, doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017 (2013).
- 42 Kusakabe, T. *et al.* Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells. *J Histochem Cytochem* **48**, 613-622, doi:10.1177/002215540004800505 (2000).
- 43 Röhrig, F. & Schulze, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 732-749, doi:10.1038/nrc.2016.89 (2016).
- 44 Cai, Y. *et al.* Loss of Chromosome 8p Governs Tumor Progression and Drug Response by Altering Lipid Metabolism. *Cancer Cell* **29**, 751-766, doi:10.1016/j.ccell.2016.04.003 (2016).
- 45 Zaidi, N., Swinnen, J. V. & Smans, K. ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. *Cancer Res* **72**, 3709-3714, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4112 (2012).
- 46 Brownsey, R. W., Boone, A. N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E. & Lee, W. M. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* **34**, 223-227, doi:10.1042/BST20060223 (2006).
- 47 Maier, T., Leibundgut, M. & Ban, N. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science* **321**, 1315-1322, doi:10.1126/science.1161269 (2008).
- 48 Jakobsson, A., Westerberg, R. & Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* **45**, 237-249, doi:10.1016/j.plipres.2006.01.004 (2006).
- 49 Horton, J. D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* **30**, 1091-1095, doi:10.1042/ (2002).
- 50 Amemiya-Kudo, M. *et al.* Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res* **43**, 1220-1235 (2002).
- 51 Mullen, P. J., Yu, R., Longo, J., Archer, M. C. & Penn, L. Z. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 718-731, doi:10.1038/nrc.2016.76 (2016).

- 52 Shimano, H. *et al.* Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* **274**, 35832-35839 (1999).
- 53 Shechter, I., Dai, P., Huo, L. & Guan, G. IDH1 gene transcription is sterol regulated and activated by SREBP-1a and SREBP-2 in human hepatoma HepG2 cells: evidence that IDH1 may regulate lipogenesis in hepatic cells. *J Lipid Res* **44**, 2169-2180, doi:10.1194/jlr.M300285-JLR200 (2003).
- 54 Düvel, K. *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* **39**, 171-183, doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022 (2010).
- 55 Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D. & Sedoris, K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res* **18**, 5546-5553, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0977 (2012).
- 56 Osthus, R. C. *et al.* Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* **275**, 21797-21800, doi:10.1074/jbc.C000023200 (2000).
- 57 Shim, H. *et al.* c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6658-6663 (1997).
- 58 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* **105**, 18782-18787, doi:10.1073/pnas.0810199105 (2008).
- 59 Gao, P. *et al.* c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 762-765, doi:10.1038/nature07823 (2009).
- 60 Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. & Lazebnik, Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* **178**, 93-105, doi:10.1083/jcb.200703099 (2007).
- 61 Li, F. *et al.* Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* **25**, 6225-6234, doi:10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005 (2005).
- 62 Gordan, J. D., Thompson, C. B. & Simon, M. C. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* **12**, 108-113, doi:10.1016/j.ccr.2007.07.006 (2007).
- 63 O'Connell, B. C. *et al.* A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* **278**, 12563-12573, doi:10.1074/jbc.M210462200 (2003).
- 64 Jacobs, S. R. *et al.* Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol* **180**, 4476-4486 (2008).
- 65 Elstrom, R. L. *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 3892-3899, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2904 (2004).
- 66 Robey, R. B. & Hay, N. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **19**, 25-31, doi:10.1016/j.semcancer.2008.11.010 (2009).
- 67 Hassanein, M. *et al.* SLC1A5 mediates glutamine transport required for lung cancer cell growth and survival. *Clin Cancer Res* **19**, 560-570, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2334 (2013).

- 68 Moreadith, R. W. & Lehninger, A. L. The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme. *J Biol Chem* **259**, 6215-6221 (1984).
- 69 Fleischmann, M. & Iynedjian, P. B. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J* **349**, 13-17 (2000).
- 70 Yang, Y. A., Han, W. F., Morin, P. J., Chrest, F. J. & Pizer, E. S. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp Cell Res* **279**, 80-90 (2002).
- 71 Porstmann, T. *et al.* PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**, 6465-6481, doi:10.1038/sj.onc.1208802 (2005).
- 72 Porstmann, T. *et al.* SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* **8**, 224-236, doi:10.1016/j.cmet.2008.07.007 (2008).
- 73 Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274, doi:10.1016/j.cell.2007.06.009 (2007).
- 74 Usenik, A. & Legiša, M. Evolution of allosteric citrate binding sites on 6-phosphofructo-1-kinase. *PLoS One* **5**, e15447, doi:10.1371/journal.pone.0015447 (2010).
- 75 Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **3**, 177-185, doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002 (2006).
- 76 Sasaki, H. *et al.* Overexpression of GLUT1 correlates with Kras mutations in lung carcinomas. *Mol Med Rep* **5**, 599-602, doi:10.3892/mmr.2011.736 (2012).
- 77 Yun, J. *et al.* Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* **325**, 1555-1559, doi:10.1126/science.1174229 (2009).
- 78 Kamphorst, J. J. *et al.* Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8882-8887, doi:10.1073/pnas.1307237110 (2013).
- 79 Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M. & Karnieli, E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* **64**, 2627-2633 (2004).
- 80 Bensaad, K. *et al.* TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**, 107-120, doi:10.1016/j.cell.2006.05.036 (2006).
- 81 Boidot, R. *et al.* Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res* **72**, 939-948, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2474 (2012).
- 82 Contractor, T. & Harris, C. R. p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res* **72**, 560-567, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1215 (2012).
- 83 Schmid, T., Zhou, J., Köhl, R. & Brüne, B. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J* **380**, 289-295, doi:10.1042/BJ20031299 (2004).
- 84 Matoba, S. *et al.* p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**, 1650-1653, doi:10.1126/science.1126863 (2006).

- 85 Brosh, R. & Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* **9**, 701-713, doi:10.1038/nrc2693 (2009).
- 86 Krogh, A. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol* **52**, 409-415 (1919).
- 87 Graeber, T. G. *et al.* Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379**, 88-91, doi:10.1038/379088a0 (1996).
- 88 Gatenby, R. A. & Gawlinski, E. T. A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res* **56**, 5745-5753 (1996).
- 89 Gatenby, R. A. & Vincent, T. L. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res* **63**, 6212-6220 (2003).
- 90 Griffiths, J. R., McIntyre, D. J., Howe, F. A. & Stubbs, M. Why are cancers acidic? A carrier-mediated diffusion model for H⁺ transport in the interstitial fluid. *Novartis Found Symp* **240**, 46-62; discussion 62-47, 152-153 (2001).
- 91 Rouschop, K. M. & Wouters, B. G. Regulation of autophagy through multiple independent hypoxic signaling pathways. *Curr Mol Med* **9**, 417-424 (2009).
- 92 Phillips, S. A. & Thornalley, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* **212**, 101-105 (1993).
- 93 Richard, J. P. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans* **21**, 549-553 (1993).
- 94 Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Smith, K. & Szwegold, B. S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes. *Biochim Biophys Acta* **1637**, 98-106 (2003).
- 95 Lee, H. J., Howell, S. K., Sanford, R. J. & Beisswenger, P. J. Methylglyoxal can modify GAPDH activity and structure. *Ann N Y Acad Sci* **1043**, 135-145, doi:10.1196/annals.1333.017 (2005).
- 96 Thornalley, P. J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J* **254**, 751-755 (1988).
- 97 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 309-317, doi:10.1016/j.semcdb.2011.02.015 (2011).
- 98 Casazza, J. P., Felver, M. E. & Veech, R. L. The metabolism of acetone in rat. *J Biol Chem* **259**, 231-236 (1984).
- 99 Lyles, G. A. & Chalmers, J. The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol* **43**, 1409-1414 (1992).
- 100 Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G. & Slater, T. F. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J* **208**, 129-140 (1982).
- 101 Thornalley, P. J., Langborg, A. & Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* **344 Pt 1**, 109-116 (1999).
- 102 Cooper, R. A. & Anderson, A. The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **11**, 273-276 (1970).
- 103 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc* **9**, 1969-1979, doi:10.1038/nprot.2014.129 (2014).

- 104 Thornalley, P. J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci* **1043**, 111-117, doi:10.1196/annals.1333.014 (2005).
- 105 Lal, S. *et al.* Fructose-3-phosphate production and polyol pathway metabolism in diabetic rat hearts. *Metabolism* **46**, 1333-1338 (1997).
- 106 Delpierre, G., Vanstapel, F., Stroobant, V. & Van Schaftingen, E. Conversion of a synthetic fructosamine into its 3-phospho derivative in human erythrocytes. *Biochem J* **352 Pt 3**, 835-839 (2000).
- 107 Shapiro, R. & Hachmann, J. The reaction of guanine derivatives with 1,2-dicarbonyl compounds. *Biochemistry* **5**, 2799-2807 (1966).
- 108 Takahashi, K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J Biol Chem* **243**, 6171-6179 (1968).
- 109 Broude, N. E. & Budowsky, E. I. The reaction of glyoxal with nucleic acid components. 3. Kinetics of the reaction with monomers. *Biochim Biophys Acta* **254**, 380-388 (1971).
- 110 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun* **458**, 221-226, doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.140 (2015).
- 111 Lis, H. & Sharon, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* **218**, 1-27 (1993).
- 112 Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* **101**, 527-537 (1984).
- 113 Hodge, J. E. The Amadori rearrangement. *Adv Carbohydr Chem* **10**, 169-205 (1955).
- 114 Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact* **23**, 125-150 (2008).
- 115 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids* **42**, 1087-1096, doi:10.1007/s00726-010-0782-1 (2012).
- 116 Thornalley, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* **27**, 565-573 (1996).
- 117 Thornalley, P. J. *et al.* Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* **375**, 581-592, doi:10.1042/bj20030763 (2003).
- 118 Baynes, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-412 (1991).
- 119 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* **42**, 1133-1142, doi:10.1007/s00726-010-0783-0 (2012).
- 120 Hopkins, F. G. & Morgan, E. J. On the distribution of glyoxalase and glutathione. *Biochem J* **39**, 320-324 (1945).
- 121 Sousa Silva, M., Gomes, R. A., Ferreira, A. E., Ponces Freire, A. & Cordeiro, C. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *Biochem J* **453**, 1-15, doi:10.1042/BJ20121743 (2013).
- 122 Thornalley, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* **269**, 1-11 (1990).
- 123 Racker, E. Spectrophotometric measurements of the metabolic formation and degradation of thiol esters and enediol compounds. *Biochim Biophys Acta* **9**, 577-578 (1952).

- 124 Vander Jagt, D. L., Han, L. P. & Lehman, C. H. Kinetic evaluation of substrate specificity in the glyoxalase-I-catalyzed disproportionation of -ketoaldehydes. *Biochemistry* **11**, 3735-3740 (1972).
- 125 Thornalley, P. J. & Rabbani, N. Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 318-325, doi:10.1016/j.semcdb.2011.02.006 (2011).
- 126 Thornalley, P. J. The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med* **14**, 287-371 (1993).
- 127 Abordo, E. A., Minhas, H. S. & Thornalley, P. J. Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* **58**, 641-648 (1999).
- 128 Thornalley, P. J. *et al.* Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochem Pharmacol* **51**, 1365-1372 (1996).
- 129 Shinohara, M. *et al.* Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest* **101**, 1142-1147, doi:10.1172/JCI119885 (1998).
- 130 Masterjohn, C. *et al.* Acute glutathione depletion induces hepatic methylglyoxal accumulation by impairing its detoxification to D-lactate. *Exp Biol Med (Maywood)* **238**, 360-369, doi:10.1177/1535370213477987 (2013).
- 131 Groener, J. B. *et al.* C332C genotype of glyoxalase 1 and its association with late diabetic complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **121**, 436-439, doi:10.1055/s-0033-1345124 (2013).
- 132 Peculis, R. *et al.* Identification of glyoxalase 1 polymorphisms associated with enzyme activity. *Gene* **515**, 140-143, doi:10.1016/j.gene.2012.11.009 (2013).
- 133 Sakhi, A. K., Berg, J. P. & Berg, T. J. Glyoxalase 1 enzyme activity in erythrocytes and Ala111Glu polymorphism in type 1-diabetes patients. *Scand J Clin Lab Invest* **73**, 175-181, doi:10.3109/00365513.2013.765028 (2013).
- 134 Birkenmeier, G. *et al.* Posttranslational modification of human glyoxalase 1 indicates redox-dependent regulation. *PLoS One* **5**, e10399, doi:10.1371/journal.pone.0010399 (2010).
- 135 Cameron, A. D., Ridderstrom, M., Olin, B. & Mannervik, B. Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure* **7**, 1067-1078 (1999).
- 136 Talesa, V. *et al.* Demonstration of glyoxalase II in rat liver mitochondria. Partial purification and occurrence in multiple forms. *Biochim Biophys Acta* **955**, 103-110 (1988).
- 137 Scire, A., Tanfani, F., Saccucci, F., Bertoli, E. & Principato, G. Specific interaction of cytosolic and mitochondrial glyoxalase II with acidic phospholipids in form of liposomes results in the inhibition of the cytosolic enzyme only. *Proteins* **41**, 33-39 (2000).
- 138 Misra, K., Banerjee, A. B., Ray, S. & Ray, M. Glyoxalase III from *Escherichia coli*: a single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. *Biochem J* **305 (Pt 3)**, 999-1003 (1995).
- 139 Tao, X. & Tong, L. Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem* **278**, 31372-31379, doi:10.1074/jbc.M304221200 (2003).

- 140 Lee, J. Y. *et al.* Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. *Hum Mol Genet* **21**, 3215-3225, doi:10.1093/hmg/dds155 (2012).
- 141 Richarme, G. *et al.* Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine, and lysine residues. *J Biol Chem* **290**, 1885-1897, doi:10.1074/jbc.M114.597815 (2015).
- 142 Vander Jagt, D. L., Robinson, B., Taylor, K. K. & Hunsaker, L. A. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J Biol Chem* **267**, 4364-4369 (1992).
- 143 Baba, S. P. *et al.* Reductive metabolism of AGE precursors: a metabolic route for preventing AGE accumulation in cardiovascular tissue. *Diabetes* **58**, 2486-2497, doi:10.2337/db09-0375 (2009).
- 144 Vander Jagt, D. L., Hassebrook, R. K., Hunsaker, L. A., Brown, W. M. & Royer, R. E. Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chem Biol Interact* **130-132**, 549-562 (2001).
- 145 Vander Jagt, D. L. & Hunsaker, L. A. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact* **143-144**, 341-351 (2003).
- 146 Izaguirre, G., Kikonyogo, A. & Pietruszko, R. Methylglyoxal as substrate and inhibitor of human aldehyde dehydrogenase: comparison of kinetic properties among the three isozymes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **119**, 747-754 (1998).
- 147 Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. & Cerami, A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* **232**, 1629-1632 (1986).
- 148 Lo, T. W., Selwood, T. & Thornalley, P. J. The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. *Biochem Pharmacol* **48**, 1865-1870 (1994).
- 149 Ferguson, G. P., VanPatten, S., Bucala, R. & Al-Abed, Y. Detoxification of methylglyoxal by the nucleophilic bidentate, phenylacetylthiazolium bromide. *Chem Res Toxicol* **12**, 617-622, doi:10.1021/tx990007y (1999).
- 150 Cooper, M. E. *et al.* The cross-link breaker, N-phenacylthiazolium bromide prevents vascular advanced glycation end-product accumulation. *Diabetologia* **43**, 660-664, doi:10.1007/s001250051355 (2000).
- 151 Vasan, S., Foiles, P. & Founds, H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys* **419**, 89-96 (2003).
- 152 Engelen, L., Stehouwer, C. D. & Schalkwijk, C. G. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies. *Diabetes Obes Metab* **15**, 677-689, doi:10.1111/dom.12058 (2013).
- 153 Boldyrev, A. A., Aldini, G. & Derave, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev* **93**, 1803-1845, doi:10.1152/physrev.00039.2012 (2013).
- 154 Hipkiss, A. R., Michaelis, J. & Syrris, P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett* **371**, 81-85 (1995).

- 155 Szwergold, B. S. Carnosine and anserine act as effective transglycating agents in decomposition of aldose-derived Schiff bases. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 36-41, doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.033 (2005).
- 156 Seidler, N. W., Yeargans, G. S. & Morgan, T. G. Carnosine disaggregates glycated alpha-crystallin: an in vitro study. *Arch Biochem Biophys* **427**, 110-115, doi:10.1016/j.abb.2004.04.024 (2004).
- 157 Gardner, M. L., Illingworth, K. M., Kelleher, J. & Wood, D. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J Physiol* **439**, 411-422 (1991).
- 158 Nagaraj, R. H. *et al.* Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch Biochem Biophys* **402**, 110-119, doi:10.1016/S0003-9861(02)00067-X (2002).
- 159 Williams, M. E. *et al.* Effects of pyridoxamine in combined phase 2 studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy. *Am J Nephrol* **27**, 605-614, doi:10.1159/000108104 (2007).
- 160 Acimovic, J. M., Penezic, A. Z., Pavicevic, I. D., Jovanovic, V. B. & Mandic, L. M. The efficiency of compounds with alpha-amino-beta-mercapto-ethane group in protection of human serum albumin carbonylation and cross-linking with methylglyoxal. *Mol Biosyst* **10**, 2166-2175, doi:10.1039/c4mb00217b (2014).
- 161 Shao, X. *et al.* Essential Structural Requirements and Additive Effects for Flavonoids to Scavenge Methylglyoxal. *J Agric Food Chem*, doi:10.1021/jf500204s (2014).
- 162 Odetti, P. *et al.* Comparative trial of N-acetyl-cysteine, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. *Diabetes* **52**, 499-505 (2003).
- 163 Viollet, B. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* **122**, 253-270, doi:10.1042/CS20110386 (2012).
- 164 Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Touchette, A. D., Lal, S. & Szwergold, B. S. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* **48**, 198-202 (1999).
- 165 Takasawa, R. *et al.* Structure-activity relationship of human GLO I inhibitory natural flavonoids and their growth inhibitory effects. *Bioorg Med Chem* **16**, 3969-3975, doi:10.1016/j.bmc.2008.01.031 (2008).
- 166 Yadav, A. *et al.* Evaluation of potential flavonoid inhibitors of glyoxalase-I based on virtual screening and in vitro studies. *J Biomol Struct Dyn* **34**, 993-1007, doi:10.1080/07391102.2015.1064830 (2016).
- 167 Santel, T. *et al.* Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PLoS One* **3**, e3508, doi:10.1371/journal.pone.0003508 (2008).
- 168 Lo, T. W. & Thornalley, P. J. Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by diethyl esters of glyoxalase inhibitors in vitro. *Biochem Pharmacol* **44**, 2357-2363 (1992).
- 169 Murthy, N. S. *et al.* S-(N-aryl-N-hydroxycarbamoyl)glutathione derivatives are tight-binding inhibitors of glyoxalase I and slow substrates for glyoxalase II. *J Med Chem* **37**, 2161-2166 (1994).
- 170 Sharkey, E. M. *et al.* Pharmacokinetics and antitumor properties in tumor-bearing mice of an enediol analogue inhibitor of glyoxalase I. *Cancer Chemother Pharmacol* **46**, 156-166, doi:10.1007/s002800000130 (2000).

- 171 Bartyik, K., Turi, S., Orosz, F. & Karg, E. Methotrexate inhibits the glyoxalase system in vivo in children with acute lymphoid leukaemia. *Eur J Cancer* **40**, 2287-2292, doi:10.1016/j.ejca.2004.06.024 (2004).
- 172 Xue, M. *et al.* Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *Biochem J* **443**, 213-222, doi:10.1042/BJ20111648 (2012).
- 173 Xue, M. *et al.* Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation. *Diabetes* **65**, 2282-2294, doi:10.2337/db16-0153 (2016).
- 174 Jung, K. A. *et al.* Identification of aldo-keto reductases as NRF2-target marker genes in human cells. *Toxicol Lett* **218**, 39-49, doi:10.1016/j.toxlet.2012.12.026 (2013).
- 175 MacLeod, A. K. *et al.* Aldo-keto reductases are biomarkers of NRF2 activity and are co-ordinately overexpressed in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* **115**, 1530-1539, doi:10.1038/bjc.2016.363 (2016).
- 176 Conroy, P. J. Carcinostatic activity of methylglyoxal and related substances in tumour-bearing mice. *Ciba Found Symp*, 271-300 (1978).
- 177 Jerzykowski, T., Matuszewski, W., Otrzonsek, N. & Winter, R. Antineoplastic action of methylglyoxal. *Neoplasma* **17**, 25-35 (1970).
- 178 Apple, M. A. & Greenberg, D. M. Inhibition of cancer growth in mice by a normal metabolite. *Life Sci* **6**, 2157-2160 (1967).
- 179 He, T. *et al.* Methylglyoxal suppresses human colon cancer cell lines and tumor growth in a mouse model by impairing glycolytic metabolism of cancer cells associated with down-regulation of c-Myc expression. *Cancer Biol Ther* **17**, 955-965, doi:10.1080/15384047.2016.1210736 (2016).
- 180 Chakrabarti, A., Talukdar, D., Pal, A. & Ray, M. Immunomodulation of macrophages by methylglyoxal conjugated with chitosan nanoparticles against Sarcoma-180 tumor in mice. *Cell Immunol* **287**, 27-35, doi:10.1016/j.cellimm.2013.11.006 (2014).
- 181 Amicarelli, F. *et al.* Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radic Biol Med* **35**, 856-871 (2003).
- 182 Davidson, S. D. *et al.* A possible regulatory role of glyoxalase I in cell viability of human prostate cancer. *Urol Res* **30**, 116-121 (2002).
- 183 Milanese, D. M., Choudhury, M. S., Mallouh, C., Tazaki, H. & Konno, S. Methylglyoxal-induced apoptosis in human prostate carcinoma: potential modality for prostate cancer treatment. *Eur Urol* **37**, 728-734, doi:20226 (2000).
- 184 Ghosh, A., Bera, S., Ray, S., Banerjee, T. & Ray, M. Methylglyoxal induces mitochondria-dependent apoptosis in sarcoma. *Biochemistry (Mosc)* **76**, 1164-1171, doi:10.1134/S0006297911100105 (2011).
- 185 Kang, Y., Edwards, L. G. & Thornalley, P. J. Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leuk Res* **20**, 397-405 (1996).
- 186 Antognelli, C., Mezzasoma, L., Fettucciari, K., Mearini, E. & Talesa, V. N. Role of glyoxalase I in the proliferation and apoptosis control of human LNCaP and PC3 prostate cancer cells. *Prostate* **73**, 121-132, doi:10.1002/pros.22547 (2013).
- 187 Antognelli, C., Mezzasoma, L., Fettucciari, K. & Talesa, V. N. A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in prostate cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 836-844, doi:10.1016/j.biocel.2013.01.003 (2013).

- 188 Taniguchi, H. *et al.* Targeting the glyoxalase pathway enhances TRAIL efficacy in cancer cells by downregulating the expression of antiapoptotic molecules. *Mol Cancer Ther* **11**, 2294-2300, doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0031 (2012).
- 189 Speer, O. *et al.* Rapid suppression of mitochondrial permeability transition by methylglyoxal. Role of reversible arginine modification. *J Biol Chem* **278**, 34757-34763, doi:10.1074/jbc.M301990200 (2003).
- 190 Loarca, L., Sassi-Gaha, S. & Artlett, C. M. Two α -dicarbonyls downregulate migration, invasion, and adhesion of liver cancer cells in a p53-dependent manner. *Dig Liver Dis*, doi:10.1016/j.dld.2013.05.005 (2013).
- 191 Ramasamy, R. *et al.* Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* **15**, 16r-28r, doi:10.1093/glycob/cwi053 (2005).
- 192 Rulli, A. *et al.* Expression of glyoxalase I and II in normal and breast cancer tissues. *Breast Cancer Res Treat* **66**, 67-72 (2001).
- 193 Wang, Y. *et al.* Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. *Anticancer Res* **32**, 3219-3222 (2012).
- 194 Romanuik, T. L. *et al.* Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts. *Am J Pathol* **175**, 2264-2276, doi:10.2353/ajpath.2009.080868 (2009).
- 195 Sakamoto, H. *et al.* Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells. *Clin Cancer Res* **7**, 2513-2518 (2001).
- 196 Bair, W. B., 3rd, Cabello, C. M., Uchida, K., Bause, A. S. & Wondrak, G. T. GLO1 overexpression in human malignant melanoma. *Melanoma Res* **20**, 85-96, doi:10.1097/CMR.0b013e3283364903 (2010).
- 197 Ranganathan, S. & Tew, K. D. Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue from human colon. *Biochim Biophys Acta* **1182**, 311-316 (1993).
- 198 Santarius, T. *et al.* GLO1-A novel amplified gene in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **49**, 711-725, doi:10.1002/gcc.20784 (2010).
- 199 Antognelli, C., Palumbo, I., Aristei, C. & Talesa, V. N. Glyoxalase I inhibition induces apoptosis in irradiated MCF-7 cells via a novel mechanism involving Hsp27, p53 and NF-kappaB. *Br J Cancer* **111**, 395-406, doi:10.1038/bjc.2014.280 (2014).
- 200 Figarola, J. L., Singhal, J., Rahbar, S., Awasthi, S. & Singhal, S. S. LR-90 prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in human endothelial cells. *Apoptosis* **19**, 776-788, doi:10.1007/s10495-014-0974-3 (2014).
- 201 Hu, X., Yang, X., He, Q., Chen, Q. & Yu, L. Glyoxalase 1 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and is essential for HCC cell proliferation. *Biotechnol Lett* **36**, 257-263, doi:10.1007/s10529-013-1372-6 (2014).
- 202 Sharaf, H. *et al.* Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 429-441, doi:10.1016/j.bbadis.2014.12.009 (2015).
- 203 Sakamoto, H., Mashima, T., Yamamoto, K. & Tsuruo, T. Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *J Biol Chem* **277**, 45770-45775, doi:10.1074/jbc.M207485200 (2002).
- 204 van Heijst, J. W. *et al.* Argpyrimidine-modified Heat shock protein 27 in human non-small cell lung cancer: a possible mechanism for evasion of apoptosis. *Cancer Lett* **241**, 309-319, doi:10.1016/j.canlet.2005.10.042 (2006).

- 205 Oya-Ito, T. *et al.* Heat-shock protein 27 (Hsp27) as a target of methylglyoxal in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 769-781, doi:10.1016/j.bbadis.2011.03.017 (2011).
- 206 Kuniyasu, H. *et al.* Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol* **196**, 163-170, doi:10.1002/path.1031 (2002).
- 207 Xu, X. C. *et al.* Knockdown of RAGE inhibits growth and invasion of gastric cancer cells. *Eur J Histochem* **57**, e36 (2013).
- 208 Meghnani, V., Vetter, S. W. & Leclerc, E. RAGE overexpression confers a metastatic phenotype to the WM115 human primary melanoma cell line. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 1017-1027, doi:10.1016/j.bbadis.2014.02.013 (2014).
- 209 Abe, R. *et al.* Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions. *J Invest Dermatol* **122**, 461-467, doi:10.1046/j.0022-202X.2004.22218.x (2004).
- 210 Radia, A. M. *et al.* Specific siRNA targeting receptor for advanced glycation end products (RAGE) decreases proliferation in human breast cancer cell lines. *Int J Mol Sci* **14**, 7959-7978, doi:10.3390/ijms14047959 (2013).
- 211 Elangovan, I. *et al.* Targeting receptor for advanced glycation end products (RAGE) expression induces apoptosis and inhibits prostate tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 1133-1138, doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.060 (2012).
- 212 Liang, H., Zhong, Y., Zhou, S. & Peng, L. Knockdown of RAGE expression inhibits colorectal cancer cell invasion and suppresses angiogenesis in vitro and in vivo. *Cancer Lett* **313**, 91-98, doi:10.1016/j.canlet.2011.08.028 (2011).
- 213 Taguchi, A. *et al.* Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* **405**, 354-360, doi:10.1038/35012626 (2000).
- 214 Kang, R. *et al.* The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ* **17**, 666-676, doi:10.1038/cdd.2009.149 (2010).
- 215 Bierhaus, A. *et al.* Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **50**, 2792-2808 (2001).
- 216 Liliensiek, B. *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest* **113**, 1641-1650, doi:10.1172/JCI18704 (2004).
- 217 Sullivan, L. B., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **16**, 680-693, doi:10.1038/nrc.2016.85 (2016).
- 218 Selak, M. A. *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **7**, 77-85, doi:10.1016/j.ccr.2004.11.022 (2005).
- 219 Adam, J. *et al.* A role for cytosolic fumarate hydratase in urea cycle metabolism and renal neoplasia. *Cell Rep* **3**, 1440-1448, doi:10.1016/j.celrep.2013.04.006 (2013).
- 220 Ward, P. S. *et al.* The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* **17**, 225-234, doi:10.1016/j.ccr.2010.01.020 (2010).
- 221 Loenarz, C. & Schofield, C. J. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat Chem Biol* **4**, 152-156, doi:10.1038/nchembio0308-152 (2008).

- 222 Xiao, M. *et al.* Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev* **26**, 1326-1338, doi:10.1101/gad.191056.112 (2012).
- 223 Nowicki, S. & Gottlieb, E. Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J* **282**, 2796-2805, doi:10.1111/febs.13295 (2015).
- 224 Sullivan, L. B., Gui, D. Y. & Heiden, M. G. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, doi:10.1038/nrc.2016.85 (2016).
- 225 Isaacs, J. S. *et al.* HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* **8**, 143-153, doi:10.1016/j.ccr.2005.06.017 (2005).
- 226 Majmundar, A. J., Wong, W. J. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* **40**, 294-309, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.022 (2010).
- 227 Xu, W. *et al.* Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* **19**, 17-30, doi:10.1016/j.ccr.2010.12.014 (2011).
- 228 Losman, J. A. *et al.* (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* **339**, 1621-1625, doi:10.1126/science.1231677 (2013).
- 229 Chowdhury, R. *et al.* The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep* **12**, 463-469, doi:10.1038/embor.2011.43 (2011).
- 230 Verrier, L., Vandromme, M. & Trouche, D. Histone demethylases in chromatin cross-talks. *Biol Cell* **103**, 381-401, doi:10.1042/BC20110028 (2011).
- 231 Zhou, V. W., Goren, A. & Bernstein, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* **12**, 7-18, doi:10.1038/nrg2905 (2011).
- 232 Guo, Y. *et al.* Effects of Methylglyoxal and Glyoxalase I Inhibition on Breast Cancer Cells Proliferation, Invasion, and Apoptosis through Modulation of MAPKs, MMP9, and Bcl-2. *Cancer Biol Ther*, 0, doi:10.1080/15384047.2015.1121346 (2015).
- 233 Zender, L. *et al.* An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* **135**, 852-864, doi:10.1016/j.cell.2008.09.061 (2008).
- 234 Mir, A. R., uddin, M., Alam, K. & Ali, A. Methylglyoxal mediated conformational changes in histone H2A-generation of carboxyethylated advanced glycation end products. *Int J Biol Macromol* **69**, 260-266, doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.05.057 (2014).
- 235 Ansari, N. A. & Dash, D. Biochemical Studies on Methylglyoxal-Mediated Glycated Histones: Implications for Presence of Serum Antibodies against the Glycated Histones in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *ISRN Biochem* **2013**, 198065, doi:10.1155/2013/198065 (2013).
- 236 Suh, K. S., Choi, E. M., Rhee, S. Y. & Kim, Y. S. Methylglyoxal induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Free Radic Res* **48**, 206-217, doi:10.3109/10715762.2013.859387 (2014).
- 237 Rosca, M. G., Monnier, V. M., Szweda, L. I. & Weiss, M. F. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal.

- Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F52-59, doi:10.1152/ajprenal.00302.2001 (2002).
- 238 Rosca, M. G. *et al.* Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F420-430, doi:10.1152/ajprenal.00415.2004 (2005).
- 239 Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820, doi:10.1038/414813a (2001).
- 240 Park, Y. S. *et al.* Identification of the binding site of methylglyoxal on glutathione peroxidase: methylglyoxal inhibits glutathione peroxidase activity via binding to glutathione binding sites Arg 184 and 185. *Free Radic Res* **37**, 205-211 (2003).
- 241 Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3217-3266, doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018 (2013).
- 242 Menegon, S., Columbano, A. & Giordano, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol Med* **22**, 578-593, doi:10.1016/j.molmed.2016.05.002 (2016).
- 243 Enomoto, A. *et al.* High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* **59**, 169-177 (2001).
- 244 Ramos-Gomez, M. *et al.* Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3410-3415, doi:10.1073/pnas.051618798 (2001).
- 245 Iida, K. *et al.* Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* **64**, 6424-6431, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1906 (2004).
- 246 Kwak, M. K. & Kensler, T. W. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol* **244**, 66-76, doi:10.1016/j.taap.2009.08.028 (2010).
- 247 DeNicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106-109, doi:10.1038/nature10189 (2011).
- 248 Singh, A. *et al.* Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* **3**, e420, doi:10.1371/journal.pmed.0030420 (2006).
- 249 Solis, L. M. *et al.* Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* **16**, 3743-3753, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3352 (2010).
- 250 Homma, S. *et al.* Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 3423-3432, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2822 (2009).
- 251 Gorrini, C., Harris, I. S. & Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 931-947, doi:10.1038/nrd4002 (2013).
- 252 Lou, H., Du, S., Ji, Q. & Stolz, A. Induction of AKR1C2 by phase II inducers: identification of a distal consensus antioxidant response element regulated by NRF2. *Mol Pharmacol* **69**, 1662-1672, doi:10.1124/mol.105.019794 (2006).
- 253 Nishinaka, T. *et al.* Regulation of aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: involvement of transcription factor Nrf2. *Chem Biol Interact* **191**, 185-191, doi:10.1016/j.cbi.2011.01.026 (2011).

- 254 Sullivan, L. B. & Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* **2**, 17, doi:10.1186/2049-3002-2-17 (2014).
- 255 Weinberg, F. *et al.* Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8788-8793, doi:10.1073/pnas.1003428107 (2010).
- 256 Porporato, P. E. *et al.* A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep* **8**, 754-766, doi:10.1016/j.celrep.2014.06.043 (2014).
- 257 Ishikawa, K. *et al.* ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* **320**, 661-664, doi:10.1126/science.1156906 (2008).
- 258 Satoh, H., Moriguchi, T., Takai, J., Ebina, M. & Yamamoto, M. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. *Cancer Res* **73**, 4158-4168, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4499 (2013).
- 259 Glasauer, A., Sena, L. A., Diebold, L. P., Mazar, A. P. & Chandel, N. S. Targeting SOD1 reduces experimental non-small-cell lung cancer. *J Clin Invest* **124**, 117-128, doi:10.1172/JCI71714 (2014).
- 260 Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* **49**, 1374-1403, doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027 (2013).
- 261 Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752, doi:10.1038/35021093 (2000).
- 262 Penault-Llorca, F. & Viale, G. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Ann Oncol* **23 Suppl 6**, vi19-22, doi:10.1093/annonc/mds190 (2012).
- 263 Goodwin, P. J. Obesity and Breast Cancer Outcomes: How Much Evidence Is Needed to Change Practice? *J Clin Oncol* **34**, 646-648, doi:10.1200/JCO.2015.64.7503 (2016).
- 264 Goodwin, P. J. Obesity, insulin resistance and breast cancer outcomes. *Breast* **24 Suppl 2**, S56-59, doi:10.1016/j.breast.2015.07.014 (2015).
- 265 van Heijst, J. W., Niessen, H. W., Hoekman, K. & Schalkwijk, C. G. Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. *Ann N Y Acad Sci* **1043**, 725-733, doi:10.1196/annals.1333.084 (2005).
- 266 Fonseca-Sanchez, M. A. *et al.* Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase 1 expression and high tumor grade. *Int J Oncol* **41**, 670-680, doi:10.3892/ijo.2012.1478 (2012).
- 267 Chiavarina, B. *et al.* Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. *Oncotarget* (2014).
- 268 Bento, C. F., Marques, F., Fernandes, R. & Pereira, P. Methylglyoxal alters the function and stability of critical components of the protein quality control. *PLoS One* **5**, e13007, doi:10.1371/journal.pone.0013007 (2010).
- 269 Neckers, L. & Workman, P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin Cancer Res* **18**, 64-76, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1000 (2012).
- 270 Barrott, J. J. & Haystead, T. A. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *FEBS J* **280**, 1381-1396, doi:10.1111/febs.12147 (2013).
- 271 Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 537-549, doi:10.1038/nrc2887 (2010).

- 272 Huntoon, C. J. *et al.* Heat shock protein 90 inhibition depletes LATS1 and LATS2, two regulators of the mammalian hippo tumor suppressor pathway. *Cancer Res* **70**, 8642-8650, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1345 (2010).
- 273 Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* **19**, 491-505, doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011 (2010).
- 274 Overholtzer, M. *et al.* Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12405-12410, doi:10.1073/pnas.0605579103 (2006).
- 275 Moroishi, T., Hansen, C. G. & Guan, K. L. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer* **15**, 73-79, doi:10.1038/nrc3876 (2015).
- 276 DeRan, M. *et al.* Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiotensin-like 1 protein. *Cell Rep* **9**, 495-503, doi:10.1016/j.celrep.2014.09.036 (2014).
- 277 Mo, J. S. *et al.* Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat Cell Biol*, doi:10.1038/ncb3111 (2015).
- 278 Wang, W. *et al.* AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat Cell Biol* **17**, 490-499, doi:10.1038/ncb3113 (2015).
- 279 Zhao, B. *et al.* Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* **21**, 2747-2761, doi:10.1101/gad.1602907 (2007).
- 280 Zhao, B. *et al.* TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* **22**, 1962-1971, doi:10.1101/gad.1664408 (2008).
- 281 Chen, P. S. *et al.* CTGF enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- α v β 3-ERK1/2-dependent S100A4-upregulated pathway. *J Cell Sci* **120**, 2053-2065, doi:10.1242/jcs.03460 (2007).
- 282 He, M. *et al.* New insights into posttranslational modifications of Hippo pathway in carcinogenesis and therapeutics. *Cell Div* **11**, 4, doi:10.1186/s13008-016-0013-6 (2016).
- 283 Nokin, M. J. *et al.* Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.19375 (2016).
- 284 Chiavarina, B. *et al.* Methylglyoxal-Mediated Stress Correlates with High Metabolic Activity and Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18010213 (2017).
- 285 Yuan, J. *et al.* The role of cPLA2 in Methylglyoxal-induced cell apoptosis of HUVECs. *Toxicol Appl Pharmacol* **323**, 44-52, doi:10.1016/j.taap.2017.03.020 (2017).
- 286 Du, J. *et al.* Superoxide-mediated early oxidation and activation of ASK1 are important for initiating methylglyoxal-induced apoptosis process. *Free Radic Biol Med* **31**, 469-478 (2001).
- 287 Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**, 13291-13295, doi:10.1074/jbc.R900010200 (2009).
- 288 Le Calvé, B. *et al.* Long-term in vitro treatment of human glioblastoma cells with temozolomide increases resistance in vivo through up-regulation of GLUT transporter and aldo-keto reductase enzyme AKR1C expression. *Neoplasia* **12**, 727-739 (2010).

- 289 Zhong, T., Xu, F., Xu, J., Liu, L. & Chen, Y. Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) is associated with the doxorubicin resistance in human breast cancer via PTEN loss. *Biomed Pharmacother* **69**, 317-325, doi:10.1016/j.biopha.2014.12.022 (2015).
- 290 Morgenstern, J. *et al.* Loss of glyoxalase 1 induces compensatory mechanism to achieve dicarbonyl detoxification in mammalian Schwann cells. *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M116.760132 (2016).
- 291 Kalapos, M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact* **171**, 251-271, doi:10.1016/j.cbi.2007.11.009 (2008).
- 292 Kalapos, M. P., Littauer, A. & de Groot, H. Has reactive oxygen a role in methylglyoxal toxicity? A study on cultured rat hepatocytes. *Arch Toxicol* **67**, 369-372 (1993).
- 293 Morcos, M. *et al.* Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **7**, 260-269, doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00371.x (2008).
- 294 Yao, D. & Brownlee, M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* **59**, 249-255, doi:10.2337/db09-0801 (2010).
- 295 Mattson, M. P. Hormesis defined. *Ageing Res Rev* **7**, 1-7, doi:10.1016/j.arr.2007.08.007 (2008).
- 296 Wellbrock, C. & Arozarena, I. The Complexity of the ERK/MAP-Kinase Pathway and the Treatment of Melanoma Skin Cancer. *Front Cell Dev Biol* **4**, 33, doi:10.3389/fcell.2016.00033 (2016).
- 297 Hall, A. *et al.* Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the (V600E)BRAF oncogene. *Oncotarget* **4**, 584-599, doi:10.18632/oncotarget.965 (2013).
- 298 Parmenter, T. J. *et al.* Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer Discov* **4**, 423-433, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0440 (2014).
- 299 Haq, R. *et al.* Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* **23**, 302-315, doi:10.1016/j.ccr.2013.02.003 (2013).
- 300 Smith, L. K., Rao, A. D. & McArthur, G. A. Targeting metabolic reprogramming as a potential therapeutic strategy in melanoma. *Pharmacol Res* **107**, 42-47, doi:10.1016/j.phrs.2016.02.009 (2016).
- 301 Haq, R., Fisher, D. E. & Widlund, H. R. Molecular pathways: BRAF induces bioenergetic adaptation by attenuating oxidative phosphorylation. *Clin Cancer Res* **20**, 2257-2263, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0898 (2014).
- 302 Shi, H. *et al.* Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun* **3**, 724, doi:10.1038/ncomms1727 (2012).
- 303 Poulidakos, P. I. *et al.* RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **480**, 387-390, doi:10.1038/nature10662 (2011).
- 304 Heidorn, S. J. *et al.* Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* **140**, 209-221, doi:10.1016/j.cell.2009.12.040 (2010).
- 305 Lidsky, M. *et al.* Mitogen-activated protein kinase (MAPK) hyperactivation and enhanced NRAS expression drive acquired vemurafenib resistance in V600E BRAF melanoma cells. *J Biol Chem* **289**, 27714-27726, doi:10.1074/jbc.M113.532432 (2014).

- 306 Emery, C. M. *et al.* MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20411-20416, doi:10.1073/pnas.0905833106 (2009).
- 307 Maertens, O. *et al.* Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov* **3**, 338-349, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0313 (2013).
- 308 Whittaker, S. R. *et al.* A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov* **3**, 350-362, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0470 (2013).
- 309 Gibney, G. T. & Smalley, K. S. An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer Discov* **3**, 260-263, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0017 (2013).
- 310 Shi, H., Kong, X., Ribas, A. & Lo, R. S. Combinatorial treatments that overcome PDGFR β -driven resistance of melanoma cells to V600E-BRAF inhibition. *Cancer Res* **71**, 5067-5074, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0140 (2011).
- 311 Gopal, Y. N. *et al.* Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer Res* **70**, 8736-8747, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0902 (2010).
- 312 Manzano, J. L. *et al.* Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med* **4**, 237, doi:10.21037/atm.2016.06.07 (2016).
- 313 Straussman, R. *et al.* Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* **487**, 500-504, doi:10.1038/nature11183 (2012).
- 314 Baenke, F. *et al.* Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Mol Oncol* **10**, 73-84, doi:10.1016/j.molonc.2015.08.003 (2016).
- 315 Gopal, Y. N. *et al.* Inhibition of mTORC1/2 overcomes resistance to MAPK pathway inhibitors mediated by PGC1 α and oxidative phosphorylation in melanoma. *Cancer Res* **74**, 7037-7047, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1392 (2014).
- 316 Zhou, G. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**, 1167-1174, doi:10.1172/JCI13505 (2001).
- 317 Wheaton, W. W. *et al.* Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife* **3**, e02242 (2014).
- 318 Ruggiero-Lopez, D. *et al.* Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol* **58**, 1765-1773 (1999).
- 319 Beisswenger, P. & Ruggiero-Lopez, D. Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes Metab* **29**, 6S95-103 (2003).
- 320 Niehr, F. *et al.* Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations. *J Transl Med* **9**, 76, doi:10.1186/1479-5876-9-76 (2011).
- 321 Yuan, P. *et al.* Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18226-18231, doi:10.1073/pnas.1317577110 (2013).
- 322 Verfaillie, A. *et al.* Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* **6**, 6683, doi:10.1038/ncomms7683 (2015).

- 323 Hashmi, F., Malone-Lee, J. & Hounsell, E. Plantar skin in type II diabetes: an investigation of protein glycation and biomechanical properties of plantar epidermis. *Eur J Dermatol* **16**, 23-32 (2006).
- 324 Paegeon, H. *et al.* Biological Effects Induced by Specific Advanced Glycation End Products in the Reconstructed Skin Model of Aging. *Biores Open Access* **4**, 54-64, doi:10.1089/biores.2014.0053 (2015).
- 325 Meerwaldt, R. *et al.* Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* **47**, 1324-1330, doi:10.1007/s00125-004-1451-2 (2004).
- 326 Corstjens, H. *et al.* Glycation associated skin autofluorescence and skin elasticity are related to chronological age and body mass index of healthy subjects. *Exp Gerontol* **43**, 663-667, doi:10.1016/j.exger.2008.01.012 (2008).
- 327 Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* **172**, 902-908 (1970).
- 328 Büttner, P. *et al.* Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* **75**, 2499-2506 (1995).
- 329 Balch, C. M. *et al.* Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* **19**, 3622-3634, doi:10.1200/JCO.2001.19.16.3622 (2001).
- 330 Rousseau, D. L. *et al.* Revised American Joint Committee on Cancer staging criteria accurately predict sentinel lymph node positivity in clinically node-negative melanoma patients. *Ann Surg Oncol* **10**, 569-574 (2003).
- 331 Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T. & Fisher, D. E. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**, 298-301, doi:10.1038/34681 (1998).
- 332 Wu, M. *et al.* c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev* **14**, 301-312 (2000).
- 333 Wellbrock, C. *et al.* Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One* **3**, e2734, doi:10.1371/journal.pone.0002734 (2008).
- 334 Konieczkowski, D. J. *et al.* A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* **4**, 816-827, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0424 (2014).
- 335 Hoek, K. S. *et al.* Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* **19**, 290-302, doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00322.x (2006).
- 336 Hoek, K. S. *et al.* In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* **68**, 650-656, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2491 (2008).
- 337 Müller, J. *et al.* Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* **5**, 5712, doi:10.1038/ncomms6712 (2014).
- 338 El-Osta, A. *et al.* Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* **205**, 2409-2417, doi:10.1084/jem.20081188 (2008).
- 339 Lin, C. C. *et al.* Methylglyoxal activates NF-kappaB nuclear translocation and induces COX-2 expression via a p38-dependent pathway in synovial cells. *Life Sci* **149**, 25-33, doi:10.1016/j.lfs.2016.02.060 (2016).

- 340 LeBleu, V. S. *et al.* PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol* **16**, 992-1003, 1001-1015, doi:10.1038/ncb3039 (2014).
- 341 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **36**, 1045-1050, doi:10.1042/BST0361045 (2008).
- 342 Xue, J. *et al.* The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. *Biochemistry* **53**, 3327-3335, doi:10.1021/bi500046t (2014).
- 343 Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867, doi:10.1038/nature01322 (2002).
- 344 Martinez-Outschoorn, U. E., Lisanti, M. P. & Sotgia, F. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol* **25**, 47-60, doi:10.1016/j.semcancer.2014.01.005 (2014).
- 345 Chaudhri, V. K. *et al.* Metabolic alterations in lung cancer-associated fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of the tumor. *Mol Cancer Res* **11**, 579-592, doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0437-T (2013).
- 346 Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12072-12077, doi:10.1073/pnas.211053698 (2001).
- 347 Elkhattouti, A., Hassan, M. & Gomez, C. R. Stromal Fibroblast in Age-Related Cancer: Role in Tumorigenesis and Potential as Novel Therapeutic Target. *Front Oncol* **5**, 158, doi:10.3389/fonc.2015.00158 (2015).
- 348 Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**, 99-118, doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144 (2010).
- 349 Pazolli, E. *et al.* Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res* **72**, 2251-2261, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3386 (2012).
- 350 Campisi, J. & Robert, L. Cell senescence: role in aging and age-related diseases. *Interdiscip Top Gerontol* **39**, 45-61, doi:10.1159/000358899 (2014).
- 351 Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T. & Hanahan, D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* **17**, 135-147, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.041 (2010).
- 352 Wahl, M. L. *et al.* Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* **1**, 617-628 (2002).
- 353 Pinheiro, C. *et al.* Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 427694, doi:10.1155/2010/427694 (2010).
- 354 Magalhaes, M. A. *et al.* Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. *J Cell Biol* **195**, 903-920, doi:10.1083/jcb.201103045 (2011).
- 355 Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R. & Gilad, E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments

- leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* **279**, 26991-27007, doi:10.1074/jbc.M311838200 (2004).
- 356 Yang, K. R. *et al.* Niche inheritance: a cooperative pathway to enhance cancer cell fitness through ecosystem engineering. *J Cell Biochem* **115**, 1478-1485, doi:10.1002/jcb.24813 (2014).
- 357 Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C. & Pouyssegur, J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* **14**, 771-794, doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x (2010).
- 358 Fais, S., Venturi, G. & Gatenby, B. Microenvironmental acidosis in carcinogenesis and metastases: new strategies in prevention and therapy. *Cancer Metastasis Rev* **33**, 1095-1108, doi:10.1007/s10555-014-9531-3 (2014).
- 359 Lee, W. Y., Huang, S. C., Hsu, K. F., Tzeng, C. C. & Shen, W. L. Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence. *Gynecol Oncol* **108**, 377-384, doi:10.1016/j.ygyno.2007.10.034 (2008).
- 360 Ibrahim-Hashim, A. *et al.* Systemic buffers inhibit carcinogenesis in TRAMP mice. *J Urol* **188**, 624-631, doi:10.1016/j.juro.2012.03.113 (2012).
- 361 Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P. & Barber, D. L. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* **11**, 671-677, doi:10.1038/nrc3110 (2011).
- 362 Belhoussine, R., Morjani, H., Sharonov, S., Ploton, D. & Manfait, M. Characterization of intracellular pH gradients in human multidrug-resistant tumor cells by means of scanning microspectrofluorometry and dual-emission-ratio probes. *Int J Cancer* **81**, 81-89 (1999).
- 363 Becelli, R., Renzi, G., Morello, R. & Altieri, F. Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. *J Craniofac Surg* **18**, 1051-1054, doi:10.1097/scs.0b013e3180de63eb (2007).
- 364 Simon, S., Roy, D. & Schindler, M. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1128-1132 (1994).
- 365 Lis, P. *et al.* The HK2 Dependent "Warburg Effect" and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate. *Molecules* **21**, doi:10.3390/molecules21121730 (2016).
- 366 Demarse, N. A. *et al.* Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation. *J Mol Biol* **394**, 789-803, doi:10.1016/j.jmb.2009.09.062 (2009).
- 367 Kwon, O. H. *et al.* Pyruvate kinase M2 promotes the growth of gastric cancer cells via regulation of Bcl-xL expression at transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 38-44, doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.063 (2012).
- 368 Shen, Y. C. *et al.* Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **108**, 72-81, doi:10.1038/bjc.2012.559 (2013).
- 369 Zhao, Y. *et al.* Overcoming trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism. *Cancer Res* **71**, 4585-4597, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0127 (2011).
- 370 Liu, Y. *et al.* A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **11**, 1672-1682, doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0131 (2012).

- 371 Cao, X. *et al.* Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother Pharmacol* **59**, 495-505, doi:10.1007/s00280-006-0291-9 (2007).
- 372 Maher, J. C., Krishan, A. & Lampidis, T. J. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol* **53**, 116-122, doi:10.1007/s00280-003-0724-7 (2004).
- 373 Maher, J. C., Wangpaichitr, M., Savaraj, N., Kurtoglu, M. & Lampidis, T. J. Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose. *Mol Cancer Ther* **6**, 732-741, doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0407 (2007).
- 374 Macheda, M. L., Rogers, S. & Best, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* **202**, 654-662, doi:10.1002/jcp.20166 (2005).
- 375 Price, G. S., Page, R. L., Riviere, J. E., Cline, J. M. & Thrall, D. E. Pharmacokinetics and toxicity of oral and intravenous lonidamine in dogs. *Cancer Chemother Pharmacol* **38**, 129-135 (1996).
- 376 Pinheiro, C. *et al.* Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* **44**, 127-139, doi:10.1007/s10863-012-9428-1 (2012).
- 377 Birsoy, K. *et al.* MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. *Nat Genet* **45**, 104-108, doi:10.1038/ng.2471 (2013).
- 378 Ko, Y. H., Pedersen, P. L. & Geschwind, J. F. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett* **173**, 83-91 (2001).
- 379 Sun, Y. *et al.* Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer. *J Bioenerg Biomembr* **47**, 319-329, doi:10.1007/s10863-015-9612-1 (2015).
- 380 Cardaci, S., Desideri, E. & Ciriolo, M. R. Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug. *J Bioenerg Biomembr* **44**, 17-29, doi:10.1007/s10863-012-9422-7 (2012).
- 381 Zhang, Q. *et al.* Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells. *Genes Cancer* **5**, 100-112, doi:10.18632/genesandcancer.9 (2014).
- 382 Ganapathy-Kanniappan, S. & Geschwind, J. F. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Mol Cancer* **12**, 152, doi:10.1186/1476-4598-12-152 (2013).
- 383 Rabbani, N. & Thornalley, P. J. The glyoxalase system--from microbial metabolism, through ageing to human disease and multidrug resistance. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 261, doi:10.1016/j.semcdb.2011.02.014 (2011).
- 384 Sakamoto, H. *et al.* Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood* **95**, 3214-3218 (2000).
- 385 Fahey, J. W. & Talalay, P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol* **37**, 973-979 (1999).
- 386 Jeong, W. S. *et al.* Differential expression and stability of endogenous nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) by natural chemopreventive compounds in HepG2 human hepatoma cells. *J Biochem Mol Biol* **38**, 167-176 (2005).

- 387 Kender, Z. *et al.* Effect of metformin on methylglyoxal metabolism in patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **122**, 316-319, doi:10.1055/s-0034-1371818 (2014).
- 388 Garg, S. K., Maurer, H., Reed, K. & Selagamsetty, R. Diabetes and cancer: two diseases with obesity as a common risk factor. *Diabetes Obes Metab* **16**, 97-110, doi:10.1111/dom.12124 (2014).
- 389 Bosco, J. L., Antonsen, S., Sorensen, H. T., Pedersen, L. & Lash, T. L. Metformin and incident breast cancer among diabetic women: a population-based case-control study in Denmark. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 101-111, doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0817 (2011).
- 390 Morales, D. R. & Morris, A. D. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu Rev Med* **66**, 17-29, doi:10.1146/annurev-med-062613-093128 (2015).
- 391 Lu, J. *et al.* The protective effect and underlying mechanism of metformin on neointima formation in fructose-induced insulin resistant rats. *Cardiovasc Diabetol* **12**, 58, doi:10.1186/1475-2840-12-58 (2013).
- 392 Thornalley, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* **419**, 31-40 (2003).
- 393 Soulis, T., Cooper, M. E., Vranes, D., Bucala, R. & Jerums, G. Effects of aminoguanidine in preventing experimental diabetic nephropathy are related to the duration of treatment. *Kidney Int* **50**, 627-634 (1996).
- 394 Hammes, H. P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K. & Brownlee, M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11555-11558 (1991).
- 395 Kihara, M. *et al.* Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology, and oxygen free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6107-6111 (1991).
- 396 Mohamad, N. A. *et al.* Aminoguanidine impedes human pancreatic tumor growth and metastasis development in nude mice. *World J Gastroenterol* **15**, 1065-1071 (2009).
- 397 Imai, T. *et al.* Inhibitory effects of aminoguanidine on thyroid follicular carcinoma development in inflamed capsular regions of rats treated with sulfadimethoxine after N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiation. *Cancer Sci* **100**, 1794-1800, doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01250.x (2009).
- 398 Iovine, B., Iannella, M. L., Nocella, F., Pricolo, M. R. & Bevilacqua, M. A. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett* **315**, 122-128, doi:10.1016/j.canlet.2011.07.021 (2012).
- 399 Iovine, B. *et al.* The anti-proliferative effect of L-carnosine correlates with a decreased expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in human colon cancer cells. *PLoS One* **9**, e96755, doi:10.1371/journal.pone.0096755 (2014).
- 400 Iovine, B., Guardia, F., Irace, C. & Bevilacqua, M. A. l-carnosine dipeptide overcomes acquired resistance to 5-fluorouracil in HT29 human colon cancer cells via downregulation of HIF1-alpha and induction of apoptosis. *Biochimie* **127**, 196-204, doi:10.1016/j.biochi.2016.05.010 (2016).
- 401 Renner, C. *et al.* Carnosine retards tumor growth in vivo in an NIH3T3-HER2/neu mouse model. *Mol Cancer* **9**, 2, doi:10.1186/1476-4598-9-2 (2010).
- 402 Renner, C. *et al.* Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. *Neurol Res* **32**, 101-105, doi:10.1179/016164109X12518779082237 (2010).

VI. Bibliographie personnelle

Bibliographie personnelle

- 1) Chiavarina B*, Nokin MJ*, **Durieux F**, Bianchi E, Turtoi A, Peulen O, Peixoto P, Irigaray P, Uchida K, Belpomme D, Delvenne P, Castronovo V and Bellahcène A, Triple negative tumors accumulate significantly less arg-pyrimidine, methylglyoxal specific adducts, than other human breast cancer subtypes, *Oncotarget*, 2014
- 2) Nokin MJ, **Durieux F**, Peixoto P, Chiavarina B, Peulen O, Blomme A, Turtoi A, Costanza B, Smargiasso N, Baiwir D, Leenders J, De Tullio P, Bianchi E, Thiry M, Uchida K, Spiegel DA, Cochrane JR, Hutton CA, De Pauw E, Delvenne P, Belpomme D, Castronovo V and Bellahcène A, Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 post-translational glycation and YAP-mediated breast tumor growth and metastasis, *eLife* 2016
- 3) Chiavarina B, Nokin MJ, Bellier J, **Durieux F**, Bletard N, Sherer F, Lovinfosse P, Peulen O, Verset L, Dehon R, Demetter P, Turtoi A, Uchida K, Goldman S, Hustinx R, Delvenne P, Castronovo V and Bellahcène A, Methylglyoxal-mediated stress correlates with high metabolic activity and promotes tumor growth in colorectal cancer, *International Journal of Molecular Sciences* 2017
- 4) Nokin MJ*, **Durieux F***, Bellier J, Peulen O, Uchida K, Spiegel DA, Cochrane JR, Hutton CA, Castronovo V and Bellahcène A, Hormetic potential of methylglyoxal, a side-product of glycolysis, in switching tumours form growth to death, accepté sous révisions mineures à *Scientific Reports* (Août 2017)
- 5) **Durieux F**, et al, Methylglyoxal-mediated dicarbonyl stress in melanoma: impact on resistance to therapy, manuscript en cours de construction

Résumé

Le métabolisme de glycolyse aérobie des tumeurs, ou effet Warburg, est une des caractéristiques reconnues des cellules cancéreuses. L'augmentation du flux glycolytique induit la production spontanée d'un dicarbonyl réactif, le méthylglyoxal (MG). Cette molécule forme des adduits de glycation sur les macromolécules biologiques. L'accumulation de ces produits de glycation avancée (AGEs) mène au stress dicarbonyl qui a été impliqué dans l'étiopathologie de maladies chroniques comme l'obésité et les complications liées au diabète. Les cellules ont développé des systèmes de détoxification du MG de façon à en limiter les effets délétères. La majorité de la détoxification du MG est réalisée par les enzymes glyoxalases 1 et 2, qui, en présence de glutathion réduit, sont capables convertir le MG en D-Lactate. Le laboratoire a entrepris l'étude du rôle du stress dicarbonyl engendré par le MG dans le cancer. Nous avons mis en évidence l'accumulation d'AGEs au niveau d'une collection d'adénocarcinomes mammaires et colorectaux humains alors que le tissu sain associé en était presque exempt. Par ailleurs, nous avons démontré que la croissance tumorale dans des modèles *in vivo* pouvait être accrue par le stress dicarbonyl et inhibée par une molécule capturant le MG, un MG-scavenger, la carnosine. Nous avons identifié une nouvelle cible protéique du MG dont la glycation mène à l'inhibition d'une voie suppresseur de tumeurs et à l'activation d'un oncogène. Nous avons ensuite adressé le rôle paradoxal, à la fois pro- et antitumoral du MG. Nous avons mis en évidence que les toutes cellules tumorales ne réagissent pas de façon équivalente au stress dicarbonyl, en fonction notamment de leur métabolisme et de leur capacité de détoxification du MG. De plus, nous avons montré un effet hormétique du MG, qui à l'instar du stress oxydant, peut être favorable aux cellules cancéreuses à faible dose mais devient toxique à plus haute dose. Enfin nous avons mis en évidence un lien entre l'acquisition de la résistance à l'inhibition de BRAF dans le mélanome avec un meilleur contrôle du stress dicarbonyl. L'impact du MG dans le processus tumoral et la possibilité de moduler le stress dicarbonyl, notamment par les MG-scavengers, sont en cours d'étude au Laboratoire. Ces travaux pourraient potentiellement aboutir au développement d'une approche thérapeutique nouvelle pour le traitement du cancer.

Aerobic glycolysis in tumors, otherwise named Warburg effect, is a common feature of cancer cells. Increased glycolytic flux induces spontaneous production of a highly reactive dicarbonyl compound, methylglyoxal (MG). This molecule forms glycation adducts on biological macromolecules. Accumulation of these advanced glycation endproducts (AGEs) leads to dicarbonyl stress which has been linked to the etiopathology of chronic diseases such as obesity and diabetes related complications. Cells have developed MG-detoxification systems in order to avoid its deleterious effects. Most of MG detoxification is operated by the glyoxalases enzymes (Glo1 and Glo2) that use reduced glutathione to convert MG into D-Lactate. Our Laboratory launched the study of MG-mediated dicarbonyl stress in cancer. We showed AGEs accumulation in breast and colorectal tumoral lesions compared to their normal tissue counterparts. We have also demonstrated that *in vivo* tumor growth could be enhanced by dicarbonyl stress and inhibited by treatment with a MG-scavenger molecule, carnosine. We then identified a new protein target of MG whose glycation led to the inhibition of a tumor suppressor pathway and to the activation of an oncogene. We next addressed the paradoxal role of MG, both pro- and antitumor. We showed that all cancer cells do not react equally to dicarbonyl stress, notably depending of their metabolism and their ability to detoxify MG. Moreover, we shed light on an hormetic effect of MG, which like reactive oxygen species, can be beneficial to cancer cells at low doses and become toxic at higher doses. Finally, we evidenced a link between resistance to BRAF inhibition and better management of dicarbonyl stress in melanoma cells. MG influence on tumoral process and the possibility of MG stress modulation by MG-scavenger are under current investigation in the Laboratory. These studies could potentially lead to the development of a new therapeutic strategy for cancer.