



# Études des propriétés fonctionnelles et du rôle de la protéine membranaire SLC5A8

Laurent Suissa

## ► To cite this version:

Laurent Suissa. Études des propriétés fonctionnelles et du rôle de la protéine membranaire SLC5A8. Biochimie, Biologie Moléculaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. NNT : 2018AZUR4034 . tel-01907742

**HAL Id: tel-01907742**

<https://theses.hal.science/tel-01907742>

Submitted on 29 Oct 2018

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

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



# THÈSE DE DOCTORAT

**Etudes des propriétés fonctionnelles et du rôle de la protéine membranaire SLC5A8**

**Laurent SUISSA**

Laboratoire TIRO UMRE 4320 - Faculté de Médecine – Nice

Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en Sciences de la vie  
de l'Université Côte d'Azur  
Dirigée par : Pr Jacques DARCOURT  
Soutenue le : 4 juin 2018

Devant le jury, composé de :  
Dr BELGHAZI Maya  
Pr DARCOURT Jacques  
Pr FAIVRE Anthony  
Dr LINDENTHAL Sabine  
Dr MAHAGNE Marie-Hélène  
Pr MOULIN Thierry  
Pr PAQUIS Philippe  
Pr PELLERIN Luc  
Pr THOMAS Pierre



# **Etudes des propriétés fonctionnelles et du rôle de la protéine membranaire SLC5A8**

**Jury :**

**Président du jury**

Pr Philippe PAQUIS, Université Côte d'Azur

**Rapporteurs**

Pr Thierry MOULIN, Université de Franche-Comté

Pr Luc PELLERIN, Université de Lausanne (Suisse)

**Examinateurs**

Dr Maya BELGHAZI, Université d'Aix-Marseille

Pr Jacques DARCOURT, Université Côte d'Azur

Pr Anthony FAIVRE, Université d'Aix-Marseille

Dr Sabine LINDENTHAL, Université Côte d'Azur

Pr Pierre THOMAS, Université Côte d'Azur

**Invité**

Dr Marie-Hélène MAHAGNE, Université Côte d'Azur

## RESUMES

**Titre :** Etudes des propriétés fonctionnelles et du rôle de la protéine membranaire SLC5A8

**Résumé :** Les propriétés fonctionnelles de la protéine membranaire SLC5A8 et son rôle physiologique ont été étudiées *in vitro* et *in vivo* en utilisant des souris slc5a8<sup>-/-</sup>. *In vitro*, des mesures d'accumulation de métabolites par LC-MS sur des cellules HEK transfectées par SLC5A8 ont permis d'étudier ses capacités de transport de monocarboxylates sodium-dépendant (pyruvate mais aussi corps cétoniques). L'étude par analyse métabolomique a permis de montrer que l'uptake de pyruvate médié par SLC5A8 avait pour conséquences, outre l'alimentation énergétique du cycle de Krebs, un effet inhibiteur d'une enzyme glycolytique (GAPDH). Son dérivé halogéné (bromopyruvate), agent anti-tumoral ciblant la GAPDH, génère la même accumulation du substrat de la GAPDH. Nos résultats indiquent que le rôle proposé dans la littérature de suppresseur tumeur de SLC5A8 soit associé à un effet anti-Warburg. *In vivo*, les souris slc5a8<sup>-/-</sup> âgées présentaient un œdème intramyélinique diffus sans démyélinisation témoignant de désordres hydro-ioniques dans l'espace périaxonal par carence énergétique. Si l'expression tubulaire rénale de SLC5A8 a été confirmée, l'expression neuronale ne l'a pas été faisant envisager une origine rénale à la leucoencéphalopathie décrite. Les souris slc5a8<sup>-/-</sup> présentaient une fuite urinaire massive de corps cétoniques à l'origine d'une insuffisance cérébrale en β-hydroxybutyrate. Ce carburant est essentiel pour le cerveau, notamment en cas de dysfonction du métabolisme glucidique, comme l'insulinorésistance démontrée en deuxième partie de vie des souris slc5a8<sup>-/-</sup>. Cette étude illustre le rôle majeur des corps cétoniques en neuroénergétique.

**Mots clés :** SLC5A8, monocarboxylates, corps cétoniques, leucoencéphalopathie, LC-MS, neuroénergétique.

**Title:** Functional Properties and physiological role of the SLC5A8 membrane protein

**Abstract:** The functional properties of the SLC5A8 membrane protein and its physiological role have been studied *in vitro* and *in vivo* using slc5a8<sup>-/-</sup> mice. *In vitro*, analysis of metabolite uptake by LC-MS with slc5a8 transfected HEK cells to study sodium-dependent transport of monocarboxylates, in particular pyruvate but also ketone bodies. Using a metabolomic approach, we showed that SLC5A8-mediated pyruvate uptake fuels the Krebs cycle and has an inhibitory effect on the glycolytic enzyme, GAPDH. Bromopyruvate, the halogen derivative of pyruvate, is a known anti-tumour agent targeting GAPDH and has a similar effect. We propose that the tumour suppressor function reported for SLC5A8 in the literature is associated with an "anti-Warburg" effect. *In vivo*, aged slc5a8<sup>-/-</sup> mice showed diffuse intramyelinic oedema without demyelination. This indicated a hydro-ionic disorder in the periaxonal space due to chronic energy deficiency. While expression of SLC5A8 was confirmed in renal tubular cells, the expression of the protein was not detected in brain suggesting a renal origin of the described leukoencephalopathy. Slc5a8<sup>-/-</sup> mice showed strong urinary loss of ketone bodies leading to cerebral insufficiency of β-hydroxybutyrate. This ketone is an essential energy source for the brain, in particular when carbohydrate metabolism is dysfunctionning, like in the case of insulin resistance that was found in aged slc5a8<sup>-/-</sup> mice. This study highlights the major role of ketone bodies in neuroenergetics.

**Keywords:** SLC5A8, monocarboxylates, ketone bodies, leukoencephalopathy, LC-MS, neuroenergetic.

*A mes grands-parents*

## **REMERCIEMENTS**

### **A Monsieur le Professeur Philippe PAQUIS,**

Je suis très honoré que vous ayez accepté de présider ce jury de thèse de science. Je profite pour remercier le Chef de Pôle des Neurosciences cliniques que vous êtes, pour votre bienveillance à mon égard concernant mes projets hospitalo-universitaires.

### **A Monsieur le Professeur Jacques DARCOURT,**

Recevez toute ma gratitude et ma reconnaissance d'avoir accepté de diriger ce travail. J'ai pris beaucoup de plaisir à évoluer durant ces années dans le laboratoire dans lequel j'ai pu m'enrichir de votre expertise en imagerie nucléaire et de votre raisonnement scientifique. Que cette thèse vous témoigne de mon investissement scientifique et de ma volonté de poursuivre les travaux au laboratoire que vous codirigez.

### **A Monsieur le Professeur Luc PELLERIN,**

Veuillez accepter tous mes sincères remerciements d'avoir accepté de juger ce travail. Votre grande expertise en neurophysiologie et en neuroénergétique a été une source d'inspiration durant ce travail au travers vos publications. Je suis ravi de pouvoir échanger avec vous prochainement sur ces passionnantes sujets.

**A Monsieur le Professeur Thierry MOULIN,**

Votre présence à ce jury m'honore. Merci d'avoir accepté de juger ce travail de thèse dont les conclusions et les perspectives nous amènerons à discuter de projets cliniques en pathologie neurovasculaire. Votre grande expertise et votre notoriété dans cette discipline neurologique honorent, par votre présence dans ce jury, le médecin neurovasculaire que je suis. Soyez également assuré de mon profond respect et de toute ma gratitude sur l'accompagnement de mon projet hospitalo-universitaire.

**A Monsieur le Professeur Pierre THOMAS,**

Je suis tout particulièrement honoré de votre présence dans ce jury. C'est l'occasion pour moi de vous remercier à nouveau de m'avoir permis d'intégrer la famille neurologique, et je vous en suis très reconnaissant. Que ce travail illustre tout mon dévouement et la passion qui m'anime d'exercer en neurologie vasculaire. Votre bienveillance en qualité de Chef de la Neurologie durant toutes ces années a été et reste un atout pour moi. Soyez assuré de mon profond respect.

**A Monsieur le Professeur Anthony FAIVRE,**

Cher Anthony, quelle joie de t'avoir dans ce jury. Ton expertise en neurologie et tes connaissances en neurosciences forcent le respect et enrichissent toujours nos discussions. Je me ravie des différents projets de recherches cliniques et fondamentales discutés au sein de notre nouveau regroupement des unités vasculaires expertes de Saint Anne et de la Timone. Soit assuré, Cher Anthony, de ma plus sincère amitié.

**A Madame le Docteur Maya BELGHAZI,**

Je vous remercie très vivement de votre participation à ce jury. Merci d'avoir si gentiment accepté de juger ce travail et de l'enrichir de votre grande expertise en spectrométrie de masse.

**A Monsieur le Docteur Sabine LINDENTHAL,**

Chère Sabine, reçois mes remerciements les plus sincères pour avoir codirigé ce travail avec beaucoup d'implication et de dévouement durant toutes ces années. Evidemment, j'ai beaucoup appris à tes cotés et j'ai pu profiter de ton enseignement et de ton expertise dans l'expérimentation animale. Soit assurée de ma profonde gratitude.

**A Madame le Docteur Marie-Hélène MAHAGNE,**

Dans tes pas, me voilà à mon tour en position de soutenir ma thèse de science devant toi. Après ton travail sur la phase aigüe et la pénombre ischémique, étonnement ce travail m'amène à discuter de neuroprotection en total adéquation avec l'évolution de notre discipline clinique. Que cette thèse soit le témoignage sincère de mon investissement dans ton service dans lequel je suis fier d'évoluer au quotidien. Si tout cela a été possible, c'est grâce à toi, et parce que tu m'as accordé ta confiance il y a 12 ans et durant toutes ces années. Je te dois aussi de m'avoir enseigné, au-delà de la médecine neuro-vasculaire, un certain nombre de valeurs au cours de nos riches discussions, qui ont fait évoluer ma pratique médicale et mon jugement. Soit assuré Marie-Hélène, de mon immense respect et de ma profonde gratitude.

**A Monsieur le Docteur Thierry POURCHER,**

Cher Thierry, Reçois tous mes remerciements et toute ma gratitude pour m'avoir si bien accueilli au sein du laboratoire TIRO. J'ai été très sensible à ton implication et ton investissement pour réaliser ce travail de thèse. Je te suis très reconnaissant d'avoir donné toute la souplesse nécessaire en réponse à mes contraintes hospitalières. J'ai beaucoup appris de nos discussions qui ont sûrement fait progresser mon raisonnement scientifique. Soit assuré de tous mes remerciements. Considérons que cette thèse n'est qu'une étape.

**A Monsieur GUIGONIS Jean-Marie,**

Cher Jean-Marie, depuis mon Master, tu as été mon Professeur en spectrométrie de masse, me permettant ainsi de rendre ce travail finalisé. Ton expertise et tes compétences dans le domaine ne sont pas discutées. L'élève n'ayant pas dépassé le Maître, l'élève aura toujours besoin du Maître. Merci pour ta gentillesse et ta patience durant ces années, nécessaires pour analyser les centaines d'échantillons préparés. C'est finalement ça la métabolomique, n'est-ce pas ? Soit assuré Jean-Marie de toute mon amitié.

**A Fanny, A Julien,**

A des moments différents de cette thèse, votre travail a été absolument indispensable à la finalisation de nos conclusions. Je voudrai souligner votre indéfectible gentillesse, patience et votre bienveillance à mon égard. Soyez assurés, tous les deux, de toute ma reconnaissance pour votre aide et de mon amitié.

**A Lun et Maha,**

Je vous souhaite tout le succès professionnel que vous méritez. Bonne continuation à toutes les deux.

**A Lisa,**

Chère Lisa, même si nous n'avons pas directement travaillé ensemble au laboratoire, j'ai au moins appris de toi, et de nos discussions, le langage émoticône ☺ ☺ ☺..... Je te souhaite tout le succès professionnel que tu mérites tellement.....en espérant qu'un jour nous collaborerons ensemble sur un projet!!! Que notre amitié dure le plus longtemps possible.....Vive la Martinique !!! :-))))))

**A tous les membres du laboratoire TIRO** avec qui les échanges durant ces dernières années n'a fait qu'enrichir ma culture scientifique. Mention spéciale à Colette pour son aide logistique.

**A la STROKE TEAM NICOISE,** et particulièrement Gwendoline et Chiara avec qui je suis très fier de travailler tous les jours.....

**A tous mes collègues hospitaliers** avec qui j'ai plaisir à évoluer chaque jour, et dont certains ont trouvé les mots justes, apaisant et encourageant durant la réalisation de ce travail.

**A mes parents,**

Sans vous, tout ce long et sinueux chemin médical et scientifique aurait été bien difficile à parcourir. Alors, quelques lignes de remerciements ne suffiront pas. Merci pour votre indéfectible soutien dans tout ce que j'ai entrepris malgré le fait qu'il est parfois difficile et obscure de comprendre pourquoi je fais tout ça. Je me pose moi-même la question quelque fois.....Mais je poursuis mon fil, l'avenir nous dira le reste.

**A mon frère et ma sœur,**

Merci Nicolas et Julie pour le soutien sincère que vous accordez à votre grand frère depuis toutes ces années.

**A Christelle, Noah et Thao,**

Ces derniers mots sont pour vous et constituent les remerciements les plus importants à mes yeux. Vous avez vécu de l'intérieur la réalisation de cette thèse de science, et qui mieux que vous en avez mesuré le sacrifice. Merci mille fois d'avoir soutenu courageusement mon entreprise malgré les coups de blues et les moments de doute que je vous ai imposé. C'est justement dans ces moments que j'ai puisé en vous toute l'énergie et la motivation nécessaire.....

## PLAN

<b>Résumés</b>	<b>2</b>
<b>Remerciements</b>	<b>4</b>
<b>Introduction</b>	<b>12</b>
<b>A- Identification de SLC5A8</b>	<b>12</b>
<b>B- SLC5A8, protéine suppresseur de tumeur</b>	<b>15</b>
a. Baisse d'expression de SLC5A8 par méthylation dans les cancers humains	15
b. Hypothèses sur le rôle de tumeur suppresseur	16
i. Suppresseur de tumeurs coliques	17
ii. Suppresseur de tumeurs non coliques	18
iii. SLC5A8 et effet Warburg	21
<b>C- SLC5A8, symporteur Na<sup>+</sup>-dépendant de monocarboxylates</b>	<b>22</b>
a. Substrats de SLC5A8 identifiés	23
b. Comparaison SLC5A8/MCTs (Monocarboxylate Transporters)	27
i. Discrimination de l'effet MCTs/SLC5A8 par le pH	28
ii. Discrimination de l'effet MCTs/SLC5A8 par les inhibiteurs	31
c. Conclusions	35
<b>D- Expression de SLC5A8 chez la souris et rôle physiologique</b>	<b>38</b>
a. Expression dans la thyroïde, les glandes salivaires	38
b. Expression dans le tube digestif	39
c. Expression rénale	41
d. Expression cérébrale et rétinienne	45

<b>E- Objectifs du travail de thèse</b>	<b>50</b>
a. Résumé 1 <sup>er</sup> article	50
b. Résumé 2 <sup>ème</sup> article	51
 <b>Article 1:</b> The tumor suppressor SLC5A8 mediates pyruvate uptake in HEK cells and inhibits glycolysis via a possible “anti-Warburg” effect.	 <b>53</b>
 <b>Article 2:</b> Urinary ketone bodies loss is at the origin of brain white matter degeneration in elderly slc5a8-null mice.	 <b>93</b>
 <b>Conclusions</b>	 <b>134</b>
<b>A- Rôle biologique de SLC5A8 dans les cancers</b>	<b>135</b>
<b>B- Rôle physiologique de SLC5A8</b>	<b>137</b>
<b>C- Perspectives</b>	<b>140</b>
 <b>Références bibliographiques</b>	 <b>143</b>

## **INTRODUCTION**

### **A- Identification de SLC5A8**

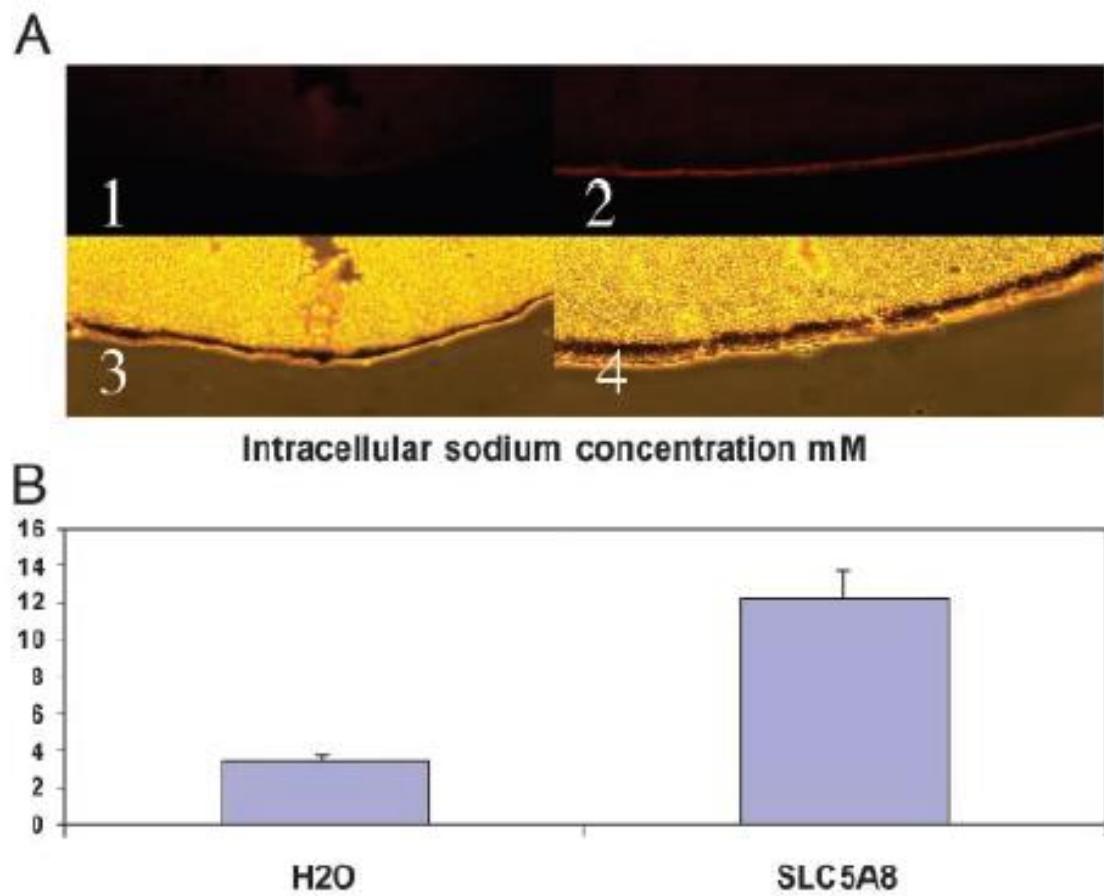
En 2002, le laboratoire TIRO, équipe particulièrement impliquée dans l'étude du métabolisme de l'iode, a identifié SLC5A8 chez l'homme (1). SLC5A8 a été caractérisée comme participant potentiellement au transport passif d'iode. Elle a été nommée hAIT (human Apical Iodide Transporter) à la membrane apicale du thyrocyte (glande thyroïde). L'identification de SLC5A8 est fondée sur une stratégie de clonage PCR basée sur l'homologie des séquences du transporteur basal de l'iode sodium-dépendant NIS (Na Iodide Symporter; SLC5A5). SLC5A8 est localisée sur le chromosome 12q23 et présente avec NIS une importante homologie avec 46% d'identité (74% de similarité) (**Figure 1**). Elle a été classée dans la famille 5 des SLC (Solute Linked Carrier) par son homologie au transporteur NIS (SLC5A5) et les autres membres de cette famille. Elle portera très brièvement le nom de SLC5A11 et sera définitivement nommée par Li et al. SLC5A8 (2,3).

hAIT	MDTPRGIGT <b>F</b> VVWDYVVFAGMLVISAAIGIYYAFAGGG
hNIS	MEAVETGERP--GA---G---L--LV-TG--LWGL-R--
hAIT	<b>PKC</b> QQT SKDFLMGGRRMTAVPVALSLTASFMSAVTVLGT PSEV
hNIS	-RSAE--FT----LA-L-G---S-----Q---V---A
hAIT	YRFGAI <b>F</b> SIFAFTYFFVVVVISAEVFPLPVFYKLGITSTYEY
hNIS	--Y-LK-LWMCLGQLLNS-LT-LL-M---R--L-----
hAIT	LELRFNKCVRLCGT <b>V</b> LFIIVQTILYTGIVIYAPALALNQVT
hNIS	--M---SRA-----LQY-A-M-----I-----
hAIT	<b>GFD</b> LWGAVVATGVVCTFYCTLGGLKAVIWTDVFQVGIMVA
hNIS	-L-I-ASLLS-II----TAV--M---V-----VV-LS
hAIT	<b>GF</b> ASVIIQAVVMQGGISTI LNDAYDGGRLNFWN FN PN PLQ
hNIS	--WV-LARG-MLV--PRQV-TL-QNHS-I-LMD---D-RS
hAIT	<b>PKC</b> RHT FWT IIIIGGTFTWTSIYGVNQS QVRYISCKSRFQAKL
hNIS	-Y----FVV---LV-L-M---A---VA-RTEK----
hAIT	SLYINL <b>V</b> GLWAILTC SVFCGLALYSRYHDCDPWTAKVSA
hNIS	A-L---Q---FL-VSSAAC--IVMFVF-T----LLL GRI--
hAIT	PDQLMPYL VLDILQDY PGLPGLFVACAYSGTLSTVSSIN
hNIS	--Y---L-----FE-L--V---L-----A-T---
hAIT	<b>PKC</b> ALAAVTVEDLIK PYFRS LSERSL SWI S QGMSV VY GALCIG
hNIS	-M-----RL---APRK-VI--K-L-LI--SA-LT
hAIT	<b>MAA</b> LASLMG ALLQAALS VFGMVGGPLMGLF ALGIL VPFA
hNIS	V---S---L-GGV--GSFT-M-VIS---L-A-I--MFL-AC
hAIT	NSIGALVGLMAGFAISLWVGIGAQIYPPPLPERTLPLHLDI
hNIS	-TP-V-A---G---L-L---AL---TL---SEQTMRV-PSSA
hAIT	<b>GLY</b> QGCNS TYN ETNLIT TTEMPFTTSV FQIYN V QRTPLM
hNIS	AR-VALSV-ASG-LDP ALL-AND-SRAPSSGM DAS-PA-A
hAIT	DNW <b>Y</b> SLSYLYFSTVGT LVTLLVGILVSLSTGGRKQ NLD P
hNIS	-SF-AI----YGAL---T-V-C-A-I-CL--PT-RSTLA-
hAIT	<b>Pk tye</b> RYILT KEDFLSNFDI FK KKKHVLS YKSH PVE
hNIS	<b>PKC</b> G-LWW-LAR QTASVAP-E EVA ILDDNL-KGPEELPT-N
hAIT	<b>PKC</b> TDNP A FN HIELN SDQSGKS
hNIS	KKP-G-LPTN EDRLFFLGQK--EGAGSWTPCVGH-GGRDQ
hAIT	NGTRL
hNIS	QE-N-

**Figure 1 : Comparaison de l'alignement des acides aminés dans les protéines hAIT (hSLC5A8) et hNIS d'après Rodriguez et al. (1).**

En 2003, Li et ses collaborateurs ont proposé que SLC5A8 soit un suppresseur de tumeurs dans les cancers du côlon sur la base de la perte d'expression du gène par des mécanismes de méthylation et de l'effet antiprolifératif de son expression dans les cellules en culture (3). Cette même équipe a montré par immunofluorescence une accumulation sodique dans les ovocytes

de xénope exprimant la protéine. Sur la base d'études électrophysiologiques sur l'ovocyte de xénope (*Xenopus laevis*), les auteurs envisagent que la protéine soit responsable d'une entrée sodique évoquant la possibilité d'un transport couplé au sodium (**Figure 2**). Considérant cette dernière donnée et l'homologie au transporteur NIS (SLC5A5), son appartenance à la famille des transporteurs Na/Solutés (SLC5) fût établie.



**Figure 2 : Accumulation de sodium intracellulaire dans les ovocytes de xénopes exprimant SLC5A8 (injection intra-ovocytaire de cRNA SLC5A8) d'après Li et al. (3).** La mesure du sodium intracellulaire est appréhendée par immunofluorescence (A) dans les ovocytes contrôles (A1) et dans les ovocytes exprimant SLC5A8 (A2). A3 et A4 correspondent à l'imagerie en phase respective. Mesure du sodium intracellulaire par électrodes à sodium (B).

Les études suivantes sur SLC5A8 vont étayer l'hypothèse d'un symporteur sodium-dépendant et identifier ses substrats. D'autres études vont conforter le rôle de suppresseur de tumeur de SLC5A8 en pathologie humaine.

## **B- SLC5A8, protéine suppresseur de tumeur**

### **a. Baisse d'expression de SLC5A8 par méthylation dans les cancers humains**

En 2003, l'étude princeps de Li et al. a identifié pour la première fois SLC5A8 comme suppresseur de tumeur (3). Il a été mis en évidence que les cellules épithéliales coliques humaines normales ne présentaient pas de méthylation de l'exon 1 du gène slc5a8, le transcrit de la protéine était exprimé. En revanche, la plupart des lignées de cellules coliques cancéreuses ou tumeurs coliques primitives testées présente une méthylation aberrante de ce même exon. La protéine SLC5A8 est moins exprimée, mais peut l'être à nouveau en utilisant une drogue de dé-méthylation (5-azacytidine). Paroder et al. vont qualifier l'expression de SLC5A8 dans le cancer colique comme marqueur pronostique. Dans une étude clinique, l'expression de SLC5A8 est corrélée à la survie des patients (4).

Par la suite, le silençage de slc5a8 a été confirmé pour le cancer colique mais a également été démontré dans d'autres cancers non coliques (5–23). Ueno et al. font la preuve d'une méthylation aberrante et d'un silençage de SLC5A8 dans le cancer de l'estomac (6). Hu et al. corrèlent l'expression de SLC5A8 avec l'espérance de vie des patients atteints d'un hépatocarcinome (14). Hong et al. font la même observation concernant des tumeurs cérébrales gliales (astrocytomes et oligodendrogiomes). Ils retrouvent l'effet antiprolifératifs *in vitro* par transfection de slc5a8 sur des lignées cellulaires de gliomes (7). Le cancer thyroïdien différencié papillaire, tumeur maligne épithéliale, fait également l'objet d'un silençage de SLC5A8

confirmé par d'autres équipes (8,10,17). Certains vont identifier dans le cancer de la prostate une down régulation de slc5a8 par hyper-méthylation suggérant l'utilisation de l'expression de SLC5A8 comme biomarqueur diagnostique et pronostique (9,20). Park et al. vont décrire des mécanismes de méthylation et de silençage de SLC5A8 pour les cancers du pancréas et du poumon (11,12). La perte de l'expression de SLC5A8 est associée à un mauvais pronostic de l'adenocarcinome ductale pancréatique (18). Concernant le cancer pulmonaire non à petites cellules, Guo et al. proposent un test diagnostic basé sur la bonne valeur prédictive de la méthylation de plusieurs gènes incluant slc5a8 (13). L'hyperméthylation est considérée par Ikeda et al. comme un facteur de mauvais pronostic de l'adénocarcinome pulmonaire (16). Le rôle de SLC5A8 est également discuté dans le cancer du sein ou encore dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (21,23). Enfin, hyperméthylation et silençage de SLC5A8 ont également été incriminés dans des cancers hématologiques comme la leucémie myéloïde aigue (22). SLC5A8 n'est pas exprimée dans toutes les cellules citées et son rôle propre de tumeur suppresseur n'est en conséquence pas envisagé ici. La méthylation de son gène codant témoigne d'avantage d'une méthylation globale de l'ADN dans ces cellules tumorales.

### **b. Hypothèses sur le rôle de tumeur suppresseur**

L'hyperméthylation à l'origine du silençage de SLC5A8 est associée à de nombreux cancers solides et liquides comme cela a été décrit plus haut. Ces observations ont pour le moment été à l'origine, en clinique, du développement d'outils diagnostiques et pronostiques. Dans l'étude de Li et ses collaborateurs, un effet antiprolifératif de SLC5A8 est mis en évidence *in vitro* sur des lignées de cellules cancéreuses coliques. La transfection de SLC5A8, dans ces cellules où la protéine n'est pas exprimée par une méthylation aberrante, bloque la prolifération cellulaire (3). Li et ses collaborateurs ont donc proposé que SLC5A8 soit un suppresseur de tumeur dans

le cancer du colon. La protéine exprimée dans les cellules normales inhibe la prolifération cellulaire. Si son expression est diminuée par méthylation de son gène codant, cette inhibition de la prolifération est levée et la cellule transformée peut former une tumeur. A la suite de cette publication, plusieurs équipes ont étudié le rôle potentiel de SLC5A8 comme suppresseur de tumeur. Toutefois, les mécanismes sous-jacents proposés à ce jour dans la littérature restent très spéculatifs.

### **i. Suppresseur de tumeurs coliques**

La principale hypothèse sur les mécanismes du rôle suppresseur de tumeur est émise en adéquation avec la mise en évidence de la fonction de transport de SLC5A8. L'équipe de Ganapathy a mis en évidence que SLC5A8 catalyse un transport de monocarboxylates et notamment de butyrate. Les auteurs proposent alors que l'uptake de butyrate, inhibiteurs connus des histones désacétylase (HDAC), sous-tendraient la fonction tumeur suppresseur de SLC5A8 dans les tumeurs coliques (24–28).

Après les travaux de Li et al. montrant son rôle de suppresseur de tumeur colique, SLC5A8 a rapidement été caractérisée comme un symporteur sodium dépendant d'acide gras à chaînes courtes (AGCC) incluant le butyrate. Au niveau du colon, ces acides gras seraient produits dans la lumière colique par la flore digestive à partir de fibres et de carbohydrates non absorbés. Ces acides gras à chaîne courte sont connus pour être absorbés par les cellules épithéliales coliques pour leurs propres besoins énergétiques. L'équipement enzymatique de ces cellules permet leur intégration au cycle de Krebs pour la production d'énergie. Des études existaient pour montrer que les acides gras à chaînes courtes coliques avaient le potentiel de réduire l'incidence du cancer colique (29–31). Certains auteurs ont proposé que les mécanismes de la fonction

suppresseur de tumeur colique de ces acides gras incluraient l'inhibition des histones désacétylases (HDAC), l'induction de l'apoptose, la modulation de l'expression de gènes ou encore l'arrêt du cycle cellulaire (32–36). Parmi les acides gras à chaînes courtes, le butyrate est particulièrement incriminé dans ce rôle de suppresseur de tumeurs coliques par sa forte inhibition sur les histones désacétylases (HDAC) (24–27).

Une cellule cancéreuse est caractérisée par une croissance incontrôlée, une perte de différenciation et une perte de contrôle du cycle cellulaire. Les anomalies dans l'expression ou la répression de gènes à l'origine de ces anomalies sont en partie liées à des modifications épigénétiques comme la modification post-traductionnelle des histones. Les histones peuvent être modifiées par méthylation ou acétylation modifiant ainsi la compaction de l'ADN autour duquel il est enroulé. L'état de compaction de l'ADN modifie l'interaction avec les protéines régulatrices de la transcription. Ces changements épigénétiques sont considérés aujourd'hui comme une marque des cancers (37).

Des expériences *in vitro* ont été réalisées par l'équipe de Ganapathy sur des cellules coliques épithéliales et sur des cellules coliques malignes. Les premières expriment SLC5A8 alors que les cellules malignes présentent un silençage de la protéine par hyperméthylation. Seule la condition associant butyrate dans le milieu de culture et transfection de SLC5A8 dans les cellules malignes génère une apoptose massive confortant ainsi l'hypothèse de cette équipe (24). Cette même équipe a réalisé plus récemment une étude *in vivo* sur souris transgéniques slc5a8<sup>-/-</sup> renforçant le lien entre symporteur, butyrate et rôle de suppresseur de tumeur colique (38). Il sera démontré que la présence de SLC5A8 est nécessaire pour protéger d'une inflammation colique induite ou du cancer du côlon uniquement sous régime alimentaire pauvre en fibre (et non en régime normal). Les fibres sont à l'origine de la production d'acides gras à chaîne courte incluant le butyrate produit par la flore bactérienne colique. Pour expliquer ce résultat lié au régime alimentaire des souris, les auteurs ont rappelé l'équipement membranaire

en transporteurs de butyrate et leurs caractéristiques. Les auteurs proposent que SLC5A8 soit un transporteur de haute affinité ( $K_m < 100 \mu M$ )/faible capacité à l'inverse des MCTs également présents à la membrane apicale du colonocyte. A haute concentration (régime riche en fibre), le butyrate produit diffuse au travers de la membrane apicale ou est absorbé par les MCTs, transporteur à faible affinité/forte capacité. Dans ces conditions, SLC5A8 serait dispensable. Inversement lorsque la diète est appauvrie en fibre, SLC5A8 deviendrait obligatoire pour l'uptake intracellulaire de butyrate.

## **ii. Suppresseur de tumeurs non-coliques**

Si cette hypothèse a permis d'envisager des mécanismes du rôle suppresseur de tumeur colique de SLC5A8, l'implication des acides gras et notamment du butyrate, n'a pas permis d'emblée d'extrapoler ce mécanisme à des tumeurs non coliques non exposées à ces mêmes substrats. En effet, parmi les substrats de SLC5A8 envisagés, les acides gras à chaîne courte incluant le butyrate ne se rencontrent qu'au contact de l'épithélium colique, dans la lumière digestive où ils sont produits par la flore bactérienne par dégradation de fibres et autres carbohydrates non digérés. On rappelle qu'initialement Li et al. avaient observés le rôle de suppresseur de tumeur de SLC5A8 par transfection de la protéine sur des cellules coliques cancéreuses (3). Les substrats de SLC5A8 n'étaient pas connus à l'époque. A posteriori, il n'y avait pas de butyrate dans le milieu de culture. Malgré cela, l'effet antiprolifératif et l'entrée de sodium médiée par SLC5A8 avaient été décrits, discordant ainsi avec l'hypothèse de Ganapathy et al. discutée plus haut (24,25). Ganapathy et al., conservant leur hypothèse initiale, ont envisagé qu'un autre substrat puisse être à l'origine de l'effet antiprolifératif. Ce substrat devrait être présent dans le milieu de culture mais aussi dans le sang pour répondre à l'effet suppresseur de tumeur des tumeurs non coliques. Thangaraju et al. vont proposer une étude pour identifier le

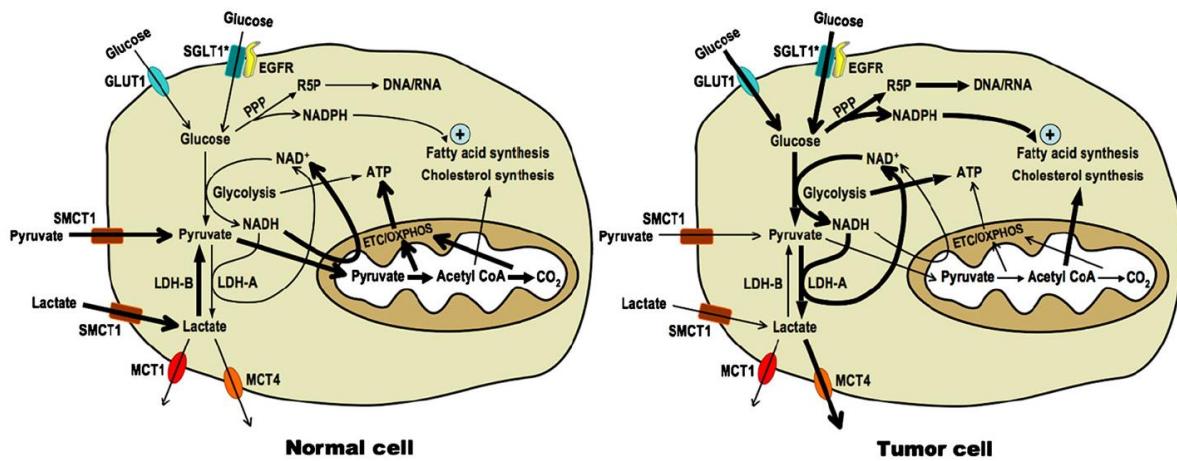
« mystérieux » substrat (28). Pour le déterminer, ils utilisent une lignée de cellules cancéreuses du sein (MCF7) n'exprimant pas SLC5A8 par silençage. Ils font le constat que la transfection de SLC5A8 conduit inéluctablement à l'apoptose de ces cellules confortant ainsi leur idée de la présence du substrat dans le milieu. Ils soupçonnent le pyruvate, monocarboxylate substrat de SLC5A8, d'être à l'origine de cet effet. Quand ce dernier n'est pas ajouté à la culture, Thangarahu et al. génèrent une lignée stable de cellules MCF7 transfectées par SLC5A8. Il est également montré que le pyruvate a la faculté d'être un inhibiteur des HDACs aussi puissant que le butyrate (28). Le pyruvate présente une forte affinité au transport par SLC5A8 ( $K_m$   $387\pm43 \mu M$ ) (39). Ainsi, Ganapathy et al. considèrent que l'effet antiprolifératif médié par SLC5A8 réside dans le transport de substrats inhibiteurs d'HDACs (24,38,40).

Cette hypothèse semble être cohérente avec les spécificités du métabolisme énergétique d'une cellule cancéreuse. On sait depuis longtemps que la cellule cancéreuse est souvent associée avec une diminution de la capacité d'oxydation mitochondriale par différents mécanismes (41,42). L'ATP est alors produite par la glycolyse cytoplasmique dont le flux est majoré dans la cellule cancéreuse. Le produit final est le pyruvate rapidement métabolisé en L-lactate. Cette capacité à inhiber la phosphorylation oxydative et à majorer le flux glycolytique est une marque des cellules cancéreuses portant le nom de celui qui l'a mis en évidence en premier, Otto Warburg dans les années 30 (43). Pour Ganapathy et ses collaborateurs, en l'absence de SLC5A8, le pyruvate ne s'accumule pas dans la cellule cancéreuse. Il n'est donc pas préjudiciable pour cette dernière. De plus, la grande production de son métabolite, le L-lactate n'est pas préjudiciable non plus car le lactate n'a pas la propriété du pyruvate d'inhiber les HDACs (24,40).

### **iii. SLC5A8 et effet Warburg**

Les liens unissant l'effet antiprolifératif de SLC5A8 et le métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse ont paradoxalement été peu étudiés malgré le fait que la plupart des substrats de SLC5A8 soient des métabolites énergétiques. Les hypothèses émises ont particulièrement focalisées le rôle inhibiteur des HDACs du butyrate et du pyruvate incriminés respectivement dans l'effet suppresseur des tumeurs coliques et non coliques (24,25,38,40). Depuis les années 30, Otto Warburg a décrit les modifications caractéristiques du métabolisme énergétique des cellules énergétiques (43). L'inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale, caractéristique décrite par Warburg dans la cellule cancéreuse, a pour conséquence une majoration importante du flux glycolytiques pour la production d'ATP. Cette propriété est d'ailleurs utilisée en médecine pour le diagnostic et la surveillance tumorale en imagerie PET <sup>18</sup>Fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG). On estime que le flux glycolytique, peu rentable en production d'ATP (2 ATP/glucose) comparé à la phosphorylation oxydative (36 ATP/glucose), est majoré d'environ 30 fois par rapport à une cellule normale. Le NAD<sup>+</sup> (NAD oxydé), cofacteur nécessaire à la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, enzyme glycolytique, est maintenu par la transformation du pyruvate en lactate produisant du NAD<sup>+</sup> car la production de NAD<sup>+</sup> par oxydation du NADH n'est plus assurée par la chaîne mitochondriale. La réaction de transformation du pyruvate en L-lactate est médiée par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) A. La forme B catalyse préférentiellement la réaction inverse. Dans les cellules cancéreuses la forme B de la LDH est peu exprimée par silençage favorisant ainsi la production de lactate et de NAD<sup>+</sup> (44–50). L'élimination cellulaire de la grande production de lactate, à la hauteur de la majoration du flux glycolytique, doit être assurée pour éviter l'acidification de la cellule et son apoptose. La surexpression de MCT4 dans les cellules tumorales, transporteur de lactate de faible affinité, pourrait être en rapport avec la fonction d'efflux nécessaire à la survie

de la cellule tumorale (51,52). Le silençage de SLC5A8 dans les cellules tumorales, discuté précédemment, pourrait être en adéquation avec le métabolisme tumoral non enclin à une captation active de lactate intracellulaire (**Figure 3**).



**Figure 3:** Métabolisme énergétique d'une cellule normale comparée à une cellule tumorale d'après Ganapathy et al. (40).

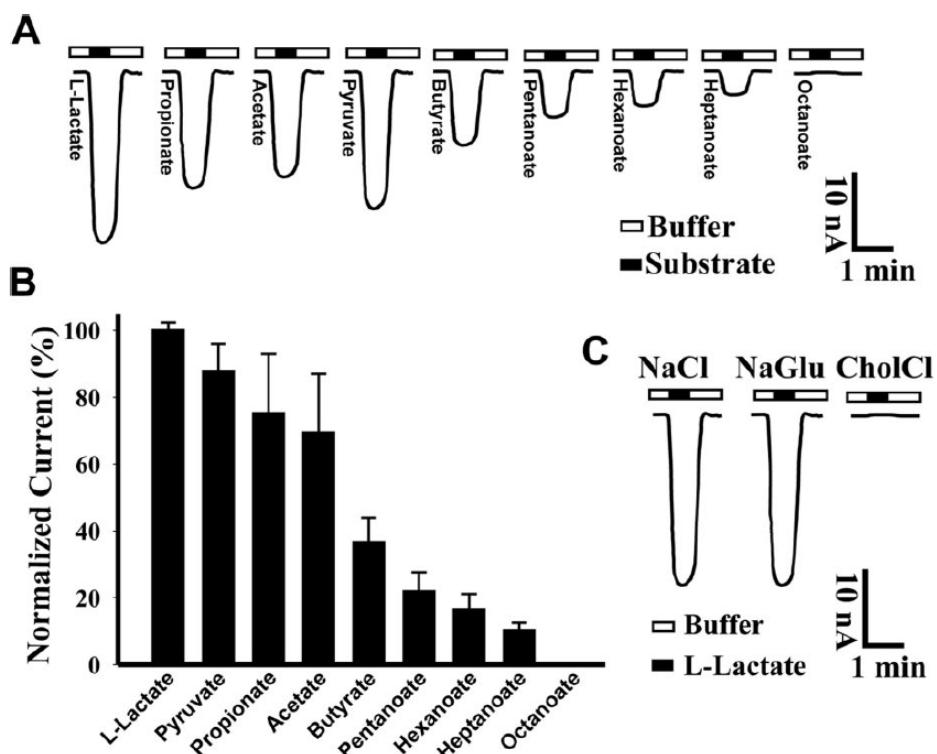
### C- SLC5A8, symporteur Na<sup>+</sup>-dépendant de monocarboxylates

L'hypothèse d'un symporteur Na/Solutés, valant à la protéine sa classification SLC5, a été basée d'une part sur l'homologie de cette protéine aux transporteurs de cette famille, notamment hNIS (SLC5A5) et d'autre part sur des données électrophysiologiques montrant un uptake de sodium dans l'ovocyte de xénope exprimant SLC5A8 (cRNA) (3,24,53).

### a. Substrats de SLC5A8 identifiés

Les premiers substrats du symporteur Na/Solutés ont été identifiés par Miyauchi et al. dans les suites de l'identification du rôle de suppresseur de tumeur colique de SLC5A8 (54). Les acides gras à chaîne courte et autres monocarboxylates (acide acétique, acide propionique et acide butyrique) ont initialement été incriminés comme substrats possible de SLC5A8. Les acides gras à chaîne courte sont les produits de dégradation finale par fermentation des bactéries coliques à partir des fibres et autres carbohydrates non absorbés. Les cellules épithéliales coliques les réabsorbent pour leur propre fin énergétique (55). Il a été démontré que ces mêmes acides gras à chaîne courte prévenaient la prolifération des cellules coliques et réduisaient l'incidence des cancers coliques par différents mécanismes développés plus haut (29). Ainsi l'expression épithéliale apicale abondante de SLC5A8 et son rôle suppresseur de tumeur a fait discuter la possibilité d'un transport d'acide gras à chaîne courte par la protéine. Outre les acides gras à chaîne courte, les monocarboxylates (pyruvate et L-lactate) ont été testés. Des uptakes radioactifs montrent une accumulation d'acetate ( $\times 1,8$ ), de butyrate ( $\times 4,0$ ), de propionate ( $\times 15,9$ ), de L-lactate ( $\times 44,7$ ) et de pyruvate ( $\times 17,4$ ) dans les ovocytes de xénophage (*Xenopus laevis*) exprimant hSLC5A8 (après injection de cRNA) uniquement en présence de sodium (54). Les études électrophysiologiques en voltage clamp montrent que seuls les ovocytes de xénophage exprimant hSLC5A8 induisent des courants sodiques uniquement en présence des substrats cités. L'intensité des courants générés varie en fonction des substrats. Pour les acides gras à chaînes courtes, seuls les acides gras de 2 à 5 carbones génèrent un courant substantiel. L'affinité des substrats est définie par le calcul du Km: acide butyrique ( $81 \pm 17 \mu\text{M}$ ) > acide propionique ( $127 \pm 14 \mu\text{M}$ ) > Acide lactique (L) ( $235 \pm 24 \mu\text{M}$ ) > acide acétique ( $2460 \mu\text{M}$ ). Le transport est qualifié d'électrogénique avec une stœchiométrie variable en fonction du substrat (acide propionique 4:1, L-lactate 2:1) (54).

Gopal et ses collaborateurs étudient pour la première fois la protéine de souris mSLC5A8 dans une lignée de cellules de mammifères (HRPE) après transfection transitoire (cDNA) ainsi que dans l'ovocyte de xénope (cRNA) (56). Cette étude confirme l'uptake d'acides gras à chaîne courte (jusqu'à C7) et autres monocarboxylates (Pyruvate, L-lactate). Les courants sodiques induits ont les mêmes caractéristiques que pour hSLC5A8. Les intensités varient en fonction du substrat. Les courants sodiques induits par les acides gras à chaîne courte ont une intensité inversement corrélée au nombre de carbone. L'octanoate (C8) ne génère plus aucun courant dans l'ovocyte exprimant mSLC5A8 (**Figure 4**). Les stœchiométries calculées pour le propionate (4:1) et le L-Lactate (2:1) diffèrent mais sont similaires à celles publiées pour hSLC5A8 (54).



**Figure 4 : Courants sodiques induits par hSLC5A8 exprimée dans l'ovocyte de xénope en électrophysiologie d'après Gopal et al. (56). Les courants dépendent du substrat (A et B) et de la présence de sodium dans le milieu (C).**

Il a été noté que l'uptake radioactif de monocarboxylates mesuré est relativement modeste dans le modèle de cellules transfectées (cDNA) contrastant avec celui enregistré dans les ovocytes de xénope exprimant mSLC5A8 souris.

Carboxylate substrate	Uptake		Increase %
	pSPORT1	slc5a8	
	<i>nmol/10<sup>6</sup> cells/20 min</i>		
L-Lactate (50 μM)	0.77 ± 0.05	1.18 ± 0.04 <sup>a</sup>	53
D-Lactate (20 μM)	0.19 ± 0.01	0.33 ± 0.02 <sup>a</sup>	74
Pyruvate (50 μM)	0.65 ± 0.02	0.89 ± 0.05 <sup>a</sup>	37
Acetate (50 μM)	0.45 ± 0.02	0.76 ± 0.06 <sup>a</sup>	69
Propionate (50 μM)	0.57 ± 0.03	0.79 ± 0.04 <sup>a</sup>	39
Butyrate (50 μM)	1.66 ± 0.09	1.99 ± 0.04 <sup>a</sup>	20
Pentanoate (500 μM)	3.93 ± 0.12	4.93 ± 0.22 <sup>a</sup>	26
Hexanoate (400 μM)	2.53 ± 0.05	3.11 ± 0.11 <sup>a</sup>	23
Succinate (50 μM)	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02	9
Citrate (50 μM)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0

<sup>a</sup> p < 0.05.

**Figure 5 : Uptake de différents monocarboxylates dans des cellules mammifères (HRPE) transfectées par SLC5A8 (cDNA) d'après Gopal et al. (56).**

Cette étude permet de conclure également à la similitude des substrats pour mSLC5A8 et hSLC5A8. Les études suivantes viendront conforter ce résultat (24,56,57). Par analogie aux substrats des MCTs, d'autres substrats comme le nicotinate (Niacin, Vitamine B3) ont été envisagés comme potentiel substrat de SLC5A8 (58,59). Gopal et al. démontrent en 2005 que l'acide nicotinique est un substrat de mSLC5A8 par uptake radioactif dans un système cellulaire HRPE transfecté (cDNA) et dans des ovocytes de xénope exprimant mSLC5A8 souris (après injection de cRNA) (57,60). L'étude électrophysiologique en patch clamp démontre l'induction de courants sodiques par le nicotinate dans les ovocytes exprimant SLC5A8. La stoechiométrie de ce substrat par SLC5A8 (Na+/nicotinate) est 2:1 et de 1:1 par MCT1 (H+/nicotinate). D'autres équipes complètent la liste des substrats de SLC5A8 par les corps cétoniques incluant l'acide acéto-acétique, l'acide β-hydroxybutyrique, l'acide α-kétoisocaproïque, un céto-acide

dérivé d'acide aminé branché (Leucine) (4,39). Miyauchi et al. font également la preuve d'un transport actif par SLC5A8 pour le pyroglutamate (5-oxoproline, pyrrolidone carboxylate) un intermédiaire du cycle  $\gamma$ -glutamyl associé au métabolisme du glutathion (61). Des substrats exogènes ont également fait la preuve d'un transport par SLC5A8: benzoate, salicylate, 5-aminosalicylate et le  $\gamma$ -hydroxybutyrate (24,60,62). Les différentes affinités (Km) des substrats de SLC5A8 induisant un courant sodique dans l'ovocyte de xénophage exprimant SLC5A8 (humain) sont reportés dans la table 1 (24).

Monocarboxylates	Km ( $\mu$ M)
<b>Acetate</b>	2460 $\pm$ 890 (54)
<b>Propionate</b>	127 $\pm$ 14 (54), 128 $\pm$ 4 (53), 162 $\pm$ 26 (4)
<b>Butyrate</b>	72 $\pm$ 8 (53), 81 $\pm$ 17 (54)
<b>L-Lactate</b>	159 $\pm$ 24 (53), 184 $\pm$ 8 (39), 235 $\pm$ 24 (54)
<b>D-Lactate</b>	742 $\pm$ 330 (54), 1088 $\pm$ 68 (39)
<b>Pyruvate</b>	387 $\pm$ 43 (39)
<b>Nicotinate</b>	230 $\pm$ 16 (60), 390 $\pm$ 36 (4)
<b>Acetoacetate</b>	213 $\pm$ 39 (39)
<b><math>\beta</math>-D-Hydroxybutyrate</b>	1442 $\pm$ 124 (39)
<b><math>\beta</math>-L-Hydroxybutyrate</b>	2327 $\pm$ 169 (39)
<b><math>\gamma</math>-Hydroxybutyrate</b>	1620 $\pm$ 86 (24)
<b><math>\alpha</math>-Ketoisocaproate</b>	209 $\pm$ 27 (39)
<b>Benzoate</b>	1100 $\pm$ 200 (60)
<b>Salicylate</b>	1500 $\pm$ 100 (60)
<b>5-Aminosalicylate</b>	6500 $\pm$ 1000 (60)

**Table 1: Différentes affinités des substrats de SLC5A8 induisant un courant sodique dans l'ovocyte de xénophage exprimant SLC5A8 humain (cRNA) d'après Ganapathy et al. (24).**

## b. Comparaison SLC5A8/MCTs (Monocarboxylate Transporters)

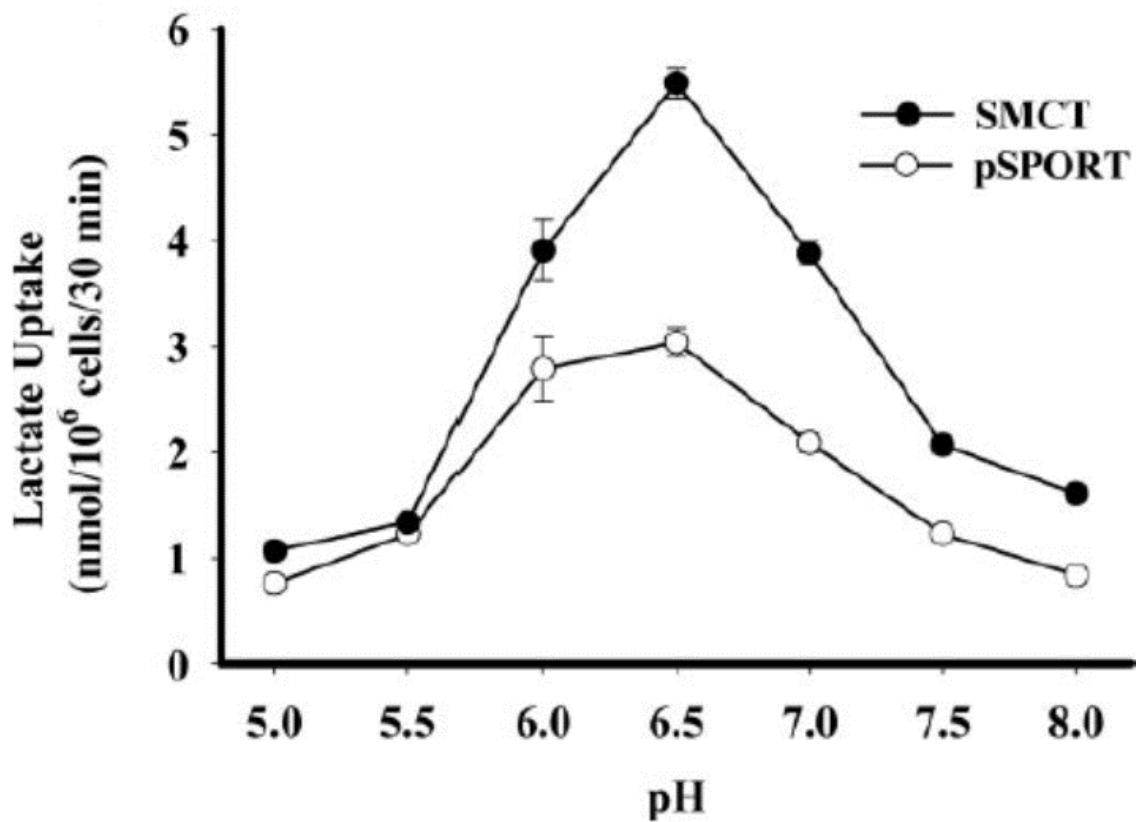
Les MCTs (Monocarboxylate Transporters) sont des transporteurs de monocarboxylates largement exprimés dans les cellules de mammifères dont les caractéristiques fonctionnelles ont largement été étudiées (63–65). Les substrats candidats à un transport par SLC5A8 étant les mêmes que ceux connus pour les MCTs (Monocarboxylate Transporter), l'appellation SMCT1 (Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1) a même été proposée par certains auteurs (54,56,63,64). Cependant, il existe un certain nombre de différences entre ces deux types de transporteurs. Malgré la similitude des substrats, MCTs et SMCT1 ne partagent pas d'homologie et appartiennent à des familles différentes SLC16 et SLC5 respectivement. Leurs appellations soulignent leur différence de force motrice qui est protonique pour les MCTs et sodique pour SMCT1 (SLC5A8). Les MCTs sont responsables d'un transport électroneutre avec une stœchiométrie H+/Monocarboxylate de 1:1 tandis que SLC5A8 transporte les mêmes substrats par un mécanisme électrogénique avec une stœchiométrie variable en fonction du substrat (acide propionique 4:1, L-lactate 2:1) (54,56). Il existe également des différences en termes d'expression discutées plus bas.

Les MCTs et SLC5A8 présentent des substrats identiques. Du fait d'une expression ubiquitaire de MCT dans la plupart des cellules de mammifères, l'étude isolée de l'effet de SLC5A8 est en fait rendue difficile. Ainsi, la question de la modulation du transport par les MCTs ou SLC5A8 est déterminante pour statuer sur l'effet propre de ces transporteurs. Ce point n'a pas toujours été pleinement considéré dans la littérature.

### i. Discrimination de l'effet MCTs/SLC5A8 par le pH

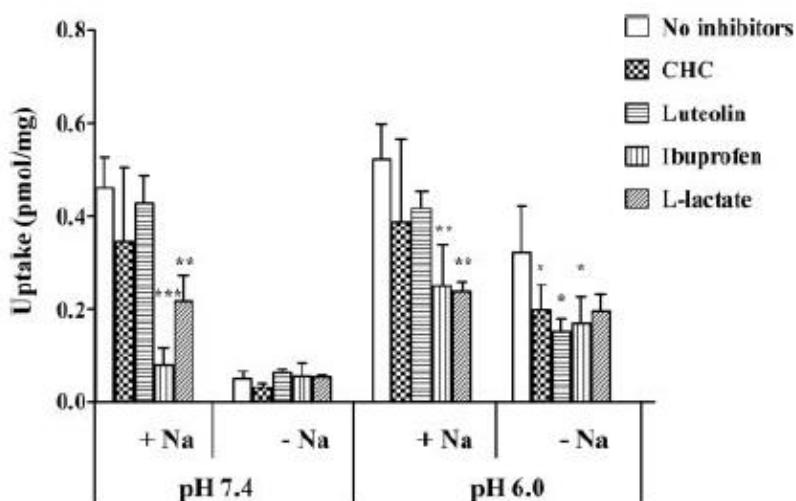
Les MCTs ont pour force motrice le gradient protonique entre le milieu extra- et intracellulaire (63–65). La modulation du pH extracellulaire est donc un moyen simple de moduler de l'uptake des monocarboxylates par ce type de transporteur. Ainsi, l'acidification du milieu extérieur est susceptible d'activer la fonction transport de monocarboxylate des MCTs. Gopal et al. vont étudier l'impact du pH extracellulaire sur l'uptake radioactif et sur les courants induits par les substrats identifiés de SLC5A8 (56). De manière intéressante, il va être noté que le pH influence l'uptake radioactif uniquement dans le modèle de cellules transfectées HPRE et non dans l'ovocyte de xénope. L'acidification du milieu extracellulaire ( $\text{pH}=6,5$ ) semble optimiser l'uptake de pyruvate et L-lactate dans les cellules HPRE transfectées (**Figure 6**). Cette influence du pH n'affecte ni l'uptake, ni les courants sodiques induits dans l'ovocyte de xénope exprimant SLC5A8. Ceci élimine l'hypothèse d'une force motrice supplémentaire proton-dépendant. L'importance de la forme ionisée du lactate en milieu extracellulaire acide est également discutée. Cependant, le  $\text{pKa}$  du lactate étant de 3,8, dans la fenêtre de pH de 6,5-7,5 plus de 99% du lactate est sous forme ionisée. Parce que le pH acide extracellulaire devrait diminuer plutôt qu'augmenter la concentration de la forme ionisée, ces résultats ne peuvent pas être expliqués par des changements de la concentration de la forme transportable du lactate dépendante du pH pour SLC5A8. Des hypothèses ont été avancées par les auteurs pour expliquer ces différences avec notamment la possibilité d'un site de régulation de SLC5A8 sensible au pH. Le fait que l'acidification du milieu extérieur module à la hausse également l'uptake de monocarboxylates dans les cellules HPRE contrôles comme le montre la figure ci-dessous est en faveur d'un transport endogène dans les cellules HPRE protons-dépendant, probablement lié aux MCTs. Nous pouvons alors envisager une autre alternative aux hypothèses de Gopal et ses collaborateurs sur ce phénomène observé. Vu les données sur

l'ovocyte de xénope, l'absence d'impact du pH sur les courants sodiques n'est pas en faveur d'une modulation directe du pH sur l'activité SLC5A8. Le pH module l'influx et l'efflux de monocarboxylates par des transports protons dépendants endogènes à la cellule. Cette hypothèse, que nous allons étayer dans notre étude, introduit la notion de fuite de monocarboxylate par les MCTs ubiquitaires des cellules de mammifères. Ceci pourrait ainsi expliquer différentes observations comme le caractère modeste de l'uptake décrit par Gopal et al. à pH 7, ou encore la variation d'intensité des courants sodiques induits par SLC5A8 en fonction des substrats ou de l'hôte cellulaire (56).



**Figure 6 :** Effet du pH sur l'uptake de lactate dans les cellules de mammifères HRPE transfectées par SLC5A8 (SMCT) d'après Gopal et al. (56).

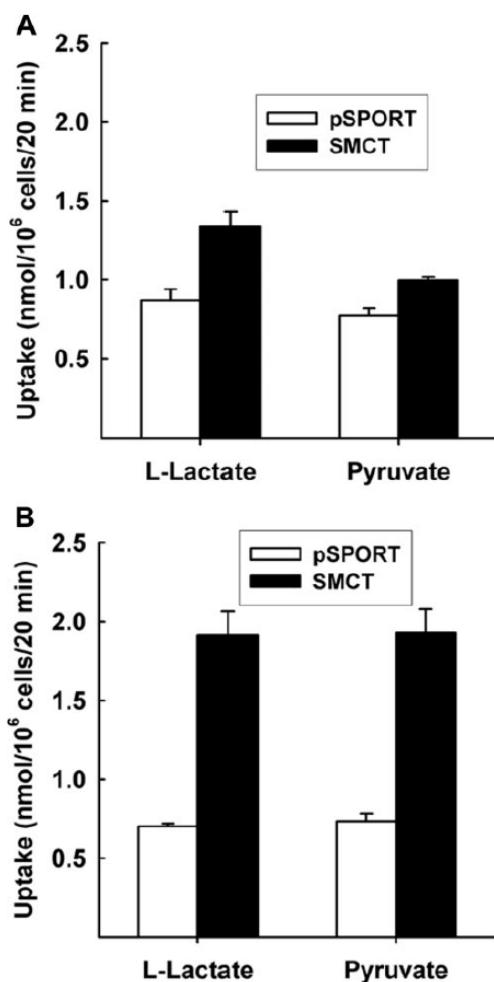
Les différences méthodologiques entre les études électrophysiologiques sur l'ovocyte de xénope et les mesures d'uptakes radioactifs sur cellules de mammifères argumentent cette hypothèse. En effet, dans les manipulations sur l'ovocyte, les mesures sont effectuées en perfusion et sur des courants induits continus loin de l'état d'équilibre obtenu dans la cellule de mammifères en condition d'uptake. De plus, à la différence des ovocytes, les cellules en culture échangent avec le milieu extérieur alors que l'ovocyte vit sur sa réserve intracellulaire. Les travaux de Cui et al. étayent également cette discussion en étudiant l'uptake d'un substrat commun aux MCTs et SLC5A8, le  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) dans une lignée cellulaire exprimant SLC5A8, MCT1 et MCT2 (62) (**Figure 7**). En absence de sodium, l'acidification du milieu extérieur, fait apparaître un uptake de GHB proton-dépendant. En milieu sodique et à pH neutre, on observe un uptake de GHB attribuable à SLC5A8. Dans cette condition, l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic (CHC), inhibiteur spécifique des MCTs, n'a aucun effet sur l'uptake de GHB argumentant aussi sur l'absence de rôle des MCTs sur l'uptake à pH neutre.



**Figure 7 : Effet des inhibiteurs sur l'uptake de GHB dans des cellules de mammifères (FRTL-5) exprimant naturellement SLC5A8, MCT1 et MCT2 au pH neutre (7,4) et acide (6,0) d'après Cui et al. (62).** CHC : acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic. Comparaison statistique par test *t* de Student aux contrôles (uptake en sodium sans inhibiteurs). \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001

## ii. Discrimination de l'effet MCTs/SLC5A8 par les inhibiteurs

Une autre façon de discriminer l'effet des MCTs de celui de SLC5A8 est l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Concernant les MCTs, des inhibiteurs spécifiques sont communément admis comme l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic (CHC) ou la luteoline (Flavonoïde) (62–66). Gopal et al. montrent que l'uptake de pyruvate et L-lactate médié par SLC5A8 dans les cellules HPRE transfectée (cDNA) n'est pas sensible au CHC à pH 6,5 (**Figure 8**) (56). Au contraire, ils observent une majoration de l'uptake pour le pyruvate (+55±5%) et le L-lactate (+170±7%) par rapport à la condition contrôle sans inhibiteur spécifique des MCTs.

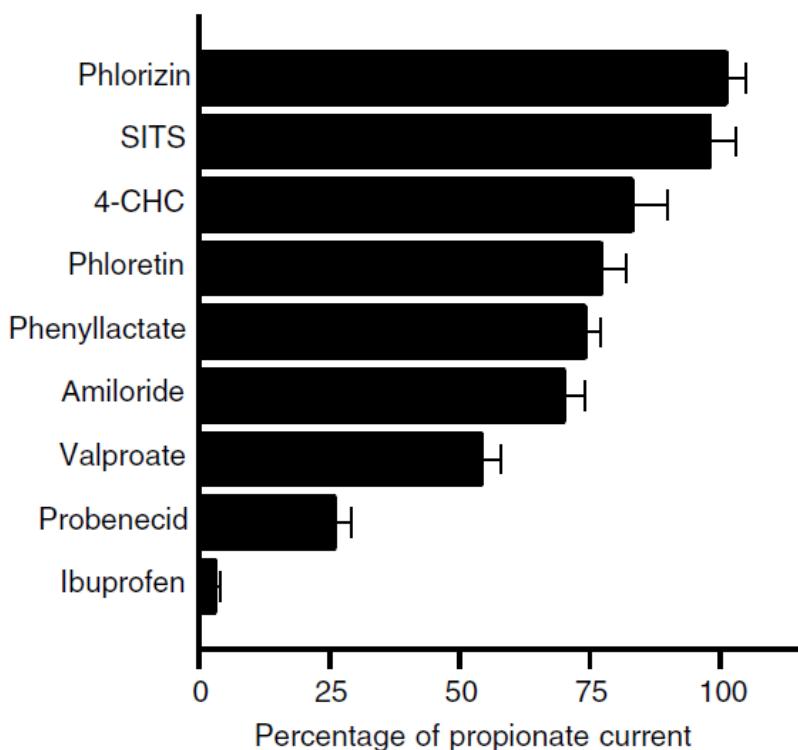


**Figure 8:** Uptake de L-Lactate et Pyruvate dans des cellules de mammifères (HPRE) transfectées par SLC5A8 (SMCT) à pH 6,5 sans (A) et avec (B) acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic (CHC) d'après Gopal et al. (56).

Concernant SLC5A8, la question de la détermination d'un inhibiteur spécifique de SLC5A8 reste beaucoup plus spéculative. L'ibuprofène, et d'autres anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été avancés par plusieurs études comme potentiels inhibiteurs spécifiques de SLC5A8 (53,62,67). Comparé à d'autres AINS, l'ibuprofène s'avère particulièrement efficace dans l'inhibition de l'uptake de monocarboxylate par SLC5A8. Cette inhibition concerne aussi bien l'uptake radioactif d'un substrat comme montré dans la **figure 9**, comme l'inhibition des courants sodiques induits par un substrat (**Figure 10**). Itagaki et al. montrent de manière intéressante que l'ibuprofène et autres AINS ne sont pas transportés par SLC5A8 à la différence des MCTs (67–69). Il s'agit là d'une remarquable différence dans les similitudes de substrats entre MCTs et SLC5A8.

Inhibitors	[ <sup>14</sup> C]-Nicotinate uptake [pmol (10 <sup>6</sup> cells) <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ]	% Control
Control	91.9 ± 2.4	100
Ibuprofen	20.9 ± 2.2	23
Ketoprofen	47.0 ± 0.7	51
Fenoprofen	28.1 ± 1.1	31
Naproxen	62.9 ± 2.3	69

**Figure 9:** Inhibition de l'uptake de [<sup>14</sup>C]-Nicotinate radioactif dans des cellules de mammifères (HRPE) transfectées par hSLC5A8 (hSMCT) en fonction de différents inhibiteurs anti-inflammatoires non-stéroïdiens d'après Itagaki et al. (67).

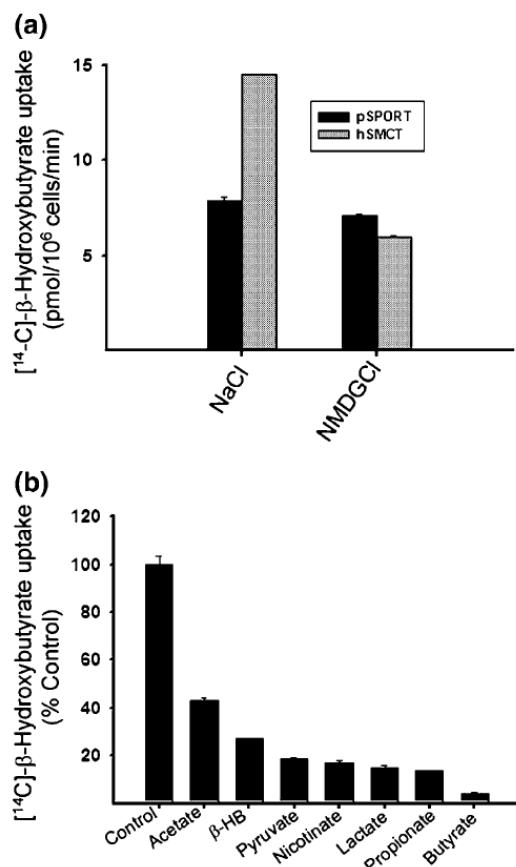


**Figure 10: Inhibition des courants sodique induits par du propionate sur des ovocytes de xénopes exprimant SLC5A8 en fonction de différents inhibiteurs d'après Coady et al. (53).**

SITS: 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulphonic acid; CHC: acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic.

Cependant, comme le rappelle Cui et al., l'ibuprofène ou apparentés restent des inhibiteurs des MCTs et s'avèrent non spécifiques à SLC5A8 malgré la puissance de l'effet inhibiteur sur cette protéine (62). Ces auteurs montrent l'inhibition de l'uptake de GHB par l'ibuprofène et autres AINS dans des cellules FRTL-5 exprimant SLC5A8. Ils montrent aussi que ces mêmes AINS bloquent l'uptake de GHB dans des cellules MDA-MB231 transfectées par MCT1 (cDNA) (62). Ainsi, l'ibuprofène et autres AINS sont inhibiteurs non spécifiques de SLC5A8 mais également des MCTs. Le CHC et la lutéoline sont des inhibiteurs spécifiques aux MCT.

Le NMDG (N-Methyl-D-glucamine), utilisé pour se substituer au sodium, annule totalement l'uptake de monocarboxylate médié par SLC5A8 (39,57). La plupart des substrats identifiés de SLC5A8 ont été testés comme inhibiteurs compétitifs non spécifiques de l'uptake de monocarboxylates (39,56). Dans l'étude de Martin et al. l'upake de  $\beta$ -hydroxybutyrate marqué dans une lignée cellulaire HRPE transfectées par SLC5A8 (cDNA) est partiellement inhibé par le substrat lui-même et d'autres substrat connus de SLC5A8 (**Figure 11**) (39). Le pyruvate, L-lactate, le nicotinate, le propionate et le butyrate génèrent une inhibition supérieure à 80% de l'uptake de  $\beta$ -hydroxybutyrate. On réalise la même observation pour les transporteurs MCTs qui présentent les mêmes substrats (62–65).



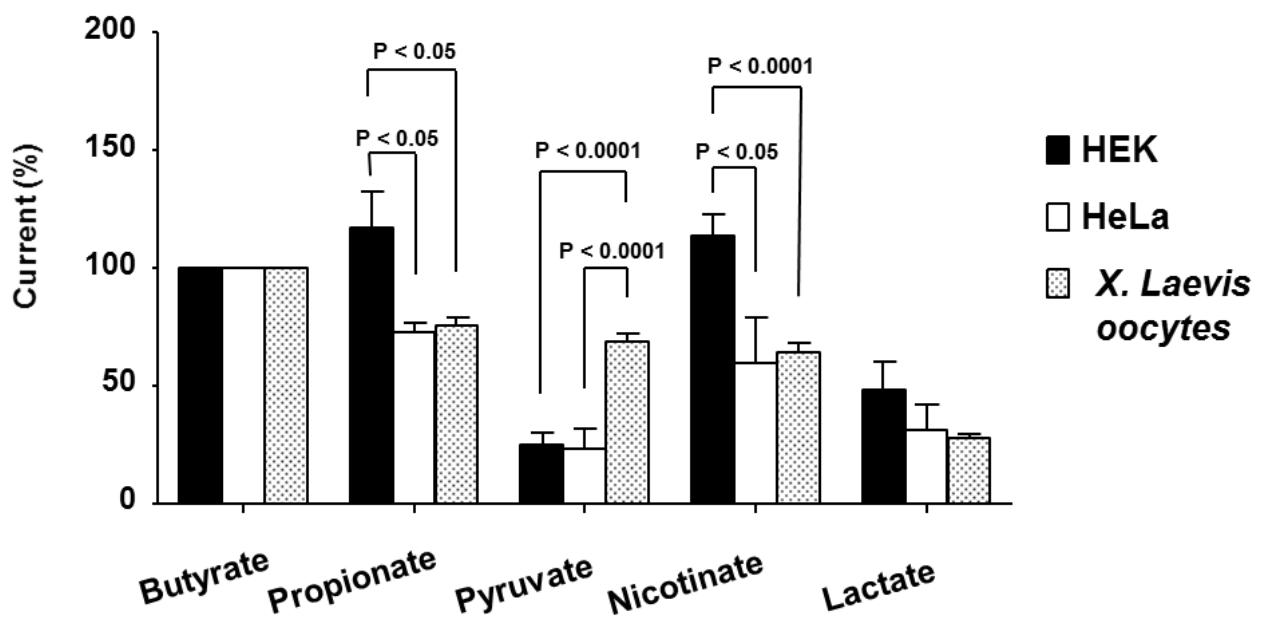
**Figure 11:** Uptake radioactif de [<sup>14</sup>C]- $\beta$ -Hydroxybutyrate dans des cellules de mammifères (HRPE) transfectées SLC5A8 en fonction de la présence ou non de sodium (remplacé par du NMDG) (a) et en condition d'inhibition compétitive (b) d'après Martin et al. (39).

### c. Conclusions

Depuis les années 80, de nombreux rapports suggèrent déjà l'existence d'un transport de monocarboxylate Na-dépendant, notamment dans le tubule rénal proximal (70–75). Depuis son clonage en 2002, les données plus récentes de la littérature semblent concordantes pour attribuer à SLC5A8 un rôle de symporteur Na/monocarboxylates. Selon les études électrophysiologiques sur ovocytes de xénope, la mise au contact d'un monocarboxylate génère un courant sodique entrant instantané s'annulant au retrait du substrat. Ce courant sodique est associé à uptake de monocarboxylates mesuré en radioactivité dans des cellules de mammifères transfectées (cDNA) ou dans des ovocytes de xénope exprimant SLC5A8 (cRNA). Les substrats endogènes identifiés sont des monocarboxylates (pyruvate, L-lactate), des acides gras à chaînes courtes (acétate, butyrate, propionate), des cétones ( $\beta$ -hydroxybutyrate, acétoacetate,  $\alpha$ -kétoisocaproate) et l'acide nicotinique. Les affinités ( $K_m$ ) à SLC5A8 varient selon les substrats et sont présentés sur la table 1.

Du fait de la similitude des substrats transportés, des auteurs ont proposés l'appellation SMCT1 (Sodium-linked Monocarboxylate Transporter) par analogie aux MCTs (Monocarboxylate Transporter). SLC5A8 et MCTs (SLC16) diffèrent entre autre par la force motrice, sodique pour le premier, protonique pour le second. Le caractère ubiquitaire des MCTs dans les lignées cellulaires de mammifères rend l'étude du transport propre par SLC5A8 difficile. Pour discriminer l'effet de SLC5A8 par rapport aux MCTs, les différentes études présentées ont utilisées le caractère sodium dépendant de SLC5A8 (NMDG), le caractère proton dépendant des MCTs (acidification du milieu extérieur) ou encore des inhibiteurs spécifiques des MCT (CHC). Bien que l'ibuprofène ait été proposé comme inhibiteur spécifique de SLC5A8, il n'en reste pas moins inhibiteur des MCTs comme la plupart des AINS.

Cette dualité d'expression dans les modèles cellulaires étudiés est probablement à l'origine de la variabilité des paramètres caractérisant SLC5A8 en fonction de l'hôte cellulaire utilisé pour l'étude. Ce dernier élément a été conforté au laboratoire en comparant pour un même substrat la réponse en termes de courant sodique en fonction d'hôtes cellulaires différents (données non encore publiées) (**Figure 12**). La différence entre les mesures d'uptake entre les cellules de mammifères et l'ovocyte de xénope ayant déjà été citée précédemment. Nous faisons l'hypothèse que les flux cellulaires de monocarboxylates entrant et sortant soient sous contrôle des MCTs comme discuté plus haut. Ainsi, nous postulons sur le fait que les mesures réalisées dans ces modèles cellulaires dépendent de l'équipement MCT en présence. L'activation ou l'inhibition des MCTs en modulant le pH pourrait ainsi avoir des conséquences sur la perméabilité de la cellule aux monocarboxylates testés. Ceci pourrait être à l'origine d'une variabilité des mesures fonctionnelles (uptake, intensité des courants, stœchiométrie) en fonction du substrat ou même de l'hôte cellulaire.



**Figure 12:** Variabilité des courants sodiques induits par les substrats de SLC5A8 en fonction de l'hôte cellulaire exprimant SLC5A8 (HEK, HeLa et ovocytes de xénope).

Données de TIRO (non encore publiées). Normalisation aux courants induits par le butyrate.

## **D- Expression de SLC5A8 et rôle physiologique**

SLC5A8 est exprimée à la membrane apicale de différentes cellules épithéliales (56,76).

### **a. Expression dans la thyroïde, les glandes salivaires**

SLC5A8, de par son homologie à SLC5A5 (NIS) et sa localisation apicale a été pressentie pour assurer l'export d'iode vers le follicule pour y être oxydé et lié à la thyroglobuline (1). Dans l'étude de Frank et al., différentes techniques sont utilisées pour localiser la protéine (hybridation *in situ*, southern blot, western blot, et immunohistochimie) (76). Cette étude a pour avantage de réaliser des comparaisons de tissus de souris contrôles « wild-type » avec des souris knockout *slc5a8<sup>-/-</sup>*. SLC5A8 est exprimée dans la membrane apicale des cellules folliculaires de la glande thyroïde. SLC5A5 (NIS), transporteur exprimé en basolatéral des cellules folliculaires thyroïdiennes est impliqué dans la captation cytoplasmique de l'iode circulant. Une autre protéine avait été préalablement identifiée dans ce rôle, la Pendrine (SLC26A4). L'étude des souris SLC26A4<sup>-/-</sup>, n'a pas confirmé cette fonction dans la mesure où les souris KO ne présentaient pas de dysfonction thyroïdienne (77). L'étude du KO *slc5a8<sup>-/-</sup>* n'a pas montré également de modifications sur l'aspect macroscopique et histologique de la glande thyroïde pour des animaux de deux ans d'âge. Le double KO *slc5a8<sup>-/-</sup>* et *slc26a4<sup>-/-</sup>*, n'a pas non plus montré d'évidences de modifications histologiques thyroïdiennes. Aucune anomalie de fonction endocrinienne, appréhendée par le dosage de l'hormone thyroïdienne (T4), n'a été identifiée pour les souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* dans les conditions expérimentales testées. Enfin, une mesure de l'organification thyroïdienne de l'iode radioactif <sup>125</sup>I n'a pas montré de différence entre les WT et les KO. Les auteurs ont conclu à l'absence de fonction de la protéine au niveau thyroïdien (76).

SLC5A8 présente également une forte expression dans les glandes salivaires. L’immunohistochimie précise l’expression à la membrane apicale des cellules canalaires et acineuses des glandes parotides, et au niveau des membranes apicales des cellules acineuses des glandes sous-mandibulaires. Au niveau des glandes salivaires, l’expression de SLC5A8, se traduit chez les souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* par une augmentation du lactate salivaire comparée aux souris WT (1,5 fois). Les auteurs n’ont pas trouvé de différence du lactate sérique entre les WT et les KO (76).

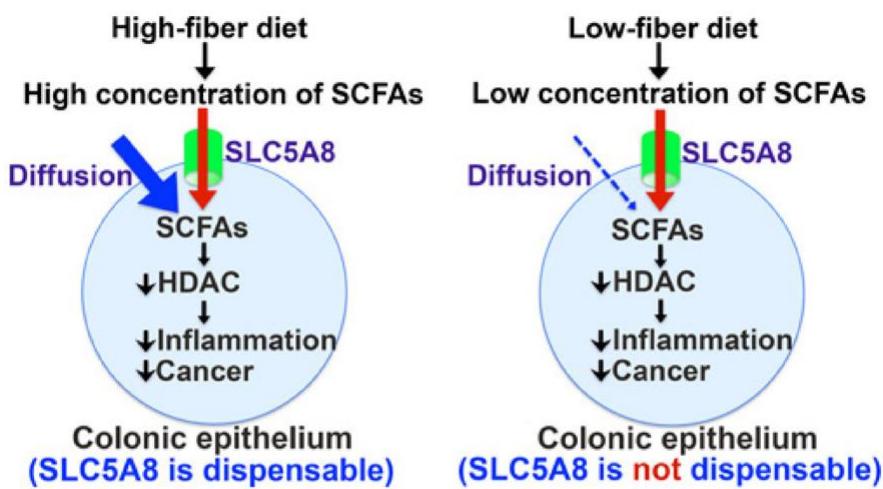
### **b. Expression dans le tube digestif**

Frank et al. retrouvent également une expression dans le tube digestif où une double coloration MCT1/SLC5A8 a été réalisée (76). SCL5A8 est exprimée à la membrane apicale quand MCT1 est exprimé sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales. Il existe une gradation de l’intensité de l’expression SLC5A8 tout au long du tube digestif débutant au jéjunum où l’expression est modeste jusqu’au niveau de la partie distale du colon où elle est maximum. Cette étude ne révèle pas d’expression gastrique ou duodénale. MCT1 est essentiellement exprimé au niveau colique.

*Slc5a8* a été identifié comme un suppresseur de tumeur colique par la fréquence de son silençage dans les cancers coliques humains (3). L’étude des colons de souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* n’a pas trouvé d’augmentation de l’incidence de tumeurs coliques suggérant l’absence d’effet préventif (76). Dans cette même étude, des agents carcinogènes par voie intra-péritonéale ont été utilisés générant une augmentation globale de l’incidence des tumeurs coliques sans différence significative entre les WT et les KO. L’étude du KO *slc5a8<sup>-/-</sup>* sur une lignée APC<sup>min</sup> (modèle de souris développant des tumeurs intestinales) a conduit aux mêmes résultats confirmant

l'absence d'effet de la déficience en SLC5A8 sur la prévention et la croissance des tumeurs coliques.

Les travaux de Gurav et al. en 2015 permettent de rediscuter l'échec de la démonstration *in vivo* du rôle suppresseur de tumeur dans l'étude du modèle murin *slc5a8<sup>-/-</sup>* (38). Ils vont démontrer, *in vivo*, que la présence de SLC5A8 est nécessaire pour protéger d'une inflammation colique induite ou du cancer du côlon uniquement sous régime alimentaire pauvre en fibre (et non en régime normal). La principale hypothèse du rôle suppresseur de tumeur de SLC5A8 dans le colon associe l'uptake de butyrate médié par SLC5A8 dans le colonocyte et la propriété du butyrate d'inhiber les HDAC (24,25). Les fibres sont à l'origine de la production d'acides gras à chaîne courte incluant le butyrate par la flore bactérienne colique. SLC5A8 est un transporteur de haute affinité ( $K_m < 100 \mu M$ ) à l'inverse des MCTs également présent à la membrane apicale du colonocyte. A haute concentration (régime riche en fibre), le butyrate produit diffuse au travers de la membrane apicale ou est absorbé par les MCTs, transporteur à faible affinité/forte capacité. Gurav et al. font l'hypothèse que, dans ces conditions, SLC5A8 serait dispensable. Inversement lorsque la diète est appauvrie en fibre SLC5A8 deviendrait obligatoire pour l'uptake intracellulaire de butyrate (**Figure 13**).



**Figure 13:** Uptake d'acides gras à chaîne courte (SCFA) dans le colonocyte sous régime riche et faible en fibre d'après Bhutia et al. (78).

### c. Expression rénale

C'est au niveau rénal qu'est observée l'expression de SLC5A8 la plus forte (**Figure 14**).

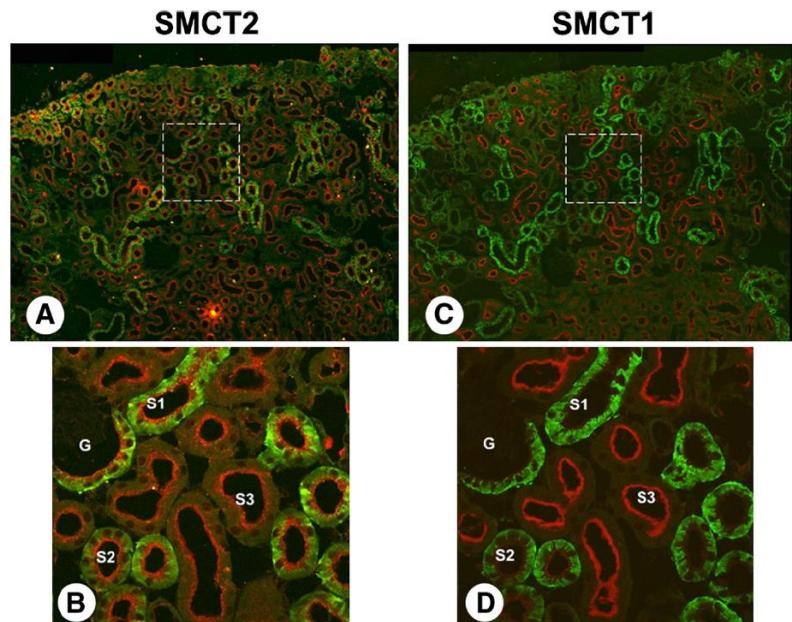
L'expression de SLC5A8 est localisée au cortex rénal au niveau de la bordure en brosse du tubule proximal rénal (56,76).



**Figure 14:** Identification de SLC5A8 par Western blot dans différents organes de souris WT comparées à des souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* d'après Frank et al. (76)

Un co-marquage avec la phalloïdine-Tetramethylrhodamine permet de préciser cette localisation tubulaire (76). Gopal et al. permettent de préciser l'expression de SLC5A8 dans les trois segments du tubule contourné proximal (S1, S2 et S3) (79). La protéine est exprimée en région S3 (Pars recta) et à un degré moindre en S2 au niveau de la bordure en brosse (membrane apicale) (**Figure 15**). Aucun marquage n'est retrouvé au niveau S1. Cette précision est importante dans la mesure où chaque section tubulaire a une fonctionnalité différente dans les mécanismes de réabsorption rénale. Ces données sont en adéquation avec la localisation corticale et médullaire externe observée en hybridation *in situ* dans de précédentes études (56,76,79). Dans cette même étude immunohistochimique, le transporteur SMCT2 (SLC5A12)

symporteur Na/monocarboxylate de faible affinité cloné en 2005 par Srinivas et al. est exprimé en revanche sur les trois segments du tubule contourné proximal (79–81).



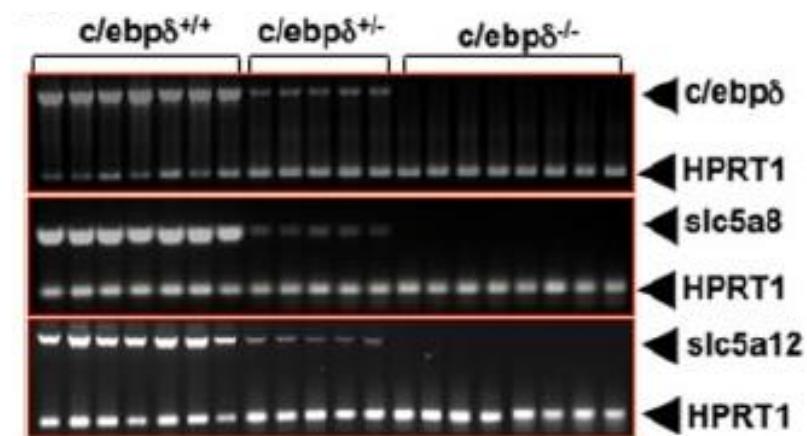
**Figure 15: Immuno-localisation de SLC5A8 (SMCT1) et de SLC5A12 (SMCT2) au niveau rénal (souris) d'après Gopal et al. (79).** SLC5A8 et SLC5A12 ont été marqués par un anticorps spécifique (rouge). L'immunolocalisation est aidée par un co-marquage CD98 spécifique aux segments S1 et S2 du tubule proximal (vert).

Yanase et al. confirmant cette localisation rénale de SLC5A8 et réalisent des co-marquages MCT1/MCT2. Ces deux transporteurs sont exprimés à la membrane basolatérale et ne coïncident pas avec l'expression SLC5A8. Dans le tubule proximal, seul MCT1 est exprimé dans le segment S1. L'absence de co-localisation tubulaire n'argumente pas sur un lien fonctionnel entre les deux transporteurs dans les mécanismes de réabsorption de monocarboxylates.

Becker et al. ont localisé SLC5A8 dans le tubule contourné proximal mais de manière plus surprenante dans les cellules intercalaires A et B du tube collecteur (co-marquages avec aquaporine 2 et AE1) (82). Cette étude confirme l'absence de co-localisation fonctionnelle de SLC5A8 et MCT1/2.

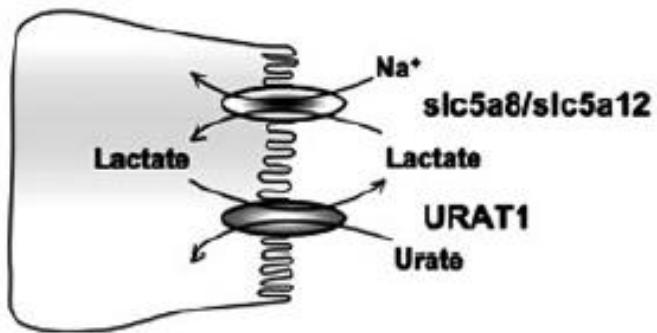
Frank et al. ont décrit une perte de lactate dans les urines collectées sur 24 heures dans des cages métaboliques des souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* comparées à des souris wild-type (76). La concentration urinaire en lactate des souris KO était 67 fois supérieure à celle des souris contrôle « wild-type ». D'autres métabolites urinaires ont été mesurés (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2-</sup>, Ca<sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, phosphate inorganique, créatinine, glucose, urée et acide urique) sans qu'aucune différence de concentration urinaire ne soit retrouvée. Ces derniers éléments couplés à l'absence de modifications histologiques rénales suggèrent l'absence de dysfonction rénale consécutive à l'hyperlactaturie des souris *slc5a8<sup>-/-</sup>*. Cette hyperlactaturie n'était pas associée à des changements de concentration dans le secteur sanguin traduisant ainsi une compensation efficiente de la perte urinaire de lactate.

Thangaraju et al. ont également confirmé la fonction de réabsorption rénale du lactate contenu dans l'urine primitive au niveau du tubule rénal proximal (81). Ils ont montré que les souris *c/ebpδ<sup>-/-</sup>*, présentaient une perte de l'expression rénale de SLC5A8 par perte de ce facteur de transcription (**Figure 16**).



**Figure 16: Perte de l'expression rénale de SLC5A8 pour les souris *c/ebpδ*<sup>-/-</sup> d'après Thangaraju et al. (81).**

Dans ce modèle murin, Thangaraju et al. ont montré que la perte d'expression rénale de SLC5A8 était associée à une hyperlacturie avec une augmentation de 29 fois la concentration urinaire de lactate (81). Celle-ci s'accompagnait d'une baisse de 90% du lactate sérique. De façon intéressante, la preuve du couplage du couplage de SLC5A8 et URAT1 transporteur de l'acide urique, a été faite. De façon concomitante à la perte de lactate urinaire, il a été observé une perte d'acide urique dans les urines des souris *c/ebpδ*<sup>-/-</sup> 6 fois supérieure à celles des souris contrôles. Il a été envisagé que l'influx de lactate dans les cellules tubulaires proximales servirait d'anion échange pour URAT1 facilitant ainsi la réabsorption de l'acide urique (**Figure 17**).



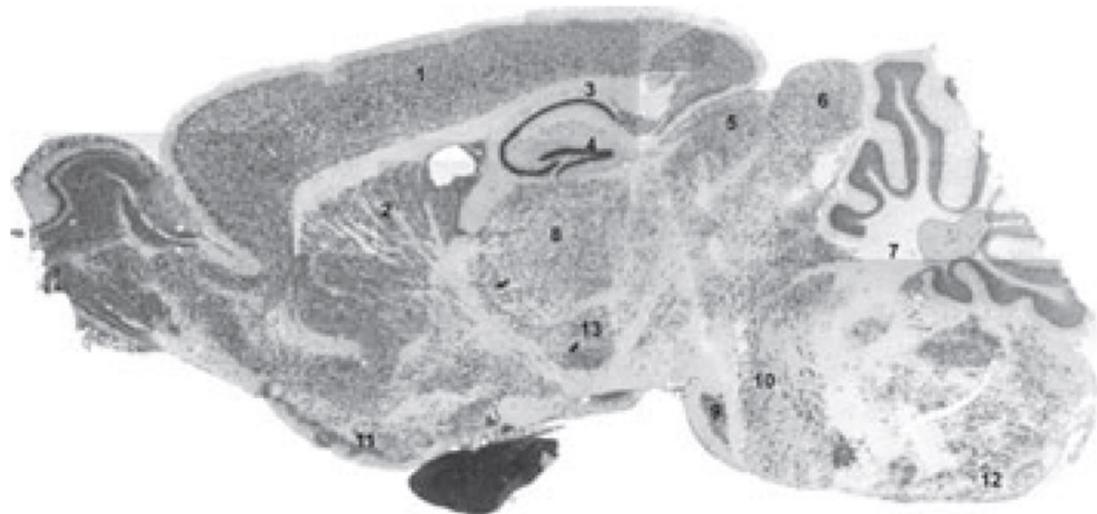
**Figure 17: Couplage de SLC5A8 et URAT1 pour la réabsorption rénale de l'acide urique d'après Thangaraju et al. (81).**

#### d. Expression cérébrale et rétinienne

L'expression de SLC5A8 cérébrale fait l'objet de données contradictoires dans la littérature (39,56,76,81).

Dans le rapport de Gopal et al. en 2003, la recherche de transcrits ARN slc5a8 dans le cerveau par technique de Northern Blot s'est avérée négative (56). Par approches Western Blot et immunohistochimie (anti-mSMCT1), Frank et al. n'observent pas d'expression cérébrale de SLC5A8 (76). Ces deux équipent avaient pour contrôle positif l'expression rénale et colique intense.

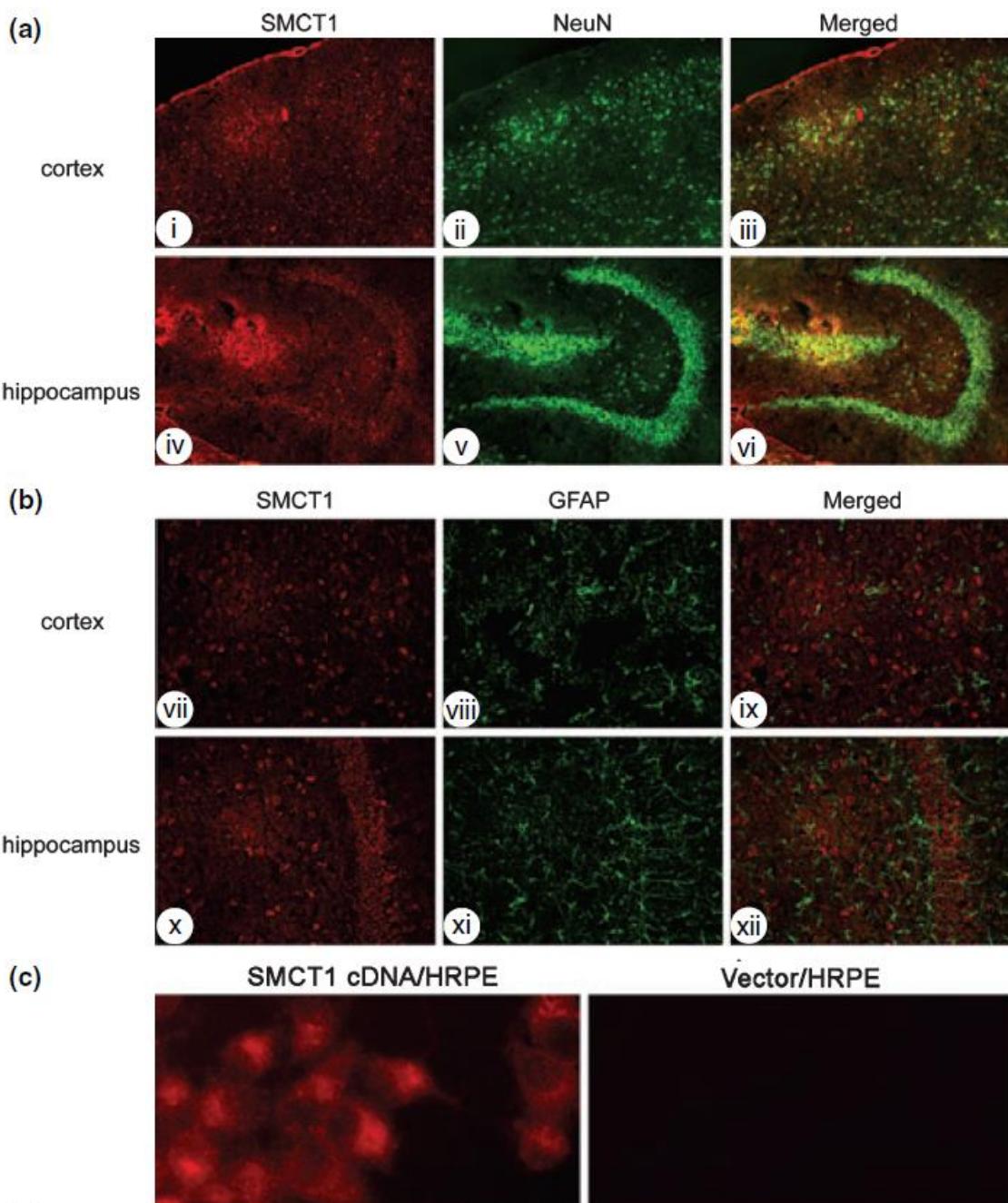
En 2006, pour la première fois, Martin et al. utilisant la technique d'hybridation in situ (sonde mARN SLC5A8) observent la présence de transcrits slc5a8 dans le cerveau murin (**Figure 18**) (39). Ils localisent ces transcrits au niveau du cortex, de l'hippocampe, du cervelet et de la glande pituitaire sur des coupes sagittales. A plus fort grossissement sur le cortex, l'expression est restreinte au corps cellulaire des neurones.



- |                      |                                |
|----------------------|--------------------------------|
| 1. Cortex layers 1-6 | 7. Interposed Cb. Nu.          |
| 2. Caudate           | 8. Thalamus                    |
| 3. Hippocampus       | 9. Pontine                     |
| 4. Dentate Gyrus     | 10. Rostral Periolivary Region |
| 5. Superior Col.     | 11. Islands of Calleja         |
| 6. Inferior Col.     | 12. Lateral Ret. Nu.           |
|                      | 13. Zona Incerta               |

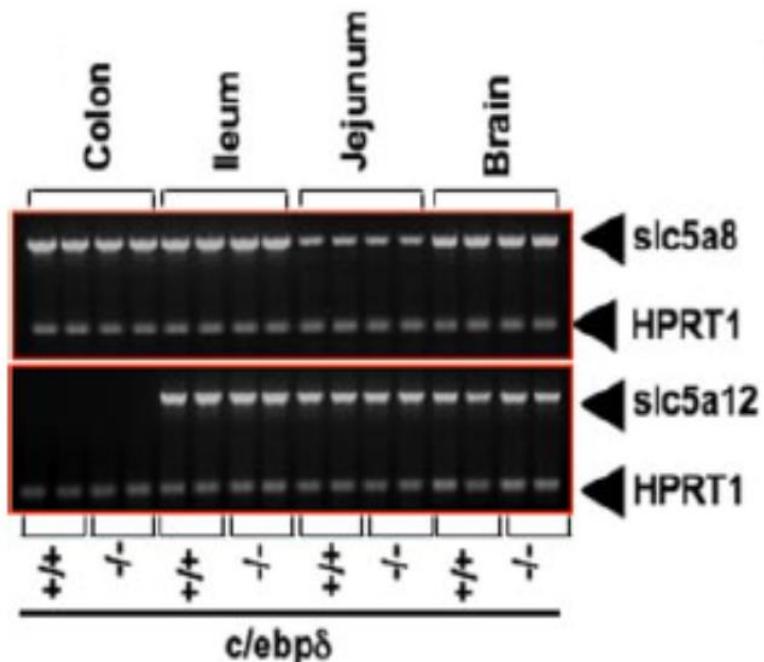
**Figure 18: Distribution de SLC5A8 (mRNA) par hybridation *in situ* sur coupes sagittales de cerveau de souris d'après Martin et al. (39).**

Une étude par immunofluorescence complète cette étude (anti-mSLC5A8) (**Figure 19**). Elle confirme les données de l’hybridation *in situ* et conforte l’expression neuronale et non gliale par co-marquage (NeuN: marqueur neuronal, GFAP: marqueur glial). La spécificité de l’anticorps est démontrée par marquage des cellules HRPE avec ou sans transfection (cADN mSLC5A8) (56). Cette démarche de contrôle de la spécificité de l’anticorps anti-SLC5A8 est d’autant plus importante qu’il n’y a pas dans cette étude de contrôle sur tissu cérébral de souris invalidées *slc5a8<sup>-/-</sup>*. On peut souligner que l’immunofluorescence SLC5A8 reste très modeste par rapport au marquage neuronal (NeuN) ou astrocytaire (GFAP) faisant supposer la faible expression au niveau cérébral. Ceci pourrait être une partie de l’explication de l’échec des premières tentatives de localiser SLC5A8 dans le cerveau murin.



**Figure 19: Immuno-localisation de SLC5A8 (SMCT1) (rouge) dans les cerveaux de souris d'après Martin et al. (39).** Co-marquage neuronal (NeuN, vert) (a) et astrocytaire (GFAP, vert) (b). La spécificité de l'anticorps SLC5A8 a été testée sur des cellules de mammifères (HRPE) transfectées (c).

Pour argumenter la présence de SLC5A8 dans le cerveau murin, nous pouvons également citer le travail de Thangaraju et al. (81). Cette équipe a mis au point une souris transgénique c/ebpdelta Null. Elle a montré que l'invalidation de ce facteur de transcription est à l'origine d'une perte totale d'expression rénale de SLC5A8 et SLC5A12. Dans ce travail, les auteurs ont recherché les modifications d'expression de transcrits ARN *slc5a8* induites par le knockout c/ebpdelta. L'ARN *slc5a8* est retrouvé au niveau cérébral sans que l'invalidation c/ebpdelta n'en modifie les niveaux (**Figure 20**).



**Figure 20:** Expression de SLC5A8 par Southern blot dans différents organes de souris wild-type et c/ebpdelta<sup>-/-</sup> d'après Thangaraju et al. (81).

Martin et al. suggèrent que de par l'expression neuronale de SLC5A8 et de sa capacité à transporter les substrats énergétiques majeurs (L-lactate et corps cétoniques) pour le cerveau, SLC5A8 jouerait un rôle dans le maintien énergétique cérébral (39). Ces auteurs vont souligner le rôle majeur des corps cétoniques, et notamment du β-Hydroxybutyrate, comme substrat de SLC5A8 et substrat énergétique neuronal majeur en alternative du glucose. SLC5A8 pourrait

être un transporteur complémentaire aux MCT2 d'expression neuronal pour l'entrée de ces substrats par des forces motrices différentes respectivement sodiques et protoniques. Aucune confirmation de ces données n'a pour l'heure été publiée.

Enfin, nous rapportons les résultats de l'étude de Martin et al. en 2007, mettant en évidence une expression de SLC5A8 dans la rétine par PCR (83). L'hybridation *in situ* et l'immunofluorescence permettent de localiser l'expression dans les couches des cellules ganglionnaires, bipolaires, plexiformes internes et externes et les couches des photorécepteurs et de l'épithélium rétinien (RPE). Martin et ses collaborateurs suggèrent, de la même façon qu'ils l'ont fait dans leur précédent rapport, un rôle hypothétique de SLC5A8 dans le maintien du métabolisme énergétique rétinien dû à sa fonction transport notamment pour le L-Lactate et les corps cétoniques.

## **E- Objectifs du travail de thèse**

Le travail de thèse a consisté à étudier notamment par des approches de métabolomique les propriétés fonctionnelles de la protéine membranaire SLC5A8, son rôle physiologique et son implication dans des pathologies au travers d'investigations *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* en mettant à profit des souris transgéniques *slc5a8<sup>-/-</sup>*. Cette thèse sur article est composée de deux manuscrits.

### **a. Résumé 1<sup>er</sup> article**

Dans une première partie, des mesures d'accumulation de métabolites *in vitro* sur un modèle de cellules mammifères (HEK-293) transfectées pour exprimer transitoirement SLC5A8 ont été réalisées en utilisant des analyses en métabolomique non ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Nous avons pu caractériser par cette approche la fonction de transport de monocarboxylates sodium-dépendant (lactate, pyruvate, et corps cétoniques) catalysée par SLC5A8. L'utilisation de la LC-MS comparée à l'utilisation plus classique de substrats radioactifs a permis d'étudier de manière originale le devenir intracellulaire des substrats transportés par analyse métabolomique non ciblée du milieu intracellulaire. Par analyses conjointes des milieux extra- et intracellulaires et modulation du pH, nous avons pu observer que dans nos conditions expérimentales (utilisées pour les mesures d'uptake) les transporteurs de monocarboxylates ubiquitaires protons-dépendant (MCTs) entraînent des fuites cellulaires de monocarboxylates. Nous avons pu montrer que l'uptake ou la réentrée de pyruvate dû à l'expression de SLC5A8 avait pour conséquences, outre l'alimentation énergétique du cycle de Krebs, un effet inhibiteur de la glycolyse au niveau de son enzyme régulatrice la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPH). Ceci a été

déduit par l'observation de l'accumulation du substrat (glycéraldéhyde-3-phosphate) de la GAPDH comme le fait son dérivé halogéné le bromopyruvate, utilisé comme agent thérapeutique anti-tumoral ciblant l'effet Warburg. Cette étude nous a permis de proposer une nouvelle alternative (inhibition de la GAPDH induisant un effet anti-Warburg) quant au rôle actuellement décrit dans la littérature de tumeur suppresseur de SLC5A8.

### b. Résumé 2<sup>ème</sup> article

Dans une deuxième partie, nous avons précisé le rôle de la protéine à l'aide d'un modèle de souris transgénique *slc5a8<sup>-/-</sup>*. Parce que SLC5A8 a pour substrats des métabolites énergétiques essentiels à la bioénergétique cérébrale et que son expression neuronale a été envisagée chez la souris, le phénotype histologique cérébral a spécifiquement été étudié. Nous avons mis en évidence chez les souris KO âgées comparées aux souris WT, des lésions d'œdème intramyélinique sans démyélinisation avec activation microgliale étendues à l'ensemble de la substance blanche. Décrit dans la littérature, un phénotype similaire est associé à des désordres hydro-ioniques dans l'espace péri-axonal causés par des désordres énergétiques associés à une déficience des pompes Na/K ATP dépendantes. Parce que l'expression neuronale discutée de SLC5A8 n'a pas été confirmée dans notre étude, nous avons donc envisagé que la leucoencéphalopathie décrite soit plutôt liée à une conséquence systémique. En effet, de par l'importante expression tubulaire rénale de SLC5A8, les souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* présentaient une fuite urinaire massive de monocarboxylates et corps cétoniques. Par approche métabolomique, il a été montré que les souris KO présentent une insuffisance en  $\beta$ -hydroxybutyrate au niveau cérébral. Des analyses en transcriptomique cérébrale ont conforté la carence en  $\beta$ -hydroxybutyrate par l'activation de voies de recours. Ce carburant est essentiel pour le cerveau, notamment en cas de dysfonctionnement du métabolisme glucidique. Nous avons pu montrer en

l'occurrence, qu'en deuxième partie de vie, les souris transgéniques présentaient une intolérance au glucose sur fond d'insuffisance en corps cétonique par fuite rénale. Cette étude nous a donc conduits à montrer le rôle majeur des corps cétoniques en neuro-énergétique.

## **ARTICLE 1**

### **The tumor suppressor SLC5A8 mediates pyruvate uptake in HEK-293 cells and inhibits glycolysis via a possible “anti-Warburg” effect.**

#### **Abstract**

Fifteen years ago, SLC5A8 was proposed to be a putative tumor suppressor in human colon cancer. Later, the protein was suggested to mediate sodium-coupled monocarboxylate transport, and this uptake process promotes an antiproliferative effect by potentially inhibiting histone deacetylases. Based on findings from SLC5A8 mutant mice, SLC5A8 does not have any apparent role in preventing tumor formation. Despite the substantial number of authors reporting the silencing of the SCL5A8-encoding gene by methylation in cancers from various organs, the mechanism of the SLC5A8-induced antiproliferative effect and its physiological role in the kidney, colon and thyroid is unclear. We performed uptake assays using radioactive monocarboxylates and liquid chromatography-mass spectrometry analyses. As shown in the present study, SLC5A8 mediates sodium-coupled uptake of pyruvate added to the uptake buffer or secreted by cells. Under uptake assay conditions, pyruvate efflux is mediated by endogenous MCT. The SLC5A8-mediated increase in intracellular pyruvate levels sequentially inhibits GAPDH and glycolysis. We propose that SLC5A8 controls the metabolism of renal cells by switching from glucose use to monocarboxylate use. We also propose that the tumor suppressor effect of SLC5A8 is linked to glycolysis inhibition through an anti-Warburg effect.

## Introduction

SLC5A8 was first identified by our team in the thyroid as a membrane protein that is putatively involved in iodide metabolism (1). Subsequently, human SLC5A8 has been attributed a tumor suppressor function in colon cancer (2). SLC5A8 exon methylation is an early event during colon tumor formation and exogenous SLC5A8 expression inhibits colony growth. Later, SLC5A8 expression was shown to be silenced by methylation in many human cancers (3–9). In 2004, two groups reported the induction of sodium-dependent inward currents in SLC5A8-expressing *Xenopus laevis* oocytes by various monocarboxylates under voltage-clamp conditions (10,11). Consequently, the physiological roles of SLC5A8 are mainly related to sodium-coupled lactate transport in the kidney and butyrate transport in the colon (10–12). The main hypothesis explaining the tumor suppressor function of SLC5A8 is based on the putative antiproliferative effect of SLC5A8 substrates that accumulate in cells. According to Miyauchi and collaborators, the SLC5A8 substrate butyrate, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, is responsible for the antiproliferative effect of slc5a8 on colon neoplasia (11). However, butyrate, a gut flora metabolite that is only found in the colon, does not explain the antiproliferative effect on non-colon cancer. Later, pyruvate, another SLC5A8 substrate, was associated with the *in vitro* antiproliferative effect on non-colon tumors (13–15). As shown in the study by Thangaraju and collaborators, SLC5A8 expression in MCF7 breast tumor cells only induces cell apoptosis if the culture medium contains pyruvate (13,16). Therefore, the antiproliferative effect of SLC5A8 was proposed to be due to HDAC inhibition mediated by pyruvate accumulation (13–15,17).

The reprogramming of energy metabolism is commonly considered a main cancer hallmark (18). The inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer cells described by Warburg in 1926 results in a significant increase in glycolytic flux (and ATP production) under

aerobic conditions (19). This so-called aerobic glycolysis promotes an increase in lactate production in these cells. Pyruvate must be transformed into lactate to allow the regeneration of NAD<sup>+</sup> required for glycolysis. Lactate export is primarily mediated by the HIF1-regulated MCT4 protein, as well as by MCT1. SCL5A8-mediated lactate uptake is incompatible with its necessary elimination to maintain the viability of tumor cells (as discussed by Ganapathy et al (15)). To our knowledge, the SLC5A8-induced antiproliferative effect has not been linked to energy metabolism reprogramming, although SLC5A8 was reported to mediate lactate, pyruvate, ketone and short-chain fatty acid (SFCA) uptake.

Here, we studied the effects of SLC5A8 expression on HEK-293 cell metabolism. We combined radiolabeled-metabolite uptake assays and metabolomics (liquid chromatography-mass spectrometry LC-MS) approaches to study the consequences of SLC5A8-mediated accumulation of metabolites involved in energy metabolism. Our study provides new insights that may improve our understanding of the physiological function of SLC5A8. In addition, we propose that the SLC5A8-induced anti-tumor effect is linked to a putative “anti-Warburg” effect.

## **Materials and Methods**

### ***Materials***

Radiolabeled metabolites were obtained from commercial sources: [<sup>14</sup>C]L-lactate, [<sup>14</sup>C]pyruvate and [<sup>14</sup>C]glucose were obtained from PerkinElmer (Villebon sur Yvette, France). L-Lactate, pyruvate, nicotinate, keto-isovalerate, methyl-keto-valerate, β-hydroxybutyrate, and bromopyruvate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin, France).

### ***Plasmids***

The *hSCL5A8* coding region was subcloned into the pcDNA3.1 expression vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) as described previously (1). From this construct, we derived a plasmid containing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused to the C-terminus of the SLC5A8 cDNA. The plasmids used for hNIS expression were also described in a previous publication (20).

### ***Cell Culture***

Human embryonic kidney HEK-293 cells were grown in DMEM supplemented with 10 % fetal calf serum, 10 mM L-glutamine, and 0.01 mg/ml gentamycin at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. All cell culture media, supplements and reagents were obtained from Invitrogen.

### ***Transfections***

On the day before transfection, HEK-293 cells were seeded on plates coated with 10 mg/ml poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), at a density of 3 x 10<sup>6</sup> cells/75 cm<sup>2</sup>. In general, transfection was performed in cells displaying a maximum 40 % confluence using the FuGENE 6 reagent (Roche, Meylan, France), according to the manufacturer's

recommendations. For each experiment, the transfection efficiency was estimated using a fluorescence assay with the EGFP protein. Usually, 40 to 70 % of the cells expressed the SLC5A8 protein.

### ***Uptake in transfected mammalian cells***

Uptake assays in transfected mammalian cells were performed 48 hours after cell transfection in wells containing  $5.10^5$  cells. The pH 7.4 uptake buffer comprised the following components: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES. The pH 6.0 uptake buffer comprised the following components: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM MES. In sodium-free buffer, NaCl was substituted with an equimolar concentration of N-methyl-D-glucamine (NMDG). Cells were washed twice with the appropriate uptake buffer. For uptake assays using radioactive pyruvate, cells were incubated for the indicated periods (generally 30 minutes) at room temperature in uptake buffer containing 100 µM [14C]-pyruvate (50 Ci/mol). Pyruvate uptake was stopped by adding ice-cold uptake buffer, followed by two washes with the same ice-cold buffer. Cells were then permeabilized with ethanol and the radioactivity was measured using an alpha-counter (Packard, PerkinElmer, Courtaboeuf, France). For the LC-MS analysis, after an appropriate incubation period (30 minutes in most experiments), an aliquot of the supernatant was collected to analyze the culture media. Then, cells were quickly rinsed twice with a cold sucrose solution (150 mM), and 1 mL of cold methanol (HPLC grade, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) was added to each well. Plates were incubated overnight at -20 °C and then centrifuged at 15 000 g for 15 minutes. Supernatants were removed and dried using a SpeedVac concentrator (SVC100H, SAVANT, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Lyophilized samples were resuspended in 80 µL of a 20:80 acetonitrile-H<sub>2</sub>O mixture (HPLC grade, Merck Millipore) prior to LC-MS/MS analyses.

## **LC-MS/MS analysis**

Metabolic profiling was performed using LC-MS/MS. Liquid chromatography analyses were performed using the DIONEX Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Ten microliters of each sample were injected onto a Synergi 4  $\mu$ m Hydro-RP 80 A 250 x 3.0 mm column (Phenomenex, Le Pecq, France). Mobile phases comprised 0.1 % formic acid (Thermo Fisher Scientific) in water (A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (B). The following gradient was established, with a flow rate of 0.9 mL/min: 0 % mobile phase B from 0 to 5 min, 0 – 95 % B from 5 to 21 min, holding at 95 % B to 21.5 min, 95 – 0 % B from 21.5 to 22 min, and holding at 0 % B until 25 min for column equilibration. The mass spectrometry analysis was performed on a Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) with a heated electrospray ionization source (HESI II) operating in both positive and negative mode. High-resolution accurate mass (HRAM) full-scan MS and the top 5 MS/MS spectra were collected in data-dependent mode at resolving powers of 70 000 and 35 000, respectively. A quality control (QC) sample was prepared from an equal mixture of all collected samples. The QC sample was injected at the beginning of the run and after every 9 samples to monitor the stability of the mass spectrometer performance.

## **Metabolomic profiling**

Raw data files were converted to mzXML files using MSconvert (version 2.1, ProteoWizard) [19]. The data obtained from positive and negative ionization modes were analyzed separately using MzMine (version 2.29) [20]. Isolated chromatograms were generated for each mass, with a noise threshold of  $10^5$ . A local minimum search algorithm was used to select the validated peaks. Peaks were then aligned by a random sample consensus (RANSAC) algorithm with a tolerance of 10 ppm for m/z and 1 min for the retention time. Missing values were added using the same m/z and RT ranges observed in detected samples, when possible. We only retained

peaks with no missing values after gap-filling. Peaks were then identified using the human metabolome database (HMDB, version 3.0) with a 15 ppm mass tolerance. Only identified metabolites were retained for further analyses. The results obtained with each polarity were combined, and for metabolites that were identified in both modes, we retained the metabolites with the higher mean intensity values.

### ***Statistical analyses***

Statistical analyses of all experiments were performed using Microsoft Excel software. Student's *t*-tests were applied for all comparison, as appropriate. P <.05 was considered as significant.

## Results

### ***Pyruvate uptake and content in SLC5A8-expressing HEK-293 cells***

We used transiently transfected HEK-293 cells to perform [<sup>14</sup>C]-pyruvate uptake assays. SLC5A8 expression induced an antiproliferative effect in HEK-293 cells. In addition, we were not able to establish cell lines that stably expressed SLC5A8. Furthermore, Thangaraju and collaborators reported that exogenous SLC5A8 expression induces pyruvate-dependent apoptosis in cultured cells (16). Therefore, our assays were performed in transiently transfected HEK-293 cells 48 hours after transfection. Transfected cells were grown in the presence of pyruvate for only 24 hours (a step required to increase the recovery of cells after transfection) to avoid any effects of apoptosis-induced pathways on our experiments. Cells were maintained in culture medium lacking pyruvate for another 24 hours before we performed our uptake experiments. Exogenous expression of membrane proteins may modify cell metabolism; thus, we chose NIS-expressing cells for our control experiments. The sodium/iodide symporter NIS (or SLC5A5) is highly homologous to SLC5A8 but does not mediate monocarboxylate transport.

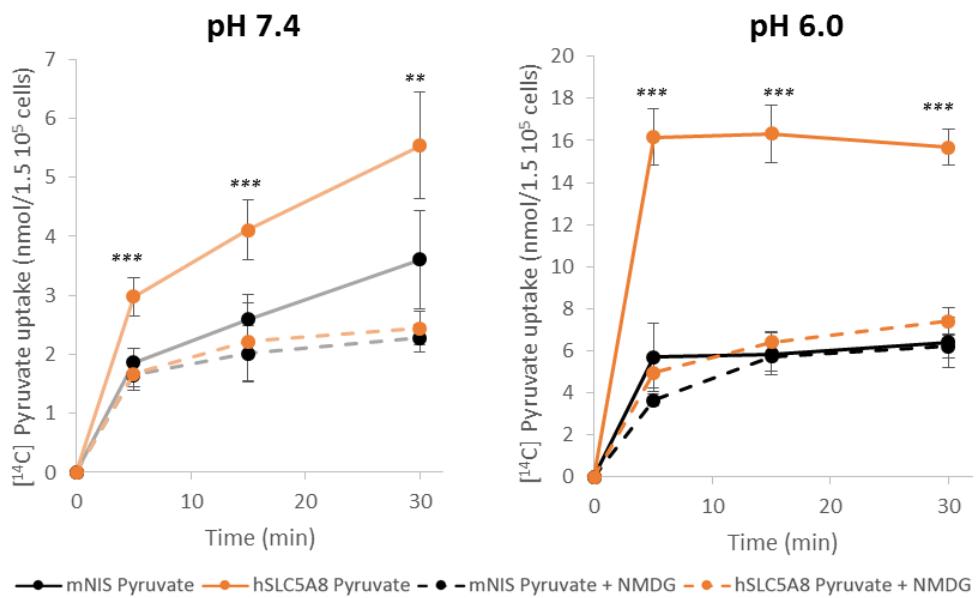
For the radiolabeled pyruvate uptake assays, cells were incubated in uptake buffer at pH 7.4 containing 100 µM pyruvate and [<sup>14</sup>C]-pyruvate (**Figure 1A**) as radiotracer. We observed a small (1.5-fold) but significant increase in pyruvate uptake in SLC5A8-expressing cells compared to NIS-expressing control cells. SLC5A8-induced pyruvate uptake depended on sodium, as shown by the inhibition of uptake with the sodium substitute N-methyl-D-glucamine (NMDG). Uptake assays were also performed at pH 6.0. Under this condition, pyruvate uptake was increased in both NIS-expressing control cells and SLC5A8-expressing cells compared to uptake measured at pH 7.4. The increase in pyruvate uptake at low pH in control cells was assumed to be mediated by members of the proton-coupled monocarboxylate transporter

(MCT) family. SLC5A8-expressing cells exhibited 2.5-fold greater uptake than that of the control cells. In sodium-free uptake medium (supplemented with NMDG), no significant difference between control and SLC5A8-expressing cells was observed. In addition, we did not observe a decrease in pyruvate uptake in NIS-expressing control cells in sodium-free uptake medium. These results confirmed that SLC5A8 expression in HEK-293 cells mediates sodium-coupled pyruvate transport. Interestingly, the increase in the pyruvate transport in these cells at low pH was considerably higher than that of the uptake expected by the activation of H<sup>+</sup>-coupled monocarboxylate transport alone.

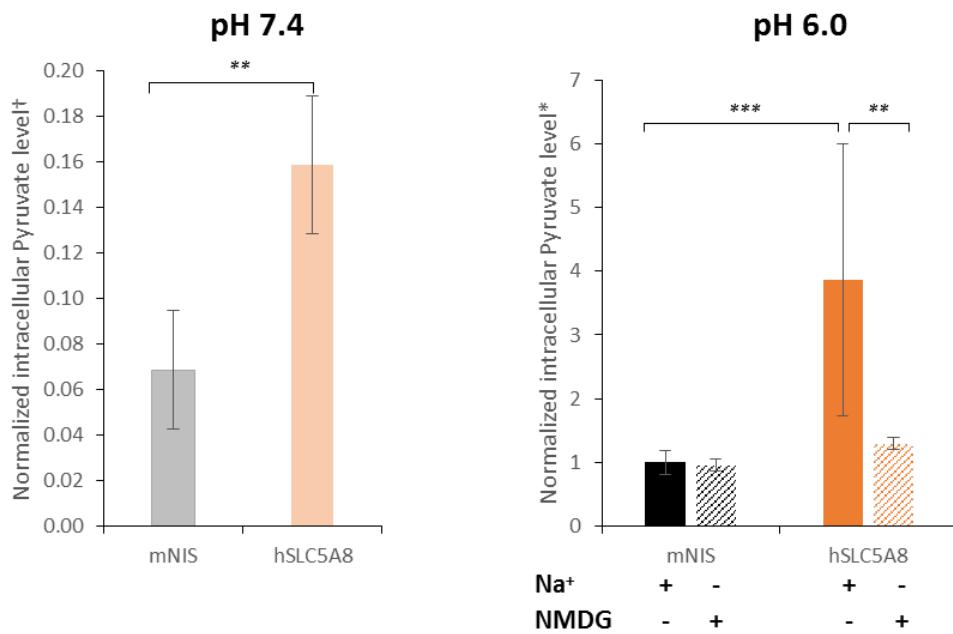
We then studied the total intracellular pyruvate content using a LC-MS approach under experimental conditions similar to those of the uptake experiments. The metabolomic analysis was performed after cells had been incubated in uptake buffer for 30 minutes in the presence 100 μM of pyruvate (**Figure 1B**). At pH 7.4, SLC5A8-expressing cells showed a 2.3-fold higher pyruvate content than that of the NIS-expressing control cells. As expected, when endogenous proton-dependent monocarboxylate transporters are present (namely, MCT1 in HEK-293 cells, see the Human Protein Atlas available from [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) and unpublished data using targeted proteomics), intracellular pyruvate levels were higher at pH 6.0 in both SLC5A8-expressing and NIS-expressing control cells (24-fold and 14-fold, respectively). This finding was expected for MCT-mediated uptake (MCTs are involved in the proton-dependent symport system). At this lower pH, the intracellular pyruvate level was 3.9-fold higher in SLC5A8-expressing cells than in the control cells. This increase did not occur in sodium-free uptake buffer, showing that the high intracellular pyruvate content in SLC5A8-expressing cells depended on Na<sup>+</sup> and thus was mediated by SLC5A8.

We also observed higher intracellular levels of several other monocarboxylates (lactate, keto-isovalerate, hydroxybutyrate and nicotinate) in SLC5A8-expressing cells than in the control cells when the metabolite was added to the uptake buffer (**Supplementary Data Figure 1**).

### A $[^{14}\text{C}]$ pyruvate uptake



### B Non-radiolabeled Pyruvate uptake (LC-MS)



**Figure 1: SLC5A8 mediates Na-dependent pyruvate uptake in HEK-293 cells.**

Pyruvate uptake in HEK cells was assessed using radiolabeled pyruvate ( $[^{14}\text{C}]$ -pyruvate) (n=3) (A) and LCMS ([M-H]<sup>-</sup>: 87.0073) 30 minutes after cells were incubated with buffer under neutral (pH 7.4) and acidic condition (pH 6.0) (n=5) (B). NMDG was used to test the sodium dependence. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. † The pyruvate level in control cells cultured at pH 6.0 was considered the reference value for normalization.

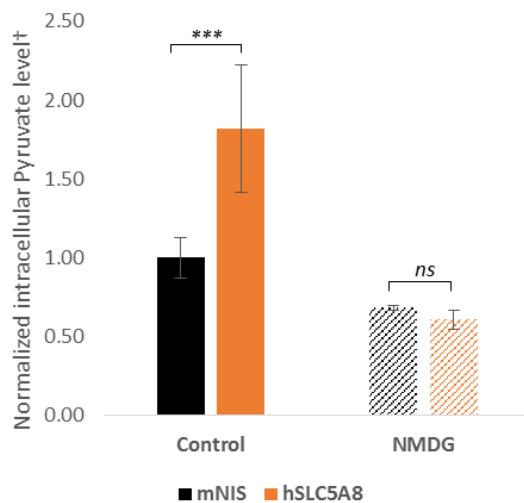
***Pyruvate content in SLC5A8-expressing HEK-293 cells cultured in uptake solution without added pyruvate***

Next, we studied the intracellular pyruvate content in SLC5A8-expressing and NIS-expressing control cells at low pH after cells were incubated in uptake buffer without added pyruvate. In the absence of pyruvate in the extracellular uptake medium, the intracellular pyruvate content was approximately two-fold higher (1.8-fold) in SLC5A8-transfected cells than in control cells (**Figure 2A**). This uptake process was sodium-dependent. We also observed a sodium-dependent increase in the intracellular levels of several other monocarboxylates (lactate, hydroxybutyrate, etc.) in SLC5A8-expressing cells compared with those of control cells in monocarboxylate-free buffer (**Supplementary Data Figure 2**). Therefore, we assumed that these higher levels were associated with SLC5A8 function. In this case, the higher intracellular pyruvate level in SLC5A8-expressing cells in the absence of extracellular pyruvate should rely on pyruvate release through a monocarboxylate transporter and simultaneous SLC5A8-mediated re-uptake into cells.

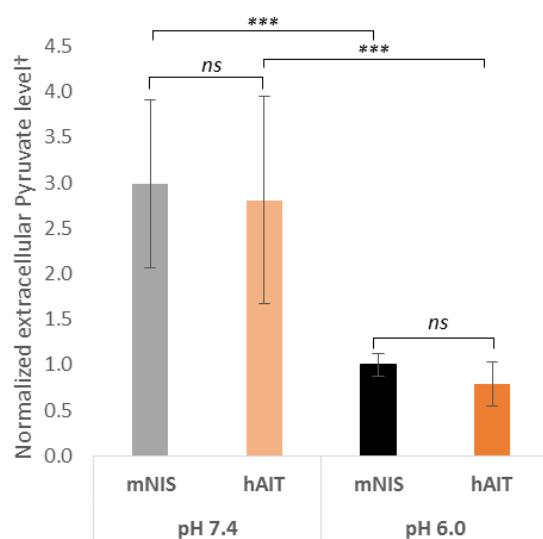
Pyruvate is converted into lactate in proliferating cells with high glycolytic activity and is then released from the cells through proton-dependent MCT transporters. This well-described mechanism is required to maintain a low intracellular lactate concentration and ensure the continuous function of glycolysis. Lactate and many other monocarboxylates, including pyruvate, are substrates of MCTs. Therefore, we postulated that endogenous MCT1 in HEK-293 cells mediated continuous pyruvate production and efflux. SLC5A8 expression mediates pyruvate re-entry into cells. Thus, we determined the initial pyruvate content in the uptake buffer lacking added pyruvate after a 30 min incubation with SLC5A8-expressing cells and NIS-expressing control cells. The pyruvate content was determined by LC-MS at both pH 7.4 and 6.0 (**Figure 2B**). Notably, prior to the 30 min incubation, cells were grown in pyruvate-free culture medium for 24 hours and then washed 3 times with uptake buffer lacking added

pyruvate. We observed a significant increase in the release of endogenous pyruvate from the cells into the extracellular buffer (3-fold) at pH 7.4 compared with pH 6.0. This finding was expected for MCT-mediated efflux.

### A Intracellular pyruvate content (LC-MS)



### B Extracellular pyruvate content (LC-MS)



**Figure 2: hSLC5A8 regulates a pyruvate re-entry system due to leakage of pyruvate into the extracellular space.**

The intracellular pyruvate level was assessed using LC-MS 30 minutes after cells were incubated with pyruvate-free buffer in the presence of sodium or NMDG (n=8) (A). Pyruvate leakage was assessed using LCMS ([M-H]<sup>-</sup>: 87.0073) by measuring extracellular levels in the media after cells had been incubated with pyruvate-free buffer for 30 min (n=4) (B). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. † The pyruvate level in control cells cultured at pH 6.0 was considered the reference value for normalization.

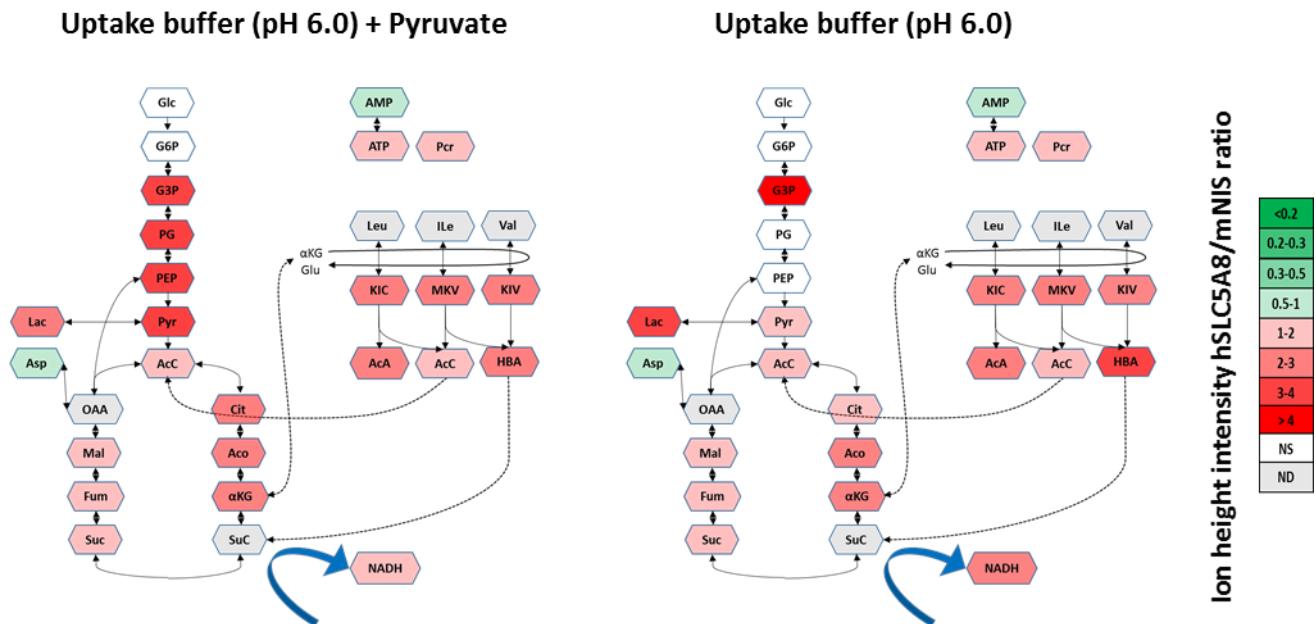
***Metabolic changes in SLC5A8-expressing cells incubated in uptake buffer with or without added pyruvate.***

Based on our metabolomics results, we also studied the effect of SLC5A8 expression on cell metabolism. Our experimental metabolomics procedure allows the identification of more than one thousand molecules representing metabolites involved in nearly all metabolic pathways.

**Figure 3** summarizes the most significant SLC5A8-related intracellular metabolic changes observed using untargeted metabolomics at pH 6.0 in the presence (A) and absence (B) of added pyruvate in the incubation medium (uptake buffer). The difference in the content of a given metabolite in both cell types is shown as a green/red color code. As expected, the main metabolic changes observed in SLC5A8-expressing cells compared to NIS-expressing cells were linked to glycolysis (neoglucogenesis) and the citric cycle. Pyruvate uptake (in the presence of added external pyruvate in the buffer) or re-entry (in the absence of added external pyruvate but with re-entry of the released pyruvate, see the results from the previous section) had the following consequences on these catabolism pathways: lactate production, replenishing the citric acid cycle and neoglucogenesis. A significant increase was observed in the levels of all intermediates of the citric acid cycle, suggesting that SLC5A8-mediated intracellular pyruvate entry might feed the citric acid cycle. According to this observation, the levels of NADH, which is mainly produced by the citric acid cycle, were significantly increased in SLC5A8-expressing cells. SLC5A8 expression induced an increase in the levels of branched-chain keto acids (KIC, MKV and KIV) that are linked to the increase in  $\alpha$ -ketoglutaric acid, an intermediate of the citric acid cycle and co-factor of BCKDH enzyme that catabolizes branched-chain amino acids (leucine, isoleucine and valine) into their corresponding keto acids. We also observed a decrease in aspartic acid levels in SLC5A8-expressing cells. Aspartic acid is an anaplerotic amino acid that is required to produce oxaloacetate, the last intermediate of the citric acid cycle that reacts with acetyl-CoA to form citrate when acetyl-CoA production increases.

The induction of neoglucogenesis from pyruvate was only observed when pyruvate was added to the uptake buffer, as indicated by the increased levels of the first intermediates in this metabolic pathway (phosphoenolpyruvate and phosphoglycerate). An analysis of energetic biomarkers suggested an increase in energy production by oxidative phosphorylation. The adenosine triphosphate (ATP) level was increased in SLC5A8-expressing cells and was inversely correlated with the significant decrease in adenosine monophosphate (AMP) levels. Interestingly, an unexpected metabolic change in SLCA58-expressing cells was observed in glycolysis. We observed a strong increase of the level of glyceraldehyde-3-phosphate (G3P), an intermediate of glycolysis, in SLC5A8-expressing cells. In contrast, no change in the levels of the downstream G3P substrates (glucose and glucose-6-phosphate or G6P) was evoked by SLC5A8 expression, suggesting that the increase in G3P levels is not due to increased glucose oxidation. Furthermore, no change in the levels of the upstream G3P substrates (3-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate) was observed in the absence of added pyruvate in the external buffer, suggesting that the accumulation of G3P is linked to the blockade of its catabolism by GAPDH. In support of this hypothesis, the activation of the neoglucogenesis pathway in response to the addition of pyruvate to the uptake buffer was not linked to increased G6P levels, suggesting that GAPDH inhibits this metabolic pathway.

Very few significant changes in metabolite levels were observed in the sodium-free uptake buffer, suggesting that the metabolic effects are related to the SLC5A8-mediated pyruvate uptake (with added pyruvate in the buffer) or re-entry (without added pyruvate) during the 30-minute incubation (**Supplementary data Figure 3**). Among the examined metabolites, only a very slight decrease in phosphoglycerate levels was observed under the experimental conditions in which external pyruvate was not added.



**Figure 3: Significant intracellular metabolic changes (glycolysis and citric acid cycle)**

were assessed using LC-MS 30 min after cells were incubated with buffer (pH 6.0) containing pyruvate or pyruvate-free buffer.

NS: not significant. ND: not detected. (n=8). Glc: glucose; G6P: glucose-6phosphate; G3P: glyceraldehyde-3-phosphate; PG: phosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; Pyr: pyruvate; Lac: lactate; AcC: acetyl-CoA; Cit: citrate; Aco: aconitate;  $\alpha$ KG:  $\alpha$ -ketoglutarate; SuC: succinyl-CoA; Suc: succinate; Fum: fumarate; Mal: malate; OAA: oxaloacetate; Asp: aspartate; Pcr: phosphocreatine; Leu: leucine; Ile: isoleucine; Val: valine; KIC: keto-isocaproate; MKV: methyl-ketovalerate; KIV: keto-isovalerate; HBA: hydroxybutyrate; AcA: acetoacetate; Glu: glutamate.

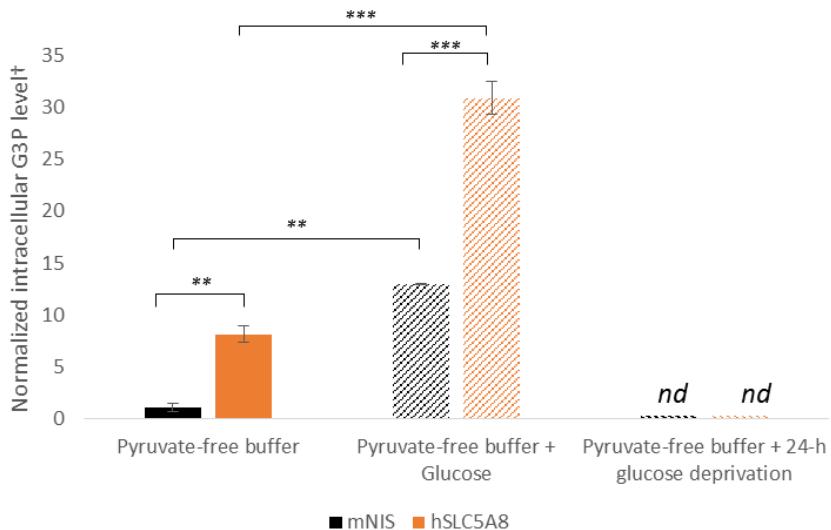
***Metabolic changes in SLC5A8-expressing cells incubated in uptake buffer with or without added glucose.***

According to our previous results, SLC5A8 substantially increases pyruvate uptake in cells incubated with uptake buffer containing added pyruvate and subsequently increases intracellular phosphoenolpyruvate (PEP) and phosphoglycerate (PG) levels (first step in the neoglucogenesis pathway). As described above, in the absence of pyruvate in the uptake buffer, both the control and SLC5A8-expressing cells released pyruvate, but SLC5A8 mediated the re-entry of pyruvate into SLC5A8-expressing cells. This re-entry of pyruvate increased the intracellular pyruvate levels but did not induce neoglucogenesis. Interestingly, the G3P level remains higher in SLC5A8-expressing cells under both conditions (with or without added pyruvate in the incubation buffer). The simplest hypothesis to explain these results is that GAPDH inhibits both metabolic pathways (glycolysis and neoglucogenesis). G3P synthesis is not affected by SLC5A8 expression in the presence or absence of pyruvate in the uptake buffer, but SLC5A8-mediated pyruvate uptake could inhibit GAPDH, which catalyzes the reaction of G3P to PG. We performed experiment in which glucose was added to the uptake buffer and on cells previously cultured without glucose for the last 24 hours before the uptake assay to investigate this hypothesis and because G3P is a glycolysis intermediate (**Figure 4**). In presence of glucose and absence of pyruvate in the uptake buffer, we observed a significant increase in G3P levels in the control or SLC5A8-expressing cells (13-fold and 4-fold, respectively) after 30 minutes, and we still obtained a similar ratio between the SLC5A8-expressing cells and control cells (more than 2-fold). This increase in G3P levels in SLCA58-expressing cells did not increase the levels of PG, the product of GAPDH. When glycolysis was inhibited by a 24-hour glucose deprivation, G3P and PG were not detected by LC-MS, indicating that G3P accumulation was not linked to another metabolic pathway. We also performed [<sup>14</sup>C]-glucose uptake assays. We did not observe any significant difference in SLC5A8-expressing cells

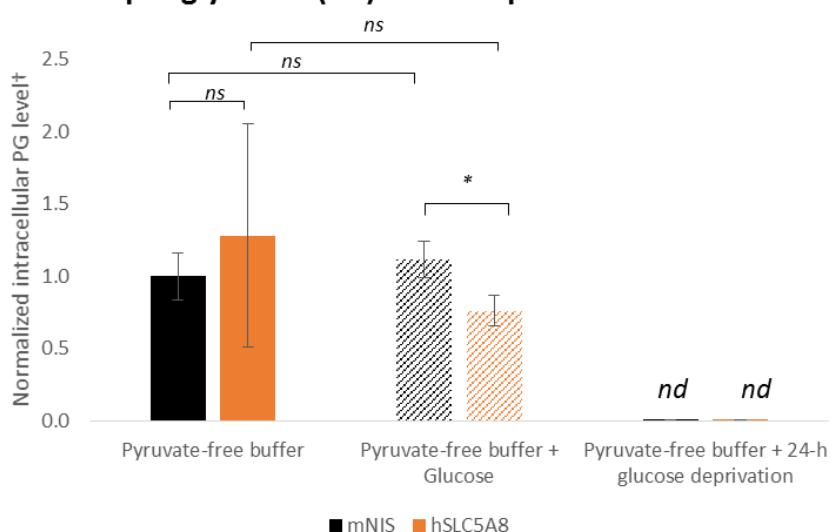
compared to that of the control cells (**Supplementary Data Figure 4**). Thus, the increase in G3P levels is not linked to an increase in glucose uptake. Based on these results, SLC5A8-mediated pyruvate uptake inhibits GAPDH through a pathway that is potentially mediated by intracellular pyruvate or its derivatives.

## Intracellular content of substrates and products of GAPDH (LC-MS).

### A Glyceraldehyde-3-phosphate (G3P): GAPDH substrate



### B 3-Phosphoglycerate (PG): GAPDH product



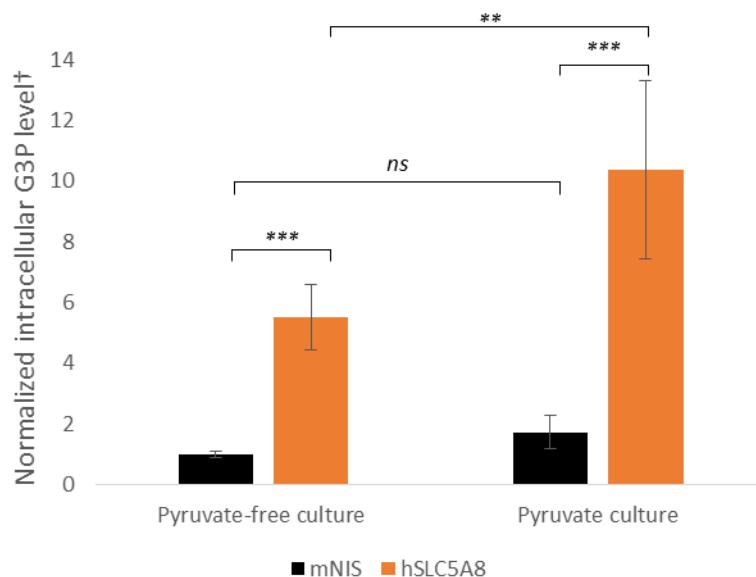
**Figure 4:** The intracellular accumulation of G3P in hSLC5A8-transfected HEK cells is due to GAPDH inhibition.

Levels of the intracellular substrate of the GAPDH enzyme (G3P) (**A**) and its product (PG) (**B**) were measured 30 min after cells had been incubated with pyruvate-free buffer (pH 6.0) under conditions that enhanced (glucose added to the buffer) or inhibited glycolysis (24-h glucose deprivation) (n=2). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. nd: not detected. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G3P: glyceraldehyde-3-phosphate; PG: 3-phosphoglycerate. † The substrate level in control cells was considered the reference value for normalization.

***Metabolic changes in SLC5A8-expressing cells cultured in media with or without pyruvate.***

Our previous experiments were performed on cells cultured in the absence of pyruvate for 24 hours before the uptake experiment. Next, we studied the potential mechanism by which pyruvate deprivation modified G3P levels. If the metabolome analysis was performed immediately after the cells were washed (without a 30 minute incubation in uptake buffer), pyruvate levels were unchanged in SLC5A8-expressing cells compared to those in control cells (data not shown), suggesting that despite the SLC5A8-mediated pyruvate uptake, MCT-mediated efflux and pyruvate metabolism compensate for this uptake. Interestingly, lower PG levels were observed in SLC5A8-expressing cells incubated in the culture media supplemented with pyruvate compared to control cells (data not shown), suggesting an inhibition of PG production. Then, we compared G3P levels after cells had been incubated with uptake buffer lacking pyruvate for 30 minutes with cells that had previously been incubated with culture media supplemented with or without pyruvate (**Figure 5**). We observed a significant increase in G3P levels in SLC5A8-expressing cells compared to control cells under both conditions. Interestingly, after a 30 minute incubation with culture media containing pyruvate, intracellular G3P levels were significantly higher than in cells cultured without pyruvate (approximately 2-fold). In control cells, we did not observe significant differences in G3P levels in cells cultured with media containing or lacking pyruvate for 24 hours. Based on these observations, SLC5A8-mediated pyruvate uptake inhibited GAPDH in cultured cells. The culture media provides many metabolic substrates for cells, and our results indicate that the levels of most of the main metabolites are tightly controlled.

### Intracellular content of a GAPDH substrate (G3P)



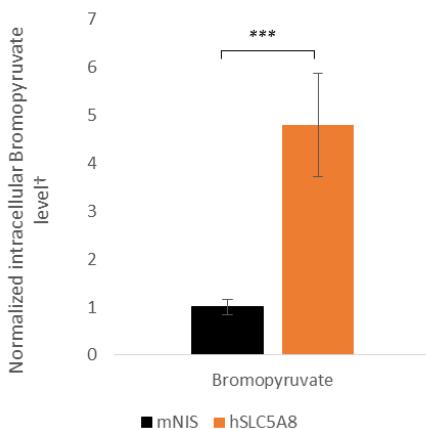
**Figure 5: GAPDH inhibition in hSLC5A8-transfected cells depends on pyruvate in the culture media.**

Modulation of G3P levels in the absence or the presence of pyruvate in the culture media (n=7). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G3P: glyceraldehyde-3-phosphate. † The G3P level in control cells was considered the reference value for normalization.

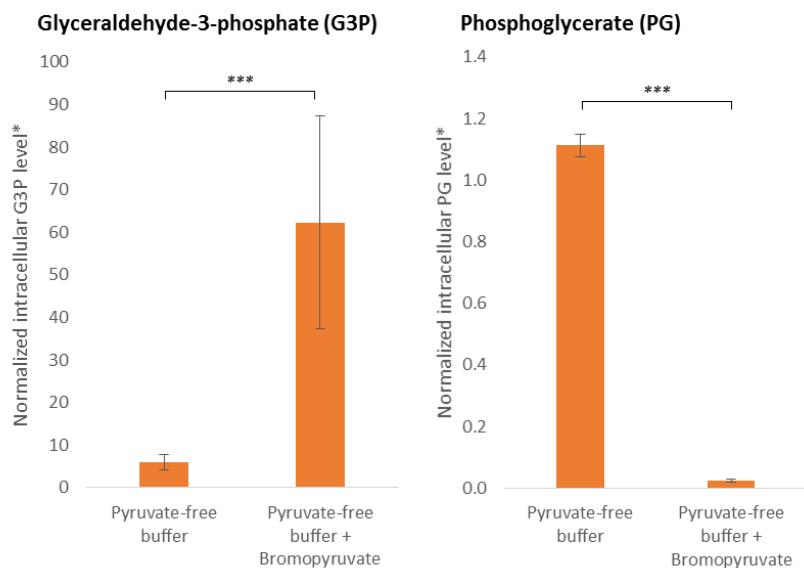
***Metabolic changes in SLC5A8-expressing cells incubated in uptake buffer with or without added 3-bromopyruvate.***

SLC5A8-mediated pyruvate uptake inhibited GAPDH; therefore, we studied SLC5A8-mediated uptake of 3-bromopyruvate, a halogenated pyruvate analogue that is a substrate of SLC5A98 and is not metabolized in the cell (**Supplementary Data Figure 5**). First, we analyzed whether SLC5A8-mediated bromopyruvate uptake was able to be measured using LC-MS. Cells were incubated with uptake buffer at pH 6 in the presence of 100  $\mu$ M bromopyruvate for 30 minutes. SLC5A8-expressing cells showed a higher intracellular level (approximately 5-fold) of this metabolite compared to that of the control cells (**Figure 6A**). This result confirmed that bromopyruvate is a SLC5A8 substrate. Then, we studied the metabolic changes evoked by bromopyruvate. For this purpose, the levels of G3P (substrate of GAPDH) and PG (product of GAPDH) were analyzed in the same bromopyruvate uptake experiments (**Figure 6B**). We observed a significant accumulation of G3P (10-fold) and strong decrease in PG levels (55-fold) when 3-bromopyruvate was added to the uptake buffer. Thus, similar to pyruvate, 3-bromopyruvate accumulates in cells through a process mediated by SCL5A8 and inhibits GADPH.

**A Uptake of non-radiolabeled bromopyruvate (LC-MS).**



**B Intracellular contents of the substrate (G3P) and product (PG) of the GAPDH enzyme in buffer containing bromopyruvate.**



**Figure 6: Bromopyruvate is a substrate of hSLC5A8 in HEK-293 cells and inhibits the GAPDH enzyme.**

Bromopyruvate uptake in HEK cells was assessed by LCMS at 30 minutes after cells had been incubated with pyruvate-free buffer containing bromopyruvate (pH 6.0). Intracellular levels of bromopyruvate are presented (n=3) (A). Intracellular levels of the substrate (G3P) and product (PG) of the GAPDH enzyme were assessed 30 min after hSLC5A8-cells had been incubated with pyruvate-free buffer in the presence and absence of bromopyruvate (pH 6.0) (n=3) (B). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. † Normalization was performed for each metabolite based on its intracellular level observed under the control condition. G3P: glyceraldehyde-3-phosphate; PG: phosphoglycerate.

## **Discussion**

This study provides new insights into the physiological function of SLC5A8 and the molecular mechanisms underlying its antiproliferative effect. SLC5A8-mediated pyruvate uptake increased intracellular pyruvate levels and subsequently reprogrammed energy production in the cell. As expected, pyruvate uptake feeds and reinforces the citric acid cycle, but unexpectedly, it inhibits a key enzyme in glycolysis. We propose that this mechanism controls the metabolism of SLC5A8-expressing epithelial cells. We also propose that the tumor suppressor effect of SLC5A8 is related to the inhibition of the glycolysis.

First, our uptake experiments using radiolabeled substrates and LC-MS analysis confirmed that SLC5A8 mediated sodium-dependent pyruvate transport (11,12). Interestingly, during a typical uptake assay, the cells released a large amount of pyruvate in the uptake medium. Unexpectedly, after a 30 minute incubation in uptake media lacking added pyruvate, a sufficient amount of pyruvate was released from the cells, allowing SLC5A8 to mediate re-uptake. In uptake assays performed at pH 7.4, an increase in intracellular pyruvate levels linked to SLC5A8 expression was observed: approximately 1.5-fold in the radiolabeled pyruvate assay and 2-fold in the LC-MS assay of the total pyruvate content. In uptake assays performed at pH 6, we observed a substantial increase in pyruvate uptake evoked by the lower pH. This steady-state increase revealed a pyruvate efflux mechanism in control and SLC5A8-expressing cells mediated by endogenous MCT (mainly MCT1 in HEK-293 cells: see comments in the results section). In SLC5A8-expressing cells, a pH-induced increase in pyruvate levels was observed in transport assays using radiolabeled pyruvate (approximately 5-fold after 5 minutes and 3-fold after 30 minutes) and LC-MS analyses (24-fold after 30 minutes). Pyruvate uptake was also increased in the control cells at pH 6 compared to the same cells cultured at pH 7.4 (approximately 2-fold for the radiolabeled pyruvate assays and 14-fold for the total pyruvate

contents). At pH 6, SLC5A8 expression evoked a sodium-dependent increase in levels of radiolabeled pyruvate (approximately 2-fold) and total pyruvate (4-fold). These ratios are slightly higher than those calculated at pH 7.4, consistent with MCT-mediated efflux in the cells. Gopal and his collaborators (12) have already observed that an acidic pH (6.5) increases monocarboxylate uptake in SLC5A8-expressing HRPE cells and to a lesser extent in control cells. The authors also used the *Xenopus laevis* oocyte expression system and studied the influence of low pH. Compared to pH 7.4 conditions, an external pH of 6.5 did not evoke an increase in the levels of the substrate-induced currents under voltage-clamp conditions. The authors proposed that a lower external pH might influence SLC5A8 function in the mammalian cell expression system but not in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. They did not explain why this effect was only observed in HRPE cells. The data presented here could explain these previously reported results. We postulate that HRPE cells exhibit a similar behavior as HEK-293 cells. Our results obtained using SLC5A8-expressing HEK-293 cells indicated that steady-state measurements of uptake combine MCT-mediated and pH-sensitive pyruvate efflux with SLC5A8-mediated pyruvate (re)uptake. This finding could explain the increased pyruvate levels observed in both control and SLC5A8-expressing HRPE cells cultured at an acidic pH. The experimental conditions of the assays using *Xenopus laevis* oocytes are very different: oocytes are perfused (perfusion buffer without or with added pyruvate) and pyruvate-induced currents are continuously monitored (that do not correspond to a steady state). Consistent with our finding that MCT-mediated efflux cooperated with SLC5A8-mediated (re)uptake in HEK-293 cells, the effect of pH on oocyte measurements linked to MCT-mediated transport is not expected with the pH-insensitive SLC5A8 protein. All these results stress the importance of performing uptake assays followed by an LC-MS analysis for transport studies of compounds that are produced or metabolized by a mammalian cell expression system and are potential substrates of endogenous transporters. More specifically for SCL5A8 studies, the importance

of endogenous transporters in monocarboxylate uptake assays of SLC5A8-expressing cells might explain the variability in the functional characteristics of SLC5A8 described in previous publications. Consistent with previous reports, SCL5A8 also mediated sodium-dependent uptake of L-lactate and nicotinic acid (B-vitamin) in uptake assays of radiolabeled compounds and LC-MS experiments in the present study (**Supplementary Data Figure 1**). Similarly, SLC5A8-mediated pyruvate uptake was also observed in HeLa cells (data not shown).

An untargeted LC-MS metabolic approach for transport assays enables the semi-quantitative detection of many compounds in the same analysis. In a typical experiment, several thousands of compounds were detected, and approximately one thousand compounds were identified using the human metabolome database. Most of the key metabolites of the main pathways were analyzed and relative changes in their cellular concentrations were determined. SLC5A8-mediated pyruvate transport in HEK-293 cells was studied using several experimental conditions: after incubation in uptake buffer with or without sodium, at pH 7.4 or pH 6, and with or without added pyruvate. Depending on the experimental conditions, the pyruvate efflux and uptake capacities were changed, and consequently, the intracellular pyruvate levels were increased or reduced. Interestingly, LC-MS analyses also allowed us to study the effects of these changes on many other metabolites. According to the LC-MS analyses, SLC5A8-mediated pyruvate uptake increased the intracellular contents of metabolites involved in energy production (**Figure 3**). SLC5A8-mediated pyruvate uptake was expected to feed the citric acid cycle.

In pyruvate-free uptake buffer, we observed an increase in levels of glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) without an increase in downstream intermediates of the glycolysis pathway, suggesting the inhibition of GAPDH, a key glycolytic enzyme regulator (**Figure 3A**). Interestingly, the reverse metabolic pathway of glycolysis, neoglucogenesis, was activated when pyruvate was

added to the uptake buffer. This metabolic pathway did not lead to glucose formation but was blocked by GAPDH, supporting the hypothesis that GAPDH was inhibited. Similar changes were also observed in SLC5A8-expressing HeLa cells (**Supplementary Data Figure 6**). Since 3-bromopyruvate (3BrPA) inhibits GAPDH (21–24) and GAPDH is pyruvalated by 3BrPA (23), we performed uptake experiments with 3BrPA to determine whether this compound induced similar effects as pyruvate on SLC5A8-expressing cells. First, our results confirmed that bromopyruvate is a substrate for SLC5A8, consistent with previous reports (22). Interestingly, under our experimental conditions, the addition of bromopyruvate to the uptake buffer increased G3P levels (10-fold) and decreased PG levels (50-fold). Based on our results, the SLC5A8-mediated increase in intracellular pyruvate levels inhibited GAPDH. The simplest hypothesis is that pyruvate directly inhibits GAPDH, but we cannot exclude the possibility that pyruvate-derived products inhibit this enzyme. Additional experiments are required to confirm this hypothesis.

SLC5A8-mediated pyruvate uptake-induced blockade of glycolysis by inhibiting GAPDH may explain the physiological function of SLC5A8 in proximal convoluted tubule. In polarized kidney cells, SLC5A8 mediates the reabsorption of monocarboxylates (lactate (25) and pyruvate (Suissa et al, in preparation)) from the primary urine. When renal cells take up a sufficient amount of pyruvate through the apical membrane, glucose use is blocked by the inhibition of the glycolysis pathway, and pyruvate is metabolized. When pyruvate concentrations in the primary urine are too low, glycolysis is not inhibited, and glucose transported from the blood through the basolateral membrane will be metabolized. Indeed, SLC5A8-mediated transport combined with glycolysis regulation allow renal cells to shift from glucose to pyruvate use.

For most cultured cells, glucose is a main metabolite required for energy production, and our finding might also explain the antiproliferative effect of SLC5A8 on cultured cells. This

antiproliferative effect was originally described by Li and his collaborators. The authors reported that in colon cancer cell lines that do not express SLC5A8, exogenous expression of SLC5A8 inhibits cell proliferation, but no significant antiproliferative effect was observed on cell lines that already expressed endogenous SLC5A8. Based on our results, we propose that the SLC5A8-evoked antiproliferative effect is related to increased intracellular pyruvate levels and subsequent inhibition of glycolysis. SLC5A8 expression should be tolerated in cells that are capable of a large monocarboxylate efflux or that readily use energetic metabolites other than glucose. Cell lines that endogenously express SLC5A8 could have acquired these features. Subsequently, Thangaraju and collaborators (16) reported that SLC5A8 expression induces apoptosis in MCF7 cells cultured in media supplemented with pyruvate. The authors proposed that SLC5A8 mediates pyruvate uptake and elevated intracellular pyruvate levels inhibit histone deacetylases (HDAC). HDAC inhibition alters the levels of several genes that induce apoptosis. As shown in the present study, SLC5A8 expression evokes a modest increase (2-fold at pH 7.4) in pyruvate levels in HEK-293 cells. Thangaraju and collaborators also reported that the intracellular pyruvate concentration in SLC5A8-expressing cells is only five times higher than that of the control cells (22). We believe that the increase in the intracellular pyruvate levels might modulate HDAC activity. However, this modest increase in the intracellular pyruvate concentration might not be the main factor that controls cell proliferation. Furthermore, a decrease in the external pH substantially increased intracellular pyruvate levels in SLC5A8-expressing cells and control cells in the present study. Consequently, acidification of the culture media should evoke a much stronger inhibition of HDACs and apoptosis than SLC5A8 expression would. Based on our results, we propose that the antiproliferative effect of SLC5A8 is most likely related to glycolysis inhibition.

Li and collaborators proposed that SLC5A8 is tumor suppressor in colon cancer. However, SLC5A8-deficient mice did not exhibit an increased probability of colon tumor formation (25).

Thus, SLC5A8 does not promote tumor formation in mice during the lifespan of the animal. Nevertheless, the number of authors reporting the silencing of the SCL5A8-encoding gene by methylation in cancers of various organs is puzzling (colon (2), colorectum (3), stomach (26), thyroid (6,27), brain (5), prostate (28), pancreas (29), head and neck (30) and blood (31)). Based on our results, we hypothesize that the tumor suppressor function of SLC5A8 is linked to the inhibition of glycolysis. More than 90 years ago, Otto Warburg described the enhanced glycolysis of cancer cells (19). Tumorigenesis depends on the reprogramming of cellular metabolism. One of the most common features of cancer cells is increases in glucose uptake and the anaerobic production of energy via glycolysis. This capacity allows cancer cells to be resistant to hypoxia. Expression of SLC5A8 in cancer cells should impair the cell survival capacity by blocking glycolysis, particularly under hypoxic conditions. Low pH and high levels of monocarboxylates are associated with hypoxic conditions when cells require the anaerobic consumption of glucose. In SCL5A8-expressing cancer cells, glycolysis was blocked by GAPDH inhibition mediated by high intracellular pyruvate contents. The importance of GAPDH in cancer cells has been highlighted in the literature because its expression is substantially upregulated in some cancers and is proposed as a target for anticancer agents (such as 3-bromopyruvate) (32,33). In contrast to the Warburg effect, our results indicate that SLC5A8 expression impairs tumor cell viability under hypoxic conditions. Therefore, we propose that pyruvate-induced GAPDH inhibition activates an anti-Warburg effect that is the main explanation for the frequent silencing of *slc5a8* expression observed in human cancer cells.

## **Conclusions**

In summary, SLC5A8-mediated pyruvate uptake inhibits GAPDH. We propose that this mechanism controls the metabolism of proximal renal cells by switching from glucose to monocarboxylate use following transport through the apical membrane of the cell. SLC5A8-mediated pyruvate uptake inhibits glycolysis and subsequently impairs the viability of cultured or cancer cells. Therefore, we propose that the tumor suppressor effect of SLC5A8 is linked to GAPDH inhibition, leading to an anti-Warburg effect.

## References

1. Rodriguez A-M, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, et al. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2002;87(7):3500-3.
2. Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, et al. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 juill 2003;100(14):8412-7.
3. Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, Park CK, Kim K-M. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* févr 2005;18(2):170-8.
4. Ganapathy V, Gopal E, Miyauchi S, Prasad PD. Biological functions of SLC5A8, a candidate tumour suppressor. *Biochem Soc Trans.* févr 2005;33(Pt 1):237-40.
5. Hong C, Maunakea A, Jun P, Bollen AW, Hodgson JG, Goldenberg DD, et al. Shared epigenetic mechanisms in human and mouse gliomas inactivate expression of the growth suppressor SLC5A8. *Cancer Res.* 1 mai 2005;65(9):3617-23.
6. Porra V, Ferraro-Peyret C, Durand C, Selmi-Ruby S, Giroud H, Berger-Dutrieux N, et al. Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2005;90(5):3028-35.
7. Paroder V, Spencer SR, Paroder M, Arango D, Schwartz S, Mariadason JM, et al. Na<sup>(+)</sup>/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 mai 2006;103(19):7270-5.

8. Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology.* mars 2007;148(3):948-53.
9. Thangaraju M, Cresci G, Itagaki S, Mellinger J, Browning DD, Berger FG, et al. Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* oct 2008;12(10):1773-81; discussion 1781-1782.
10. Coady MJ, Chang M-H, Charron FM, Plata C, Wallendorff B, Sah JF, et al. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na<sup>+</sup>-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol.* 15 juin 2004;557(Pt 3):719-31.
11. Miyauchi S, Gopal E, Fei Y-J, Ganapathy V. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+) -coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2 avr 2004;279(14):13293-6.
12. Gopal E, Fei Y-J, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P, et al. Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+) -coupled transport of lactate. *J Biol Chem.* 22 oct 2004;279(43):44522-32.
13. Ganapathy V, Thangaraju M, Gopal E, Martin PM, Itagaki S, Miyauchi S, et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J.* 2008;10(1):193-9.
14. Bhutia YD, Babu E, Ramachandran S, Yang S, Thangaraju M, Ganapathy V. SLC transporters as a novel class of tumour suppressors: identity, function and molecular mechanisms. *Biochem J.* 01 2016;473(9):1113-24.
15. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther.* janv 2009;121(1):29-40.

16. Thangaraju M, Gopal E, Martin PM, Ananth S, Smith SB, Prasad PD, et al. SLC5A8 triggers tumor cell apoptosis through pyruvate-dependent inhibition of histone deacetylases. *Cancer Res.* 15 déc 2006;66(24):11560-4.
17. Thangaraju M, Carswell KN, Prasad PD, Ganapathy V. Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J.* 1 janv 2009;417(1):379-89.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 mars 2011;144(5):646-74.
19. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 24 févr 1956;123(3191):309-14.
20. Huc-Brandt S, Marcellin D, Graslin F, Averseng O, Bellanger L, Hivin P, et al. Characterisation of the purified human sodium/iodide symporter reveals that the protein is mainly present in a dimeric form and permits the detailed study of a native C-terminal fragment. *Biochim Biophys Acta.* janv 2011;1808(1):65-77.
21. Pedersen PL. The cancer cell's « power plants » as promising therapeutic targets: an overview. *J Bioenerg Biomembr.* févr 2007;39(1):1-12.
22. Thangaraju M, Karunakaran SK, Itagaki S, Gopal E, Elangovan S, Prasad PD, et al. Transport by SLC5A8 with subsequent inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC3 underlies the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *Cancer.* 15 oct 2009;115(20):4655-66.
23. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind J-FH, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Res.* déc 2009;29(12):4909-18.

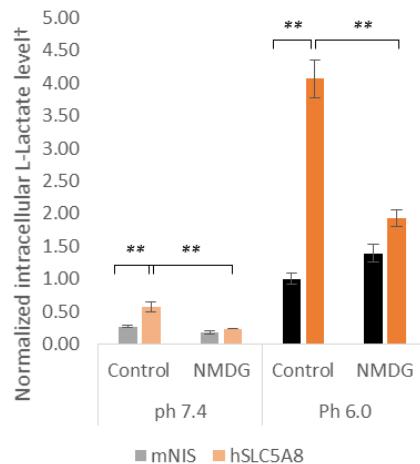
24. Ehrke E, Arend C, Dringen R. 3-bromopyruvate inhibits glycolysis, depletes cellular glutathione, and compromises the viability of cultured primary rat astrocytes. *J Neurosci Res.* juill 2015;93(7):1138-46.
25. Frank H, Gröger N, Diener M, Becker C, Braun T, Boettger T. Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *J Biol Chem.* 5 sept 2008;283(36):24729-37.
26. Ueno M, Toyota M, Akino K, Suzuki H, Kusano M, Satoh A, et al. Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* juin 2004;25(3):134-40.
27. Lacroix L, Pourcher T, Magnon C, Bellon N, Talbot M, Intaraphairot T, et al. Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters. *J Clin Endocrinol Metab.* mars 2004;89(3):1423-8.
28. Park JY, Zheng W, Kim D, Cheng JQ, Kumar N, Ahmad N, et al. Candidate tumor suppressor gene SLC5A8 is frequently down-regulated by promoter hypermethylation in prostate tumor. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(5):359-65.
29. Park JY, Helm JF, Zheng W, Ly QP, Hodul PJ, Centeno BA, et al. Silencing of the candidate tumor suppressor gene solute carrier family 5 member 8 (SLC5A8) in human pancreatic cancer. *Pancreas.* mai 2008;36(4):e32-39.
30. Bennett KL, Karpenko M, Lin M-T, Claus R, Arab K, Dyckhoff G, et al. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 15 juin 2008;68(12):4494-9.

31. Whitman SP, Hackanson B, Liyanarachchi S, Liu S, Rush LJ, Maharry K, et al. DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication. *Blood*. 1 sept 2008;112(5):2013-6.
32. Krasnov GS, Dmitriev AA, Snezhkina AV, Kudryavtseva AV. Deregulation of glycolysis in cancer: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. juin 2013;17(6):681-93.
33. Wang D, Moothart DR, Lowy DR, Qian X. The expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase associated cell cycle (GACC) genes correlates with cancer stage and poor survival in patients with solid tumors. *PloS One*. 2013;8(4):e61262.

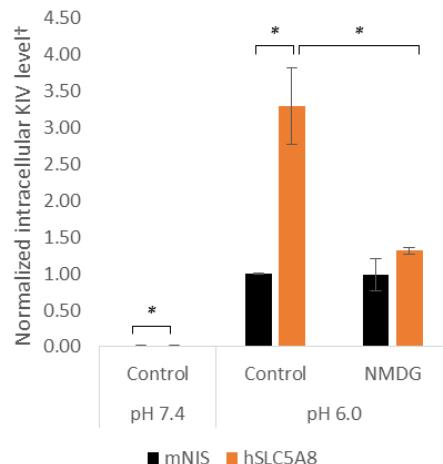
## Supplementary data

### Uptake of non-radiolabeled SLC5A8 substrates (LC-MS).

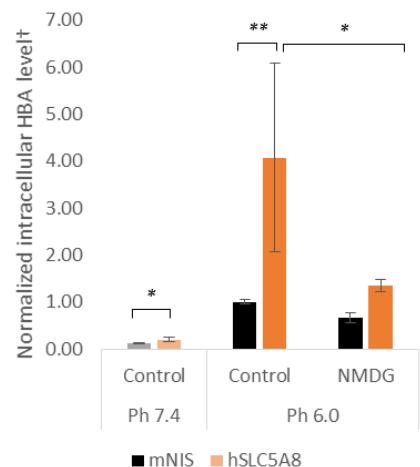
#### A L-Lactate



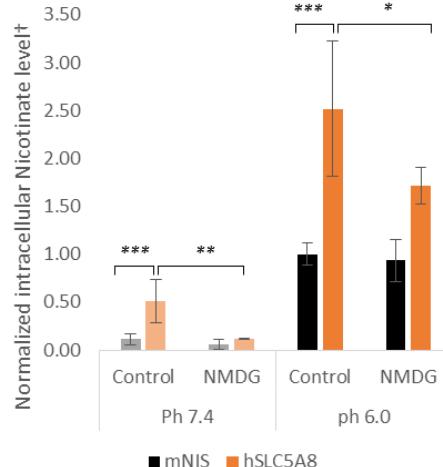
#### B Keto-isovalerate



#### C 3-Hydroxybutyrate



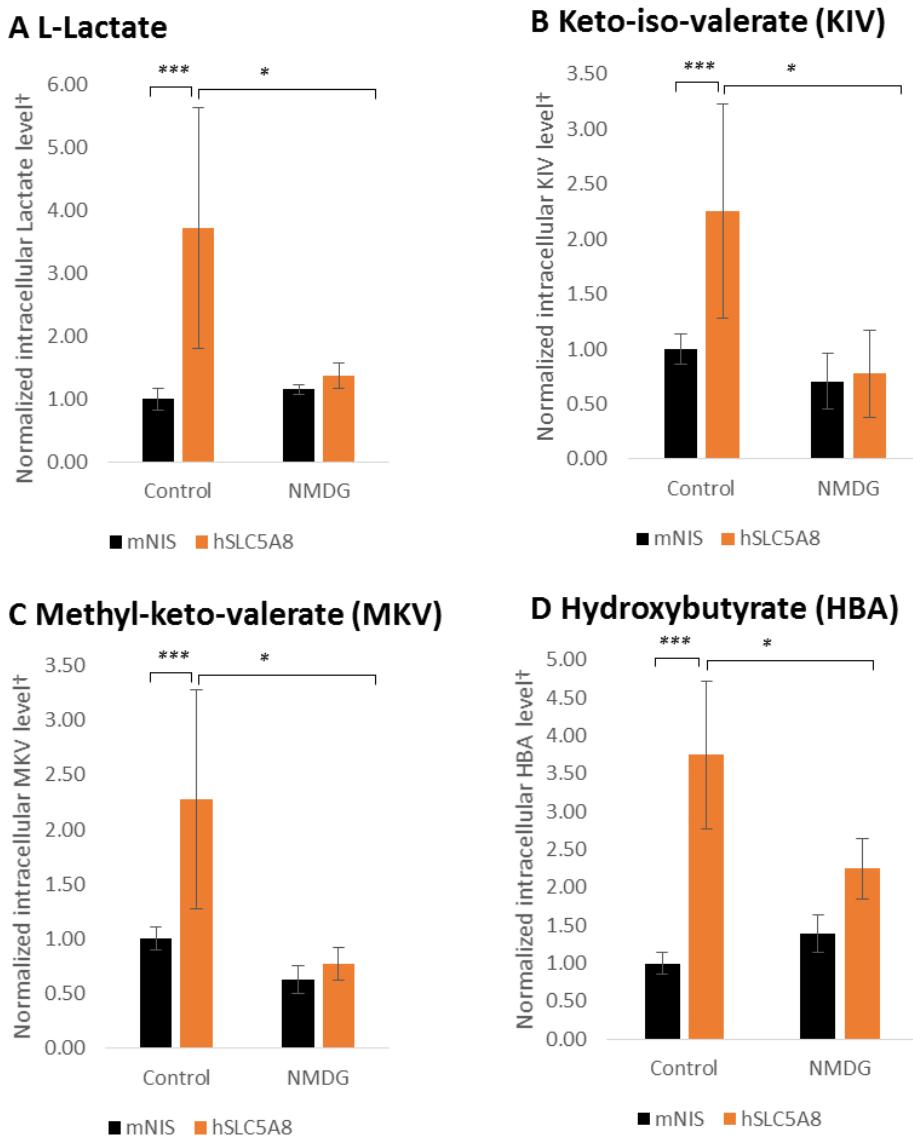
#### D Nicotinate



**SD Figure 1: hSLC5A8 mediates Na-dependent uptake of monocarboxylates in HEK-293 cells.**

Monocarboxylate uptake in HEK cells was assessed by LCMS 30 minutes after cells were incubated with neutral (pH 7.4) and acidic buffer (pH 6.0). NMDG was used to test the sodium dependence. L-Lactate ([M-H]: 89.0230) (A). Keto-iso-valerate (KIV) ([M-H]: 115.0387) (B). 3-OH-butyrat (HBA) ([M-H]: 103.0387) (C). Nicotinate ([M-H]: 122.0234) (D). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. † Levels of each substrate in control cells cultured at pH 6.0 were considered reference values for normalization.

### Intracellular monocarboxylate contents.



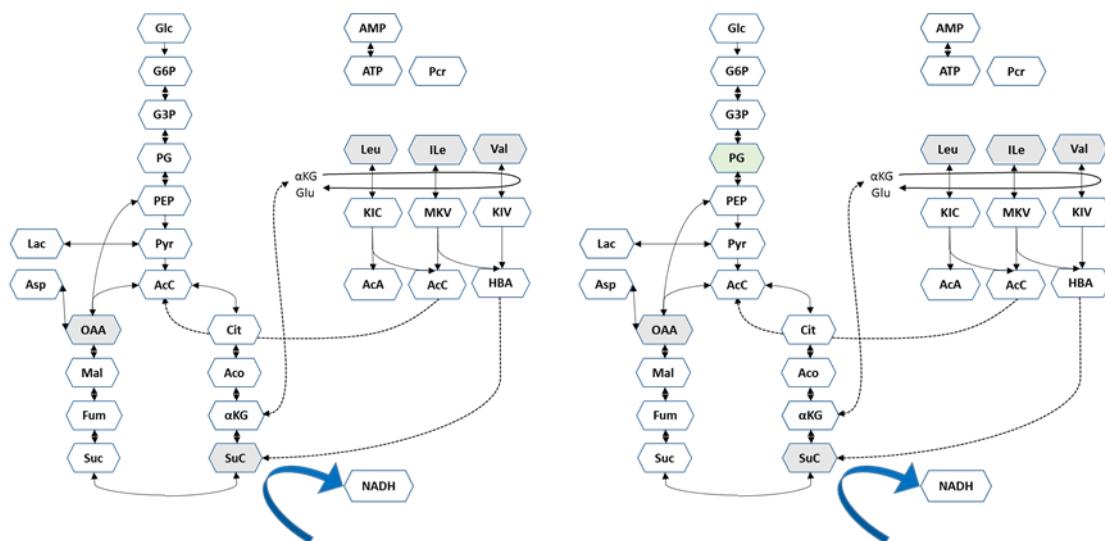
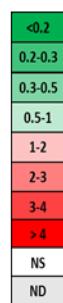
**SD Figure 2:** hSLC5A8 regulates the monocarboxylate re-entry system due to leakage of monocarboxylates into the extracellular media.

Intracellular monocarboxylate levels were measured by LCMS 30 minutes after cells had been incubated with monocarboxylate-free buffer in the presence of sodium or NMDG (n=8). L-Lactate ([M-H]: 89.0230) (A). Keto-iso-valerate (KIV) ([M-H]: 115.0387) (B). Methyl-keto-isovalerate (MKV) ([M-H]: 129.0545) (C). 3-OH-butyrate (HBA) ([M-H]: 103.0387) (D). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. † Substrate levels in control cells cultured at pH 6.0 were considered reference values for normalization.

**Uptake buffer (pH 6.0) + Pyruvate  
+ NMDG**

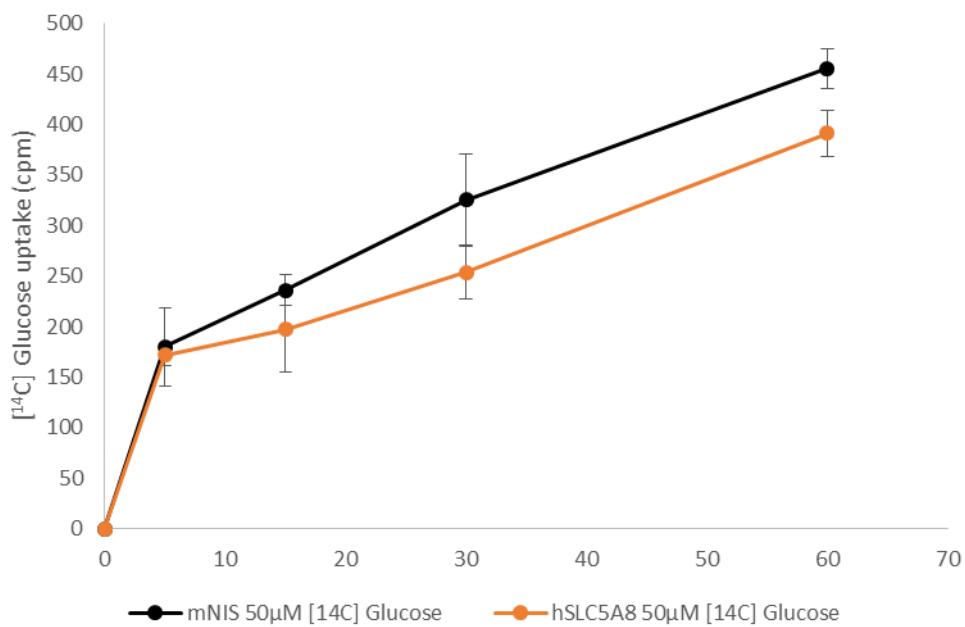
**Uptake buffer (pH 6.0)  
+ NMDG**

Ion height intensity hSLC5A8/mNIS ratio



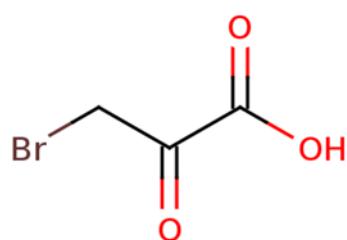
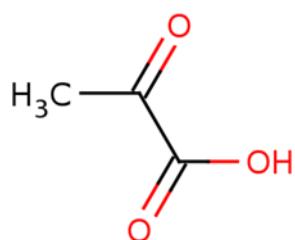
**SD Figure 3:** Significant intracellular metabolic changes (glycolysis and citric acid cycle) were assessed using LC-MS 30 min after cells were incubated with buffer (pH 6.0) containing pyruvate or pyruvate-free buffer.

NS: not significant. ND: not detected. (n=8). Glc: glucose; G6P: glucose-6phosphate; G3P: glyceraldehyde-3-phosphate; PG: phosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; Pyr: pyruvate; Lac: lactate; AcC: acetyl-CoA; Cit: citrate; Aco: aconitate; αKG:  $\alpha$ -ketoglutarate; SuC: succinyl-CoA; Suc: succinate; Fum: fumarate; Mal: malate; OAA: oxaloacetate; Asp: aspartate; Pcr: phosphocreatine; Leu: leucine; Ile: isoleucine; Val: valine; KIC: keto-isocaproate; MKV: methyl-ketovalerate; KIV: keto-isovalerate; HBA: hydroxybutyrate; AcA: acetoacetate; Glu: glutamate.



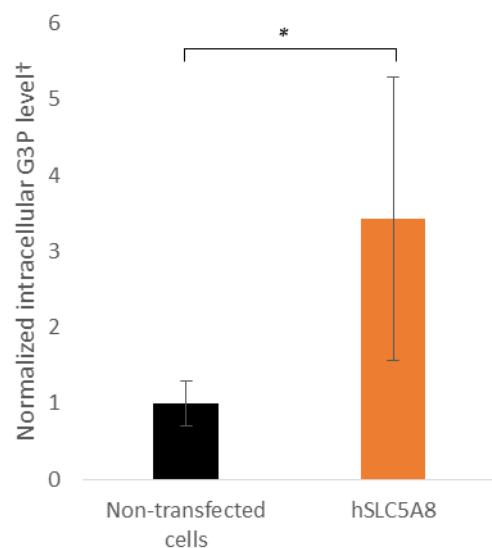
**SD Figure 4:** No difference in [<sup>14</sup>C] glucose uptake was observed in SLC5A8-transfected cells compared to control cells.

\* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.



**SD Figure 5:** Structures of pyruvate and its halogenated analog bromopyruvate.

### Intracellular content of a GAPDH substrate (G3P) (pH 6.0).



**SD Figure 6: GAPDH inhibition in hSLC5A8-transfected HeLa cells (n=2).**

\* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G3P: glyceraldehyde-3-phosphate. † The G3P level in control cells was considered the reference value for normalization.

## **ARTICLE 2**

### **Urinary ketone bodies loss is at the origin of brain white matter degeneration in elderly slc5a8-null mice.**

#### **Abstract**

SLC5A8 was found in the apical membrane of various epithelial cell types where it mediates sodium-coupled monocarboxylate transport. The protein has also been localized in neurons and a putative role in neuroenergetics due to SLC5A8-mediated active uptake of L-lactate and ketone bodies in neurons has been proposed. We used slc5a8-null mice to study the effect of the lack of slc5a8 expression in order to understand the physiological role of this protein in mouse brain. We detected alterations of the cerebral energy metabolism in the white matter of elderly slc5a8-null mice by studying brain regional metabolism with SPECT HMPAO. Elderly slc5a8-null mice suffered diffuse leucoencephalopathy characterized by intramyelinic oedema without myelin loss suggesting chronic energetic failure. Since we did not detect SLC5A8 protein in mouse brain, we hypothesized that the white matter phenotype of aging slc5a8-null mice underlies metabolic disorders caused by the lack of slc5a8 expression in a peripheral organ, i.e. for example kidney where SLC5A8 is strongly expressed in renal proximal tubules. We found hyper-excretion of the ketone  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) in the urine of SLC5A8-null mice by LC-MS analyses and showed that slc5a8-null mice suffer BHB insufficiency in the brain specifically in the white matter. We assumed that the loss of energetic substrates in the urine of SLC5A8-null mice generate chronic energetic deficiency in the brain. This hypothesis

was strengthened by the finding that SLC5A8-null mice activate ketogenic amino-acid and lipid catabolism in the brain to compensate for urinary BHB loss. In addition, we found that elderly slc5a8-null mice are insulin-resistant and consequently, present altered glucose metabolism. This further challenges cerebral energy metabolism in SLC5A8-null mice because these animals can not counterbalance glucose deficit by an increased use of the brain's main alternative fuel, BHB.

We here describe for the first time a mouse model for BHB insufficiency. The presented results, in particular the described alterations of the brain white matter found in SLC5A8-null animals underline the major roles of ketone bodies in neuroenergetics and in neuroprotection.

## **Introduction:**

SLC5A8 was first identified by our group as a protein putatively involved in iodide metabolism (1). The human gene *slc5a8*, has been associated, by Li et al. (2003), with a tumor suppressor function in colic cancer (2). In 2004, two groups reported sodium-dependent inward currents induced by various monocarboxylates under voltage-clamp conditions with SLC5A8-expressing *Xenopus laevis* oocytes (3–5). Later, it was proposed that the physiological roles of SLC5A8 are mainly those of sodium-coupled lactate absorption in the kidney and butyrate absorption in the colon (4–14). Expression of SLC5A8 was found in the apical membranes of different epithelial cell types (kidney, colon, thyroid and salivary glands). Frank et al. showed that *slc5a8*-null mice are viable, fertile and are lacking a morphological phenotype (10). The group demonstrated the role of *slc5A8* in lactate-reabsorption in the kidney, salivary glands and colon. Despite its tumor suppressor function, SLC5A8-deficient mice did not show a higher incidence of colic tumor formation (10) than control animals.

In the literature, expression of SLC5A8 in brain remains unclear. Frank et al. did not detect SLC5A8 in mouse brain whereas Martin et al. reported a neuron-specific expression and thus, proposed that SLC5A8 functions as a  $\text{Na}^+$ -coupled transporter responsible for the active uptake of L-lactate and ketone bodies in neurons (15). Recent advances in neuroenergetics demonstrated metabolic compartmentalization where astrocytes display more glycolytic activity while neurons mostly rely on oxidative pathways. Consequently, the utilization of glucose, the major energy source of the brain (16) is different in the two cell types. According to the astrocyte neuron lactate shuttle hypothesis (ANLS), glucose is mostly utilized by astrocytes that feed neurons through the release of L-lactate which is formed from the glycolysis end product pyruvate. Under normal physiological conditions, lactate is thought to be the preferred energy substrate of neurons (16–18). Ketones are also capable of fulfilling the energy

requirements of the brain and become the primary energetic fuel when the entry of glucose is impaired (19–25) as is the case in diabetes, during starvation and aging. Similar to the interaction between the astrocytes and neurons in L-lactate production and utilization, ketone bodies are also shuttled between astrocytes and neurons (26). In the neurovascular unit mainly composed of neurons, astrocytes and endothelial cells of the blood brain barrier, the transport of monocarboxylates and ketone bodies is mediated by monocarboxylate transporters (MCTs). The expression of different members of the MCT family in each cell type of the neurovascular unit allows the flux of energetic substrates not only through the blood brain barrier, but also among brain parenchyma cells (27,28). Since previous reports demonstrated that SLC5A8 is a  $\text{Na}^+$ -dependant transporter of monocarboxylates and ketone bodies (3–5,13,15) and neuronal expression of the protein has been found, Martin et al. proposed a putative role of SLC5A8 in neuroenergetic contributing to the maintenance of the energy status and function of neurons (15).

Here, we use *slc5a8*-null mice to study the effect of the lack of *slc5a8* expression in order to understand the physiological role of the protein in the brain notably during aging.

## **Materials and Methods**

### ***Generation of SLC5A8-deficient mice***

A neomycin-resistance cassette flanked by loxP sites upstream of the sixth exon and a loxP site downstream of the seventh exon was inserted into the *slc5a8* locus. Embryonic stem (ES) cells (129Sv) were electroporated under standard conditions. Clones were selected for G418 resistance. We identified homologously recombined clones and mutant mice by Southern blot with a 3' probe and a 5' probe, and by PCR. Four independent ES clones carrying the recombined allele were injected into C57BL/6 blastocysts. Chimeric males derived from two independent ES clones were bred with C57BL/6 females, and their progeny was analyzed by Southern blot. Mice homozygous for the modified *Slc5a8* locus were obtained. No obvious differences compared with parental mice were detected. Females carrying the floxed-SLC5A8 allele in a mixed C57BL6/129Sv background were next bred with a heterozygous Cre transgenic male (mixed 129Sv/FVB), leading to the deletion of the sixth and seventh exons. The progeny were genotyped and mice carrying both the Cre transgene and the *slc5a8* mutant allele were selected. First, males and females were mated to obtain mice carrying the *slc5a8* allele but lacking the Cre transgene. These males and females were then mated to obtain homozygous SLC5A8-deficient mice. All study protocols were approved by our local Committee for Animal Studies and were consistent with the National Institute of Health principles of animal laboratory care (NIH publication 86-23, revised 1995). Animals were fed a standard diet. Mice with the same mixed background were used as controls and called wild-type (WT).

### ***In vivo SPECT $^{99m}\text{Tc}$ -dl-HMPAO (hexa-méthyl-propyl-amineoxime) imaging***

SPECT (Single photon emission computed tomography) was used for *in vivo* imaging of mouse brain with the  $^{99m}\text{Tc}$ -dl-HMPAO (hexa-méthyl-propyl-amineoxime) perfusion tracer (CERESTAB<sup>TM</sup>, GE Healthcare SAS, France). The  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO injection solutions for clinical use were prepared from a commercially available kit following the manufacturer's guidelines by the radio-pharmacy of the medical center for oncology Antoine Lacassagne (Nice). Technetium pertechnetate eluate ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) was produced by a  $^{99m}\text{Tc}$ -generator at the radio-pharmacy. HMPAO is a lipophilic compound, and intravenous administration was required to obtain optimal cerebral capture of the tracer. For stability reasons, the HMPAO solution was prepared at the latest two hours prior to injection. 100 to 150 MBq in 0.25ml 0.9% NaCl was injected in the animal's caudal vein using a 29-gauge (13 × 0.33 mm) needle. The activity truly injected was calculated from the measurement of the activity in the syringe before and after injection by a dosimeter calibrated at  $^{99m}\text{Tc}$ . 30 minutes after injection, mice were anesthetized with 1.5% Isoflurane\* under respiratory monitoring before starting the imaging procedure. Imaging was performed with a semiconductor gamma camera and multi-pinhole coupled to a General Electric CT Scanner (eXplore speCZT CT120). The imaging procedure started with the tracking sequence (SCOUT) followed by the acquisition SPECT coupled to the CT scanner (Parameters of X-ray tube: 100 kV voltage, 50 mA current) for 30 minutes. Image analysis was performed using the Amide software (A Medical Image Data Examiner version 1.0.4) (29). Native values of SPECT imaging were expressed in a percentage of injected activity per volume of tissue. For this, the activity present in the animal at the time of imaging was calculated from the injected activity corrected for the period of imaging. This value was calculated with as follows: activity injected, the imaging timeframe, the decay formula radioactivity and the half-life of  $^{99m}\text{Tc}$  (6.005 hours). CT scanner imaging provides only bone information on the mouse cranial box, acquired images have been recaled with the anatomical

atlas digital brain of the adult mouse C56Bl/6 to perform measurement of radioactivity in different brain anatomical regions (30). All values obtained have been normalized and are given as a percentage of the average cerebral HMPAO uptake.

Because blood flow in the brain is tightly coupled to local brain metabolism and energy used, was used to assess regional brain metabolism.

### ***Histology***

Mice were sacrificed by cervical dislocation. Brain and kidneys were rapidly removed and fixed in 3.7% (v/v) paraformaldehyde for 24 hours prior to paraffin embedding. Slices of 4 µm were deparaffinized, rehydrated and pre-treated using automate PT link (Dako SA, Trappes, France). The slices were stained with HES (Hematoxylin 3min, Eosin 30s and Safran 15min). Luxol fast blue coloration (for 12h at 56°C) was used to visualise myelin distribution. Image acquisitions were performed by light microscopy as described for immunohistological experiments below.

Whole brains were rapidly removed from sacrificed animals and frozen in liquid nitrogen. Sections of 10 µm were prepared from frozen brains with a cryostat. Slices were placed on glass slides and stored at -20°C until used for LC-MS sample preparation. Chosen parts of the slices were carefully removed from the slide by scraping. Remaining parts were then detached from the slides with 70% methanol and collected in 1.5 ml centrifuge tubes and incubated overnight at -20°C. Samples were then centrifuged at 13 000xg for 15 min at 4°C. Supernatants were removed and dried using a SpeedVac concentrator (SVC100H, SAVANT, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Lyophilized samples were resuspended in 80 µL of a 20:80 acetonitrile-H<sub>2</sub>O mixture (HPLC grade, Merck Millipore) and stored at -20°C until use for LC-MS analysis.

### ***Immunohistochemistry***

Mouse brain sections and kidneys were fixed in 3.7% formalin (in PBS for 24hours), embedded in paraffin, and sectioned at 4 µm. Sections were deparaffinized, rehydrated and antigens retrieved (pH 6.0, 10mM Na-citrate buffer) using a PT link (Dako SA, Trappes, France). Immunostaining was performed with the Dako Autostainer (Dako SA) following the manufacturer's standardized protocol for all steps.

Antibodies : monoclonal anti-SLC5A8 antibody was obtained by immunizing mice with purified peptides corresponding to the C-terminus domain (starting from G544) of the human SLC5A8 and fusion of their splenocytes with a mouse myeloma cell line (ATCC®CRL-1580) according to standard protocols (31). Anti-SLC5A8 antibody was used at 1:200. Brain cell-specific antibodies were NeuN (1:50; Abcam), Olig2 (1:100; Abcam), GFAP (1:4000; Abcam) and Iba1 (1:500; RayBiotech). The secondary antibodies were EnVision reagents (Dako SA), and used following the manufacturer's instructions. All sections were counterstained with hematoxyline, rinsed in water, dehydrated and mounted with cover slips. Image acquisition was performed using ICS Framework software (TRIBVN, Chatillon, France) and a Nikon microscope (Nikon France Instruments, Champigny sur Marne, France) equipped with a Nikon Camera and motorized stage.

### ***Urine collection***

Male mouse littermates (three per cage) were housed collectively in a mouse metabolic cage (Techniplast, Germany) with free access to water and standard mouse chow. After adaptation to the cage for maximum 48 hours or until no weight loss was detected, urine was collected over a period of 24 hours and stored at -20°C until use.

### ***LC-MS analysis***

24-hours urine samples were mixed with 3 volumes of methanol and incubated overnight at -20°C for protein precipitation. Samples were then centrifuged at 13 000xg for 15 min at 4°C. Supernatants were removed and dried using a SpeedVac concentrator (SVC100H, SAVANT, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Lyophilized samples were resuspended in 80 µL of a 20:80 acetonitrile-H<sub>2</sub>O mixture (HPLC grade, Merck Millipore) and stored at -20°C until use for LC-MS analysis.

- ***HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)***

Chromatographic analysis was performed with the DIONEX Ultimate 3000 HPLC system coupled to a chromatographic column (Phenomenex Synergi 4 u Hydro-RP 80A 250x3.0 mm) set at 40°C and a flow rate of 0.9 mL/min. Gradients of mobile phases (Mobile phase A: 0.1% formic acid in water and Mobile phase B: 0.1% formic acid in acetonitrile) for 25 minutes of total analyse was as follow: 0 min (100% A; 0% B), 5 min (100% A; 0% B), 21 min (5% A; 95% B), 21.5 min (5% A; 95% B), 22 min (0% A; 100% B) and 25 min (0% A; 100% B).

- ***Mass Spectrometry***

MS analysis was carried out on a Thermo Scientific Exactive Plus benchtop Orbitrap mass spectrometer. The Heated Electrospray Ionization source (HESI II) was used in positive (spray voltage at 3800 V) and negative ion modes (spray voltage at 2500 V). The vaporizer temperature was 350 °C and the ion sweep gas was 1.0 units. The temperature of the ion transfer tube temperature was 300 °C. Sheath gas pressure (N2) was 60 units and the auxiliary gas pressure (N2) was 15 units. With the Exactive Plus benchtop Orbitrap mass spectrometer, generic conditions and an external mass calibration were applied. The instrument was operated in full scan mode from *m/z* 67 to *m/z* 1000. High-resolution accurate mass (HRAM) full-scans MS and top 5 MS/MS spectra were collected in a data-dependent fashion at a resolving power

of 70,000 and 35,000 at FWHM  $m/z$  200, respectively. The Stepped NCE (Normalized Collision Energy) setting was 40. The post-treatment of data was performed using the MZmine 2 version 2.31 (Boston, United States). Metabolites were identified using the Human Metabolome Database version 4.0 (HMDB).

### ***Microarrays experiments and statistical analysis***

Microarrays with mouse 24109 oligonucleotides were obtained from the Service de Génomique fonctionnelle (CEA Evry, France) as described (32). RNA was isolated with a RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) from freshly removed mouse brain tissue according to the manufacturer's protocol. Total RNA (1 $\mu$ g) was first amplified using the Amino Allyl MessageAmp II aRNA Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and then mouse aRNA (5  $\mu$ g) was reverse transcribed and indirectly labelled using the FairPlay Microarray Labelling Kit (Stratagene, Agilent Technologies, Massy, France) with amino reactive Cy3- and Cy5-dyes (CyTM Dye Post-Labelling Reactive Dye Pack, Amersham, GE Healthcare). Microarrays were scanned with GenePix 4000B (Axon Instrument Inc., Forster City, CA, USA). Cy3 and Cy5 spot fluorescence intensities were quantified after local subtraction of background noise using Genepix Pro 4.0 software (Axon Instrument Inc.). For each examined condition, four raw fluorescence result data files with gpr extension (two biological replicates and, for each, two technical replicates) were submitted to GeneSpring software 6.2 (Agilent Technologies) as follows. The data were converted to take into account the results of dyeswap reverse labelling, and then normalized using the Lowess method, applying robust locally-weighted regression to smooth the intensity-dependence of the log ratios. The normalized data were then filtered on a quality test basis. This involved selecting spots detected on a half of the microarrays with at least 70% pixels above threshold intensity (set to the median background plus two standard deviations). From these remaining spots, we selected those with fluorescence ratios

(representing condition 1 samples versus condition 2) above 1.5-fold change with pvalue  $\leq 0.05$  using a t-test statistical analysis on Genespring software and performing a Benjamini and Hochberg false discovery rate multiple testing corrections.

### ***Intra-peritoneal glucose and insulin tolerance tests***

For glucose tolerance test (GTT), mice were injected intraperitoneally with 2g glucose (Sigma) per kg of body weight in 0.9% NaCl after an overnight fast (16h). For insulin tolerance tests (ITT), mice were starved for 6h and injected with 0.75 IU/kg body weight of soluble insulin (Humulin Regular; Eli Lilly & Co., Indianapolis, Indiana, USA). Blood glucose levels were measured before ( $t=0$ ) and after glucose/insulin injection at 15, 30, 60 and 120 minutes. Glycemia was measured on venous blood samples from the tail vein using a Glucometer OneTouch Verio (LifeScan Inc., Canada).

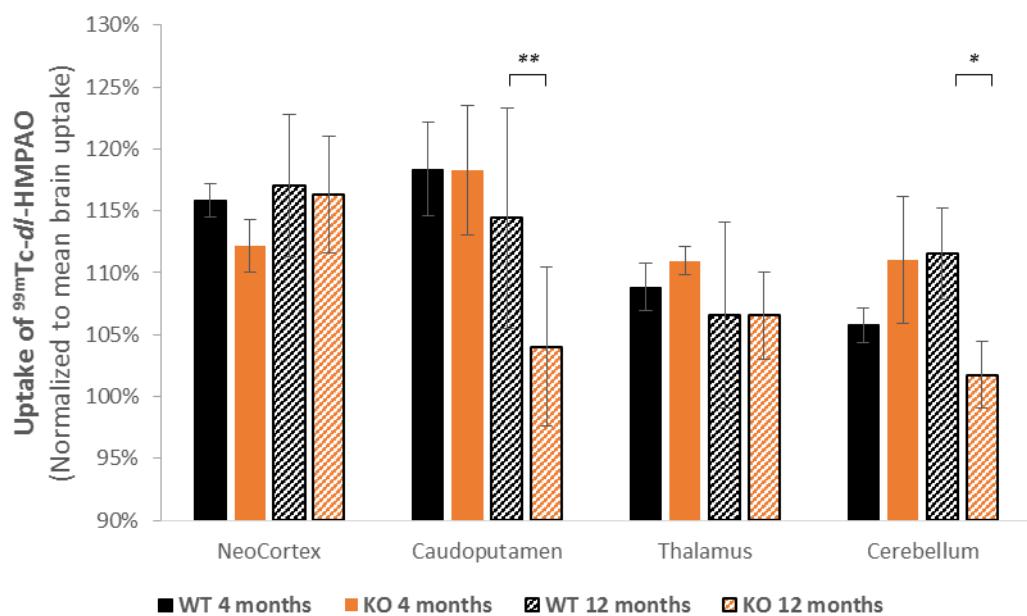
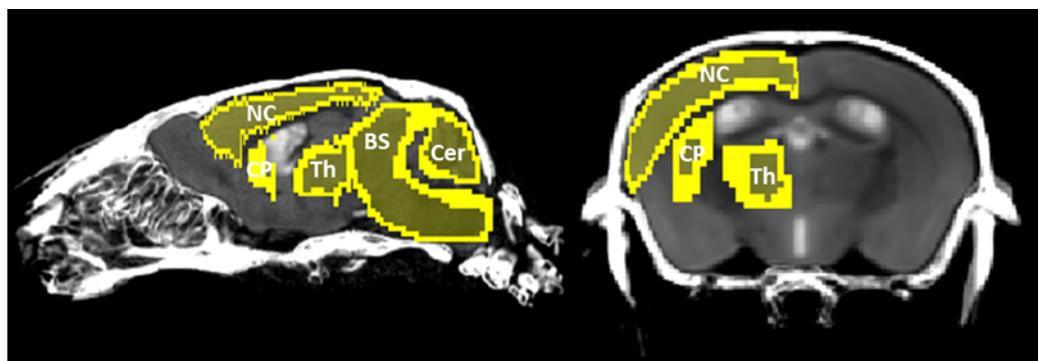
### ***Statistical analyses***

Statistical analyses were performed using Microsoft Excel software for all experiments. Results were expressed as the means  $\pm$  of the standard errors. Student's *t*-tests were used to compare different conditions. A *p* value of  $< 0.05$  was considered to be significant.

## Results

### ***In vivo SPECT imaging with $^{99m}\text{Tc-dl-HMPAO}$ (hexa-méthyl-propyl-amineoxime) with *slc5a8-null/WT* mice brain***

Brain regional metabolism was analysed by *in vivo* SPECT imaging with *slc5a8-null* mice. Because blood flow in the brain is tightly coupled to local brain metabolism and energy consumption, we used the  $^{99m}\text{Tc-dl-HMPAO}$  (hexa-méthyl-propyl-amineoxime) perfusion tracer to assess regional brain metabolism. It has to be noted that *brain*  $^{18}\text{F-FDG}$  (*Fluorodeoxyglucose*) *PET* imaging seems to be a possible alternative approach but would have allowed assessment of cerebral glucose metabolism alone. We thus analysed cerebral  $^{99m}\text{Tc-dl-HMPAO}$  (CERESTAB\*) uptake in *slc5a8-null* and wild-type mice aged 4 and 12 months, respectively by SPECT imaging.  $^{99m}\text{Tc-dl-HMPAO}$  uptake was measured in the neo-cortex, caudo-putamen, thalamus and cerebellum and normalized to the mean brain uptake (**Figure 1**). No difference in HMPAO uptake in the gray matter, represented by the neo-cortex and thalamus regions, was detected between *slc5a8-null* and control mice at both ages. In contrast, mixed brain structures containing gray and white matter like caudo-putamen and cerebellum, presented significant hypoperfusion in elderly *slc5a8-null* mice when compared to control mice at the same age (**Figure 1**). Since hypoperfusion was only found in mixed brain structures, we concluded that alterations of the cerebral energy metabolism in elderly *slc5a8-null* mice are limited to the brain white matter.



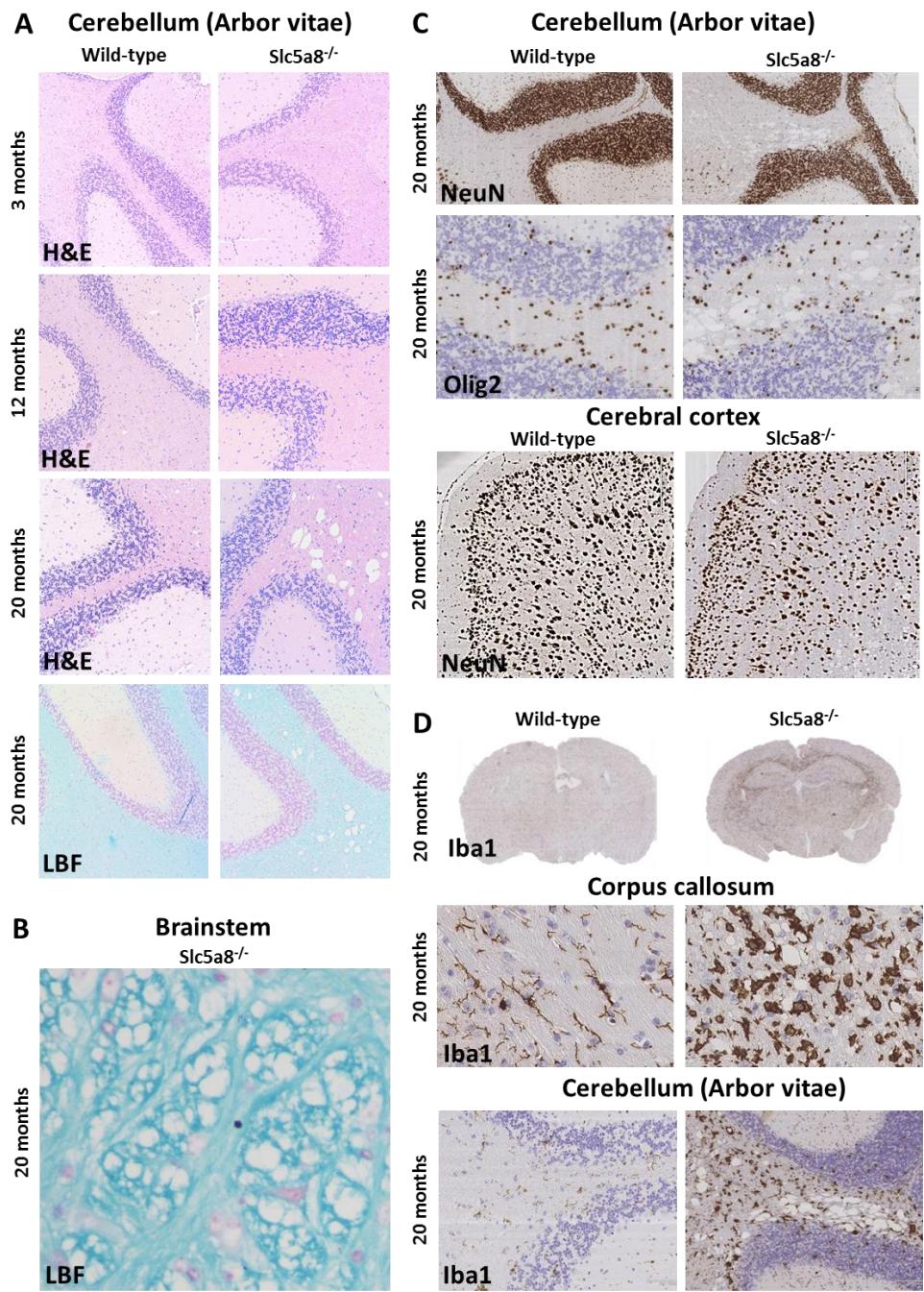
**Figure 1: Elderly slc5a8-null mice presented regional metabolism disturbances in cerebellum and caudoputamen.**  $^{99m}\text{Tc}-dl\text{-HMPAO}$  (Céréstab\*) regional distribution according to phenotype (WT/KO) and age (4/12 months). Uptake of  $^{99m}\text{Tc}-dl\text{-HMPAO}$  was normalized to mean brain uptake ( $n=4$ ).

\*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

### ***Immunohistology of sl5a8-null/WT mice brain.***

We then investigated the histological phenotype our sl5a8-null mice. Hematoxylin and eosin (H&E) staining of sagittal brain slices revealed large vacuoles with spongiform appearance throughout the white matter of arbor vitae of cerebellar of 18 months-old sl5a8-null mice. These vacuoles were not detected in brains of 18 months-old wild-type mice and both 4 months old mice, sl5a8-deficient and controls respectively (**Figure 2A**). Using luxol fast blue staining (FBL), no myelin loss was found in arbor vitae of cerebellar of all slc5a8-null mice compared to wild-type mice indicating normal myelination and myelin maintenance (**Figure 2A**). Because empty vacuoles, at high magnification, were crossed by fine luxol-stained tissue strands, we concluded that these vacuoles may be located within myelinic regions. Furthermore, myelin bundles of large fiber tracts in the brainstem of slc5a8-null mice were found to be distorted suggesting swelling in myelin sheaths (**Figure 2B**). Segmental intramyelinic oedema without myelin loss was detected in all other brain regions containing white matter (corpus callosum, internal capsule, pencils of Wilcoxon, fiber bundles of caudoputamen and brainstem). According to the intramyelinic location of vacuoles, no vacuoles were observed in the gray matter (cortical or cerebellar cortex) of these animals (**Figure 2C**). In addition, no cytoplasmic vacuoles were revealed in oligodendrocytes and neurons by immunostaining with anti-Olig2 antibodies and with anti-NeuN antibodies (**Figure 2C**). Microglia was studied by immunostaining using anti-Iba1 antibodies. In 18-month old slc5a8-null mice, iba1 positive staining revealed the activation of microglial cells characterized by an amoeboid morphology and increased cell volume. In control mice and in young null-mice, iba1 staining revealed the “resting” phenotype of microglial cells with a relatively small cellular body and long branching extensions (**Figure 2D**). Iba1 immunostaining of coronal sections of caudal-diencephalon regions showed microglial activation of white matter areas only in 18-month old slc5a8-null mice. Therefore, we concluded that elderly slc5a8-null mice present diffuse

leucoencephalopathy characterized by segmental intramyelinic oedema without myelin loss and associated to microglial activation.

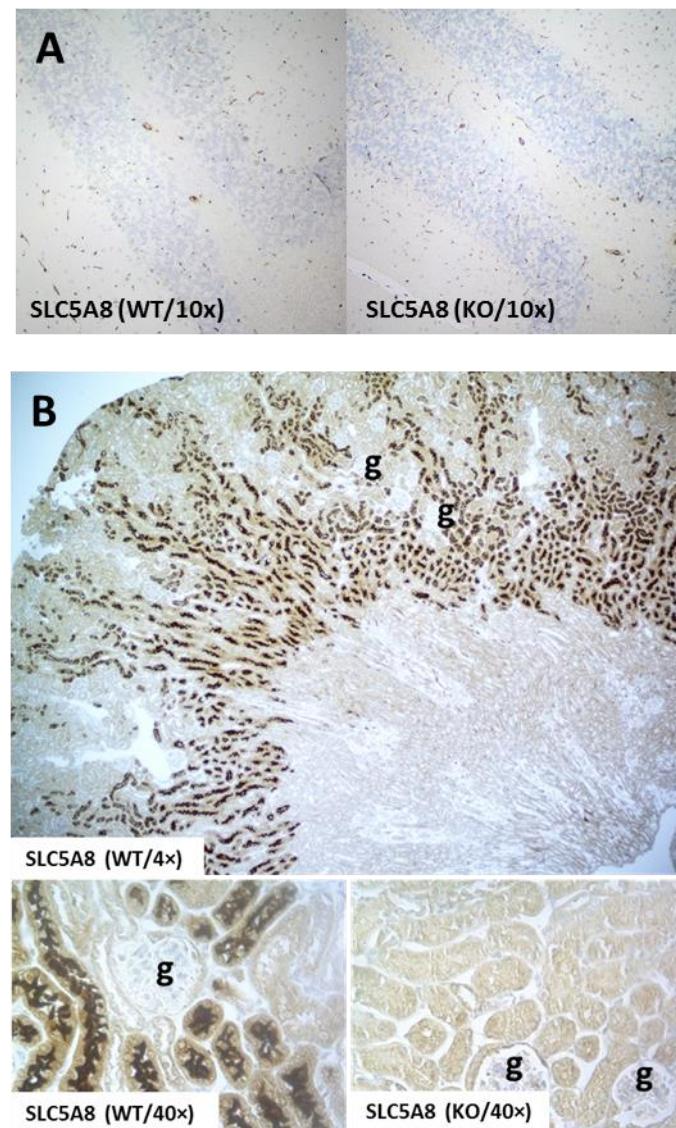


**Figure 2: Elderly slc5a8-null mice present diffuse leucoencephalopathy characterized by intramyelinic oedema without myelin loss associated with microglial activation.**

Hematoxylin and eosin staining (H&E) and luxol blue fast (LBF) of cerebellum in WT and slc5a8-null mice (optical microscopy  $\times 10$ ) (A). Intramyelinic oedema assessed by high magnificence ( $\times 40$ ) of white matter tract fibers in brainstem in KO mice using LBF staining (B). NeuN and Olig2 immunohistochemistry in cerebellum and brain cortex in elderly WT and KO mice ( $\times 10$ ) (C). Microglial activation in KO mice in corpus callosum and cerebellum assessed by immunohistochemistry ( $\times 40$ ;  $\times 10$ ) (D).

### ***Expression of SLC5A8 in wild type mice***

To further analyse SLC5A8 expression in different brain regions in wild type mice we used immunohistochemistry with an anti-SLC5A8 antibody. In our hands, no difference in SLC5A8-specific staining was detected between the brains of 3 months and 18 months old wild type animals and slc5a8 null mice at the same ages. Thus, we did not detect SLC5A8 protein in mouse brain (**Figure 3A**). In contrast, strong SLC5A8-specific staining was revealed with the same anti-SLC5A8 antibody in the kidney of 3 months old wild type mice. Staining was not detected in the kidney of 3 months old slc5a8 null mice (**Figure 3B**). According to the literature, expression of SLC5A8 protein was localized in the brush border of proximal convoluted tubules in the kidney of wild type mice.



**Figure 3:** Expression of SLC5A8 was not shown in brain, but strongly in renal proximal tubules. SLC5A8 expression was assessed by immunohistochemistry using specific SLC5A8 antiserum in WT and in *slc5a8*-null mice in cerebellar brain (**A**) and kidney (**B**) tissues. (**g**) Renal glomerulus.

### ***LC-MS analyses of 24 hours urine from slc5a8 null/WT mice.***

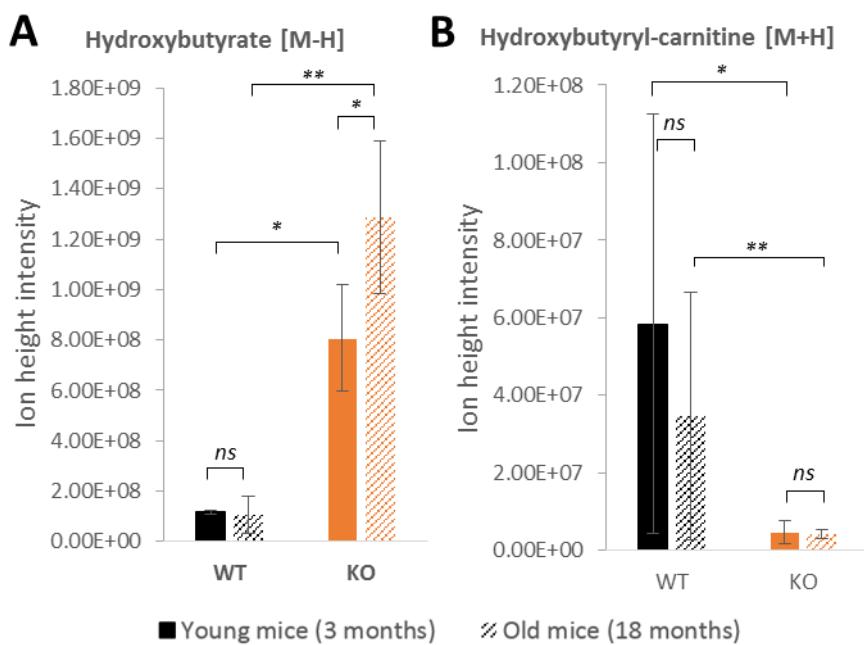
Since we did not detect SLC5A8 protein in the brain of wild-type mice, we hypothesized that the described cerebral phenotype of our slc5a8-null mice was associated to a systemic effect due to the loss of energetic fuel substrates during renal filtration. Frank et al. reported lactaturia in slc5a8-null mice but the authors found no alterations of the plasma L-lactate level in these mice compared to control animals (10). We analysed renal secretion and reabsorption of another SLC5A8 transporter substrate, the ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate. Similar to L-lactate, ketones are considered as the brain's main alternative energy source to glucose (24).

We studied the physiological role of the SLC5A8 protein in renal reabsorption through a comparison of the urinary metabolome of wild type mice to slc5a8 null mice. 24h-urines of null mice and control animals were collected and analysed by LC-MS. We found that  $\beta$ -hydroxybutyrate was significantly increased in 24h-urines of slc5a8-null mice compared to wild type mice. KO/WT ratios of this ketone body were higher for 18-months old mice (approximately 12-fold) than for 3-months old mice (approximately 7-fold) (**Figure 4A**). No differences in the urinary levels between all animals were noted for creatinine (**Supplementary Data Figure 1A**) allowing the above comparison without normalization. As described by Frank et al., we found lactaturia in slc5a8 null mice (3.5 fold) and also an increased level of pyruvate in the urine of slc5a8 null mice compared to control animals (5.7 fold) (**Supplementary Data Figure 1B**).

Hydroxybutyryl-carnitine, the ester of hydroxybutyryl and carnitine is the activated form of  $\beta$ -hydroxybutyrate. Because the level of this acyl carnitine was known correlated with systemic level of its derived short chain fatty acid, systemic consequence of  $\beta$ -hydroxybutyrate loss in slc5a8-null mice urine was apprehended by analysis of  $\beta$ -Hydroxybutyryl-carnitine. We found that the level of the acyl-carnitine form of  $\beta$ -hydroxybutyrate was highly decreased in slc5a8 null mice versus control mice in 24-hours urines suggesting systemic impact due to ketone body

loss in urine of KO mice. No significant differences in the KO/WT ratio of hydroxybutyryl-carnitine between young mice ( $\approx$ 12-fold) and old mice ( $\approx$ 8-fold) (**Figure 4B**) were found. The level of two other ketones, i.e. acetoacetate and acetone that cannot be detected by LC-MS. Acetoacetate was assessed by a semi-quantitative urinalysis reagent test (Legall method). This colorimetric test gave positive staining for high levels of acetoacetate in the urine of slc5a8 null mice while the test was negative (no staining) was obtained with the urine of WT mice. In conclusion, slc5a8 null mice showed a defect in renal reabsorption of both main ketone bodies.

## 24-hours urine metabolites (LC-MS)

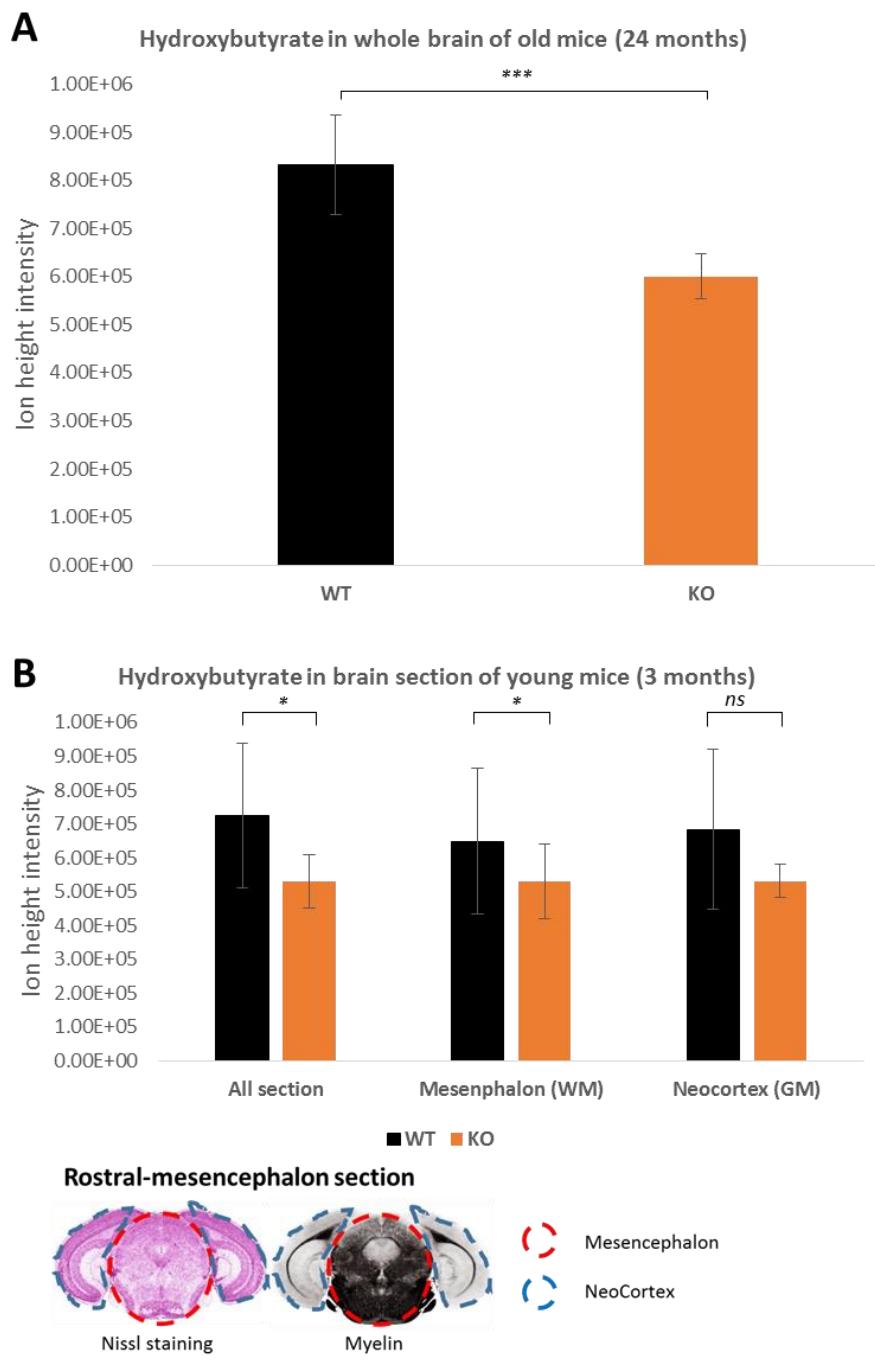


**Figure 4:** *In vivo*, *slc5a8-null* mice presented  $\beta$ -Hydroxybutyrate deficiency by renal reabsorption defect in proximal tubular tubule. Level of hydroxybutyrate [M-H] m/z: 103.0387 (A) and its carnitine acyl [M+H] m/z: 248.1492 (B) in 24-hours urine of wild type and *slc5a8*<sup>-/-</sup> mice assessed by LC-MS (n=4).

\* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

### ***LC-MS of slc5a8 null/WT mice brain.***

Since slc5a8 null mice presented strong ketonuria, we compared cerebral β-Hydroxybutyrate levels of slc5a8-null mice to WT mice using an LC-MS approach. First, we measured β-Hydroxybutyrate levels in homogenized whole brains of 24 months old mice. We found that the slc5a8-null mice brain contained 28% less β-Hydroxybutyrate than the brain of the control animals (**Figure 5A**). Second, we assessed the level of β-Hydroxybutyrate in different cerebral areas. To exclude that the above described results are due to aging, we used 6 months old mice for these experiments. We choose rostral-mesencephalon brain sections including the occipital neo-cortex (grey matter) and the mesencephalon (white matter) (**Figure 5B**). The level of β-Hydroxybutyrate was 27% lower in coronal mesencephalon sections of slc5a8-null mice than in the same brain sections of control animals. We concluded that SLC5A8 deficient mice suffer from low cerebral β-Hydroxybutyrate levels particularly in the white matter most probably due to loss of ketone bodies in the urine. This phenomenon was not a consequence/result of aging.



**Figure 5: Depletion of  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $[M-H]$  m/z: 103.0387) level in brain of slc5a8-null mice assessed by LCMS.** Measures were performed from crushed fresh brain of older mice (24 months) (n=5) (A) and from rostral-mesencephalon frozen section of young mice (3 months) (n=4) (B). Frozen section was analysed whole and after microdissection of Neocortex (Grey matter) and mesencephalon (white matter) as specified on cutting plane below. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001.

### ***Transcriptomic analyses of slc5a8-null/WT mice brain.***

In the brain, ketones are produced by ketogenic amino acid and fatty acid breakdown in astrocytes. We used transcriptomic analyses of whole brain homogenates from slc5a8 null and control mice at the age of 4 and 18 months to study the expression of genes encoding proteins that are involved in ketogenic amino-acid and lipid catabolism (33–36).

We found significant up regulation of *BCAT2*, *Aass* and *Tdo2* in slc5a8 null mice at 4 and 18 months of age. These genes encode proteins involved in the degradation of the ketogenic amino acids Leucine, Lysine and Tryptophan. *BCAT2* is encoding the mitochondrial enzyme “branched chain amino acid transaminase 2” that catalyses the first step of the leucine degradation pathway leading to the production of acetyl-CoA, acetoacetate and β-hydroxybutyrate. *Aass* stands for aminoacidate-semialdehyde synthase, a bifunctional enzyme responsible for the first two steps of the lysine degradation pathway. *Tdo2* for tryptophan 2,3-dioxygenase catalyses the first and rate-limiting step of tryptophan catabolism. The *Pts* gene product 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase is involved in the transformation of the ketogenic aminoacids phenylalanine, tyrosine and tryptophan into non-energetic degradation products. *Pts* was found to be down regulated in the slc5a8 null mice suggesting a metabolic reorientation that may allow the production of ketones from these amino acids instead of non-energetic molecules. In addition, we found up-regulation of the *LAT4* (*SLC43A2*) expression in slc5a8-null mice but this finding was limited to 18 months old animals. Interestingly, the *LAT4* gene encodes a member of the amino acid transporter-3 family (SLC43). The protein mediates transport of branched-chain amino-acid including leucine. Taken together, these results show enhanced transcription of genes encoding proteins that are involved in ketogenic amino-acid catabolism and transport in the brain of slc5a8 deficient mice. This finding suggests increased ketogenic amino acid catabolism and ketone production in the brain of these animals that may serve to compensate for urinary ketone loss.

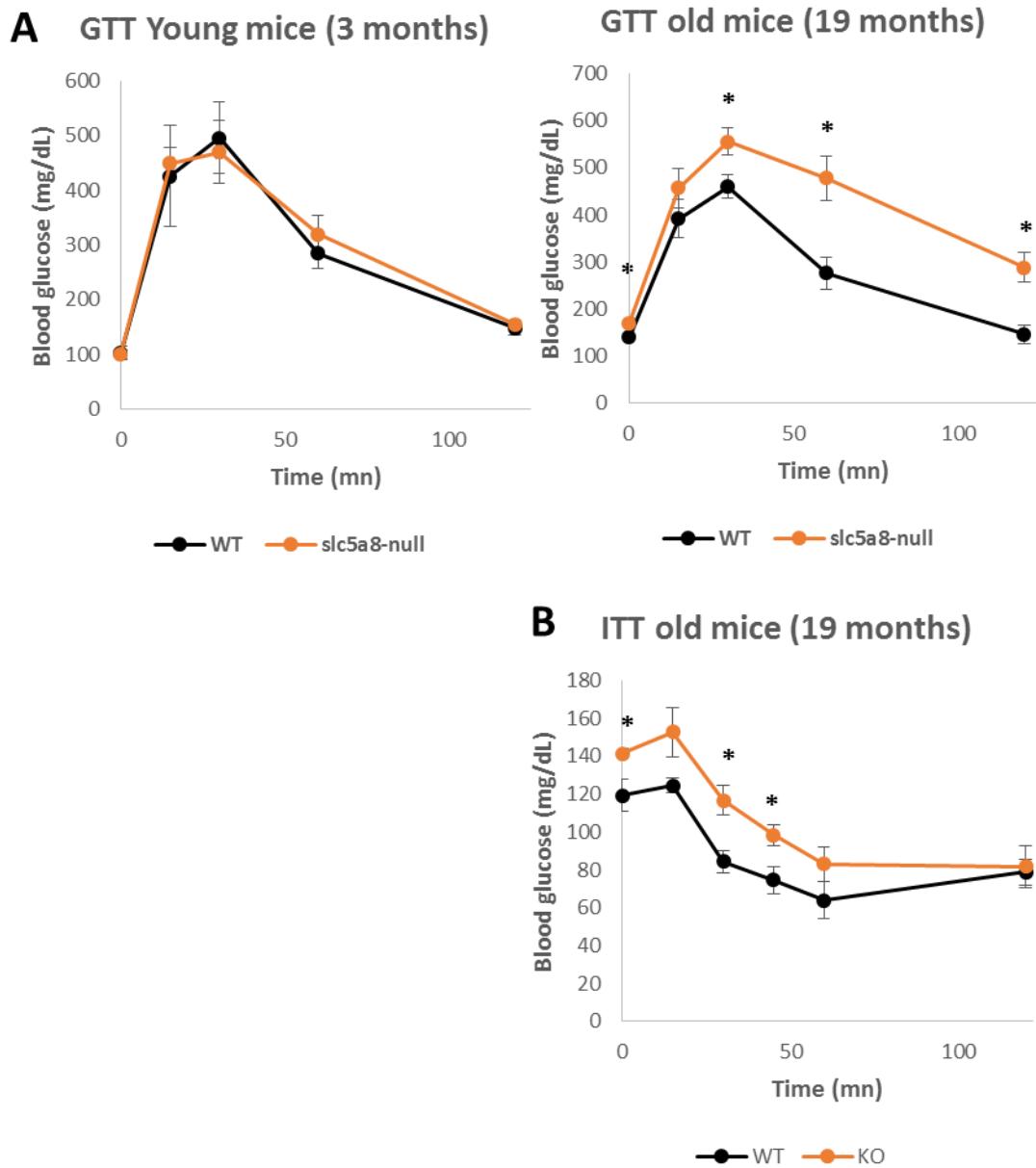
Phospholipase A<sub>2</sub> (*Pla2g4e*) gene transcripts were observed to be up-regulated in the brain of slc5a8-null mice of both ages when compared to the brain of the corresponding control mice. Phospholipase A<sub>2</sub> found in brain was associated to the cPLA<sub>2</sub>-sphingomyelinase pathway in which brain lipids are utilized to generate fatty acids. In astrocytes fatty acids are converted into ketone bodies to fulfil energy needs of neurons (36). In 18 months old slc5a8-null mice the level of transcripts from two other genes encoding lipolytic enzymes, phospholipase C (*Plcd4*) and phospholipase D2 (*Pld2*) were also up regulated when compared to control mice.

We thus concluded that slc5a8-null mice activated ketogenic amino-acid and lipid catabolism as an adaptive compensatory response to the β-Hydroxybutyrate deficiency in brain. As would be expected, this compensatory mechanism intensified in the aging brain.

In addition, we detected enhanced levels of *Fxyd2* gene transcripts coding for an auxiliary subunit of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in slc5a8-null elderly mice. FXYD2 proteins regulate Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by increasing the apparent affinity of the transporter for ATP while decreasing its Na<sup>+</sup>-affinity. Increased expression of the *Fxyd2* gene occurs to maintain the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-gradient across the plasma membrane when ATP production is low (37). This finding is in accordance with our hypothesis that slc5a8-null mice are confronted with difficulties to meet energy demands of the brain particularly during aging.

### ***Glucose and insulin tolerance tests (GTT/ITT) with young and elderly slc5a8-null/WT mice.***

We previously showed that slc5a8-null mice present white matter degeneration in the aging brain that is most probably linked to ketone body deficiency. The principal reason why ketone bodies become the primary energy source in the brain is an impaired entry of glucose into brain cells as is the case for example during prolonged starvation or diabetes. Our animals had free access to drinking water and food, and did not suffer starvation. We therefore assessed glucose metabolism performing glucose tolerance tests (GTT) with 3 months and 18 months old slc5a8-null and control mice. GTT with young slc5a8-null and control mice did not reveal any glucose metabolism disorder in these animals. On the contrary, aged slc5a8-null mice presented significantly higher ( $170.3 \pm 11.1$  mg/dl) overnight fasting capillary glycaemia than control mice ( $139.6 \pm 6.1$  mg/dl). GTT with aged slc5a8-null mice revealed that blood glucose level after intra-peritoneal glucose injection was significantly upper than control suggesting glucose intolerance (**Figure 6A**). We then performed ITT in slc5a8-null mice presenting glucose intolerance with the same animals. ITT is an appropriated method for quantifying insulin resistance that may be at the origin of the detected glucose intolerance in slc5a8-null mice. Our results showed that the decay rate of capillary glycaemia was significantly lower in elderly slc5a8-null mice leading us to the conclusion that these mice presented glucose intolerance due to insulin resistance (**Figure 6B**).



**Figure 6: Elderly slc5a8-null mice presented insulino-resistance.** Glucose intolerance in elderly slc5a8-null mice assessed by GTT protocol ( $n=5$ ) (A). Because elderly slc5a8-null mice presented glucose intolerance, ITT protocol was performed ( $n=6$ ) (B).

\*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

## **Discussion:**

We here report for the first time that slc5a8-null mice present ketone body deficiency due to a renal ketone reabsorption defect. Ketone bodies are an alternative energy source for the brain, particularly when glucose supply is impaired. Our studies showed that aging slc5a8-null mice present brain white matter lesions. This cerebral phenotype is most probably due to a chronic energy defect caused by ketone deficiency and glucose intolerance. This report also highlights the major role of ketones in the fields of neuroenergetics and neuroprotection.

Elderly slc5a8-null mice show diffuse leucoencephalopathy characterized by intramyelinic oedema without myelin loss associated with microglial activation. According to Van Der Knaap's classification of myelin disorders, intramyelinic oedema without myelin loss but with a spongy aspect of myelin is associated to metabolic disorders or intoxication (38). Intramyelinic oedema is commonly referred to as a water/ion homeostasis disorder in periaxonal regions or between lamellae, the so called "panglial syncytium". Strong evidences revealed that alterations in the "panglial syncytium" could lead to myelin ultra-structural lesions with intramyelinic oedema in mice and human (39). For transgenic mouse knockout models for connexins 43/30, Kir 4.1, ClC2 or GlialCAM (a ClC2 chaperone) an intramyelinic oedema phenotype in brain was reported (40–44). In humans, loss-of-function mutations of ClC2, lead to megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, a disease characterized by chronic brain white matter oedema with vacuoles predominantly located within myelin sheaths (45,46). Interestingly, chronic brain hypoperfusion models also lead to segmental intramyelinic oedema in the white matter (42). In TgPAC-Notch3<sup>R169C</sup> mice, a pre-clinical mouse model of small vessel disease (SVD) named CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical infarctus and Leukoencephalopathy), early changes in white matter are

resumed to intramyelinic oedema with microglial activation (47). We observed similar changes in the white matter of our aging slc5a8-null mice to those described by Wakita *et al.* with a chronic hypoperfusion mice model obtained by permanent bilateral occlusion of common carotid arteries (48). Since brain hypoperfusion is associated to energy deficit, this finding suggests that the intramyelinic oedema and glial activation are associated to chronic energy deficiency. In a mouse model for maple syrup urinary disease (MSUD), an inherited disorder of branched-chain amino acid metabolism, vacuolisation and disruption of white matter was reported and attributed by the authors in part to cerebral long-term energy deprivation (49). For several groups, these histological lesions might be the consequences of a water/ion homeostasis defect in the “panglial syncytium” due to the failure of key ATP-dependant ion pumps (39,47,49). Our studies of brain regional metabolism by SPECT HMPAO also comforted the hypothesis that chronic energetic failure leads to intramyelinic oedema with glial activation in the white matter.

In contrast to the results of Martin *et al.* but according to reports of Frank *et al.* (10,15), we did not detect expression of SLC5A8 in mouse brain. We therefore hypothesized that the white matter phenotype of aging slc5a8-null mice underlies metabolic disorders caused by the lack of slc5a8 expression in a peripheral organ. We assumed that brain chronic energetic failure shown by prototypic histological lesions and energetic metabolism disturbances with SPECT HMPAO in the white matter of elderly slc5a8-null mice were in fact the results of the loss of energetic substrates in the urine. According to the literature, we showed that SLC5A8 is strongly expressed in kidney proximal tubule that is the major resorptive segment of the nephron (5,10). In addition, SLC5A8 is known to mediate sodium-dependant transport of monocarboxylates and ketone bodies leading us to the assumption that the renal reabsorption defect of these metabolites give rise to an energy deficiency in the brain of aging slc5a8-null mice (3–5,13,15). In vivo, LC-MS analyses of 24-hours urine confirmed lactaturia in slc5a8-null mice as

described by Frank *et al.* (10) and also revealed an increased urinary level of other monocarboxylates including pyruvate. But most interestingly, these studies showed strong hyper-excretion of the ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate in the urine of SLC5A8-deficient mice. We then turned to investigate the systemic effects of this strong  $\beta$ -hydroxybutyrate loss in particular in the brain. Interestingly, the serum levels of ketone bodies was not affected by the renal loss. However, the acyl-carnitine form of  $\beta$ -Hydroxybutyrate (i.e. hydroxybutyryl-carnitine) was found to be highly decreased in 24-hours urine of slc5a8-null mice. It has to be noted that hydroxybutyryl-carnitine is the activated form of ketone bodies allowing their entry into mitochondria and subsequent oxidation to acetyl-CoA. We therefore concluded that despite a constant serum level, the loss of  $\beta$ -hydroxybutyrate through urine in slc5a8-null mice had significant effects on its use in the energy metabolism of these animals.

Our data clearly showed that slc5a8-null mice suffer  $\beta$ -hydroxybutyrate insufficiency in the white matter (mesenphalon) while normal levels were obtained for the grey matter. This may be due to a more efficient  $\beta$ -hydroxybutyrate uptake across the blood brain barrier in cortical regions where monocarboxylate transporters (MCTs) are more abundant (35,50,51). It was shown with a human brain ischemic model that white matter is more vulnerable to energy crisis than grey matter (52). Whole-brain transcriptomic data showed that slc5a8-null mice activate degradation of ketogenic amino-acids, in particular leucine, and lipids most probably to compensate for  $\beta$ -hydroxybutyrate deficiency caused by urinary ketone loss. According to our results, it has recently been proposed by Klosinski *et al.* that lipolysis of myelin lipids in the brain is an adaptive response generating ketone bodies to fulfil the energy needs of neurons (36). The authors presented evidence that the loss of myelin sheath integrity observed only with electronic microscopy is induced by activation of the cPLA<sub>2</sub>-sphingomyelinase pathway (36). Consistently, our slc5a8-null mice presented enhanced expression of phospholipase A<sub>2</sub> in the brain indicating most likely increased lipolysis.

Despite of the permanent ketone body loss from an early age on, only aged slc5a8-null mice showed cerebral metabolism disturbances and light microscopy detectable histological lesions in the white matter. Slc5a8-null mice cannot rely on the neuroprotective function of ketone bodies in the brain. In younger animals neuroprotection may be one of the minor physiological functions of ketones and compensatory systems may account for the absence of metabolic disorders or histological alterations in the brain. During aging, the neuroprotective function of ketones becomes more important because cells are exposed to impaired glucose entry, increased oxidative stress and pro-inflammatory environment (35,36,53). Notably, we found that glucose metabolism was altered in elderly slc5a8-null mice when compared to control animals. We suggest that the glucose intolerance in elderly slc5a8-null mice in addition to permanent ketone body insufficiency leads to a chronic energy crisis in the brain of aging slc5a8-null mice. The elucidation of the molecular mechanisms underlying the glucose intolerance in elderly slc5a8-null mice needs further investigations. We propose that the insulin-resistance found in elderly slc5a8-null mice was the consequence of chronic ketogenesis induced by ketone body urinary loss as suggested in the literature (54). The neuroprotective effect of ketones was also attributed to a control of oxidative stress in brain injury mediated in part by the antioxidant glutathione (35,53). Interestingly, we found a reduced GSH/GSSH ratio in whole brain homogenates from slc5a8-null mice (5, 10 and 15 months) compared to wild-type mice indicating a situation of oxidative stress (**Supplementary Data Figure 2**). To date we can only speculate that the permanent urinary ketone loss induces oxidative stress in the brain of slc5a8-null mice from an early age on.

## **Conclusions**

In summary, we describe for the first time a mouse model for ketone body insufficiency. The presented results, in particular the alterations of the brain white matter found in these animals underline the major roles of ketones as alternative energy substrates and in neuroprotection when glucose metabolism is impaired due to insulin resistance and aging. At present, studies of the physiological roles of ketones are limited to the use of animal injury models or to cases of human traumatic, ischemic or neurodegenerative diseases with the application of various ketone administration protocols or ketogenic diets (35). We here provide a new mouse model with permanent ketone deficiency that should be very useful for the development of neuroprotective agents in the case of brain injury or aging.

## References

1. Rodriguez A-M, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, et al. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2002;87(7):3500-3.
2. Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, et al. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 juill 2003;100(14):8412-7.
3. Coady MJ, Chang M-H, Charron FM, Plata C, Wallendorff B, Sah JF, et al. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na<sup>+</sup>-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol.* 15 juin 2004;557(Pt 3):719-31.
4. Miyauchi S, Gopal E, Fei Y-J, Ganapathy V. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2 avr 2004;279(14):13293-6.
5. Gopal E, Fei Y-J, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P, et al. Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+)-coupled transport of lactate. *J Biol Chem.* 22 oct 2004;279(43):44522-32.
6. Gupta N, Martin PM, Prasad PD, Ganapathy V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sci.* 18 avr 2006;78(21):2419-25.
7. Thangaraju M, Cresci G, Itagaki S, Mellinger J, Browning DD, Berger FG, et al. Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance

to colon cancer. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* oct 2008;12(10):1773-81; discussion 1781-1782.

8. Brim H, Kumar K, Nazarian J, Hathout Y, Jafarian A, Lee E, et al. SLC5A8 gene, a transporter of butyrate: a gut flora metabolite, is frequently methylated in African American colon adenomas. *PloS One.* 2011;6(6):e20216.
9. Gurav A, Sivaprakasam S, Bhutia YD, Boettger T, Singh N, Ganapathy V. Slc5a8, a Na<sup>+</sup>-coupled high-affinity transporter for short-chain fatty acids, is a conditional tumour suppressor in colon that protects against colitis and colon cancer under low-fibre dietary conditions. *Biochem J.* 15 juill 2015;469(2):267-78.
10. Frank H, Gröger N, Diener M, Becker C, Braun T, Boettger T. Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *J Biol Chem.* 5 sept 2008;283(36):24729-37.
11. Takebe K, Nio J, Morimatsu M, Karaki S-I, Kuwahara A, Kato I, et al. Histochemical demonstration of a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids (slc5a8) in the intestine and kidney of the mouse. *Biomed Res Tokyo Jpn.* oct 2005;26(5):213-21.
12. Iwanaga T, Takebe K, Kato I, Karaki S-I, Kuwahara A. Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8. *Biomed Res Tokyo Jpn.* oct 2006;27(5):243-54.
13. Ganapathy V, Thangaraju M, Gopal E, Martin PM, Itagaki S, Miyauchi S, et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J.* 2008;10(1):193-9.

14. Yanase H, Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T. Cellular expression of a sodium-dependent monocarboxylate transporter (Slc5a8) and the MCT family in the mouse kidney. *Histochem Cell Biol.* nov 2008;130(5):957-66.
15. Martin PM, Gopal E, Ananth S, Zhuang L, Itagaki S, Prasad BM, et al. Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na<sup>+</sup>-coupled transporter for active uptake of L-lactate and ketone bodies in the brain. *J Neurochem.* juill 2006;98(1):279-88.
16. Pellerin L, Magistretti PJ. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry.* févr 2004;10(1):53-62.
17. Pellerin L. How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol.* août 2005;32(1):59-72.
18. Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* juill 2012;32(7):1152-66.
19. Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem J.* mars 1971;122(1):13-8.
20. Hawkins RA, Mans AM, Davis DW. Regional ketone body utilization by rat brain in starvation and diabetes. *Am J Physiol.* févr 1986;250(2 Pt 1):E169-178.
21. Gjedde A, Crone C. Induction processes in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation. *Am J Physiol.* nov 1975;229(5):1165-9.
22. Andersen JV, Christensen SK, Nissen JD, Waagepetersen HS. Improved cerebral energetics and ketone body metabolism in db/db mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* mars 2017;37(3):1137-47.
23. Courchesne-Loyer A, Croteau E, Castellano C-A, St-Pierre V, Hennebelle M, Cunnane SC. Inverse relationship between brain glucose and ketone metabolism in adults during short-

term moderate dietary ketosis: A dual tracer quantitative positron emission tomography study.  
J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. juill 2017;37(7):2485-93.

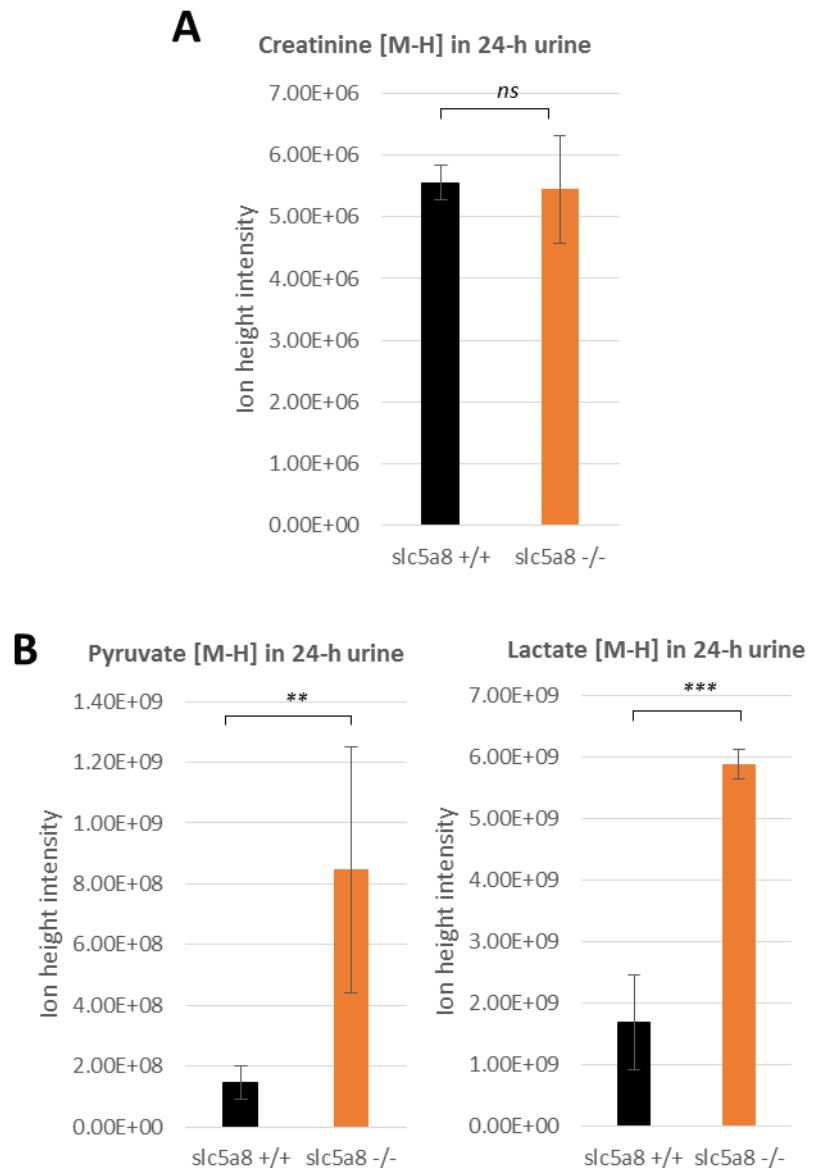
24. Cunnane SC, Courchesne-Loyer A, Vandenberghe C, St-Pierre V, Fortier M, Hennebelle M, et al. Can Ketones Help Rescue Brain Fuel Supply in Later Life? Implications for Cognitive Health during Aging and the Treatment of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:53.
25. Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, Tremblay S, et al. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. janv 2011;27(1):3-20.
26. Guzmán M, Blázquez C. Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. mars 2004;70(3):287-92.
27. Pellerin L, Bergersen LH, Halestrap AP, Pierre K. Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res*. 1 janv 2005;79(1-2):55-64.
28. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem*. juill 2005;94(1):1-14.
29. Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Mol Imaging*. juill 2003;2(3):131-7.
30. Li X, Aggarwal M, Hsu J, Jiang H, Mori S. AtlasGuide: software for stereotaxic guidance using 3D CT/MRI hybrid atlases of developing mouse brains. *J Neurosci Methods*. 30 oct 2013;220(1):75-84.
31. de StGroth SF, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods*. 1980;35(1-2):1-21.

32. Le Brigand K, Russell R, Moreilhon C, Rouillard J-M, Jost B, Amiot F, et al. An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res.* 19 juill 2006;34(12):e87.
33. Auestad N, Korsak RA, Morrow JW, Edmond J. Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem.* avr 1991;56(4):1376-86.
34. Bixel MG, Hamprecht B. Generation of ketone bodies from leucine by cultured astroglial cells. *J Neurochem.* déc 1995;65(6):2450-61.
35. White H, Venkatesh B. Clinical review: ketones and brain injury. *Crit Care Lond Engl.* 6 avr 2011;15(2):219.
36. Klosinski LP, Yao J, Yin F, Fonteh AN, Harrington MG, Christensen TA, et al. White Matter Lipids as a Ketogenic Fuel Supply in Aging Female Brain: Implications for Alzheimer's Disease. *EBioMedicine.* déc 2015;2(12):1888-904.
37. Arystarkhova E, Wetzel RK, Sweadner KJ. Distribution and oligomeric association of splice forms of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase regulatory gamma-subunit in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* mars 2002;282(3):F393-407.
38. van der Knaap MS. Magnetic resonance in childhood white-matter disorders. *Dev Med Child Neurol.* oct 2001;43(10):705-12.
39. Rash JE. Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience.* 28 juill 2010;168(4):982-1008.
40. Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1 août 2001;21(15):5429-38.

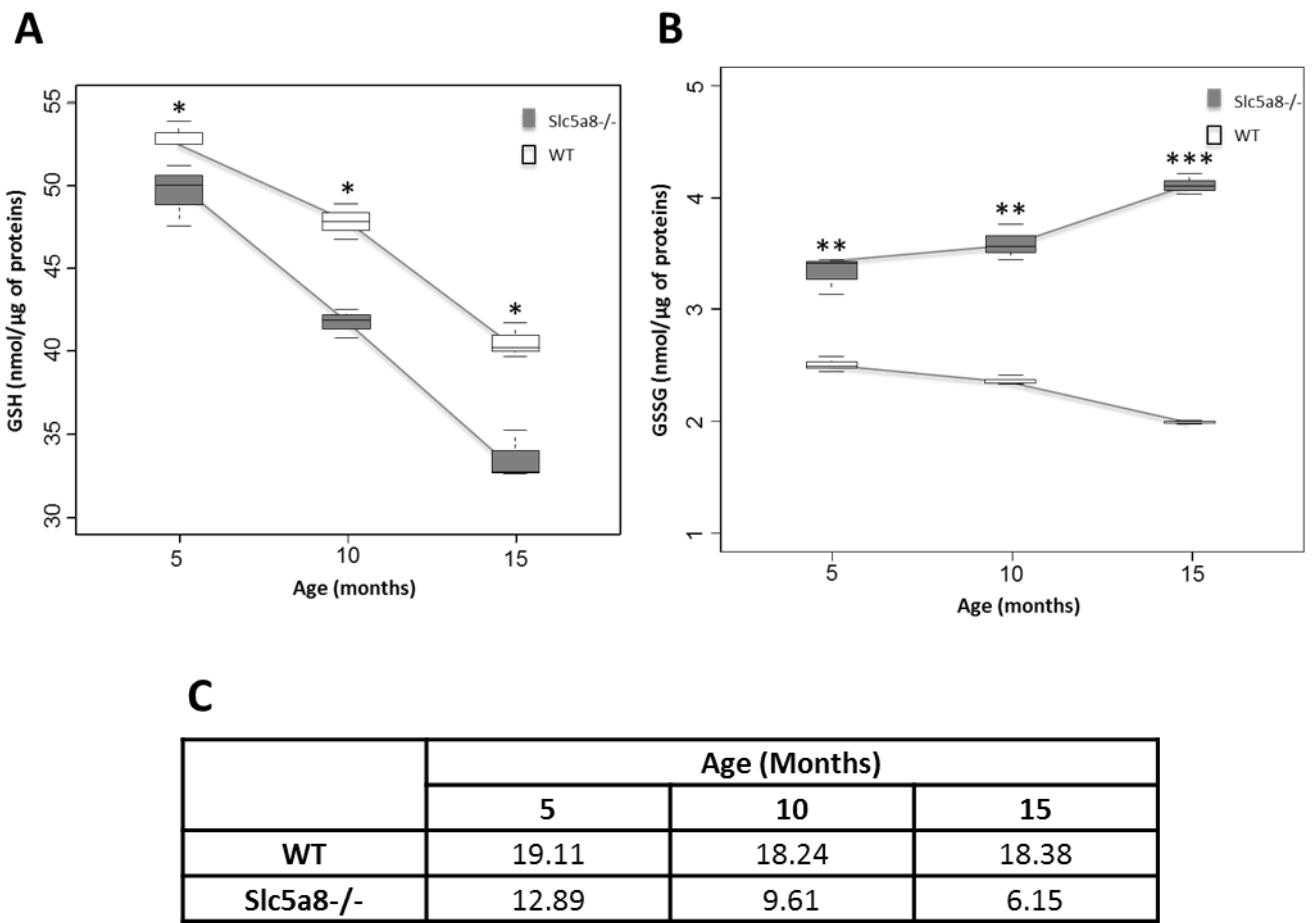
41. Lutz SE, Zhao Y, Gulinello M, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF. Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 17 juin 2009;29(24):7743-52.
42. Blanz J, Schweizer M, Auberson M, Maier H, Muenscher A, Hübner CA, et al. Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 13 juin 2007;27(24):6581-9.
43. Bugiani M, Dubey M, Breur M, Postma NL, Dekker MP, Ter Braak T, et al. Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts: the Glialcam-null mouse model. *Ann Clin Transl Neurol*. juill 2017;4(7):450-65.
44. Hoegg-Beiler MB, Sirisi S, Orozco IJ, Ferrer I, Hohensee S, Auberson M, et al. Disrupting MLC1 and GlialCAM and ClC-2 interactions in leukodystrophy entails glial chloride channel dysfunction. *Nat Commun*. 19 mars 2014;5:3475.
45. van der Knaap MS, Boor I, Estévez R. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: chronic white matter oedema due to a defect in brain ion and water homoeostasis. *Lancet Neurol*. nov 2012;11(11):973-85.
46. Depienne C, Bugiani M, Dupuits C, Galanaud D, Touitou V, Postma N, et al. Brain white matter oedema due to ClC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol*. juill 2013;12(7):659-68.
47. Cognat E, Cleophax S, Domenga-Denier V, Joutel A. Early white matter changes in CADASIL: evidence of segmental intramyelinic oedema in a pre-clinical mouse model. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 30 avr 2014 [cité 25 janv 2018];2. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4035092/>

48. Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kimura J. Glial activation and white matter changes in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1994;87(5):484-92.
49. Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K, Skvorak KJ, Paul HS, Homanics GE, et al. Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain J Neurol. avr* 2009;132(Pt 4):903-18.
50. Pierre K, Magistretti PJ, Pellerin L. MCT2 is a major neuronal monocarboxylate transporter in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. mai* 2002;22(5):586-95.
51. Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life. févr* 2012;64(2):109-19.
52. Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke. sept* 1996;27(9):1641-6; discussion 1647.
53. Gasior M, Rogawski MA, Hartman AL. Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behav Pharmacol. sept* 2006;17(5-6):431-9.
54. Ellenbroek JH, van Dijck L, Töns HA, Rabelink TJ, Carlotti F, Ballieux BEPB, et al. Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced  $\beta$ - and  $\alpha$ -cell mass but no weight loss in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab. 1 mars* 2014;306(5):E552-558.

## Supplementary Data



**Supplementary data Figure 1: Level of creatinine [M-H] m/z: 112.0503 (A), Pyruvate [M-H] m/z: 87.0073 and Lactate [M-H] m/z: 88.0230 (B) in 24-hours urine of young wild type and slc5a8<sup>-/-</sup> mice (3 months) assessed by LC-MS (n=4). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.**



**Supplementary Data Figure 2: GSH (A), GSSH (B) and GSH/GSSH ratio (C) in whole brain of slc5a8-null mice compared to WT according to age by enzymatic dosage normalized by proteins level. \* p<0.05; \*\* p<0.01.**

## CONCLUSIONS

Le travail de thèse a consisté à étudier notamment par des approches de métabolomique par LC-MS les propriétés fonctionnelles de la protéine membranaire SLC5A8, son rôle physiologique et son implication dans des pathologies au travers d'investigations *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* en mettant à profit des souris transgéniques slc5a8<sup>-/-</sup>.

L'étude *in vitro* des propriétés fonctionnelles de SLC5A8 a permis de conforter le rôle de symporteur sodium-dépendant de monocarboxylates et d'acides gras à chaîne courte par approche métabolomique ciblée par LC-MS. L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation de la métabolomique non ciblée ayant permis d'étudier de nombreux effets induit par l'expression de SLC5A8 dans son activité de transport de monocarboxylates. Cette technique, et notamment l'analyse post-traitement des données générées a fait l'objet d'une mise au point et d'un développement en début de thèse. L'utilisation de la métabolomique non ciblée par LC-MS a permis d'envisager les effets biologiques de l'absorption intracellulaire des substrats de SLC5A8. Cette protéine membranaire est à l'origine du transport intracellulaire de substrats ayant pour point commun de participer à la production d'énergie cellulaire. Le lactate et le pyruvate, produits finaux de la dégradation du glucose par la glycolyse, et les corps cétoniques sont susceptibles d'alimenter le cycle de Krebs au niveau du carrefour énergétique représenté par l'acétyl-coA shuntant ainsi la voie glycolytique. Nous avons pu également montrer qu'au-delà du shunt glycolytique, le pyruvate ou ses catabolites (lactates ou intermédiaires du cycle de Krebs) avaient pour conséquences un rétrocontrôle négatif sur la glycolyse par inhibition d'une enzyme la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Outre la fonction directe de symporteur sodium-dépendant de monocarboxylates et de corps cétoniques, l'expression membranaire de SLC5A8 a donc pour conséquence indirecte au travers des

substrats énergétiques qu'elle transporte, de shunter le métabolisme glucidique de l'hôte cellulaire. Ces résultats nous ont permis de proposer une nouvelle alternative (un effet anti-Warburg) aux mécanismes sous-jacents de la fonction de tumeur suppresseur de SLC5A8 décrits dans la littérature.

L'étude *in vivo* mettant à profit la souris transgénique slc5a8<sup>-/-</sup> a mis en exergue la fonction biologique de l'expression rénale et a permis d'identifier la souris slc5a8<sup>-/-</sup> comme modèle pertinent de déficience chronique en corps cétonique par fuite rénale. Les perspectives inhérentes à la découverte de ce modèle sont discutées plus bas.

#### A- Rôle biologique de SLC5A8 dans les cancers

L'hyperméthylation à l'origine de la diminution d'expression de SLC5A8 dans le colon est associée à de nombreux cancer solides et liquides lui valant la qualification de tumeur suppresseur (3). Dans les cancers affectant des tissus n'exprimant pas la protéine, la méthylation de son gène codant témoigne d'avantage d'une méthylation globale de l'ADN dans les cellules tumorales. Ces observations ont pour le moment été à l'origine en clinique du développement d'outils diagnostiques et pronostiques (4–23). Les mécanismes du rôle suppresseur de tumeur de slc5a8 étaient spéculatifs. Le rôle antiprolifératif de SLC5A8 a été mis en évidence *in vitro* par transfection transitoire sur lignée cellulaires cancéreuse. Ce rôle antiprolifératif a été jusqu'à présent principalement associé au rôle propre des substrats de SLC5A8, et notamment le butyrate et le pyruvate. Certains auteurs ont proposé que l'entrée de ces substrats médiée par SLC5A8, inhibiteurs des histones déacetylases (HDAC), soit à l'origine de l'effet antiprolifératif (24,25,38,40). Paradoxalement, les liens unissant l'effet antiprolifératif de SLC5A8 et le métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse a paradoxalement été peu

étudié malgré le fait que la plupart des substrats de SLC5A8 soient des métabolites énergétiques. Depuis les années 30, Otto Warburg a décrit les modifications caractéristiques du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses (43). L'inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale, caractéristique décrite par Warburg dans la cellule cancéreuse, a pour conséquence une majoration importante du flux glycolytiques pour la production d'ATP. On estime que le flux glycolytique, peu rentable en production d'ATP (2 ATP/glucose) comparé à la phosphorylation oxydative (36 ATP/glucose), est majoré d'environ 30 fois celui d'une cellule normale. Nous avons pu ainsi montrer que l'uptake ou la réentrée de pyruvate dû à l'expression transitoire de SLC5A8 avait pour conséquences un effet inhibiteur de la glycolyse au niveau de son enzyme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPH) déjà impliquée dans la régulation de la glycolyse. Ceci a été déduit par l'observation de l'accumulation du substrat (glycéraldéhyde-3-phosphate) de la GAPDH comme le fait son dérivé halogéné le bromopyruvate, utilisé comme agent thérapeutique anti-tumoral ciblant l'effet Warburg (84,85). Cette étude nous a permis de proposer une nouvelle alternative (effet anti-Warburg) quant au rôle identifié dans la littérature de tumeur suppresseur de SLC5A8.

D'autre part, nous pouvons rajouter que la baisse d'expression de SLC5A8 dans les cellules tumorales, pourrait être en adéquation avec le métabolisme tumoral non enclin à un influx de lactate intracellulaire. En effet, l'élimination cellulaire de la grande production de lactate, à la hauteur de la majoration du flux glycolytique, doit être assurée pour éviter l'acidification de la cellule tumorale et son apoptose. SLC5A8 catalyse une entrée forcée de lactate (couplage avec du sodium) peu compatible avec une sortie de lactate.

## B- Rôle physiologique de SLC5A8

SLC5A8 est une protéine membranaire exprimée dans les cellules épithéliales rénales, coliques, thyroïdiennes et des glandes salivaires. Si les conclusions sur le rôle fonctionnel dans le métabolisme basal peuvent être aisément exportées aux principales cellules épithéliales exprimant la protéine, le rôle de l'expression de SLC5A8 dans le thyrocyte reste spéculatif et fait l'objet de travaux au laboratoire. SLC5A8 est fortement exprimée dans le rein sur la membrane apicale du tubule rénal proximal (segment S2-S3) siège de la majorité des réabsorptions de métabolites dans l'urine primitive. Les conclusions sur le rôle fonctionnel rénal de SLC5A8 ont été confortées et étendues par nos travaux. Hormis la perte urinaire de lactate dans le modèle *slc5a8<sup>-/-</sup>* décrit par Frank et ses collaborateurs, notre travail a permis d'étendre le défaut de réabsorption rénal dû à la déficience de SLC5A8 à d'autres substrats du symporteur (pyruvate et corps cétonique) (76).

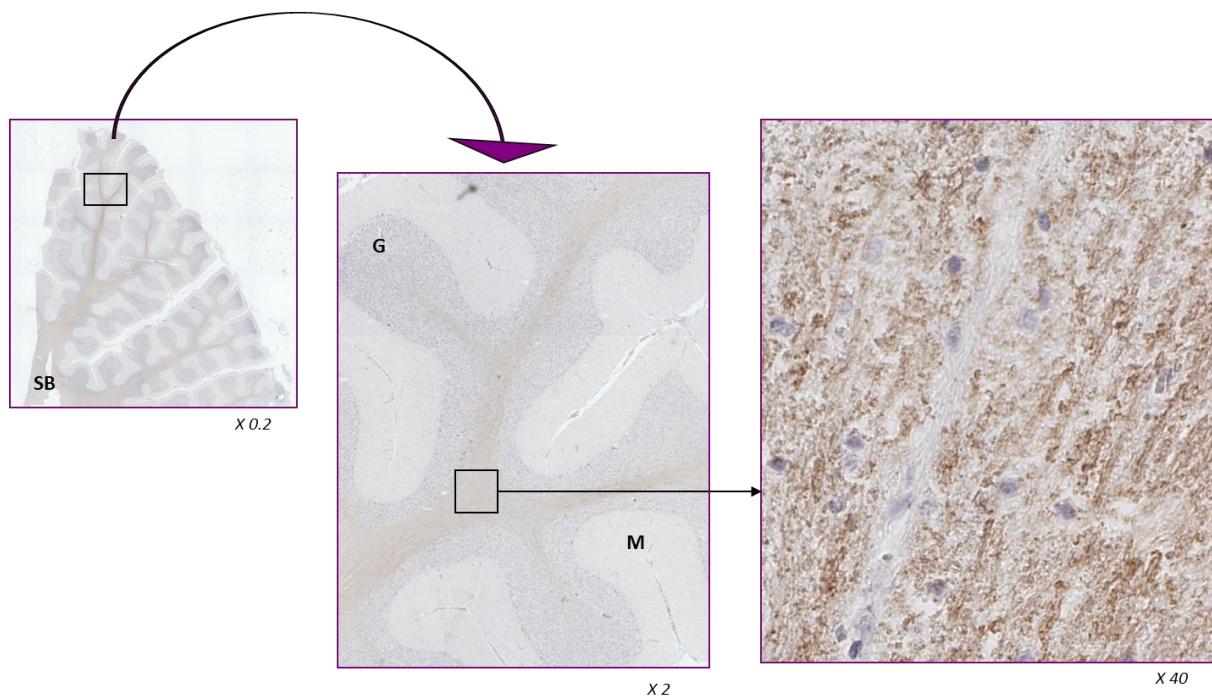
Les monocarboxylates et les corps cétoniques, métabolisables par les cellules rénales, constituent une source d'énergie pour les cellules tubulaires. L'absorption rénale est considérée comme source énergétique principale pour les cellules tubulaires rénales dont l'équipement enzymatique glycolytique est déficient. Le rétrocontrôle négatif sur l'activité glycolytique que nous avons décrit *in vitro* dans les cellules rénales HEK nous paraît s'inscrire dans cette logique. La perte de l'expression tubulaire chez les souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* n'engendre toutefois pas de conséquences fonctionnelles rénales et notamment pas de syndrome de Fanconi traduisant l'insuffisance tubulaire proximale. Nos travaux nous ont conduits à porter un intérêt particulier à la fuite urinaire des principaux corps cétoniques ( $\beta$ -hydroxybutyrate et acétoacétate). Nous avons pu démontrer, qu'à la différence des monocarboxylates, le défaut de réabsorption de  $\beta$ -hydroxybutyrate avait des conséquences systémiques. Nous avons mis en évidence une déficience en  $\beta$ -hydroxybutyrate dans le cerveau, un des seuls organes avec le rein à pouvoir

utiliser ce fuel énergétique en alternative au glucose. Nous avons conclu que *slc5a8<sup>-/-</sup>* était un modèle murin pertinent de déficience en corps cétoniques par fuites rénales. L'exploitation ultérieure de ce modèle est discutée dans la partie perspective.

Parce que *SLC5A8* a pour substrats des métabolites énergétiques essentiels à la bioénergétique cérébrale et que son expression neuronale a été envisagée chez la souris, le phénotype histologique cérébral a spécifiquement été étudié. Nous avons mis en évidence chez les souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* âgées comparées aux souris wild-type, des lésions d'œdème intra-myélinique sans démyélinisation avec activation microgliale étendues à l'ensemble de la substance blanche. Décrit dans la littérature, ce phénotype est associé à des désordres hydro-ioniques dans l'espace péri-axonal causés par des désordres énergétiques dûs à une déficience des pompes Na/K ATP dépendantes. Parce que l'expression neuronale discutée de *SLC5A8* n'a pas été confirmée dans notre étude, nous avons donc envisagé que la leucoencéphalopathie décrite soit uniquement liée à une conséquence systémique. Mais nous ne pouvons pas complètement exclure un faible niveau d'expression dans le cerveau des rongeurs avec des effets plus directs sur le contrôle du métabolisme neuronal. La déficience cérébrale en corps cétonique décrite plus haut dans notre modèle a été confortée par la démonstration en transcriptomique cérébrale de l'activation des voies de recours (catabolisme des acides aminés cétogéniques et des lipides). Les corps cétoniques constituent un carburant essentiel pour le cerveau, notamment en cas de dysfonction du métabolisme glucidique. Nous avons pu montrer en l'occurrence, qu'en deuxième partie de vie, les souris transgéniques présentaient une intolérance au glucose par insulinorésistance dans ce contexte d'insuffisance en corps cétoniques par fuite rénale. Cette étude nous a donc conduits à considérer le rôle majeur des corps cétoniques en neuro-énergétique.

Si l'expression de *SLC5A8* n'a pas été retrouvée chez la souris, des immuno-marquages réalisés au laboratoire sur cerveau humain (**Figure 21**) ont mis en évidence une expression axonale de *SLC5A8*. Ceci permet d'envisager le rôle physiologique de l'expression axonale humaine dans

le métabolisme énergétique axonal. Parce que slc5a8 est la cible fréquente de la méthylation de l'ADN avec comme conséquence la perte de l'expression de SLC5A8, la protéine pourrait être impliquée dans les maladies du vieillissement cérébral (2). Cela ouvre la voie à de nouvelles perspectives dans la compréhension des lésions de la substance blanche associées aux maladies neurodégénératives et au vieillissement.



**Figure 21: Immunomarquage SLC5A8 sur un cervelet humain (34 ans).**

## C- Perspectives

Seules les perspectives entrant dans mon champ d'application clinique neurologique sont discutées ici. Toutefois en continuité avec le travail expérimental présenté dans ce manuscrit, plusieurs études plus fondamentales sont poursuivies notamment pour analyser les inhibitions de la GAPDH, l'effet du butyrate et le rôle physiologique de SLC5A8 au niveau de la thyroïde.

Comme discuté plus haut, l'expression axonale humaine, son rôle de transporteur de substrats énergétiques (et neuroprotecteurs), et le silençage fréquent de son gène par méthylation font qualifier SLC5A8 comme un possible acteur des lésions chroniques de la substance blanche lors du vieillissement ou des maladies neurodégénératives. Cependant, l'absence d'expression cérébrale (ou sa très faible expression) chez la souris rend caduque les investigations de cette hypothèse dans ce modèle murin.

Le modèle *slc5a8<sup>-/-</sup>* offre cependant des perspectives intéressantes en terme de translation clinique. *Slc5a8<sup>-/-</sup>* peut être qualifié de premier modèle murin viable de déficience chronique en corps cétoniques par fuite rénale. Nous envisageons de mettre à profit ce modèle murin dans l'optique d'améliorer la compréhension du rôle des corps cétoniques en neuro-énergétique et son implication potentielle en neuroprotection.

Le rôle neuroprotecteur des corps cétoniques a été démontré dans la littérature sur des modèles animaux et en pathologie clinique (86). Les mécanismes de neuroprotection étudiés chez l'animal ne sont pas totalement définis. Les études chez l'animal pour démontrer le rôle neuroprotecteur des corps cétoniques et en étudier les mécanismes sous-jacents a nécessité l'administration directe de corps cétoniques ou la réalisation de diète cétogéniques chez des modèles animaux cérébro-lésés. Notre modèle offre la possibilité de démontrer un effet neuroprotecteur par le raisonnement inverse avec une déficience permanente et constante en

corps cétoniques. Cette propriété offre la possibilité d'étudier les différents mécanismes neuroprotecteurs des corps cétoniques. Les effets neuroprotecteurs des cétones sont principalement liés au contrôle du stress neuroénergétique, mais aussi à la protection contre le stress oxydatif, l'excitotoxicité glutamatergique et les dommages liés à l'inflammation dans les lésions cérébrales (32, 48). Ainsi, nous avons pu montrer que dans le contexte de vieillissement et d'insulinorésistance survenant chez les souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* âgées, la carence en corps cétonique était à l'origine d'un phénotype histologique spécifique corollaire d'une altération du métabolisme énergétique dans la substance blanche. L'effet neuroprotecteur des corps cétoniques a également été attribué à un effet antioxydant médié par le métabolisme de la glutathione. Il était intéressant de mentionner que les souris *slc5a8<sup>-/-</sup>* présentaient quel que soit l'âge dans le cerveau entier une diminution du rapport GSH/GSSH en faveur d'un stress oxydatif cérébral dans le contexte de déficience en corps cétoniques.

En pathologie humaine, le rôle neuroprotecteur des corps cétoniques a été envisagé par l'utilisation de diètes cétogènes facilement réalisable en clinique (87). Cependant, leur manipulation reste empirique. Le modèle animal s'avère particulièrement intéressant pour connaître les cibles neuroprotectrices des corps cétoniques afin de mieux cibler leur utilisation en clinique.

Par exemple, en pathologie neurovasculaire, le rôle neuroprotecteur des corps cétoniques dans l'accident vasculaire cérébral a été étudié chez l'animal (86,88–92). La translation de cette thérapeutique dans le modèle humain d'ischémie cérébrale reste très pertinente. En effet, dans l'ischémie cérébrale, les lésions cérébrales définitives sont liées à la privation sanguine de la zone vascularisée par l'artère occluse, aux conséquences liée à la cascade ischémique mais aussi aux conséquences inhérentes à la reperfusion de la zone ischémie. Aujourd'hui les médecins neurovasculaires sont susceptibles de reperméabiliser précocement par voie chimique ou mécanique l'artère cervicale ou cérébrale occluse (93,94). Cependant, même si la recanalisation

est nécessaire, elle n'est pas toujours suffisante pour obtenir un bénéfice clinique suffisant pour nos patients. La voie de la neuroprotection adjuvante aux techniques médicales de recanalisation artérielle doit être développée. A ce jour, aucune thérapeutique neuroprotectrice n'a montré un bénéfice clinique dans cette pathologie malgré les nombreux essais réalisés. Notre modèle animal pourrait être soumis à un modèle expérimental d'ischémie cérébral afin de conforter le rôle neuroprotecteur des corps cétoniques et le cas échéant d'en déterminer la ou les cibles biologiques. Ces études fondamentales pourraient ainsi nous renseigner sur le mécanisme neuroprotecteur à cibler en pathologie humaine et nous donner des informations sur la fenêtre d'utilisation de ces traitements.

La poursuite des études du modèle murin *slc5a8<sup>-/-</sup>* est une opportunité réelle pour avancer dans le domaine très actuel de la neuro-énergétique et de son corollaire la neuroprotection. Elle donne la possibilité d'entrevoir des translations cliniques dans le domaine des neurosciences.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Rodriguez A-M, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, et al. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2002;87(7):3500-3.
2. Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* févr 2004;447(5):510-8.
3. Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, et al. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 juill 2003;100(14):8412-7.
4. Paroder V, Spencer SR, Paroder M, Arango D, Schwartz S, Mariadason JM, et al. Na(+)/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 mai 2006;103(19):7270-5.
5. Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, Park CK, Kim K-M. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* févr 2005;18(2):170-8.
6. Ueno M, Toyota M, Akino K, Suzuki H, Kusano M, Satoh A, et al. Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* juin 2004;25(3):134-40.
7. Hong C, Maunakea A, Jun P, Bollen AW, Hodgson JG, Goldenberg DD, et al. Shared epigenetic mechanisms in human and mouse gliomas inactivate expression of the growth suppressor SLC5A8. *Cancer Res.* 1 mai 2005;65(9):3617-23.

8. Porra V, Ferraro-Peyret C, Durand C, Selmi-Ruby S, Giroud H, Berger-Dutrieux N, et al. Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2005;90(5):3028-35.
9. Park JY, Zheng W, Kim D, Cheng JQ, Kumar N, Ahmad N, et al. Candidate tumor suppressor gene SLC5A8 is frequently down-regulated by promoter hypermethylation in prostate tumor. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(5):359-65.
10. Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology.* mars 2007;148(3):948-53.
11. Park JY, Kim D, Yang M, Park HY, Lee SH, Rincon M, et al. Gene silencing of SLC5A8 identified by genome-wide methylation profiling in lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* mars 2013;79(3):198-204.
12. Park JY, Helm JF, Zheng W, Ly QP, Hodul PJ, Centeno BA, et al. Silencing of the candidate tumor suppressor gene solute carrier family 5 member 8 (SLC5A8) in human pancreatic cancer. *Pancreas.* mai 2008;36(4):e32-39.
13. Guo S, Yan F, Xu J, Bao Y, Zhu J, Wang X, et al. Identification and validation of the methylation biomarkers of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Epigenetics.* 2015;7:3.
14. Hu B-S, Xiong S-M, Li G, Li J-P. Downregulation of SLC5A8 inhibits hepatocellular carcinoma progression through regulation of Wnt/β-catenin signaling. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* oct 2016;37(10):13445-53.
15. Valo S, Kaur S, Ristimäki A, Renkonen-Sinisalo L, Järvinen H, Mecklin J-P, et al. DNA hypermethylation appears early and shows increased frequency with dysplasia in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas and carcinomas. *Clin Epigenetics.* 2015;7:71.

16. Ikeda K, Shiraishi K, Koga T, Motooka Y, Fujino K, Shibata H, et al. Prognostic Significance of Aberrant Methylation of Solute Carrier Gene Family 5A8 in Lung Adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg.* mai 2015;99(5):1755-9.
17. Zane M, Agostini M, Enzo MV, Casal Ide E, Del Bianco P, Torresan F, et al. Circulating cell-free DNA, SLC5A8 and SLC26A4 hypermethylation, BRAF(V600E): A non-invasive tool panel for early detection of thyroid cancer. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* oct 2013;67(8):723-30.
18. Helm J, Coppola D, Ganapathy V, Lloyd M, Centeno BA, Chen D-T, et al. SLC5A8 nuclear translocation and loss of expression are associated with poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas.* août 2012;41(6):904-9.
19. Brim H, Kumar K, Nazarian J, Hathout Y, Jafarian A, Lee E, et al. SLC5A8 gene, a transporter of butyrate: a gut flora metabolite, is frequently methylated in African American colon adenomas. *PLoS One.* 2011;6(6):e20216.
20. Lin H-Y, Park HY, Radlein S, Mahajan NP, Sellers TA, Zachariah B, et al. Protein expressions and genetic variations of SLC5A8 in prostate cancer risk and aggressiveness. *Urology.* oct 2011;78(4):971.e1-9.
21. Elangovan S, Pathania R, Ramachandran S, Ananth S, Padia RN, Srinivas SR, et al. Molecular mechanism of SLC5A8 inactivation in breast cancer. *Mol Cell Biol.* oct 2013;33(19):3920-35.
22. Whitman SP, Hackanson B, Liyanarachchi S, Liu S, Rush LJ, Maharry K, et al. DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication. *Blood.* 1 sept 2008;112(5):2013-6.

23. Bennett KL, Karpenko M, Lin M-T, Claus R, Arab K, Dyckhoff G, et al. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 15 juin 2008;68(12):4494-9.
24. Ganapathy V, Thangaraju M, Gopal E, Martin PM, Itagaki S, Miyauchi S, et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J.* 2008;10(1):193-9.
25. Ganapathy V, Gopal E, Miyauchi S, Prasad PD. Biological functions of SLC5A8, a candidate tumour suppressor. *Biochem Soc Trans.* févr 2005;33(Pt 1):237-40.
26. Gupta N, Martin PM, Prasad PD, Ganapathy V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sci.* 18 avr 2006;78(21):2419-25.
27. Thangaraju M, Cresci G, Itagaki S, Mellinger J, Browning DD, Berger FG, et al. Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* oct 2008;12(10):1773-81; discussion 1781-1782.
28. Thangaraju M, Gopal E, Martin PM, Ananth S, Smith SB, Prasad PD, et al. SLC5A8 triggers tumor cell apoptosis through pyruvate-dependent inhibition of histone deacetylases. *Cancer Res.* 15 déc 2006;66(24):11560-4.
29. Blottière HM, Buecher B, Galmiche J-P, Cherbut C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc.* févr 2003;62(1):101-6.
30. Wächtershäuser A, Stein J. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr.* août 2000;39(4):164-71.

31. Chen JS, Faller DV, Spanjaard RA. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? *Curr Cancer Drug Targets.* juin 2003;3(3):219-36.
32. Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr.* mai 2002;132(5):1012-7.
33. Jan G, Belzacq A-S, Haouzi D, Rouault A, Métivier D, Kroemer G, et al. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ.* févr 2002;9(2):179-88.
34. Augenlicht LH, Anthony GM, Church TL, Edelmann W, Kucherlapati R, Yang K, et al. Short-chain fatty acid metabolism, apoptosis, and Apc-initiated tumorigenesis in the mouse gastrointestinal mucosa. *Cancer Res.* 1 déc 1999;59(23):6005-9.
35. Basson MD, Liu YW, Hanly AM, Emenaker NJ, Shenoy SG, Gould Rothberg BE. Identification and comparative analysis of human colonocyte short-chain fatty acid response genes. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* oct 2000;4(5):501-12.
36. Wang J, Friedman EA. Short-chain fatty acids induce cell cycle inhibitors in colonocytes. *Gastroenterology.* mai 1998;114(5):940-6.
37. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* avr 2005;37(4):391-400.
38. Gurav A, Sivaprakasam S, Bhutia YD, Boettger T, Singh N, Ganapathy V. Slc5a8, a Na<sup>+</sup>-coupled high-affinity transporter for short-chain fatty acids, is a conditional tumour

suppressor in colon that protects against colitis and colon cancer under low-fibre dietary conditions. *Biochem J.* 15 juill 2015;469(2):267-78.

39. Martin PM, Gopal E, Ananth S, Zhuang L, Itagaki S, Prasad BM, et al. Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na<sup>+</sup>-coupled transporter for active uptake of L-lactate and ketone bodies in the brain. *J Neurochem.* juill 2006;98(1):279-88.

40. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther.* janv 2009;121(1):29-40.

41. Ristow M. Oxidative metabolism in cancer growth. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* juill 2006;9(4):339-45.

42. Pedersen PL. The cancer cell's « power plants » as promising therapeutic targets: an overview. *J Bioenerg Biomembr.* févr 2007;39(1):1-12.

43. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 24 févr 1956;123(3191):309-14.

44. Balinsky D, Platz CE, Lewis JW. Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res.* déc 1983;43(12 Pt 1):5895-901.

45. Singh R, Kaurya OP, Shukla PK, Ramputty R. Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes patterns in ocular tumours. *Indian J Ophthalmol.* juin 1991;39(2):44-7.

46. Kawamoto M. Breast cancer diagnosis by lactate dehydrogenase isozymes in nipple discharge. *Cancer.* 1 avr 1994;73(7):1836-41.

47. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, Polychronidis A, Sivridis E. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(1):25-30.

48. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.* 15 janv 2006;66(2):632-7.
49. Leiblich A, Cross SS, Catto JWF, Phillips JT, Leung HY, Hamdy FC, et al. Lactate dehydrogenase-B is silenced by promoter hypermethylation in human prostate cancer. *Oncogene.* 11 mai 2006;25(20):2953-60.
50. Thangaraju M, Carswell KN, Prasad PD, Ganapathy V. Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J.* 1 janv 2009;417(1):379-89.
51. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Res.* 1 mai 2007;67(9):4182-9.
52. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Scapulatempo C, Ferreira L, Martins S, Pellerin L, et al. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch Int J Pathol.* févr 2008;452(2):139-46.
53. Coady MJ, Chang M-H, Charron FM, Plata C, Wallendorff B, Sah JF, et al. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na<sup>+</sup>-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol.* 15 juin 2004;557(Pt 3):719-31.
54. Miyauchi S, Gopal E, Fei Y-J, Ganapathy V. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na<sup>(+)</sup>-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2 avr 2004;279(14):13293-6.
55. Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996;216:132-48.

56. Gopal E, Fei Y-J, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P, et al. Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+) -coupled transport of lactate. *J Biol Chem.* 22 oct 2004;279(43):44522-32.
57. Gopal E, Fei Y-J, Miyauchi S, Zhuang L, Prasad PD, Ganapathy V. Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by slc5a8, a member of the Na/glucose co-transporter gene family. *Biochem J.* 15 mai 2005;388(Pt 1):309-16.
58. Simanjuntak MT, Tamai I, Terasaki T, Tsuji A. Carrier-mediated uptake of nicotinic acid by rat intestinal brush-border membrane vesicles and relation to monocarboxylic acid transport. *J Pharmacobiodyn.* mai 1990;13(5):301-9.
59. Takanaga H, Maeda H, Yabuuchi H, Tamai I, Higashida H, Tsuji A. Nicotinic acid transport mediated by pH-dependent anion antiporter and proton cotransporter in rabbit intestinal brush-border membrane. *J Pharm Pharmacol.* oct 1996;48(10):1073-7.
60. Gopal E, Miyauchi S, Martin PM, Ananth S, Roon P, Smith SB, et al. Transport of nicotinate and structurally related compounds by human SMCT1 (SLC5A8) and its relevance to drug transport in the mammalian intestinal tract. *Pharm Res.* mars 2007;24(3):575-84.
61. Miyauchi S, Gopal E, Babu E, Srinivas SR, Kubo Y, Umapathy NS, et al. Sodium-coupled electrogenic transport of pyroglutamate (5-oxoproline) via SLC5A8, a monocarboxylate transporter. *Biochim Biophys Acta.* juin 2010;1798(6):1164-71.
62. Cui D, Morris ME. The drug of abuse gamma-hydroxybutyrate is a substrate for sodium-coupled monocarboxylate transporter (SMCT) 1 (SLC5A8): characterization of SMCT-mediated uptake and inhibition. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* juill 2009;37(7):1404-10.
63. Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J.* 15 oct 1999;343 Pt 2:281-99.

64. Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life*. févr 2012;64(2):109-19.
65. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family--from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*. févr 2004;447(5):619-28.
66. Wang Q, Morris ME. Flavonoids modulate monocarboxylate transporter-1-mediated transport of gamma-hydroxybutyrate in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. févr 2007;35(2):201-8.
67. Itagaki S, Gopal E, Zhuang L, Fei Y-J, Miyauchi S, Prasad PD, et al. Interaction of ibuprofen and other structurally related NSAIDs with the sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8). *Pharm Res*. juin 2006;23(6):1209-16.
68. Tamai I, Takanaga H, Maeda H, Sai Y, Ogihara T, Higashida H, et al. Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 14 sept 1995;214(2):482-9.
69. Choi J-S, Jin MJ, Han H-K. Role of monocarboxylic acid transporters in the cellular uptake of NSAIDs. *J Pharm Pharmacol*. sept 2005;57(9):1185-9.
70. Bachowska-Mac M, Nehlig A, Nałecz MJ, Nałecz KA. Transport of alpha-ketoisocaproate in neuroblastoma NB-2a cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 8 août 1997;237(1):63-7.
71. Mengual R, Schlageter MH, Sudaka P. Kinetic asymmetry of renal Na<sup>+</sup>-L-lactate cotransport. Characteristic parameters and evidence for a ping pong mechanism of the trans-stimulating exchange by pyruvate. *J Biol Chem*. 5 janv 1990;265(1):292-9.

72. Nord EP, Wright SH, Kippen I, Wright EM. Specificity of the Na<sup>+</sup>-dependent monocarboxylic acid transport pathway in rabbit renal brush border membranes. *J Membr Biol.* 1983;72(3):213-21.
73. Barac-Nieto M, Murer H, Kinne R. Asymmetry in the transport of lactate by basolateral and brush border membranes of rat kidney cortex. *Pflugers Arch. févr* 1982;392(4):366-71.
74. Ullrich KJ, Rumrich G, Klöss S. Reabsorption of monocarboxylic acids in the proximal tubule of the rat kidney. II. Specificity for aliphatic compounds. *Pflugers Arch. 11 nov* 1982;395(3):220-6.
75. Wright EM. Transport of carboxylic acids by renal membrane vesicles. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:127-41.
76. Frank H, Gröger N, Diener M, Becker C, Braun T, Boettger T. Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *J Biol Chem.* 5 sept 2008;283(36):24729-37.
77. Everett LA, Belyantseva IA, Noben-Trauth K, Cantos R, Chen A, Thakkar SI, et al. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet.* 15 janv 2001;10(2):153-61.
78. Bhutia YD, Babu E, Ramachandran S, Yang S, Thangaraju M, Ganapathy V. SLC transporters as a novel class of tumour suppressors: identity, function and molecular mechanisms. *Biochem J.* 01 2016;473(9):1113-24.
79. Gopal E, Umapathy NS, Martin PM, Ananth S, Gnana-Prakasam JP, Becker H, et al. Cloning and functional characterization of human SMCT2 (SLC5A12) and expression pattern of the transporter in kidney. *Biochim Biophys Acta.* nov 2007;1768(11):2690-7.

80. Srinivas SR, Gopal E, Zhuang L, Itagaki S, Martin PM, Fei Y-J, et al. Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem J.* 15 déc 2005;392(Pt 3):655-64.
81. Thangaraju M, Ananth S, Martin PM, Roon P, Smith SB, Sterneck E, et al. c/ebpdelta Null mouse as a model for the double knock-out of slc5a8 and slc5a12 in kidney. *J Biol Chem.* 15 sept 2006;281(37):26769-73.
82. Becker HM, Mohebbi N, Perna A, Ganapathy V, Capasso G, Wagner CA. Localization of members of MCT monocarboxylate transporter family Slc16 in the kidney and regulation during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* juill 2010;299(1):F141-154.
83. Martin PM, Dun Y, Mysona B, Ananth S, Roon P, Smith SB, et al. Expression of the sodium-coupled monocarboxylate transporters SMCT1 (SLC5A8) and SMCT2 (SLC5A12) in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* juill 2007;48(7):3356-63.
84. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind J-FH, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Res.* déc 2009;29(12):4909-18.
85. Williamson JR, Jones EA. INHIBITION OF GLYCOLYSIS BY PYRUVATE IN RELATION TO THE ACCUMULATION OF CITRIC ACID CYCLE INTERMEDIATES IN THE PERFUSED RAT HEART. *Nature.* 12 sept 1964;203:1171-3.
86. White H, Venkatesh B. Clinical review: ketones and brain injury. *Crit Care Lond Engl.* 6 avr 2011;15(2):219.
87. Gasior M, Rogawski MA, Hartman AL. Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behav Pharmacol.* sept 2006;17(5-6):431-9.

88. Puchowicz MA, Zechel JL, Valerio J, Emancipator DS, Xu K, Pundik S, et al. Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* déc 2008;28(12):1907-16.
89. Xu K, Ye L, Sharma K, Jin Y, Harrison MM, Caldwell T, et al. Diet-Induced Ketosis Protects Against Focal Cerebral Ischemia in Mouse. *Adv Exp Med Biol.* 2017;977:205-13.
90. Gibson CL, Murphy AN, Murphy SP. Stroke outcome in the ketogenic state--a systematic review of the animal data. *J Neurochem.* nov 2012;123 Suppl 2:52-7.
91. Yin J, Han P, Tang Z, Liu Q, Shi J. Sirtuin 3 mediates neuroprotection of ketones against ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* nov 2015;35(11):1783-9.
92. Shaafi S, Mahmoudi J, Pashapour A, Farhoudi M, Sadigh-Eteghad S, Akbari H. Ketogenic Diet Provides Neuroprotective Effects against Ischemic Stroke Neuronal Damages. *Adv Pharm Bull.* déc 2014;4(Suppl 2):479-81.
93. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet Lond Engl.* 23 avr 2016;387(10029):1723-31.
94. Emberson J, Lees KR, Lyden P, Blackwell L, Albers G, Bluhmki E, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet Lond Engl.* 29 nov 2014;384(9958):1929-35.