



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

2015-2016

FACULTÉ DE PHARMACIE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement

Le 1^{er} février 2016, sur un sujet dédié aux :

CELLULES SOUCHES DU GLIOBLASTOME : CIBLES THERAPEUTIQUES PROMETTEUSES

Pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **AZIEZ Yassine**

né le 18 Avril 1987

Membres du Jury

Président du jury : Pr. Bertrand RIHN, Professeur des Universités

Directeur de thèse: Dr. Mohamed ZAIOU, Maître de Conférences Universitaire

Juges : Pr. Alain LEFAOU, Professeur des Universités

Dr. Véronique DECOT-MAILLERET, Maître de Conférences Universitaire

Dr. Joël COULON, Maître de Conférences Universitaire

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2015-2016

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable de la Communication

Responsable de la Cellule de Formation Continue

et individuelle

Responsable de la Commission d'agrément

des maîtres de stage

Responsables des échanges internationaux

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Francine KEDZIEREWICZ

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Florence DUMARCAZ	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	85/86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY ³	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Gabriel TROCKLE	86	<i>Pharmacologie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>
Colette ZINUTTI	85	<i>Pharmacie galénique</i>

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
--------------------	----	-------------------

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Alexandre HARLE ³	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
------------------------------	----	--

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

³En attente de nomination

*Disciplines du Conseil National des Universités

:

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAires



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorier ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

A mon président de jury de thèse, Monsieur Bertrand Rihn, Professeur des Universités,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury et de juger mon travail. Je vous remercie également pour la qualité de vos enseignements dont j'ai pu bénéficier tout au long de mon cursus et de votre constante bonne humeur.

A mon directeur de thèse, Monsieur Mohamed Zaiou, maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Nancy,

Merci de me faire l'honneur de juger et de diriger mon travail.

Vous avez été l'initiateur de ce projet. Monsieur Le directeur, je vous suis très reconnaissant pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ce projet. Je vous remercie de votre disponibilité et votre aide précieuse pour mener à bien ce travail. Je vous remercie également des conseils et orientations apportés. J'ai pris un immense plaisir à réaliser ce travail à vos côtés.

Aux membres du Jury :

A Professeur Le Faou, Docteur Decot-Mailleret, je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger notre travail et de participer à mon jury de thèse. Monsieur Coulon, je vous remercie également pour votre écoute, vos conseils, votre disponibilité tout au long de mon cursus universitaire.

Merci à tous mes Professeurs ainsi qu'au personnel de la Faculté de pharmacie de Nancy

TABLES DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTES DES ABREVIATIONS	6
AVANT-PROPOS.....	8
PARTIE I : LES GLIOBLASTOMES MULTIFORMES	13
I.1. Classification des gliomes.....	14
➤ Classification selon l'OMS	14
➤ Glioblastomes primaires et secondaires	15
➤ Epidémiologie des glioblastomes	16
I.2. Caractéristiques génétiques des glioblastomes	17
➤ EGFR	18
➤ PTEN	18
➤ p53.....	18
➤ MGMT.....	19
➤ IDH	19
➤ Autres altérations génétiques	20
I.3. Caractéristiques biologiques des glioblastomes	22
➤ Invasion	22
➤ Prolifération.....	22
➤ Nécrose.....	22
➤ Angiogénèse	23
➤ Apoptose	23
I.4. Prise en charge actuelle des glioblastomes	24
➤ Chirurgie	24

➤ Radiothérapie	24
➤ Chimiothérapie.....	25
PARTIE II : CONCEPT DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES DANS LES GLIOBLASTOMES	29
II.1. Origine des gliomes.....	30
II.2. Exploration historique de la théorie des CSCs dans les glioblastomes	32
➤ Cellule souche cancéreuse à l'origine des leucémies myéloïdes	32
➤ Identification de cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes	33
II.3. Caractéristiques et propriétés des cellules souches cancéreuses des glioblastomes.....	34
➤ Origine	34
➤ Auto-renouvellement.....	36
➤ Multipotentialité	36
➤ Propagation tumorale	37
II.4. Marqueurs actuels d'identification des CSCs des glioblastomes.....	39
➤ CD133 / prominine	39
➤ Nestine	40
➤ L1CAM	40
➤ SOX2	41
➤ CD15 ou lexis X ou ssea1	41
➤ CXCR4	41
➤ CD44	42
➤ A2B5	42
II.5. Limites du concept des cellules souches cancéreuses	44
➤ Marqueurs d'identification	44
➤ Hétérogénéité de la tumeur.....	44
➤ Modèle et procédures expérimentales	45
II.6. Concept de niche des cellules souches cancéreuses dans les GBMs.....	46

➤ Niche périvasculaire	46
➤ Niche hypoxique.....	47
➤ Interactions mutuelles entre CSCGs et niche.....	49
II. 7. Concept des CSCGs et résistance aux traitements.....	53
➤ Radiorésistance	53
➤ Chimiorésistance	55
PARTIE III : LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES DES GLIOBLASTOMES COMME CIBLES THERAPEUTIQUES	58
III.1. Cibler des molécules spécifiques de surface des CSCGs.....	60
III.2. Inhiber des voies de signalisations spécifiques des CSCGs.....	61
➤ Voie EGFR-PI3k-Akt	61
➤ Voie de signalisation Notch.....	61
➤ Voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh)	62
➤ Voie de signalisation STAT3.....	63
➤ Signalisation Wnt/β-caténine.....	64
III.3. Cibler les facteurs de transcriptions impliqués dans le maintien des CSCGs.....	65
III.4. Thérapie différenciatrice	67
III.5. Cibler le microenvironnement des CSCGs.....	70
➤ L'hypoxie	70
➤ La niche vasculaire.....	71
III.6. Réguler les CSCGs par des microARN (miARNs)	73
III.7. Essais cliniques ciblant les CSCGs en cours de développement.....	77
CONCLUSION	80
BIBLIOGRAPHIE.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : IRM (imagerie à résonnance magnétique) d'un glioblastome.....	14
Figure 2 : Incidence et mortalité des GBMs en France en 2000 selon le sexe et l'âge.....	16
Figure 3 : Altérations génétiques associées aux glioblastomes	21
Figure 4 : Estimation de la survie globale des patients atteints de GBMs en fonction du traitement administré.	26
Figure 5 : Représentation schématique du modèle « stochastique »	30
Figure 6 : Représentation schématique du modèle « hiérarchique ».....	31
Figure 7 : L'origine des cellules souches cancéreuses dans les GBMs reste inconnue	35
Figure 8 : Caractéristiques des cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes.	38
Figure 9 : La niche périvasculaire des CSCGs	47
Figure 10 : Architecture histologique caractéristique des GBMs	48
Figure 11 : Schéma illustrant le remaniement du microenvironnement.....	50
Figure 12 : Interactions mutuelles entre les CSCGs et leur microenvironnement.....	52
Figure 13 : La thérapie ciblée : de nouveaux espoirs au pronostic des GBMs ?	59
Figure 14 : Différentes options de traitements des glioblastomes.....	69
Figure 15 : Facteurs régulant les CSCGs	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Types de tumeurs cérébrales en fonction de l'origine histologique et du grade selon l'OMS.	15
Tableau II : Principales altérations génétiques rencontrées dans les GBMs.	17
Tableau III : Marqueurs moléculaires utilisés dans l'étude des CSCGs	43
Tableau IV : MicroARN dérégulés dans les CSCGs et leur(s) fonction(s).....	76
Tableau V : Essais cliniques en cours ciblant les CSCs dans le traitement des glioblastomes.....	78
Tableau VI : Stratégies thérapeutiques pour atteindre les CSCs des glioblastomes	79

LISTES DES ABREVIATIONS

AACR	:	Association américaine pour la recherche sur le cancer
ABC	:	<i>Adenosine triphosphate-binding cassette</i>
ABCG2	:	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>
Akt	:	Protéine kinase B
ALDH	:	Aldéhyde déshydrogénase
AMM	:	Autorisation de mise sur le marché
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messager
ATP	:	Adénosine triphosphate
Bcl-2	:	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRP1	:	<i>Breast cancer resistance protein 1</i>
BMP	:	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMI1	:	<i>B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i>
CD	:	Cluster de différenciation
CE	:	Cellules endothéliales
CSCs	:	Cellules souches cancéreuses
CSCGs	:	Cellules souches cancéreuses des glioblastomes
CSNs	:	Cellules souches neuronales
Chk	:	<i>Checkpoint kinase</i>
EGF	:	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	:	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FDA	:	<i>Food and Drug Administration</i>
GBMs	:	Glioblastomes Multiformes
GSK3-β	:	Glycogène synthase kinase
HIF-1α	:	hypoxia-inductible factor 1 α
IDH1	:	isocitrate déshydrogénase 1

IGF2	:	<i>Insulin growth factor 2</i>
IL	:	Interleukine
IRM	:	Imagerie à résonnance magnétique
JAM-A	:	<i>Junctional adhesion molecule-A</i>
L1CAM	:	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
LOH	:	<i>Loss of Heterozygosity</i>
MDR	:	<i>Multidrug resistance</i>
MEC	:	Matrice extracellulaire
MGMT	:	O6-méthylguanine-ADN-méthyltransférase
miARN	:	micro-ARN
MMR	:	<i>mismatch repair</i>
mTOR	:	<i>mammalian Target of rapamycin</i>
NF- κ B	:	Facteur nucléaire- κ appa B
NPV	:	Niche périvasculaire
Olig2	:	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
OMS	:	Organisation Mondiale de Santé
p53	:	<i>Tumor protein 53</i>
PI3K/AKT	:	Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt
PTEN	:	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
RAS	:	<i>Rat sarcoma virus oncogene</i>
RTKs	:	Récepteurs à tyrosine kinase
Shh	:	Sonic hedgehog
SNC	:	Système nerveux central
SP	:	<i>Side population</i>
SSEA-1	:	Spécifique au stade embryonnaire antigène-1
STAT 3	:	Transducteurs du Signal et Activateurs de Transcription 3
TGF	:	<i>Tumor growth factor</i>
TNF	:	Facteur tumoral nécrotique
TMZ	:	Témozolomide
VEGF	:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est la deuxième cause mondiale de décès après les maladies cardiovasculaires, avec 8,2 millions de décès en 2012 (World Cancer Report 2014, IARC). Avec l'augmentation et le vieillissement de la population, ce chiffre ne cessera de s'accroître tant que les scientifiques n'auront pas trouvé de solutions concrètes à l'enrayement de ce fléau.

Les tumeurs du cerveau ne représentent que 2 % de l'ensemble des cancers avec une incidence globale estimée à environ 18 cas pour 100 000 habitants et sont au demeurant assez rares. Cependant, elles sont plus fréquentes avec l'âge, ce qui explique en partie l'augmentation de leur nombre depuis les années 1970. Ce type de cancer compte parmi les cancers les plus agressifs et les plus meurtriers. Il existe une grande variété de tumeurs primitives cérébrales et les gliomes en représentent plus de la moitié (PARK et RICH, 2009).

Parmi ces gliomes, nous retrouvons majoritairement les astrocytomes, tumeurs dérivant des astrocytes. Nous définissons les astrocytes comme des cellules gliales qui assurent le soutien, la nutrition des neurones et la gestion des connexions entre les neurones. Ces astrocytes assurent également l'approvisionnement en nutriments et le métabolisme énergétique du système nerveux, ainsi que la régulation des neurotransmetteurs.

L'astrocytome peut correspondre à des grades histologiques différents en fonction de la différenciation cellulaire. Selon l'OMS, il peut être bénin mais il peut aussi se transformer en astrocytome anaplasique ou, à un degré supérieur de malignité, en glioblastomes multiformes (GBMs). Les GBMs sont des gliomes de grade IV. Avec 2700 cas par an en France (BOUDJELTIA, DHAER, VAN ANTWERPEN et al., 2012), les GBMs restent rares mais cependant responsables d'un taux extrêmement élevé de morbidité et de mortalité (PARK et RICH, 2009). En effet, la médiane de survie globale des patients atteints de GBMs n'excède jamais 15 mois et ce, malgré un traitement multimodal bien conduit incluant chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie et thérapie ciblée (TURPIN, SHARIF, STOVEN et al., 2015). Ce traitement pluridisciplinaire et agressif n'aboutit pas à l'éradication totale de la maladie car la récidive et la résistance aux traitements sont systématiquement observées dans tous les GBMs (PARK et RICH, 2009). Les mécanismes de résistance aux traitements sont aussi multiples : Efflux des médicaments à l'extérieur des cellules tumorales via les pompes à efflux ATP-dépendantes, augmentation des mécanismes de réparation de l'ADN

et inhibition des mécanismes d'apoptose et de régulation du cycle cellulaire (BREDEL, 2001). De ce fait, les méthodes classiques du traitement du glioblastome finissent dans la plupart des cas par un échec thérapeutique. Il est donc urgent de développer des stratégies innovantes surtout dans une ère où le progrès scientifique bat des records avec les approches du séquençage à haut débit, de l'« omics » et du tri cellulaire. Dans ce contexte, les cellules souches cancéreuses ou initiatrices de cancer et en particulier de glioblastomes constituerait une cible thérapeutique très prometteuse afin d'agir efficacement sur les GBMs.

Grâce aux nouveaux progrès scientifiques, notamment dans le domaine de la génétique et de la biologie moléculaire et cellulaire, de plus en plus d'études suggèrent que les GBMs sont constitués de plusieurs sortes de cellules notamment les cellules souches cancéreuses des glioblastomes (CSCGs). Ce contingent de cellules (de 0,5 à 5% de la masse tumorale) (VLASHI, McBRIDE et PAJONK, 2009) possède les caractéristiques des cellules souches neuronales (CSNs) du fait que les cellules qui le constituent ne sont pas différenciées et sont capables de se différencier et de s'auto-renouveler. Cependant, ces cellules ont été soupçonnées d'être à l'origine de l'initiation et du développement de la tumeur, donnant lieu ainsi à l'émergence du concept de cellules souches cancéreuses.

Les cellules souches cancéreuses (CSCs) ont été découvertes tout d'abord dans des leucémies en 1997 (BHATIA, WANG, KAPP et al., 1997), puis elles ont été retrouvées dans d'autres tumeurs telles que le cancer du sein (AL-HAJJ, WICHA, BENITO-HERNANDEZ et al., 2003), du pancréas (SUZUKI, NAKAUCHI et TANIGUCHI, 2004), de la prostate et de la vessie (COLLINS, BERRY, HYDE et al., 2005), de la peau (YU, MINTER-DYKHOUSSE, MALUREANU et al., 2005), des ovaires (SZOTEK, PIERETTI-VANMARCKE, MASIAKOS et al., 2006), du côlon (RICCI-VITIANI, PALLINI, BIFFONI et al., 2010), de l'intestin et de l'estomac (VRIES, HUCH et CLEVERS, 2010), du poumon, de la tête et du cou (NEMOTO, MARUO, SATO et al., 2011), du foie (SELL, 2010) et du cerveau (IGNATOVA, KUKEKOV, LAYWELL et al., 2002). Récemment trois équipes de recherche auraient démontré l'existence de CSCs dans les glioblastomes grâce à des méthodes d'analyse *in vivo* (BAKER, 2012). Cette catégorie de cellules serait, en partie, responsable de l'incurabilité des GBMs car les CSCs seraient capables à elles seules d'initier et de développer une tumeur (GROTHUIS, WIJNHOVEN et VAN LANSCHOT, 2012). La découverte de l'existence de CSCs dans les GBMs constituerait dès lors, une piste très intéressante pour la recherche et le développement de nouvelles thérapies efficaces en vue d'éradiquer totalement les GBMs.

En 2006, lors d'un rassemblement organisé par l'Association Américaine pour la Recherche sur le Cancer (AACR), les scientifiques se sont mis d'accord pour définir une

cellule souche cancéreuse comme « une cellule d'une tumeur qui possède la capacité de s'auto-renouveler et de produire les lignées hétérogènes de cellules cancéreuses contenues par la tumeur en question » (CLARKE, DICK, DIRKS et al., 2006). C'est par cette capacité d'auto-renouvellement et de différenciation que les CSCs des glioblastomes participeraient à la propagation tumorale. De même, les CSCs pourraient se mettre en dormance, et donc résister aux thérapies actuelles.

Structure du sujet de thèse :

La contribution des cellules souches cancéreuses dans l'émergence et la récidive tumorales est de plus en plus reconnue par la communauté scientifique. Cependant, malgré l'intérêt que suscitent ces cellules, leur caractérisation, l'identification de leurs mécanismes de fonctionnement et la mise en œuvre de traitements adéquats rencontrent encore des difficultés majeures. Pour ces raisons, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux CSCs dans les glioblastomes avec pour objectif principal de faire une synthèse des travaux récents de la littérature dans ce domaine. De ce fait, ce mémoire sera structuré en trois parties.

1) Dans une première partie, nous présenterons les caractéristiques des glioblastomes, les stratégies actuelles de traitement ainsi que les conséquences de cet échec à savoir la résistance et la récidive de la tumeur.

2) Dans une deuxième partie, nous aborderons l'hypothèse des cellules souches cancéreuses et leur implication dans la résistance des glioblastomes aux différents traitements. La première étape consiste en une exploration historique de la théorie des CSCs et, plus précisément, de l'hypothèse générale sur les cellules de types souches étant à l'origine des cancers. Tout d'abord, nous relaterons leur découverte à travers les expériences menées sur les leucémies et ensuite leur identification dans les GBMs. Ce sera l'occasion de présenter les données biologiques à partir desquelles a été élaborée la théorie des CSCGs. Ensuite, dans une seconde étape, nous détaillerons les caractéristiques et les propriétés des cellules souches des glioblastomes, leur localisation, leurs marqueurs actuels d'identification ainsi que la controverse de ces marqueurs.

3) La troisième partie sera consacrée aux développements de stratégies thérapeutiques ciblées anti-CSCGs ainsi qu'à des essais cliniques en cours. Nous allons détailler les nouvelles stratégies actuellement testées par les scientifiques pour cibler les cellules souches de glioblastomes, notamment la niche. Il s'agit d'un milieu spécifique et

propice au maintien des propriétés de ces cellules (SNEDDON et WERB, 2007), qui pourrait les protéger contre des agressions de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Nous allons nous intéresser aux voies de signalisation, aux facteurs de transcription et aux protéines spécifiques des CSCGs. Dans ce sens, l'analyse transcriptomique différentielle du niveau d'expression des gènes dans les CSCGs favorisera l'élaboration de thérapies dirigées contre des cibles moléculaires spécifiques des CSCGs, impliquées dans les mécanismes de tumorigénèse. Plusieurs stratégies thérapeutiques peuvent être désignées, notamment le développement d'anticorps qui permettent de bloquer spécifiquement une voie moléculaire en cause dans la résistance. Un exemple de ce type de traitement est l'utilisation d'Avastin®, un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre le VEGF (anti-angiogénique), qui a été approuvé par l'agence Américaine du médicament « *Food and drugs administration* » (FDA) en 2009 pour une utilisation dans le traitement du glioblastome seul ou associé à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie (WAGLE, NGHIEMPHU, LAI et al., 2010). Nous achèverons ce mémoire par les essais cliniques ciblant les CSCGs en cours de développement ainsi que les perspectives dans ce domaine.

PARTIE I :

LES GLIOBLASTOMES

MULTIFORMES

I.1. Classification des gliomes

➤ Classification selon l'OMS

Les gliomes sont des tumeurs primitives du système nerveux central qui se développent aux dépens des cellules gliales. Ils correspondent à des grades histologiques différents en fonction de la différenciation cellulaire. Nous y retrouvons majoritairement les astrocytomes, tumeurs dérivant des astrocytes. Ils peuvent être bénins ou évoluer en astrocytome anaplasique ou encore atteindre le stade des glioblastomes multiformes (GBMs) illustrés dans la figure 1. Les GBMs sont des gliomes de grade IV selon l'OMS (tableau I).

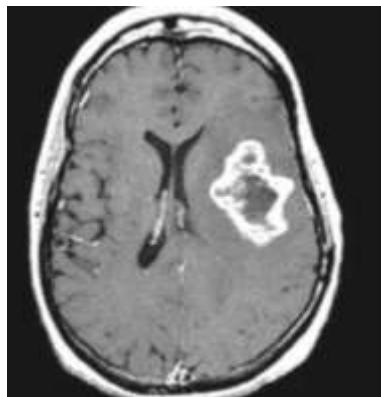


Figure 1 : IRM (imagerie à résonnance magnétique) d'un glioblastome d'après WAGLE, NGHIEMPHU, LAI et al., 2010.

Les gliomes de grade I sont considérés comme des tumeurs bénignes à faible potentiel de prolifération. Ils sont bien délimités et donc chirurgicalement curables. Le potentiel prolifératif des gliomes de grade II est également faible mais ils peuvent être malheureusement infiltrants, d'où leur réapparition dans le tissu cérébral après la chirurgie. Les grades I et II sont des gliomes de bas grade qui évoluent souvent avec le temps vers les grades III et IV considérés comme de hauts grades de malignité. Seuls les gliomes d'origine astrocytaire peuvent atteindre le grade IV. Très invasifs, les gliomes de grade IV, appelés glioblastomes, se caractérisent par un fort potentiel prolifératif et plusieurs zones de nécrose, d'hypoxie et d'angiogénèse (les glioblastomes font partie des tumeurs les plus angiogéniques). De plus, ces tumeurs possèdent une zone inflammatoire péri-tumorale.

Tableau I : Types de tumeurs cérébrales en fonction de l'origine histologique et du grade selon l'OMS.

	<u>Origine astrocytaire</u>	<u>Origine oligodendrogliale</u>	<u>Origine épendymaire</u>	<u>Origine mixte</u>
<u>Grade I</u>	Astrocytome		Subépendymome	
<u>Grade II</u>	Actrocytome diffus	Oligodendrogliome	Ependymome	Oligoastrocytome
<u>Grade III</u>	Astrocytome anaplasique	Oligodendrogliome anaplasique	Ependymome anaplasique	Oligoastrocytome anaplasique
<u>Grade IV</u>	Glioblastome			

➤ **Glioblastomes primaires et secondaires**

Il existe deux sous-catégories de glioblastomes : les glioblastomes *de novo* ou primaires et les glioblastomes secondaires. Les glioblastomes secondaires sont des gliomes résultant de l'évolution d'astrocytomes de bas grade. Alors que dans le cas des glioblastomes primaires, les astrocytomes de haut grade apparaissent *de novo*. Il a été démontré que les GBMs primaires (GBMs I) touchent plutôt les hommes alors que les femmes prédominent dans les GBMs secondaires (GBMs II) (OHGAKI et KLEIHUES, 2005). Ce sont les glioblastomes secondaires qui ont un meilleur pronostic, justifié probablement par un âge moyen plus jeune des patients atteints de ce type de glioblastome (62 ans pour les glioblastomes primaire et 45 pour les glioblastomes secondaires) (OHGAKI et KLEIHUES, 2005). Malheureusement, la majorité des glioblastomes sont de types primaires (plus de 90% des cas) (FURNARI, FENTON, BACHOO et al., 2007).

➤ Epidémiologie des glioblastomes

D'une manière générale, les gliomes de haut grade représentent 63% des astrocytomes (CRUCERU, NEAGU, DEMOULIN et al., 2013). On dénombre environ 2700 nouveaux cas de glioblastomes par an en France, ce qui en fait la tumeur cérébrale la plus fréquente chez l'adulte (CLARKE, BUTOWSKI et CHANG, 2010). L'incidence est d'environ 4 pour 100 000 habitants en France (BALDI, HUCHET, BAUCHET et al., 2010). Son augmentation chaque année de 1%, peut être expliquée en partie par un vieillissement de la population et une meilleure accessibilité à l'imagerie. Ces tumeurs, touchant particulièrement l'adulte, présentent une grande activité mitotique, des caractères diffus et très infiltrants, ce qui rend impossible la résection chirurgicale totale. La proportion d'hommes atteints de glioblastomes est supérieure à celle des femmes (HALLAND, KOSCHNY, AHNERT et al., 2010). Comme nous pouvons le voir dans la figure 2, les glioblastomes peuvent survenir à tout âge mais touchent, dans 70% des cas, des sujets âgés entre 50 et 70 ans (REMONTET, ESTEVE, BOUVIER et al., 2003).

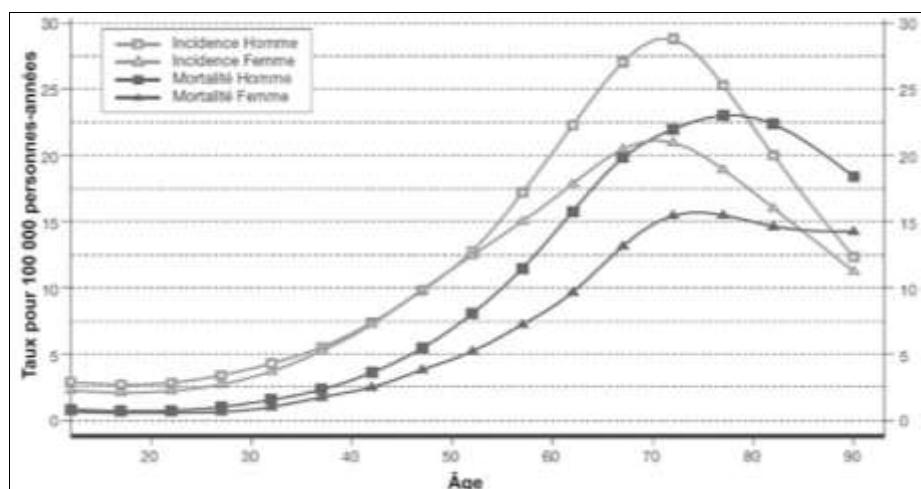


Figure 2 : Incidence et mortalité des glioblastomes en France en 2000 selon le sexe et l'âge d'après REMONTET, ESTEVE, BOUVIER et al., 2003.

Selon le rapport « *Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group* » (1998), les patients atteints de glioblastomes ont une survie moyenne comprise entre 9 et 12 mois s'ils reçoivent le traitement standard (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie par le témozolomide). Cette moyenne de survie peut aller jusqu'à 15 mois lorsque le patient reçoit une chimiothérapie adjuvante (SCOTT, SCARANTINO, URTASUN et al., 1998). Sans traitement, ces tumeurs se propagent en 2 à 3 mois dans l'ensemble du cerveau (STUPP, DIETRICH, OSTERMANN et al., 2002) mais ne métastasent que rarement dans les autres organes.

I.2. Caractéristiques génétiques des glioblastomes

Aujourd’hui la génétique permet de différencier les GBMs des tumeurs de grade inférieur. En effet, les GBMs présentent des altérations génétiques caractéristiques. Il existe d’ailleurs une classification des glioblastomes selon leur profil génétique et moléculaire (VERHAAK, HOADLEY, PURDOM et al., 2010). Ce sont donc les gènes altérés qui permettent de caractériser les GBMs. Le tableau II, présenté ci-dessous, résume les altérations les plus fréquemment mentionnées dans la littérature.

Ces altérations peuvent activer certaines voies de signalisation, déréguler le cycle cellulaire, supprimer les gènes suppresseurs de tumeurs ou entraîner l’activation de l’expression des facteurs de croissances.

Tableau II : Principales altérations génétiques rencontrées dans les GBMs.

<u>Altérations génétiques</u>	<u>Répercussions de ces altérations</u>
Mutation d'EGFR	Augmentation de la résistance thérapeutique, du pouvoir invasif et de la prolifération cellulaire
Perte de <i>PTEN</i>	Augmentation de la résistance à l'apoptose
Délétion de <i>p53</i>	Perte de contrôle du cycle cellulaire G1/S, conduisant à une instabilité génomique
Méthylation de <i>MGMT</i>	Diminution de la protection de l'ADN contre tous agents alkylants
Mutation d'IDH	Augmentation du stress oxydatif

➤ EGFR

La surexpression ou les mutations du gène du récepteur transmembranaire à tyrosine kinase, appelé *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) est une des caractéristiques génétiques des glioblastomes (SIBILIA, KROISMAYR, LICHTENBERGER et al., 2007). Sa surexpression est associée à un facteur de mauvais pronostic (MURACCIOLE, ROMAIN, DUFOUR et al., 2002) avec une augmentation de la chimio et radiorésistance, du pouvoir invasif et de la prolifération cellulaire (GLADSON, PRAYSON et LIU, 2010). L'amplification de ce gène est très souvent rencontrée dans les glioblastomes primaires (WIKSTRAND, REIST, ARCHER et al., 1998). La mutation du gène *EGFR* entraîne souvent l'amplification de cet oncogène (CHU, EVERISS, WIKSTRAND et al., 1997).

➤ PTEN

La perte du bras long du chromosome 10, ou plus globalement de l'hétérozygotie, appelée « *Loss of Heterozygosity* » (LOH), là où est placé le gène suppresseur de tumeur *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*), est présente dans 25 % des GBMs I (OHGAKI, DESSEN, JOURDE et al., 2004). *PTEN* est un régulateur négatif direct de la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase/protéine kinase B (PI3K/Akt) (MELLINGHOFF, CLOUGHESY et MISCHEL, 2007). Cette voie est impliquée dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de certaines voies de mort cellulaire lorsque Akt est activée indéfiniment (WANG, PUC, LI et al., 1997). La perte du gène *PTEN* entraîne donc une suractivation de la voie PI3/Akt (WANG, PUC, LI et al., 1997) qui protège alors les cellules cancéreuses contre les divers stimuli pro-apoptotiques.

➤ p53

p53 (*Tumor protein 53*) est une protéine qui assure le contrôle de l'intégrité du génome (ALBRECHTSEN, DORNREITER, GROSSE et al., 1999). Cette protéine bloque les cellules possédant un génome instable en phase G1 de leur cycle cellulaire ou active leur apoptose par l'intermédiaire de caspases (VOUSDEN et LU, 2002). Des mutations du gène *p53* (situé sur le bras court du chromosome 17) sont fréquemment observées dans les gliomes de bas grade, dans les astrocytomes anaplasiques ainsi que dans les GBMs ; laissant penser que l'inactivation de *p53* intervient très tôt dans le processus de gliomagénèse (LOUIS, 1994). Il a été démontré que 28% de glioblastomes primaires et 65%

de glioblastomes secondaires possèdent une mutation sur le gène *p53* (OHGAKI et KLEIHUES, 2005). La délétion de ce gène suppresseur de tumeur est associée à la perte de contrôle du cycle cellulaire G1/S, conduisant à une instabilité génomique. Cela favorise l'apparition de mutations génétiques successives pouvant être responsables de la progression tumorale.

➤ **MGMT**

La méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) est une protéine enzymatique qui répare les alkylations de l'ADN au niveau de la guanine dans la position O6 (et parfois O4) (GERSON, 2004). Sans l'intervention de la MGMT, la cellule entrerait en apoptose (WATANABE, NAKAMURA, KROS et al., 2002). Des études ont montré que la méthylation du promoteur du gène *MGMT* provoque une diminution de son expression (QIAN et BRENT, 1997). Cette méthylation touche 30% à 50% des patients atteints de glioblastomes (STUPP et HEGI, 2007). *P53* pourrait également réguler négativement l'expression de *MGMT* (BLOUGH, ZLATESCU et CAIRNCROSS, 2007). MGMT protège les cellules contre tout agent alkylant, y compris le témozolomide (médicament de référence dans le traitement actuel du glioblastome que nous détaillerons un peu plus loin), ce qui explique en partie la chimiorésistance des GBMs non porteurs de l'altération du gène *MGMT* (STUPP et HEGI, 2007). Une étude de phase III, menée par L'EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) et le NCIC (*National Cancer Institute of Canada*), montre que 46% des patients dont le promoteur du gène *MGMT* est méthylé sont encore en vie 2 ans après le diagnostic contre seulement 14% pour ceux dont le gène *MGMT* s'exprime (STUPP et HEGI, 2007).

➤ **IDH**

Les mutations du gène isocitrate déshydrogénase (*IDH*) sont souvent rencontrées dans les glioblastomes secondaires (88%) (YAN, PARSONS, JIN et al., 2009) mais quasiment absentes dans les GBMs primaires (VERHAAK, HOADLEY, PURDOM et al., 2010), laissant penser une certaine implication de ces mutations dans l'évolution des tumeurs de bas grade vers les glioblastomes secondaires. D'autres études ont révélé l'implication précoce de ces mutations *IDH* dans le processus de gliomagénèse (LARSEN, 2010). En outre, les patients traités dont le gène *IDH* a muté ont une espérance de survie

supérieure aux patients traités ne possédant pas de mutation sur ce gène (YAN, PARSONS, JIN et al., 2009).

➤ Autres altérations génétiques

mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) est une enzyme de la famille des séries / théonine kinases. Son rôle est de réguler la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. La surexpression du gène mTOR est souvent rencontrée dans le cas des GBMs secondaires (DUZGUN, EROGLU et BIRAY, 2015).

Moins fréquentes mais néanmoins présentes dans les glioblastomes, certaines altérations génétiques nous semblent pertinentes à relever. Les délétions homologues des gènes *neurofibromin1* (*NF1*) et *parkinson protein 2* (*PARK2*), et l'amplification d'*AKT3* (*v-akt murin thymoma viral oncogene homolog 3*) sont également des signatures génétiques des glioblastomes (VERHAAK, HOADLEY, PURDOM et al., 2010).

Nous rencontrons également dans beaucoup de glioblastomes la délétion du bras court du chromosome 1 au niveau de la région 1p36 (ICHIMURA, VOGAZIANOU, LIU et al., 2008). Cette région porte notamment le gène suppresseur « *Mitogen-inducible gene-6* » (*Mig-6*), qui semble diminuer le potentiel tumorigène de la voie de signalisation EGFR par son implication dans la dégradation du couple EGF-EGFR dans les endosomes (YING, ZHENG, SCOTT et al., 2010). La plupart des altérations génétiques associées aux glioblastomes sont illustrées dans la figure 3.

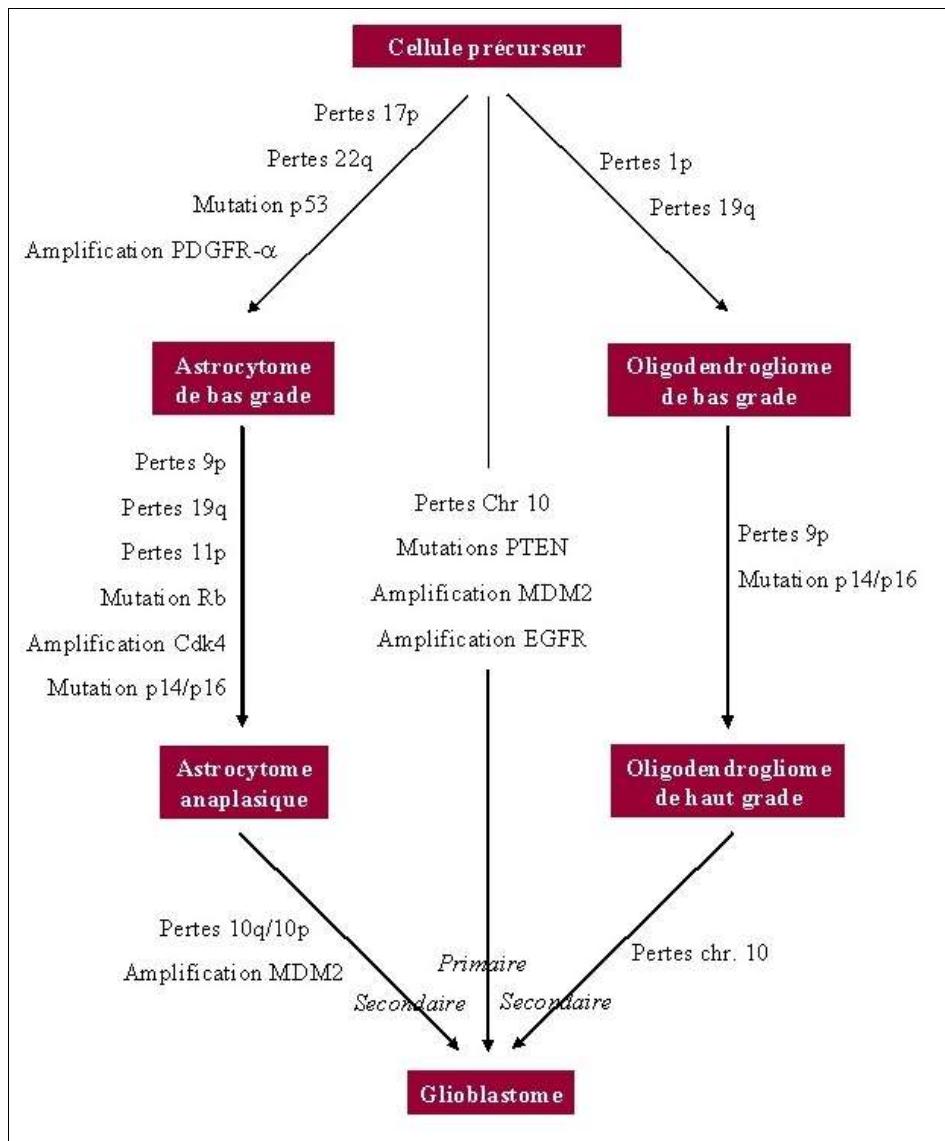


Figure 3 : Altérations génétiques associées aux glioblastomes d'après OHGAKI et KLEIHUES, 2005.

I.3. Caractéristiques biologiques des glioblastomes

➤ Invasion

Dans les glioblastomes, les cellules tumorales, par leur motilité et leur capacité à remodeler la matrice extracellulaire, migrent dans le parenchyme cérébral. L'invasion tumorale se déroule en plusieurs étapes. Il y a tout d'abord un détachement des cellules cancéreuses de la tumeur d'origine (MARET, GRUZGLIN, SADR et al., 2010), puis les cellules adhèrent à la matrice extracellulaire (MEC) via des intégrines (GUO, 2004). Ensuite, ces cellules sécrètent des protéases de la matrice extracellulaire (MMP-2 et 9) qui facilitent la migration tumorale en dégradant cette MEC (RAO, 2003).

Les mécanismes les plus importants dans l'invasion cellulaire semblent être les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire et/ou avec d'autres cellules. Cependant, il a été prouvé que la surexpression du facteur de transcription inducible par l'hypoxie (HIF-1) dans ces cellules tumorales génère de nombreux facteurs de croissance qui facilitent l'invasion des cellules cancéreuses (SEMENZA, 2003).

➤ Prolifération

Il a été établi que la surexpression de HIF-1 α ou de l'interleukine 8 (IL-8) favorise également une très forte prolifération cellulaire caractéristique des GBMs (RONG, DURDEN, VAN MEIR et al., 2006). Cette intense prolifération serait due à une perte de contrôle du cycle cellulaire. Cette caractéristique différencie les GBMs des gliomes de bas grades car ces derniers prolifèrent à un degré nettement moindre.

➤ Nécrose

Une zone nécrotique au centre de la tumeur pouvant englober jusqu'à 80% du glioblastome est également une des particularités de ce genre de tumeurs. La nécrose fait suite à une demande énergétique et métabolique trop importante des cellules tumorales par rapport aux capacités d'apport. Il semblerait que l'hypoxie résultante des exigences du développement des cellules cancéreuses impliquerait une néovascularisation afin

d'acheminer les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur croissance (POUYSSEGUR, DAYAN et MAZURE, 2006).

➤ Angiogénèse

Il est bien admis que le facteur de transcription HIF-1 α est en partie responsable de la néoangiogénèse (POUYSSEGUR, DAYAN et MAZURE, 2006). En effet, HIF-1 α contrôle l'expression de l'angiopoïétine-2 et de « *Vascular Endothelial Growth Factor* » (VEGF) (VAJKOCZY, FARHADI, GAUMANN et al., 2002). La surexpression du facteur de croissance VEGF dans les cellules tumorales, en réponse à l'hypoxie, stimule la migration et la prolifération des cellules endothéliales et protège les cellules de l'apoptose (LARSEN, 2010). De plus, une étude récente a montré que l'hypoxie inhibe l'expression des facteurs anti-angiogéniques (LARSEN, 2010). L'angiogénèse anormale résultant de ce processus est formée soit à partir de vaisseaux préexistants soit par le glioblastome qui se charge de modifier des vaisseaux « normaux » après les avoir englobés (LARSEN, 2010). Ces nouveaux capillaires sanguins étant beaucoup plus longs, nous parlerons de prolifération « directionnelle » ou de prolifération « intraluminale » lorsque nous mentionnerons l'augmentation de leur épaisseur (BRAT et VAN MEIR, 2001). La forte perméabilité des parois de ces capillaires augmente la teneur en eau dans le tissu tumoral pouvant conduire à d'importants œdèmes (VERHOEFF, VAN TELLINGEN, CLAES et al., 2009). Ces néo-vaisseaux sont également le siège de nombreuses thromboses, nécroses et hémorragies intratumorales qui traduisent une mauvaise gestion du flux sanguin. Il a été démontré aussi que la néoangiogenèse participe à la formation de niches vasculaires, refuge pour les cellules souches cancéreuses et qu'elle contribue à la chimiorésistance (TURPIN, SHARIF, STOVEN et al., 2015).

➤ Apoptose

L'apoptose intervient lorsque les cellules n'adhèrent plus à la matrice extracellulaire. Les modifications génétiques et moléculaires des cellules des glioblastomes leurs confèrent cette particularité d'être résistantes à l'apoptose (GUISE, ABBATTISTA, SINGLETON et al., 2010). Cette résistance accrue passe notamment par la sur activation de protéines ou de voies anti-apoptotiques (CHIARUGI et GIANNONI, 2008). Or, La majorité des thérapies actuelles sont de types pro-apoptotiques d'où leur faible efficacité sur les GBMs.

I.4. Prise en charge actuelle des glioblastomes

Actuellement, le but des thérapies est de réduire les déficits neurologiques induits par la tumeur et le traitement mais la finalité est, bien entendu, d'augmenter la survie du malade tout en maintenant une qualité de vie optimale. Malheureusement, jusqu'à présent, la quasi-totalité des patients atteints de glioblastomes sont victimes de récidives.

➤ Chirurgie

La première étape du traitement pour un patient atteint de glioblastome repose sur la résection chirurgicale la plus large possible de la tumeur. Plus le volume de la tumeur est faible, plus la réponse positive au traitement est importante (KELES, LAMBORN, CHANG et al., 2004). Afin de limiter les risques de séquelles neurologiques liés à la complexité de l'opération, il existe la chirurgie éveillée du patient, qui est une technique consistant à cartographier par électrostimulation les zones du cerveau (DE BENEDICTIS, MORITZ-GASSER et DUFFAU, 2010). Il existe également le gliolan, un produit qui colore en rouge les cellules tumorales exposées à la lumière bleue, ce qui permet de mieux les visualiser lors des opérations (IDOATE, DIEZ VALLE, ECHEVESTE et al., 2011). En regard à la complexité du cerveau et au caractère infiltrant de ces tumeurs, la résection totale de la tumeur ne peut être pratiquée sans endommager des fonctions motrices ou cérébrales. A défaut d'être curative, la chirurgie cytoréductive permet néanmoins d'améliorer l'état neurologique général des patients en réduisant la pression intracrânienne. Ce processus donne lieu, dans certains cas, à une augmentation du taux de survie.

➤ Radiothérapie

La radiothérapie altère les chromosomes en ionisant les acides nucléiques ce qui perturbe les divisions des cellules cancéreuses. Cependant, tous les GBMs d'une part développent une certaine radiorésistance et d'autre part, une radionécrose, une démyélinisation ou une augmentation transitoire de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pouvant survenir après une radiothérapie (KEIME-GUIBERT, CHINOT, TAILLANDIER et al., 2007). Le schéma de référence pour la radiothérapie, suggéré par Stupp et ses collaborateurs dans une étude réalisée en 2005, est de 30 à 35 fractions de 1,8 à 2 Gy délivrées 5 jours par semaine sur 6 semaines pour atteindre une dose de 60 Gy

(STUPP, MASSON, VAND DEN BENT et al., 2005). L'augmentation de la dose globale (allant jusqu'à 90 Grey) ou de la dose quotidienne (3-4 Grey), ne renforce que la toxicité sans accroître significativement l'effet bénéfique de la radiothérapie sur les glioblastomes (NIEDER, ANDRATSCHKE, WIEDENMANN et al., 2004).

➤ Chimiothérapie

Une chimiothérapie vient s'associer à la radiothérapie mais son efficacité semble dépendre de l'activation de l'enzyme MGMT qui est surexprimée dans les GBMs (LIU, YUAN, ZENG et al., 2006). C'est surtout la surexpression de transporteurs membranaires de la famille des «*adenosine triphosphate-binding cassette (ABC)*», expulsant continuellement les agents de chimiothérapie dans le milieu extracellulaire, qui est responsable de la majorité de la chimiorésistance des glioblastomes (LIU, YUAN, ZENG et al., 2006).

Le témozolomide (TMZ)

Par sa grande efficacité, tout en préservant une bonne qualité de vie au patient, sa capacité à induire l'autophagie et sa faculté à inhiber les mécanismes d'angiogénèse, le témozolomide de la famille des nitroso-urées, s'est très vite installé en tête de file pour le traitement chimiothérapeutique des glioblastomes (STUPP, MASSON, VAND DEN BENT et al., 2005).

Le caractère amphiphile du TMZ lui permet de passer facilement la barrière hémato encéphalique pour ensuite se dissoudre facilement en milieu aqueux (FRIEDMAN, KERBY et CALVERT, 2000). Le témozolomide est un agent alkylant imidazotétrazine de seconde génération pouvant être pris par voie orale et ne nécessitant aucune métabolisation hépatique pour produire l'agent actif (STUPP, MASSON, VAND DEN BENT et al., 2005). Il améliore significativement la survie des patients atteints de glioblastomes (STUPP, HEGI, MASON et al., 2009).

La figure 4 illustre les résultats d'un essai clinique, réalisé par Stupp et ses collaborateurs en 2005, sur l'effet du témozolomide dans le traitement des glioblastomes (STUPP, MASSON, VAND DEN BENT et al., 2005). Au bout de 2 ans, le taux de survie des patients atteints de glioblastomes a plus que doublé lorsque nous associons (dès le début du traitement) le témozolomide à la radiothérapie par comparaison aux patients traités uniquement par radiothérapie.

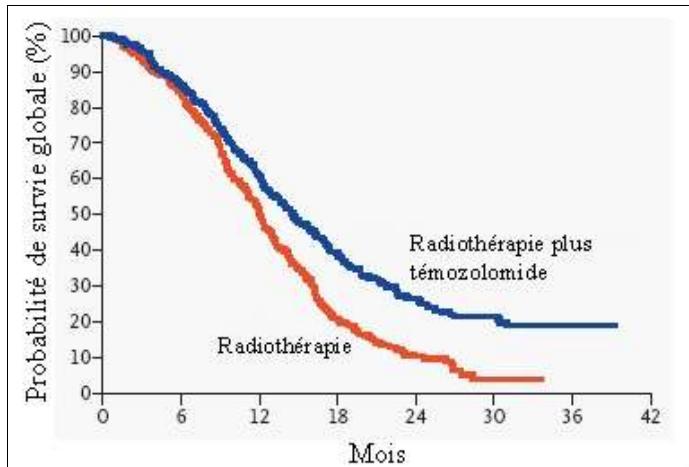


Figure 4 : Estimation de la survie globale des patients atteints de GBMs en fonction du traitement administré d'après STUPP, MASSON, VAND DEN BENT et al., 2005.

Le protocole consiste à administrer 75mg/m²/jour tout au long de la radiothérapie sans dépasser 49 jours consécutifs. Après ce premier cycle, une pause de 4 semaines est nécessaire avant de reprendre jusqu'à 6 cycles avec 28 jours séparant chaque cycle. Les doses administrées durant ces cycles commencent à 150 mg/m² par jour durant 5 jours consécutifs. Nous pouvons augmenter cette dose jusqu'à 200mg/m² en fonction de la tolérance au traitement (STUPP, MASSON, VAND DEN BENT et al., 2005). Les neutropénies sont les principaux effets indésirables à surveiller lors de cette chimiothérapie. De ce fait, nous pourrons alors mettre en place une antibioprophylaxie afin d'éviter l'apparition d'infections opportunistes.

Cependant, l'activation de l'enzyme de réparation MGMT diminue l'efficacité du témozolamide (HEGI, DISERENS, GORLIA et al., 2005). Dans ce cas, il serait nécessaire d'essayer d'autres molécules chimiothérapeutiques.

Les autres molécules

Tout comme le TMZ, d'autres molécules sont administrées au début et tout au long de la radiothérapie afin d'optimiser le traitement contre les GBMs. Nous retrouvons d'autres nitroso-urées comme la carmustine, la lomustine, la belustine, la fotémustine qui ont été pendant plusieurs années le traitement chimiothérapeutique de première intention dans les gliomes de haut grade en complément de la radiothérapie (PRADOS, SCOTT, CURRAN et al., 1999). Les nitroso-urées sont des agents qui alkylant la position O6 de la guanine de l'ADN. Leur bonne liposolubilité en fait la classe d'agents chimiques la plus efficace pour le traitement des glioblastomes en chimiothérapie (SOUHAMI, SEIFERHELD, BRACHMAN et al., 2004).

Aux Etats-Unis, nous assistons également à l'utilisation de la carmustine dans « la technique de gliadel ». Cette technique repose sur l'imprégnation d'un implant de carmustine (Gliadel®) introduit au niveau de la cavité résultant de l'exérèse de la tumeur. L'autorité nord-américaine de santé, « *Food and Drug Administration* » (FDA), a validé cette technique comme traitement de seconde ligne (QUINN, JIANG, CARTER et al., 2009). Le gliadel possède également une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour la première ligne et pour la récidive (BOTA, DESJARDINS, QUINN et al., 2007). Cependant, il faut noter que le gliadel perturbe la surveillance IRM (HART, GRANT, GARSIDE et al., 2011).

Nous pouvons également citer la procarbazine de la famille des triazènes comme autre agent alkylant utilisé dans le traitement chimiothérapeutique. Nous retrouvons aussi la vincristine, un alcaloïde extrait de la pervenche de Madagascar, qui agit en inhibant la polymérisation de la tubuline en microtubules (JORDAN, HIMES et WILSON, 1985).

Enfin, nous pouvons associer plusieurs molécules entre elles, ce qui augmente l'efficacité de la chimiothérapie comme par exemple la combinaison PCV (Procarbazine, Lomustine et Vincristine) (MURPHY, PICKLES, KNOWLING et al., 2002) ou encore la combinaison carboplatine /étoposide (FRANCESCHI, CAVALLO, SCOPECE et al., 2004).

Bien que nous continuons à utiliser ces molécules aujourd'hui dans le traitement des GBMs, l'échec de ces traitements nous pousse à réfléchir à d'autres molécules plus efficaces, avec un mécanisme d'action différent afin de garantir une meilleure prise en charge thérapeutique des patients atteints de glioblastomes (SOUHAMI, SEIFERHELD, BRACHMAN et al., 2004). C'est dans cet esprit que les anticorps monoclonaux humanisés, tel que le bévacizumab (AVASTIN) ciblant le VEGF circulant, ont vu le jour. En effet, cette molécule a obtenu l'AMM depuis 2009 en complément du protocole de Stupp dans les récidives (COHEN, SHEN, KEEGAN et al., 2009), ce qui augmenterait la survie des patients de 6 mois (NAGPAL, HARSH et RECHT, 2011).

Une nouvelle avancée dans la compréhension de nombreux cancers, y compris les GBMs, est la découverte des cellules souches cancéreuses (GUICHET, BIECHE, TEIGELL et al., 2013). L'identification de cellules souches cancéreuses au sein des GBMs (IGNATOVA, KUKEKOV, LAYWELL et al., 2002) a permis de mieux comprendre la biologie tumorale et de reconsiderer l'approche thérapeutique. En effet, nous pouvons constater que les traitements actuels ciblent les cellules en division rapide. Or, les CSCs seraient quiescentes, d'où l'inefficacité des traitements actuels. Ce concept reste certes encore à l'état embryonnaire du fait que nous devons faire face à des difficultés d'ordre technique. Il est vrai que la caractérisation des CSCs des glioblastomes demeurera incomplète tant

qu'aucun marqueur spécifique n'aura été défini. Malgré ces limites, la théorie des CSCs nous offre de nouvelles perspectives en vue de contrer la résistance thérapeutique des GBMs. Cibler les CSCs deviendrait alors une priorité contre les GBMs.

Dans la suite de notre thèse, nous allons nous focaliser sur l'implication des cellules souches cancéreuses (ou cellules initiatrices de tumeur) dans le développement des glioblastomes. Nous allons faire une synthèse des publications scientifiques participant à l'avancée conceptuelle pour comprendre les mécanismes de résistance aux traitements à travers cette population cellulaire. Parvenir à cibler spécifiquement ces cellules ou forcer leur différenciation permettrait de les rendre inoffensives.

PARTIE II :

CONCEPT DES CELLULES

SOUCHES CANCEREUSES

DANS LES GLIOBLASTOMES

II.1. Origine des gliomes

L'origine tumorale est depuis des siècles une préoccupation de la communauté scientifique. Deux modèles principaux ont été proposés.

Selon le modèle stochastique ou modèle de l'évolution clonale, qui faisait consensus, toutes les cellules cancéreuses, même différenciées, auraient la capacité de proliférer indéfiniment (PERSANO, RAMPAZZO, BASSO et al., 2013). Ces cellules formeraient des clones indépendants qui muteraient de façon aléatoire au fur et à mesure de leur multiplication. Les tumeurs évolueraient ensuite selon une sélection des clones les plus efficaces et adaptés dans l'environnement tumoral (PERSANO, RAMPAZZO, BASSO et al., 2013). La différenciation de ces cellules ainsi que leurs variantes génétiques seraient alors la cause de l'hétérogénéité des cellules cancéreuses (figure 5). Ce modèle, appelé modèle « stochastique », permettrait également d'expliquer le phénomène de dédifférenciation des cellules matures selon un environnement adéquat (PERSANO, RAMPAZZO, BASSO et al., 2013).

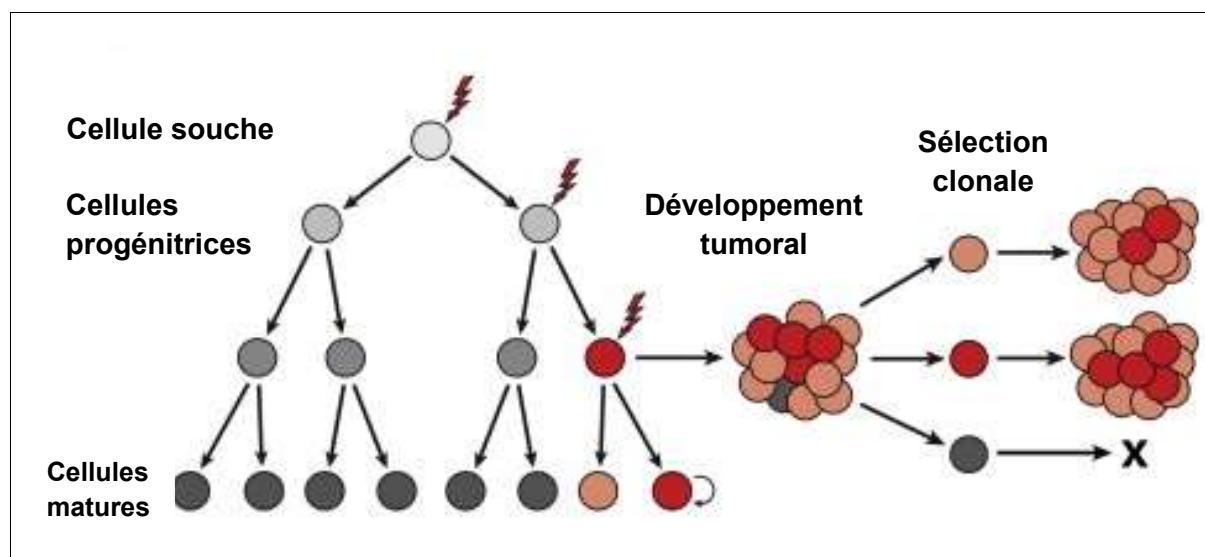


Figure 5 : Représentation schématique du modèle « stochastique » adapté de VISVADER LINDEMAN, 2012.

Un deuxième modèle appelé modèle « hiérarchique », illustré dans la figure 6, pourrait être pris en compte dans notre conception du cancer : l'hypothèse des cellules souches cancéreuses. A l'inverse du modèle stochastique, celui-ci postule un fonctionnement hiérarchique des cellules. Les cellules souches cancéreuses, au sommet de la hiérarchie seraient les seules initiatrices de cancer (PERSANO, RAMPAZZO, BASSO et al., 2013). Sur le fonctionnement des cellules souches normales, un nombre restreint de CSCs (ayant reçu des mutations) permettrait un développement tumoral. Dans ce modèle monoclonal, l'hétérogénéité des cellules cancéreuses serait la conséquence de l'arrêt de différenciation intervenant à différents stades (PERSANO, RAMPAZZO, BASSO et al., 2013). Ce nouveau modèle, qui fait encore débat dans la communauté scientifique pourrait être responsable de l'échec thérapeutique et de la récidive tumorale.

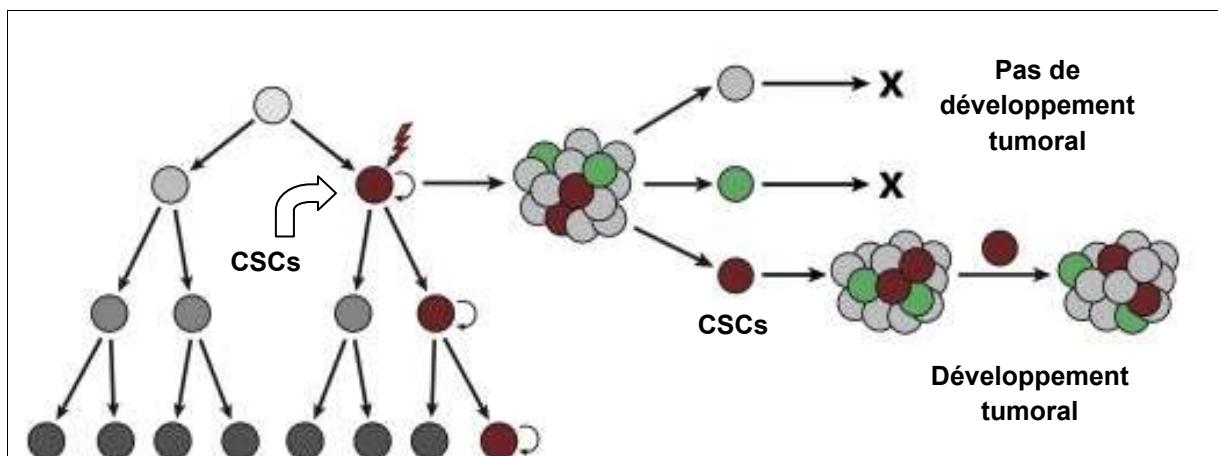


Figure 6 : Représentation schématique du modèle « hiérarchique » adapté de VISVADER et LINDEMAN, 2012.

II.2. Exploration historique de la théorie des cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes

C'est au XIXème siècle qu'apparaît tout d'abord l'hypothèse des cellules souches cancéreuses (SELL, 2010). Cependant à cette époque, la priorité était de traiter les maladies infectieuses. Ce sont les expériences menées sur les leucémies myéloïdes qui ont aidé à se prononcer sur la théorie monoclona (SELL, 2010).

➤ **Cellule souche cancéreuse à l'origine des leucémies myéloïdes**

Des recherches menées en 1967 (FIALKOW, DENMAN, JACOBSON et *al.*, 1978) ont montré que les cellules myéloïdes leucémiques spécialisées sont issues d'une seule et même cellule précurseur. L'origine de ce cancer serait, dès lors, monoclona et la cellule responsable se situerait à une position élevée dans la hiérarchie cellulaire. D'autres chercheurs en arrivent à la même conclusion en étudiant le chromosome Philadelphie (WALKER et HARDY, 1976).

Grâce au modèle animal, notamment la souris NOD/SCID qui est un bon modèle pour la xénogreffe (UCKUN, 1996), l'approfondissement de l'analyse des leucémies permet de mieux identifier les cellules à l'origine du cancer. Ainsi, une étude (BRUCE et VAN DER GAAG, 1963) a démontré que la xénotransplantation de 100 cellules d'un lymphome T dans une souris saine génère une tumeur. De plus, le nombre de cellules développées est proportionnel au nombre de cellules cancéreuses injectées. Des études supplémentaires utilisant des modèles murins (LAPIDOT, SIRARD, VORMOOR et *al.*, 1994) ont mis en évidence le fait que seules certaines cellules sont tumorigènes *in vivo*.

L'étude en cytométrie de flux de sang périphérique et de moelle osseuse de patients leucémiques a permis d'identifier une cellule à l'origine de la leucémie pour la première fois en 1994 (LAPIDOT, SIRARD, VORMOOR et *al.*, 1994). Ce type de cellules, qui représenterait moins de 1% des cellules cancéreuses, exprimait le marqueur CD34 (un des marqueurs des cellules souches) mais n'exprimaient pas le marqueur CD38 (qui caractérise les cellules sanguines différenciées). De surcroît, Bonnet et Dick (BONNET et DICK, 1997), ont constaté en 1997 que ces cellules CD34⁺ et CD38⁻, provenant de patients leucémiques, présentaient les propriétés de cellules souches avec la capacité d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation.

Nous savons aujourd’hui que les leucémies sont organisées sous une forme hiérarchique ayant au sommet une cellule initiatrice de leucémie (SL-IC pour *leukemia-initiating cell*). L’identification de ces CSCs dans les leucémies a poussé les chercheurs à travailler sur d’autres tumeurs avec les mêmes méthodes d’isolement et d’identification. C’est dans ce contexte que des CSCs ont été retrouvées dans plusieurs tumeurs et notamment dans le cancer du sein (AL-HAJJ, WICHA, BENITO-HERNANDEZ et al., 2003), et dans les GBMs (IGNATOVA, KUKEKOV, LAYWELL et al., 2002).

➤ **Identification de cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes**

En 2003, des CSCs ont pu être isolées depuis une suspension unicellulaire de tumeur cérébrale pédiatrique en utilisant la cytométrie et le marqueur CD133, soit « cluster » de différenciation 133, ou bien aussi appelé prominine 1 (SINGH, CLARKE TERASAKI et al., 2003). Ces cellules CD133⁺ forment des neurosphères en culture. Elles ont un potentiel d’auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation. Ces CSCs ont également la faculté de régénérer la tumeur originale *in vivo* et *in vitro*.

Au cours de la même année, Hemmati et ses collaborateurs (HEMMATI, NAKANO, LAZAREFF et al., 2003) ont noté le potentiel tumorigène, migratoire, prolifératif et de différenciation des neurosphères dérivées de glioblastomes multiformes chez l’enfant, après les avoir introduites dans le cerveau de rats.

En 2004, des chercheurs (SINGH, HAWKINS, CLARKE et al., 2004) ont relevé la présence de cellules CD133⁺ provenant de glioblastomes d’enfant et d’adulte, capables toutes les deux de reformer entièrement la tumeur originelle après transplantation dans le cerveau d’une souris immunodéprimée. Les CSCs sont donc présentes dans les glioblastomes, à la fois chez les enfants et chez les adultes. Une toute petite fraction de CSCs CD133⁺ suffit pour former une tumeur, tandis qu’avec des dizaines de milliers de cellules CD133⁻ mis en culture dans les mêmes conditions, aucune tumeur ne se forme.

En parallèle, la multipotentialité de ces CSCs a été prouvée (GALLI, BINDA, ORFANELLI et al., 2004). Ces cellules ont le pouvoir de se différencier *ex vivo* en exprimant les marqueurs spécifiques du tissu hôte. Par la suite, d’autres chercheurs ont réussi à isoler des CSCs de glioblastomes pédiatriques et adultes (PATRU, ROMAO, VARLET et al., 2010).

II.3. Caractéristiques et propriétés des cellules souches cancéreuses des glioblastomes

Lors du congrès annuel de 2006, l'AACR (*American Association for Cancer Research*) a organisé un atelier sur les cellules souches tumorales, où les questions de la définition et de l'origine des cellules souches cancéreuses ont été discutées (CLARKE, DICK, DIRKS et al., 2006). Le consensus s'est fait autour d'une définition unique. Les cellules souches tumorales sont alors décrites comme étant les cellules issues de la tumeur, ayant la capacité de s'auto-renouveler et de reproduire l'hétérogénéité de la tumeur d'origine, notamment via des expériences de xénogreffes, considérées comme le test fiable qui fait référence dans le domaine. En fait, le terme de cellules souches tumorales fait plus référence au potentiel de ces cellules qu'à leur origine. C'est pourquoi elles sont parfois appelées « cellules initiatrices de tumeurs » ou encore « cellules tumorigéniques ».

➤ Origine

La première hypothèse était que les CSCGs dérivaient plutôt de cellules souches normales qui auraient la possibilité d'accumuler des mutations au cours de leur longue vie. Elles ne dériveraient donc pas de cellules progénitrices, dont la durée de vie est excessivement courte avant le passage à la différenciation terminale (OWENS et WATT, 2003). Quelques années plus tard, une origine progénitrice ayant réacquis des propriétés de cellules souches suite à une mutation tardive fut suggérée (PARK, TSENG et WEISSMA, 2009). Cette mutation mènerait à une réactivation des voies de contrôle de l'auto-renouvellement. Enfin, une dédifférenciation de cellules astrocytaires pourrait également être à l'origine de ces cellules souches cancéreuses (FRIEDMANN-MORVINSKI, BUSHONG, KE et al., 2012). La figure 7 illustre l'interrogation sur l'origine des CSCGs.

De manière plus générale, le cancer pourrait également découler d'une expression inappropriée de programmes d'expression des gènes du type « Cellule Souche » (WANG et ARMSTRONG, 2008).

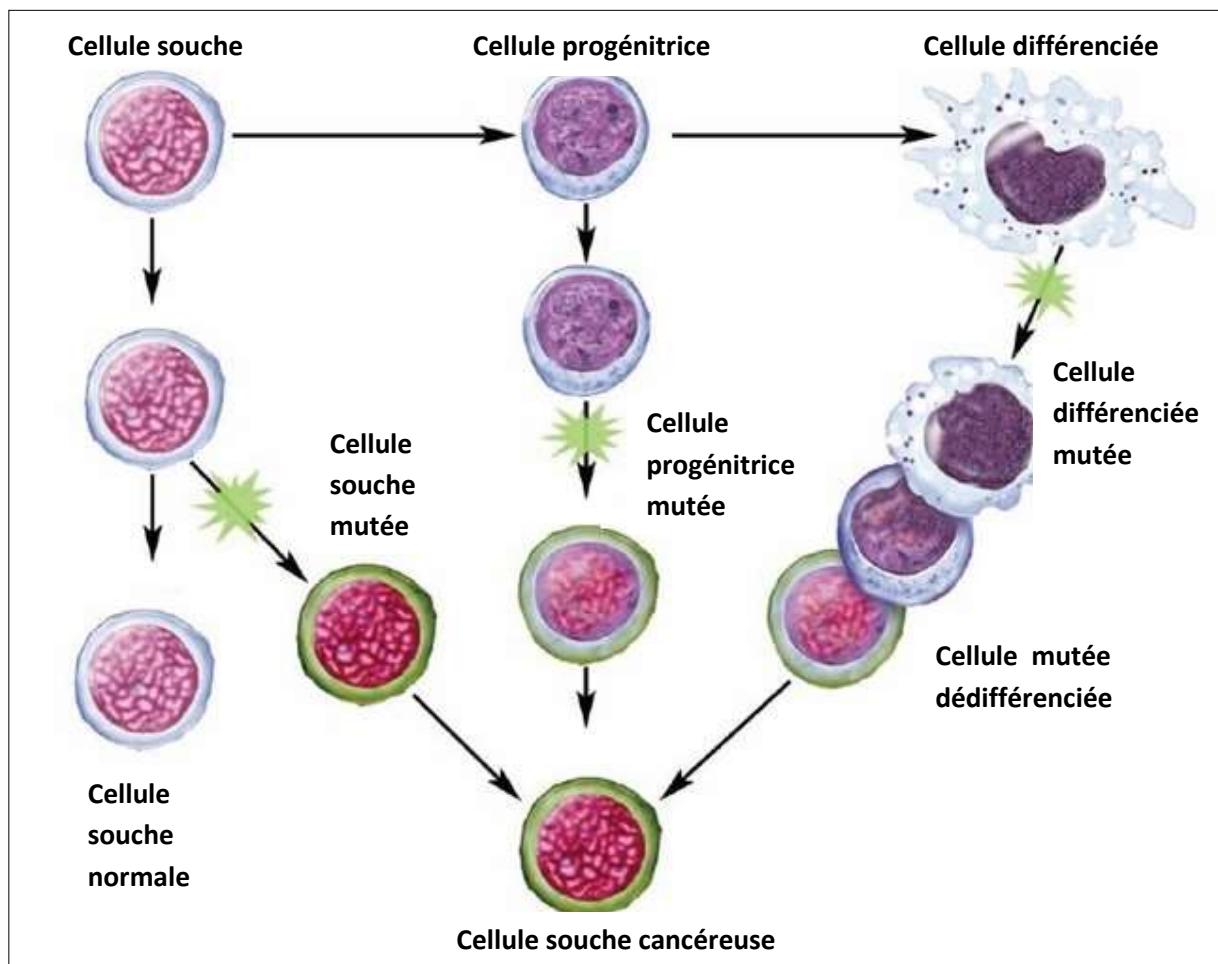


Figure 7 : L'origine des cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes reste inconnue, illustration adaptée de GOLDTHWAITE, 2006.

Les études sur les cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes sont nombreuses. Observer les CSCGs reste toutefois ardu du fait de leur localisation cérébrale et donc de la difficulté d'y avoir accès. Ces cellules gardent cependant les mêmes caractéristiques principales que les cellules souches neurales normales. Si nous les comparons à ces dernières, les CSCs peuvent être considérées comme une petite sous-population cellulaire à l'intérieur de la tumeur. Elles possèdent des propriétés d'auto-renouvellement, nécessaire au maintien de leur pool, ainsi qu'une capacité de prolifération presque infinie mais aussi une aptitude de différenciation en cellules hétérogènes permettant de régénérer la masse tumorale.

➤ Auto-renouvellement

La question de l'auto-renouvellement demeure essentielle, dans le cas présent, tout comme lorsqu'il s'agit d'un développement normal. Pour entretenir son pool et garder la capacité de produire de nouvelles cellules, une cellule souche cancéreuse doit conserver l'aptitude de s'auto-renouveler par division symétrique ou asymétrique et donner lieu, *a minima*, à une cellule fille ayant les mêmes propriétés de cellule souche que la cellule mère. Si la cellule souche en proliférant, ne s'auto-renouvelle pas, le pool de cellules souches en sera alors appauvri.

Une mise en culture des CSCs provenant de patients atteints de GBMs est effectuée afin d'observer leur renouvellement autonome. Suite à la résection tumorale, et en vue d'obtenir des cellules isolées, la tumeur est dissociée. Le milieu dans lequel sont placées les CSCs isolées était dépourvu de sérum mais contient des facteurs de croissances tels que l'EFG ou encore le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Un pouvoir d'auto-renouvellement est alors remarqué car il y a formation d'agglomérats caractéristiques de la présence de ces cellules capables d'auto-renouvellement et de prolifération. Ces agglomérats nommés neurosphères sont ensuite remis en culture après avoir été dissociés, cela dans le but de démontrer leur capacité illimitée d'auto-renouvellement et de prolifération (GALLI, BINDA, ORFANELLI et *al.*, 2004). La méthode employée dite de « *Neurosphere assay* » est, au départ, employée dans l'isolation et l'amplification des CSNs normales (REYNOLDS et WEISS, 1992).

➤ Multipotentialité

Au cours de leur développement, les cellules souches neurales se différencient en vue de générer des cellules matures qui appartiennent aux différents lignages (gliaux ou neuronaux), cela pour structurer et organiser le tissu adulte. Cette multipotentialité, qui permet l'obtention de types cellulaires distincts à partir d'un tissu donné, est l'une des caractéristiques importantes des CSNs.

Lorsque nous isolons des cellules souches cancéreuses par clonogénérité, nous évaluons ainsi leur capacité de différenciation. Ceci permet de confirmer l'hypothèse des cellules souches cancéreuses. Il a été ainsi mis en évidence par Singh et ses collaborateurs (SINGH, HAWKINS, CLARKE et *al.*, 2004) et d'autres équipes (HEMMATI, NAKANO, LAZAREFF et *al.*, 2003 ; GALLI, BINDA, ORFANELLI et *al.*, 2004 ; PATRU, ROMAO,

VARLET et al., 2010) que ces cellules isolées ont la capacité de former des neurosphères et de se différencier en cellules du SNC.

➤ Propagation tumorale

La propagation tumorale est l'une des caractéristiques essentielles des CSCs. Effectivement, les CSCs sont à l'origine des tumeurs et se doivent donc d'être capables de former *de novo* ou de régénérer la tumeur. Par le protocole de dilution limite il a été démontré qu'un nombre minimal de cellules pouvait former une nouvelle masse tumorale (SINGH, HAWKINS, CLARKE et al., 2004). Cette démonstration comprend des greffes orthotopiques en présence de quantités décroissantes de cellules souches. Il a été prouvé par cette expérience, ainsi que par celle de Bao et son équipe (BAO, WU, SATHORNSUMETEE et al., 2006), qu'après une greffe, un pool de 100 à 1000 CSCs provenant de tumeurs de patients était encore capable de former une tumeur.

Ces différentes expériences prouvent la présence d'une petite fraction de CSCs dans les GBMs, ayant la capacité d'initier et de reproduire, seule, la tumeur originelle après xénotransplantation. La figure 8 illustre les caractéristiques des CSCGs y compris celles partagées avec les CSNs. En effet, à partir de marquages de neurosphères provenant de GBMs, il a été démontré que des marqueurs d'immaturité des CSNs tels que CD133, la nestine, ou encore Sox2 pouvaient être utilisés pour caractériser des CSCGs (CHONG, TOH, ZAIDEN et al., 2009).

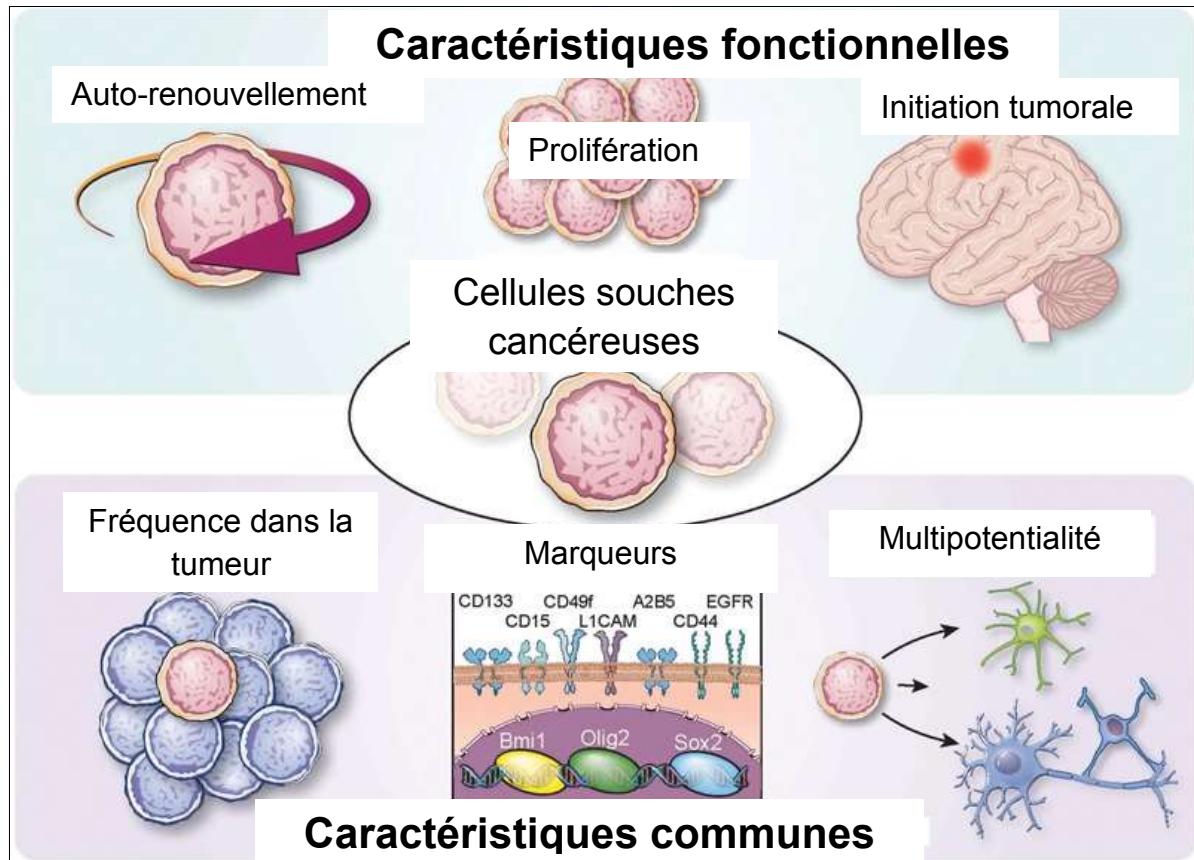


Figure 8 : Caractéristiques des cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes, schéma adapté de LATHIA, MACK, MULKEARNS-HUBERT et al., 2015.

II.4. Marqueurs actuels d'identification des CSCs des glioblastomes

Nous allons voir une liste non exhaustive de marqueurs pouvant être utilisés dans l'identification des CSCGs. Cependant, à l'heure actuelle aucun marqueur n'est exclusif et spécifique à ces cellules. En effet, certains de ces marqueurs se retrouvent dans les CSNs, d'autres dans des précurseurs neuronaux ou encore dans des cellules différenciées. CD133 fut le premier marqueur utilisé dans l'isolation et l'identification des CSCGs.

➤ CD133 / prominine

Le marqueur CD133, analogue humain de la *Prominin-1*, a été identifié dans différents types de cellules souches et de cellules tumorales. Son expression est réprimée dans les cellules différenciées (KANIA, CORBEIL, FUCHS et al., 2005).

Singh et ses collaborateurs (SINGH, HAWKINS, CLARKE et al., 2004) ont observé que les cellules de GBMs exprimant CD133 possédaient des propriétés « souche » *in vitro*. Ils ont constaté que seules les cellules CD133+ avaient la capacité d'initier une tumeur *in vivo*. Ces cellules CD133+ ont été ainsi assimilées à des CSCs. Mais peu de temps après cette observation, une autre équipe (BEIER, HAU, PROESCHOLDT et al., 2007) a prouvé, via des expériences de xénogreffes, que des cellules CD133- sont également capables de générer une tumeur *in vivo*. Le CD133 n'est donc pas un marqueur d'identification spécifique des CSCGs. Dès lors, il a été montré que des cellules CD133+ pouvaient descendre de cellules CD133- après xénogreffé (WANG, SAKARIASSEN, TSINKALOVSKY et al., 2008). Il a aussi été établi, lors de cultures *in vitro*, que des CSCGs pouvaient éventuellement perdre l'expression de CD133, sans toutefois altérer leurs caractéristiques de cellules souches (PATRU, ROMAO, VARLET et al., 2010). CD133 pourrait néanmoins être utilisé comme marqueur de stress environnemental (GRIGUER, OLIVA, GOBIN et al., 2008).

En conclusion, l'utilisation de CD133 comme seul marqueur des CSCGs reste controversée. La recherche d'autres marqueurs de CSCGs demeure la priorité les scientifiques.

Selon une étude réalisée par Zhang et son équipe en 2008 (ZHANG, SONG, YANG et al., 2008), la co-expression CD133 / nestine dans les CSCGs est corrélée à une forme agressive de la tumeur.

➤ Nestine

La nestine est une protéine exprimée par les cellules souches neuro-épithéliales au niveau des filaments intermédiaires de leur cytosquelette. Cette protéine intervient dans la signalisation et le métabolisme cellulaire ainsi que dans l'organisation du cytosquelette. Elle est également considérée comme marqueur de cellules proliférantes et migrantes (DELL'ALBANI, 2008).

La différenciation cellulaire entraîne la perte du marqueur nestine. Mais cela provoque également l'augmentation de l'expression de neurofilaments dans les neurones, ou encore de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) dans les précurseurs de cellules gliales (MESSAM, HOU et MAJO, 2000).

Dans de nombreux cancers, l'expression de la nestine est associée à la mobilité et aux capacités invasives des cellules (STROJNIK, ROSLAND, SAKARIASSEN et al., 2007). Sa localisation de la nestine au niveau du noyau des cellules tumorales provenant de glioblastomes suggère une implication de cette protéine dans l'organisation de la chromatine lors des divisions des cellules souches ou dans la régulation de l'expression de gènes (VESELSKA, KUGLIK, CEJPEK et al., 2006). Une grande proportion de CSCs des GBMs exprime la nestine (PATRU, ROMAO, VARLET et al., 2010). Cependant, ce marqueur n'est pas assez spécifique pour permettre son utilisation comme marqueur unique d'identification des CSCGs.

➤ L1CAM

L1CAM est une glycoprotéine de surface qui intervient dans la régulation de la croissance des cellules neurales au cours du développement du système nerveux central, et aussi dans leur migration et la survie des cellules neurales (KIEFEL, BONDONG, HAZIN et al., 2012).

L1CAM est souvent surexprimée dans les CSCGs exprimant CD133 (ARLT, NOVAK-HOFER, GAST et al., 2006). Une étude (BAO, WU, LI et al., 2008) a révélé que l'inhibition de L1CAM réduit la durée de vie des cellules CD133⁺. L1CAM serait un intermédiaire entre les différents types de cellules cancéreuses. Des recherches plus poussées permettraient de légitimer l'utilisation de L1CAM comme marqueur d'identification de CSCGs.

➤ **SOX2**

SOX2 est un facteur de transcription des cellules souches et des progéniteurs neuronaux (GRAHAM, KHUDYAKOV, ELLIS et al., 2003). La surexpression de SOX2 dans les CSCGs joue un rôle important dans la prolifération. Sox2 maintient le caractère souche de ces cellules en inhibant leur différenciation cellulaire (GRAHAM, KHUDYAKOV, ELLIS et al., 2003). Selon une étude récente (GANGEMI, GRIFFERO, MARUBBI et al., 2009) réalisée *in vivo*, son inhibition entraîne la maturation des CSCGs et la perte de capacité tumorigène.

Cependant lorsque nous induisons SOX2 dans une cellule ne l'exprimant pas, il agit uniquement sur le caractère invasif et migratoire de celle-ci. Donc, SOX2 intervient bien dans l'aspect indifférencié dans les CSCGs mais leurs propriétés ne dépendent pas seulement de ce facteur (ALISON, LIM et NICHOLSON, 2011). La présence de SOX2 dans plusieurs types de cellules de la tumeur ne permet pas d'utiliser exclusivement ce marqueur pour identifier les cellules souches du glioblastome (PHI, PARK, KIM et al., 2008).

➤ **CD15 ou lexis X ou ssea1**

Le CD15 est un antigène glucidique fortement exprimé à la surface de cellules souches pluripotentes (Capela et Temple 2002). Il est aussi appelé Lexis (antigène Lewis X), ou encore SSEA1 (*Stage-Specific Embryonic Antigen 1*). Le CD15 a été proposé pour l'identification des CSCGs (SON, WOOLARD, NAM et al., 2009). En effet, ce marqueur est intensément exprimé dans beaucoup de cellules souches pluripotentes (CAPELA et TEMPLE, 2002) et son expression diminue significativement avec le stade de différenciation cellulaire. De plus, les CSCGs CD15⁺ sont fortement clonogéniques (auto-renouvellement et différenciation en plusieurs types cellulaires) et hautement tumorigènes *in vitro*. Ces cellules CD15⁺, contrairement aux cellules CD15⁻, sont capables de former des tumeurs secondaires après passages *in vivo* et peuvent recréer une tumeur entière, en générant des cellules CD15⁻ et CD15⁺ à travers des divisions asymétriques (SON, WOOLARD, NAM et al., 2009).

➤ **CXCR4**

De nombreux processus biologiques, comme la mobilité des cellules souches, la différenciation, l'angiogénèse, l'apoptose ou l'attraction des lymphocytes, sont régulés par une voie de signalisation impliquant le récepteur membranaire CXCR4. La molécule CXCR4 et son unique ligand connu, la CXCL12 (ou SDF-1 pour *Stromal-Derived Factor-1*) sont

exprimés aussi bien dans les cellules neuronales que dans les cellules gliales. Ils interviennent dans la neurogénèse et la connectivité (ZHENG, SHEN, YANG et al., 2007).

Le CXCR4 est surexprimé dans les CSCGs (EHTESHAM, MAPARA, STEVENSON et al., 2009). Il est impliqué dans l'invasion, la néovascularisation (EHTESHAM, MAPARA, STEVENSON et al., 2009) et la quiescence des CSCGs (KHAN, BRANDIMARTI, MUSSER et al., 2003).

➤ **CD44**

Le récepteur CD44 intervient, quant à lui, dans plusieurs fonctions immunitaires. C'est un marqueur important de cellules souches normales et cancéreuses (CHAN, ESPINOSA, CHAO et al., 2009). C'est une molécule d'adhésion intervenant dans les mécanismes d'invasion tumorale et de métastases (RANUNCOLO, LADEDÀ, SPECTERMAN et al., 2002). Le CD44 favoriserait la migration de cellules tumorales dans certains cancers.

La surexpression de CD44 dans les glioblastomes, permet à la tumeur de résister aux espèces réactives d'oxygène (EROs) et à la chimiothérapie (XU, STAMENKOVIC et YU, 2010). Cette surexpression augmente davantage avec le stade tumoral (WEI, HUANG, CHEN et al., 2010).

➤ **A2B5**

L'épitope de surface A2B5 est exprimé dans les précurseurs neuronaux (COLIN, BAEZA, TONG et al., 2006). Les cellules cancéreuses du glioblastome exprimant A2B5 possèdent des caractéristiques tumorigènes (OGDEN, WAZIRI, LOCHHEAD et al., 2008).

Après transplantation, les cellules cancéreuses exprimant A2B5 forment des tumeurs, contrairement aux cellules cancéreuses A2B5⁻. Les caractéristiques souches de ces cellules A2B5⁺ ne dépendent pas de l'expression de CD133. Elles sont capables de s'auto-renouveler, de migrer et de se différencier en cellules gliales (TCHOGHANDJIAN, BAEZA, COLIN et al., 2010). A2B5 est indispensable à la cellule cancéreuse pour conserver son potentiel tumorigène. Malheureusement, le rapport CD133⁺ / A2B5⁺ n'est pas constant entre les différents patients atteints de GBMs.

La majorité des CSCGs identifiées expriment un mélange de marqueurs (SCHMALZ, SHEN et PARK, 2011). Le tableau III présente chronologiquement les principaux marqueurs utilisés actuellement dans l'identification des CSCGs. Cependant, aucun de ces marqueurs n'est spécifique ni exclusif aux CSCGs (PATRU, ROMAO, VARLET et al., 2010). Cette limite actuelle révèle une caractérisation incomplète des cellules souches cancéreuses.

Tableau III : Marqueurs moléculaires utilisés dans l'étude des CSCGs d'après SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014.

<u>Marqueurs</u>	<u>Auteurs</u>
CD133 (<i>Prominin 1</i>)	SINGH, CLARKE, TERASAKI et al., 2003
A2B5	OGDEN, WAZIRI, LOCHHEAD et al., 2008
L1CAM	BAO, WU, McLENDON et al., 2008
SOX 2	GANGEMI, GRIFFERO, MARUBBI et al., 2009
CXCR4	EHTESHAM, MAPARA, STEVENSON et al., 2009
CD15 (SSEA-1, Lewis X)	SON, WOOLARD, NAM et al., 2009
CD44	ANIDO, SAEZ-BORDERIAS, GONZALEZ-JUNCA et al., 2010
CD36	HALE, OTVOS, SINYUK et al., 2014

II.5. Limites du concept des cellules souches cancéreuses

Bien que l'hypothèse des CSCGs soit très attractive, l'étude des CSCGs pose de nombreux problèmes générant ainsi des résultats contradictoires. Parmi les limites, de ce concept nous notons : la spécificité des marqueurs, l'hétérogénéité de la tumeur, les procédures et le modèle expérimental.

➤ **Marqueurs d'identification**

Une limite majeure dans le domaine de l'investigation des CSCGs est l'utilisation de certains marqueurs dont la spécificité reste critiquée. Cela pose des problèmes dans la définition et la caractérisation des cellules souches cancéreuses. Actuellement, puisque aucun marqueur n'est exclusif aux CSCGs, nous utilisons une combinaison de marqueurs pour isoler ces cellules (HADNAGY, GABOURY, BEAULIEU et *al.*, 2006). Cependant, certains résultats divergent. Ces marqueurs ne semblent donc finalement pas être spécifiques aux cellules souches. En effet, des cellules non souches semblent exprimer la plupart des marqueurs disponibles ce qui explique les résultats contradictoires de certains laboratoires. De plus, pour la majorité des marqueurs utilisés, leur fonction reste inconnue. Prenons l'exemple du marqueur de surface CD133 dont la fonction reste inconnue et son utilisation controversée. Enfin, l'expression de marqueurs pourrait dépendre du comportement des CSCGs à un moment donné (CHEN, McKAY et PARADA, 2012). Il est donc urgent de trouver des marqueurs souches.

➤ **Hétérogénéité de la tumeur**

La controverse vient aussi du fait que la tumorigénérité ne serait pas due à un seul contingent de cellules au sein de la tumeur (PRESTEGARDEN, SVENDSEN, WANG et *al.*, 2010). Nous savons que les GBMs sont très hétérogènes avec probablement différents génotypes et phénotypes. Les cellules souches cancéreuses ont la capacité de changer continuellement leur phénotype pour augmenter leur chance de survie. Cela laisse les scientifiques sceptiques quant à l'idée qu'il n'y ait une seule population au sein de la tumeur, à savoir : les cellules souches cancéreuses.

➤ Modèle et procédures expérimentales

Les procédures expérimentales changent évidemment d'un laboratoire à l'autre, cela génère ainsi des résultats contradictoires. Les méthodes d'isolation des CSCGs ainsi que celles de leur culture sont également différentes d'une expérimentation à l'autre. Nous pouvons noter par, ailleurs, des différences dans le tri des populations des CSCGs.

Du point de vue du modèle, la xénotransplantation chez la souris immunodéprimée est la méthode de référence pour attester de la présence de CSCs dans les glioblastomes humains (CLARKE, DICK, DIRKS et al., 2006). Ainsi, les cellules humaines doivent s'adapter à de nouveaux macro et micro environnements au sein de la souris très éloignés de ceux de l'homme. La réponse immunitaire chez la souris, diffère également de la réponse immunitaire humaine. Cette méthode permet d'attester le potentiel tumorigène des CSCGs sans pouvoir analyser le comportement de ces cellules dans leur environnement naturel (PARK et RICHE, 2009).

Récemment, avec des techniques d'analyse génétique, une équipe de l'université du Texas (CHEN, McKAY et PARADA, 2012) a réussi à suivre spécifiquement des cellules souches tumorales « pures » dans leur environnement naturel chez la souris. Cette équipe s'est servie de marqueurs moléculaires fluorescents pour suivre, de manière aléatoire, certaines cellules cancéreuses. Ainsi, toutes les cellules filles provenant de la cellule initialement marquée ont la même couleur. Les chercheurs ont donc observé qu'une sous population cellulaire était responsable de la croissance tumorale après chimiothérapie faisant ainsi référence aux cellules souches cancéreuses.

Le concept des cellules souches cancéreuses présente certaines limites notamment au niveau de la définition, de la caractérisation, de la spécificité des marqueurs et du modèle expérimental utilisé pour les identifier. La xénotransplantation permet d'affirmer, malgré tout, la présence de CSCs dans les GBMs mais également de nous interroger sur l'environnement tumoral de ce type de cellule. Une équipe américaine (SNEDDON et WERB, 2007) a proposé un concept de « microenvironnement tumoral » de cellules souches cancéreuses dans le glioblastome semblable à celui, déjà connu, des cellules souches neurales normales. Ces cellules souches cancéreuses seraient alors localisées dans un environnement cellulaire spécifique et vascularisé appelé « niche » favorisant leur maintien et leurs caractéristiques.

II.6. Concept de niche des cellules souches cancéreuses dans les GBMs

L'équipe américaine de Gilbertson (SNEDDON et WERB, 2007) a proposé un concept de « microenvironnement tumoral » de cellules souches cancéreuses des glioblastomes appelé « niche ». Cette niche est composée de plusieurs types de cellules (myofibroblastes, cellules immunitaires, mésenchymateuses, cellules nerveuses, etc.). Ce microenvironnement joue un rôle crucial dans la régulation des cellules souches cancéreuses (ALISON, LIM et NICHOLSON, 2011).

➤ Niche périvasculaire

En 2006, l'existence d'une relation entre les CSCGs et l'angiogénèse a été révélée pour la première fois. En effet, l'injection de CSCGs CD133⁺ à des souris immunodéprimées a déclenché la formation de tumeurs très vascularisées. De plus, selon la même étude, le Bévacizumab (ou Avastin), un anticorps monoclonal qui se lie au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), inhibe la migration des cellules endothéliales *in vitro* et l'initiation tumorale *in vivo* (BAO, WU, SATHORNSUMETEE et al., 2006).

En se basant sur ces résultats, d'autres chercheurs (CALABRESE, POPPLETON, KOCAK et al., 2007) ont par la suite défini le concept de « niche périvasculaire » dans les tumeurs cérébrales. Ils ont montré, dans un modèle de culture, que des cellules provenant de plusieurs tumeurs cérébrales exprimant CD133 (CD133⁺) et la nestine, se situent à proximité des capillaires tumoraux CD34⁺. De plus, ces cellules interagissent sélectivement avec les cellules endothéliales (CE) (CALABRESE, POPPLETON, KOCAK et al., 2007).

Dans une expérience de xénogreffes, ces mêmes chercheurs ont souligné que la proportion de cellules en auto-renouvellement et la vitesse de croissance tumorale augmente avec le nombre de cellules endothéliales (CALABRESE, POPPLETON, KOCAK et al., 2007). Les CE semblent donc intervenir dans l'auto-renouvellement des cellules souches. Enfin, l'auto-renouvellement de ces cellules et la croissance de la tumeur sont altérés par les anti-angiogéniques (CALABRESE, POPPLETON, KOCAK et al., 2007).

La figure 9 illustre le fait que les néovaisseaux composés de CE, de péricytes et d'éléments de la matrice extracellulaire (MEC), constituent les limites de la niche périvasculaire. Néanmoins, il existe également, comme pour les niches de CSNs normales, d'autres éléments cellulaires élaborant la niche des CSCGs, tels que des astrocytes, des

cellules immunitaires (dont une bonne majorité de macrophages), des cellules microgliales, des fibroblastes et des cellules tumorales non-souches (CHARLES et HOLLAND, 2010).

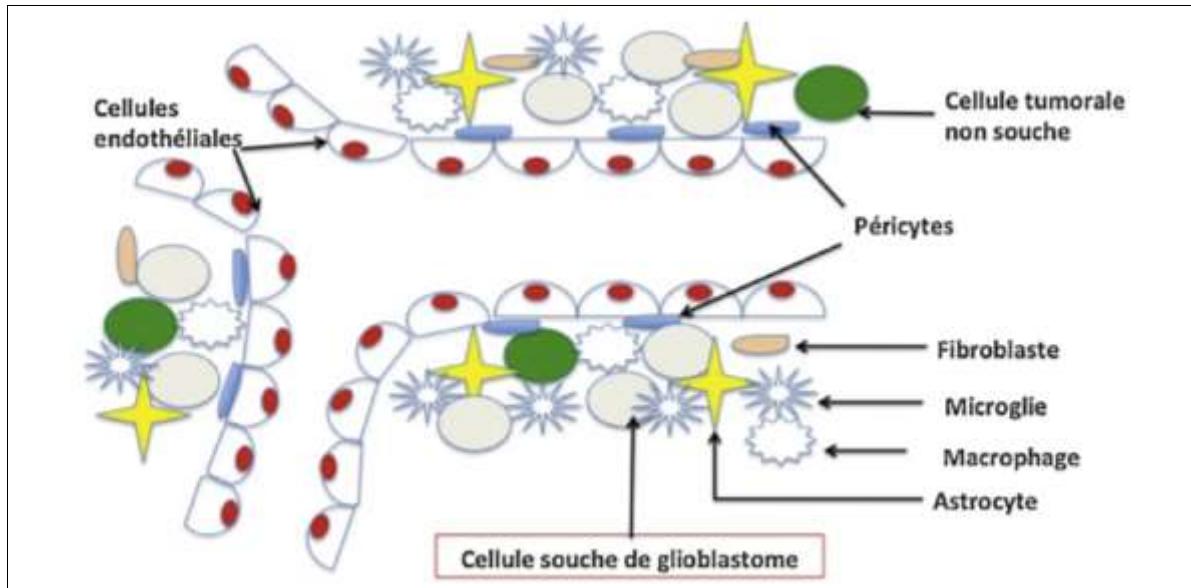


Figure 9 : La niche périvasculaire des CSCGs d'après TURPIN, SHARIF, STOVEN et al., 2015.

➤ Niche hypoxique

La figure 10 montre la particularité histologique des GBMs : une large zone nécrotique résultante de sa croissance plus forte que sa néovascularisation (LOUIS, 2006). De petites zones nécrotiques et hypoxiques peuvent aussi entourer localement des néovaisseaux non-fonctionnels (FILATOVA, ACKER et GARVALOV, 2013). Avec des concentrations en oxygène ne dépassant pas 2,5%, les GBMs sont majoritairement hypoxiques. Cette hypoxie contribue grandement à la résistance aux traitements des GBMs (FILATOVA, ACKER et GARVALOV, 2013).

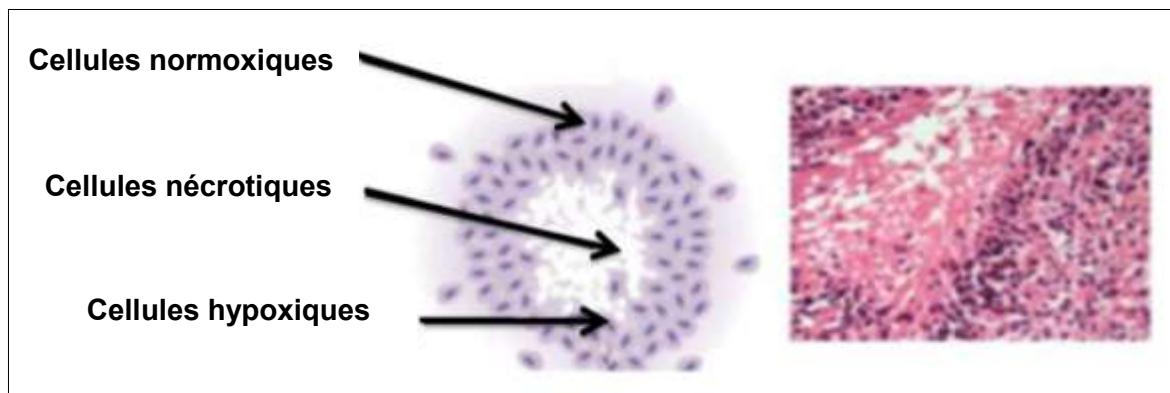


Figure 10 : Architecture histologique caractéristique des GBMs, illustration adaptée de LOUIS, 2006.

Au niveau moléculaire, la réponse à cette hypoxie entraîne la formation du facteur de transcription HIF (*hypoxia-inducible factor*) contrôlant notamment la transcription de gènes régulant l'angiogénèse (FILATOVA, ACKER et GARVALOV, 2013). De plus, HIF1- α participe à l'entretien du renouvellement autonome des CSCGs (FILATOVA, ACKER et GARVALOV, 2013). Cette participation se fait via l'activation des voies de signalisation PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) /Akt ou PKB (protéine kinase B), et Erk (*extra-cellular signal-regulated kinase*) (SOEDA, PARK, LEE et al., 2009).

En culture, le potentiel d'auto-renouvellement des CSCGs se réduit lorsque HIF- α est inhibé (SOEDA, PARK, LEE et al., 2009). En 2009, une équipe (PARK et RICH, 2009) a constaté une surexpression de la *HIF2- α* dans les CSCGs, par comparaison aux cellules tumorales non-souches ou encore aux neuroprogéniteurs fœtaux humains normaux, alors qu'en hypoxie, *HIF1- α* est aussi bien surexprimé dans les CSNs que dans les CSCGs. Une surexpression préférentielle de *HIF2- α* des CSCGs en milieu hypoxique a également été confirmée en western blot (LI, BAO, WU et al., 2009). Ces résultats suggèrent le rôle important de *HIF2- α* dans les CSCGs en hypoxie.

De surcroît, des expériences d'immunofluorescence menées sur des prélèvements de glioblastomes humain *in situ*, ont attesté l'expression de *HIF2- α* dans les cellules souches CD133⁺. Enfin, les expériences d'inhibition de *HIF*, via l'utilisation de *shRNA* (*short hairpin RNA*), ont montré une diminution de la formation de neurosphères (LI, BAO, WU et al., 2009).

Nous savons que les CSCGs entretiennent la tumeur via VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (BAO, WU, SATHORNSUMETEE et al., 2006). Or l'inhibition de *HIF* (et plus précisément *HIF1- α* ou *HIF2- α*) diminue la production de VEGF par les CSCGs. *HIF2- α* semble donc contribuer spécifiquement à la production de VEGF par les CSCGs. Ceci

prouve que les niches hypoxiques et vasculaires seraient confondues en une seule et unique niche commune : un environnement constitué de vaisseaux anormaux en milieu hypoxique.

En 2010, une étude transcriptomique (SEIDEL, GARVALOV, WIRTA et al., 2010) est venue réaffirmer l'influence de HIF2- α et de l'hypoxie sur les CSCGs. Cette étude a également permis la découverte de gènes surexprimés en conditions hypoxiques : le gène *MAML3* (appartenant à la voie NOTCH), le gène *NFATc2* (appartenant à la voie des calcineurines) et le gène *ASPHD2* (SEIDEL, GARVALOV, WIRTA et al., 2010). La surexpression de ces gènes joue un rôle dans la régulation du phénotype des CSCGs. De plus, Mao et son équipe en 2011 (MAO, YAN, XUE et al., 2011), ont révélé par des expériences de RT-PCR, une surexpression du gène *ZNF217* intervenant dans la préservation des CSCGs, qui est elle-même régulée par HIF1 α et HIF2 α .

Par conséquent, les CSCGs et leur microenvironnement interagiraient mutuellement pour garantir le maintien des CSCGs et de leurs propriétés.

➤ **Interactions mutuelles entre CSCGs et niche**

Les cellules endothéliales

Bao et ses collaborateurs (BAO, WU, SATHORNSUMETEE et al., 2006) ont constaté que les CSCGs recrutent les cellules endothéliales pour la néoangiogénèse. Dans un autre article (FOLKINS, SHAKED, MAN et al., 2009), nous pouvons lire que les CSCGs mobilisent également des progéniteurs endothéliaux via le facteur de croissance endothérial VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et SDF1 (*stromal-derived factor 1*). De plus, il a été rapporté que les CSCGs ont la faculté de se différencier directement en cellules endothéliales (RICCI-VITIANI, PALLINI, BIFFONI et al., 2010). Ainsi, des mutations telles que l'amplification d'*EGFR* ou du chromosome 7, caractérisant les cellules des GBMs, sont retrouvées dans les cellules endothéliales des néovaisseaux (WANG, CHADALAVADA, WILSHIRE et al., 2010). Un bon nombre de ces cellules endothéliales possède un profil d'altération génomique identique à celui des cellules des GBMs (RICCI-VITIANI, PALLINI, BIFFONI et al., 2010). Enfin, des expériences de transduction sur ces cellules endothéliales provenant des CSCGs soulignent leur implication dans la croissance tumorale (RICCI-VITIANI, PALLINI, BIFFONI et al., 2010).

Les péricytes

Des travaux (CHENG, HUANG, ZHOU et al., 2013) mettent en avant une similitude dans les altérations génétiques des péricytes et des cellules des GBMs (perte de *PTEN*,

amplification d'*EGFR*). Avec des études complémentaires, cette équipe a pu montrer que les péricytes dérivaient des CSCGs. Cette même équipe, par des expériences de transfection de gène, a prouvé la forte implication des péricytes issue des CSCGs dans la croissance tumorale via la vascularisation. Ces chercheurs se sont également penchés sur le recrutement des cellules endothéliales par les CSCGs (CHENG, HUANG, ZHOU et al., 2013). Rappelons que la protéine SDF1 est élaborée par les cellules endothéliales et que la protéine CXCR4 est exprimée par les CSCGs. L'inhibition particulière de l'une ou l'autre de ces protéines a très nettement diminué l'assimilation des CSCGs dans les complexes endothéliaux. Ils en ont alors déduit que l'axe SDF1/CXCR4 permet le recrutement des cellules endothéliales par les CSCGs. La figure 11 illustre ce remaniement du microenvironnement entourant les CSCGs, participant ainsi à la croissance tumorale.

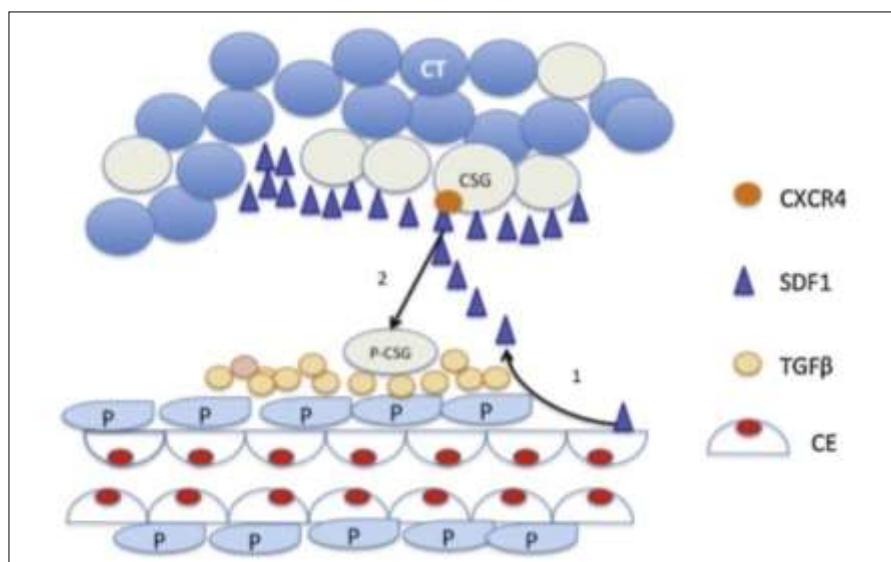


Figure 11 : Schéma illustrant le remaniement du microenvironnement d'après TURPIN, SHARIF, STOVEN et al., 2015.

1 : sécrétion de SDF1 par les cellules endothéliales et liaison de SDF1 à son récepteur CXCR4 exprimé à la surface des cellules souches du glioblastome

2 : différenciation des cellules souches du glioblastome en péricytes

P : péricytes

P-CSG : péricyte issu des cellules souches du glioblastome

CSG : cellules souches du glioblastome

CE : cellules endothéliales

CT : cellules tumorales

SDF1 : stromal-derived factor 1

CXCR4 : chemokine receptor 4

Les protéines de la matrice extra cellulaire

De nombreuses molécules d'adhésion de la famille des intégrines et des laminines ont une fonction dans l'invasion tumorale des glioblastomes. Ainsi, des chercheurs (LATHIA, GALLAGHER, HEDDLESTON et al., 2010) ont mis en évidence la forte implication de l'intégrine α -6 dans l'invasion tumorale. Ils ont également relevé la participation de la laminine α -2 dans la croissance tumorale (LATHIA, LI, GALLAGHER et al., 2012). Par ailleurs, une autre étude (NAKADA, NAMBU, FURUYAMA et al., 2013) a souligné l'importance de l'intégrine α -3 (récepteur de la fibronectine et de la laminine) dans le caractère invasif des CSCGs. Dans cette dernière étude, l'intégrine α -3 est retrouvée surexprimée dans les CSCGs et localisée dans des cellules tumorales invasives mais aussi dans des cellules proches des vaisseaux. De plus, cette même étude a montré que le pouvoir migratoire des cellules invasives se réduit lors de l'inhibition de l'intégrine α -3.

Par analyse bioinformatique, des chercheurs (LATHIA, LI, SINYUK et al., 2014) ont caractérisé une nouvelle molécule participant à l'entretien des CSCGs, la JAM-A (*junctional adhesion molecule a*). Il existerait ainsi une relation entre le taux de JAM-A et la capacité d'auto-renouvellement. Par ailleurs, la neutralisation de JAM-A, par un anticorps, diminue l'auto-renouvellement des CSCGs. En revanche, cela n'entraîne aucune baisse de l'auto-renouvellement dans les cellules souches neurales normales (LATHIA, LI, SINYUK et al., 2014).

La voie Notch

Fan et ses collaborateurs (FAN, KHAKI, ZHU et al., 2010) ont démontré que le blocage de la voie Notch affaiblissait le développement tumoral chez la souris xénotransplantée. Zhu et son équipe (ZHU, COSTELLO, TALSMA et al., 2011) ont étudié l'auto-renouvellement des CSCGs par les cellules endothéliales à l'aide d'expériences basées sur l'inhibition d'expression de gène. Ils se sont aperçus que cet auto-renouvellement se faisait via les molécules appartenant à la voie Notch (*Jagged1, Delta-like 4*).

Les cytokines

Les cytokines produites par les cellules de la niche sont impliquées dans l'entretien des CSCGs et/ou dans la propagation tumorale (FILATOVA, ACKER et GARVALOV, 2013). Une étude (INFANGER, CHO, LOPEZ et al., 2013) a récemment décrit le comportement de l'interleukine (IL8) produite par les cellules endothéliales de la niche. *In vitro*, IL8 favorise le développement et la migration des CSCGs. *In vivo*, cette équipe a relevé une action d'IL8 sur la tumorigénicité. Enfin ces auteurs ont également constaté que les cellules endothéliales induisaient une hausse de l'expression des récepteurs à l'IL8, CXCR1 et CXCR2 dans les

CSCGs. Ces résultats potentialisent le rôle d'IL8 dans l'entretien et la croissance des CSCGs.

La niche serait donc un lieu d'interactions mutuelles entre les CSCGs et leur microenvironnement (figure 12) préservant ainsi les propriétés des CSCGs et la propagation de la tumeur. Cette niche les préserverait également « des agressions extérieures » (CHOMIENNE, 2014). Ce « petit nid douillet » (CHOMIENNE, 2014) viendrait alors renforcer la résistance des CSCs aux thérapies actuelles. En effet les CSCs, de par leurs caractéristiques intrinsèques, résistent aux traitements actuels.

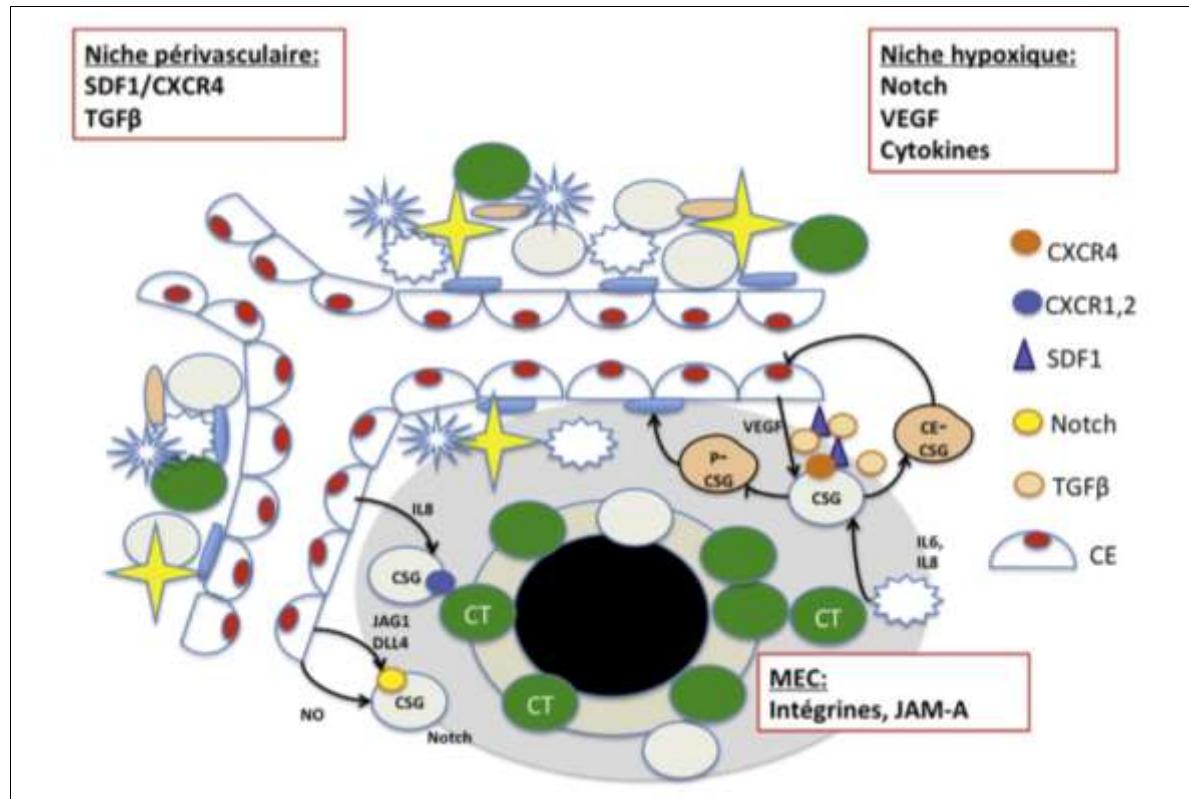


Figure 12 : Interactions mutuelles entre les CSCGs et leur microenvironnement d'après TURPIN, SHARIF, STOVEN et al., 2015.

II. 7. Concept des CSCGs et résistance aux traitements

Les CSCGs sont-elles à l'origine des échecs thérapeutiques ?

Les cellules souches cancéreuses semblent être à la base des résistances thérapeutiques et de la récidive (BAO, WU, McLENDON et al., 2006 ; CHEN, YANJIAO, TZONG-SHIUE et al., 2012). Cette résistance est due en partie à des molécules exprimées à la surface de ces cellules notamment les transporteurs responsables de l'efflux des médicaments. Une des caractéristiques des cellules souches est leur capacité d'entrer en quiescence. Lors des études *ex vivo*, les cellules souches cancéreuses de glioblastomes prolifèrent mais cela peut être dû aux conditions de culture utilisées. Les CSCs seraient quiescentes par comparaison aux cellules différenciées de la tumeur. La capacité des CSCGs à être résistantes aux traitements actuels renforce d'autant plus cette hypothèse. Les cellules en division sont les seules à être ciblées par les traitements standards. Le phénotype quiescent de ces cellules, à qui l'on pourrait attribuer cette résistance (parmi d'autres facteurs), leur permettrait d'éviter les dommages causés à l'ADN suite au traitement et de pouvoir y survivre. Les études attestant la quiescence des CSCGs de glioblastome sont peu nombreuses, bien qu'elles puissent expliquer en partie la résistance des CSCs aux traitements (SCOPELLITI, CAMMARERI, CATALANO et al., 2009).

➤ Radiorésistance

La radiothérapie est une approche thérapeutique qui utilise les radiations ionisantes pour provoquer des lésions au niveau de l'ADN des cellules cancéreuses et arrêter la croissance des cellules qui ne se multiplient plus. De ce fait, les cellules meurent. Le traitement des GBMs par irradiation apparaît actuellement comme étant le plus efficace des traitements non chirurgicaux. Les mécanismes de réponse aux radiations ionisantes ont été étudiés via des xénogreffes de cellules issues de tumeurs de patients, d'un côté des tumeurs enrichies et de l'autre des tumeurs non enrichies dans le but de les comparer (BAO, WU, McLENDON et al., 2006). Selon cette étude, la population de cellules enrichies en CSCGs augmente après une irradiation. Une meilleure capacité de survie de ces populations de cellules CSCGs irradiées a également été démontrée, en comparaison avec celles des cellules non-CSCGs (BAO, WU, McLENDON et al., 2006). De plus, ils ont remarqué que les tumeurs les plus résistantes à la radiothérapie étaient composées d'un nombre plus important de cellules CD133⁺.

La radiorésistance serait due à une activation importante des points de contrôle du cycle cellulaire (mécanismes qui arrêtent la progression du cycle de la cellule en cas de détection de l'ADN endommagé), et à une augmentation de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN. Ainsi, après irradiation, il semblerait que les cellules CD133⁺ activent de manière préférentielle leurs mécanismes de points de contrôle du cycle cellulaire. Il a été montré aussi que ces cellules CD133⁺ luttent de manière plus efficace contre la présence d'ADN endommagé suite à l'irradiation, beaucoup mieux que les cellules CD133⁻ (BAO, WU, McLENDON et al., 2006).

Chk1, Chk2 et ATM

Les études réalisées sur les GBMs ont montré que les CSCs (isolées par le marqueur CD133) résistent à l'irradiation grâce aux protéines régulatrices des points de contrôles du cycle cellulaire à savoir Chk1, Chk2 (*Checkpoint kinases 1 et 2*) et ATM (*Ataxia Telangiectasia Muted*) (BAO, WU, McLENDON et al., 2006 ; HAMBARDZUMYAN, BECHER, ROSENBLUM et al., 2008). Après une irradiation, il semble que les protéines kinases ATM, Chk1 et Chk2 sont activées dans les cellules CD133⁺ (BAO, WU, McLENDON et al., 2006). De plus, le caractère radiorésistant des cellules CD133⁺ est neutralisé, en inhibant spécifiquement les protéines kinases Chk1 et Chk2. Ces protéines semblent donc détenir un rôle majeur dans la résistance au traitement des CSCs CD133⁺ (BAO, WU, McLENDON et al., 2006). Les protéines kinases comme l'ATM, la Chk1 et la Chk2 ne sont pas les seules à être impliquées dans la résistance à l'irradiation des CSCGs. D'autres acteurs semblent avoir un rôle dans ce processus de résistance.

Les voies de signalisation

Il a été révélé que la voie de Wnt / β caténine joue un rôle dans la radiorésistance des CSCGs (KIM, KIM, LEE et al., 2012). Les Wnt (famille de glycoprotéines) et la β -caténine (protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, la signalisation cellulaire et la transcription de protéines) ont des rôles précisément définis dans le développement des cellules souches normales, ainsi que dans le cas de cellules souches cancéreuses (KIM, KIM, LEE et al., 2012). Elles sont donc potentiellement impliquées dans la radiorésistance des CSCGs. La résistance des CSCGs aux dommages de l'ADN peut également être permise par d'autres voies de signalisation des cellules souches.

La voie de signalisation Notch semble également être impliquée dans la radiorésistance de nombreuses tumeurs notamment les tumeurs mammaires. Dans ce contexte, Phillips et ses collaborateurs (PHILIPS, KHARBANDA, CHEN et al., 2006) ont montré l'activation de la voie Notch dans des mammosphères, après l'irradiation des

cellules. De plus, les CSCs CD133⁺ seraient plus sensibles au traitement par le témozolomide, suite à l'inhibition des voies de signalisation Shh et Notch dans le glioblastomes.

Enfin, les voies de signalisation Shh et Gli (WANG, PAN, CHE et al., 2010), le gène *PTEN* (JIANG, PORE, CERNIGLIA et al., 2007) et le gène *EGFR* (CHAKRAVARTI, DICKER et MEHTA, 2004) semblent tenir un rôle important dans la radiorésistance des CSCGs des glioblastomes. Etant donné la résistance des CSCGs aux contraintes endommageant l'ADN par irradiation, cela suggère que les CSCGs pourraient également résister à d'autres genres de traitements, telle la chimiothérapie.

➤ Chimiorésistance

La chimiothérapie est souvent utilisée comme traitement adjuvant à la radiothérapie. Le TMZ est l'agent alkylant le plus souvent utilisé (STUPP, MASON, VAN DEN BENT et al., 2005). Il provoque la méthylation de la guanine en position O6 sur l'ADN. Mais une population de cellules (les CSCGs) résiste au traitement par le TMZ (CHEN, YANJIAO, TZONG-SHIUE et al., 2012). Ces cellules sont aussi résistantes à d'autres types de molécules utilisées en chimiothérapie notamment le carboplatine, le paclitaxel et l'étoposide (LIU, YUAN, ZENG et al., 2006). Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer cette résistance.

Les transporteurs ABC

Un autre mécanisme qui joue un rôle clé dans la résistance de ces cellules à la chimiothérapie est la résistance à de multiples médicaments, appelée « *Multidrug resistance* » (MDR). Il faut tout d'abord savoir que les cellules souches normales et les CSCGs expriment de nombreuses pompes à efflux, à savoir les systèmes de transport utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour l'import ou l'export unidirectionnel d'une variété considérable de substrats (des ions aux macromolécules), comme c'est le cas pour la famille des transporteurs ABC. Ces transporteurs se trouvent au niveau de la membrane et contribuent à l'efflux de composés lipophiles variés dont les drogues de chimiothérapie (KARTNER, RIORDAN et LING, 1983). Cette famille inclut aussi la protéine BCRP (pour *Breast Cancer Resistance Protein* aussi nommée ABCG2) (ZHOU, SCHUETZ, BUNTING et al., 2001).

Il a été démontré que les CSCGs expriment un taux élevé de ces protéines (notamment ABCG2 et ABCA3). En effet, les CSCGs disposent de transporteurs qui

éliminent activement le colorant Hoechst 33342 de leur milieu intracellulaire (HIRSCHMANN-JAX, FOSTER, WULF et al., 2004). Cette propriété d'élimination du Hoechst, permet aux CSCGs de se protéger contre des agents cytotoxiques. Cette capacité d'élimination a été mise en évidence dans des cellules souches hématopoïétiques (GOODELL, BROSE, PARADIS et al., 1996), ce qui a mené à l'emploi du terme « *side population* » ou « cellules SP ». Ce terme fait référence au fait que la « *side population* » est différente de la population principale à travers l'analyse des cellules par cytométrie en flux. Des « *side population* » ont été isolées à partir de tissus d'origine variée (sein, cerveau, cœur, poumon, pancréas, testicules, foie, ou encore peau). Ces cellules apparaissent comme étant des cellules souches correspondant à un lignage particulier (ZHOU, SCHUETZ, BUNTING et al., 2001). Les cellules SP leucémiques possèdent une énorme capacité de relargage d'agents chimio-thérapeutiques dans le milieu extracellulaire. Et cette augmentation de la capacité d'efflux, permise grâce à un fort taux de transporteurs membranaires, contribue à la résistance des CSCGs aux agents chimio-thérapeutiques (WULF, WANG, KUEHNLE et al., 2001).

Par ailleurs, la sensibilité des CSCGs issue de GBMs aux traitements chimiothérapeutiques a été étudiée par l'équipe de Liu (LIU, YUAN, ZENG et al., 2006). Ils ont mis en évidence que le niveau d'expression des gènes associés à la chimiorésistance (comme *BCRP1* et *MGMT*) est supérieur dans les cellules CD133⁺, par rapport à celui des cellules CD133⁻. Les cellules CD133⁺ possèdent également une plus grande résistance aux chimiothérapies multiples que les cellules CD133⁻ (LIU, YUAN, ZENG et al., 2006).

Les transporteurs BCRP et ABC sont par conséquent mis en cause, de manière spécifique, dans l'élimination des agents chimiothérapeutiques dans le milieu extracellulaire.

ALDH1

En plus de montrer des capacités d'élimination des traitements chimiothérapeutiques efficaces, les CSCGs possèdent également des médiateurs moléculaires du métabolisme, tel que l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ou ALDH1). Il se trouve que cette enzyme est connue pour provoquer une résistance au cyclophosphamide dans les cellules souches normales (MAGNI, SHAMMAH, SCHIRO et al., 1996). L'activité de l'ALDH1 paraît potentialisée au sein des CSCs leucémiques, où elle aurait une fonction dans la résistance aux agents alkylants (PEARCE, TAUSSIQ, SIMPSON et al., 2005). Concernant le cancer du sein, il a été rapporté que l'expression de l'ALDH1 dans les CSCs est associée à un mauvais pronostic (GINESTIER, HUR, CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007). On peut donc en conclure que la survie des patients est directement impactée par les processus qui favorisent la résistance des CSCs à la chimiothérapie. Certaines études se sont intéressées à l'expression de l'ALDH1 dans les glioblastomes. En particulier, l'une d'entre elles, a montré

que des cellules issues de GBMs, exprimant l'enzyme polymorphe ALDH1, avaient des caractéristiques similaires aux CSCGs (RASPER, SCHAFER, PIONTEK et al., 2010). On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle les CSCGs expriment l'ALDH1, et que cette expression est corrélée à la résistance aux traitements chimiothérapeutiques.

Les cellules souches cancéreuses semblent détenir un rôle clé dans les mécanismes de résistance à la chimiothérapie et radiothérapie. Les mécanismes exacts de ces cellules ne sont pas connus mais une combinaison d'activation préférentielle des mécanismes de réparation de l'ADN, d'activation de voies de signalisation (tels que Notch, Shh ou Gli), de surexpression de transporteurs membranaires pourraient être impliquée. Nous savons que les cellules souches cancéreuses sont localisées dans un environnement cellulaire spécifique et vascularisé appelé « niche » favorisant le maintien de leurs caractéristiques. Ce microenvironnement constituerait également un autre facteur de résistance aux thérapies actuelles. Récemment, Jamal et ses collaborateurs (JAMAL, RATH, TSANG et al., 2012) ont démontré l'importance du microenvironnement tumoral dans la résistance des cellules souches à la radiothérapie. Ces chercheurs ont constaté que les CSCGs CD133⁺ résistent mieux aux radiations lorsqu'elles sont *in vivo* qu'*in vitro*.

Malgré l'association des deux approches thérapeutiques : radiothérapie et chimiothérapie, les GBMs continuent à développer des résistances. Contre cette résistance thérapeutique des GBMs, et cibler les CSCs et leurs niches donneraient certainement de nouveaux espoirs dans la lutte contre les GBMs.

PARTIE III :

LES CELLULES SOUCHES

CANCEREUSES DES

GLIOBLASTOMES COMME CIBLES

TERAPEUTIQUES

Les thérapies traditionnelles ne produisent que des effets palliatifs sur les GBMs, vraisemblablement parce qu'elles ciblent des cellules proliférantes non cancerigènes. Au contraire, les CSCGs sont la plupart considérées comme quiescentes et par conséquent résistantes aux thérapies conventionnelles. Elles pourraient donc être une réserve pour les récidives potentielles. Malgré de récents progrès sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la fonction des CSCGs, nos connaissances sur le sujet restent au stade embryonnaire. Dans ce chapitre, nous allons discuter des récentes avancées dans la définition des mécanismes impliqués dans la progression tumorale des CSCGs et des stratégies potentielles pour identifier des cibles thérapeutiques efficaces contre ce type de cellule. Cibler les CSCs et leurs niches, comme illustré dans la figure 13, donneraient certainement de nouveaux espoirs dans la lutte contre les GBMs.

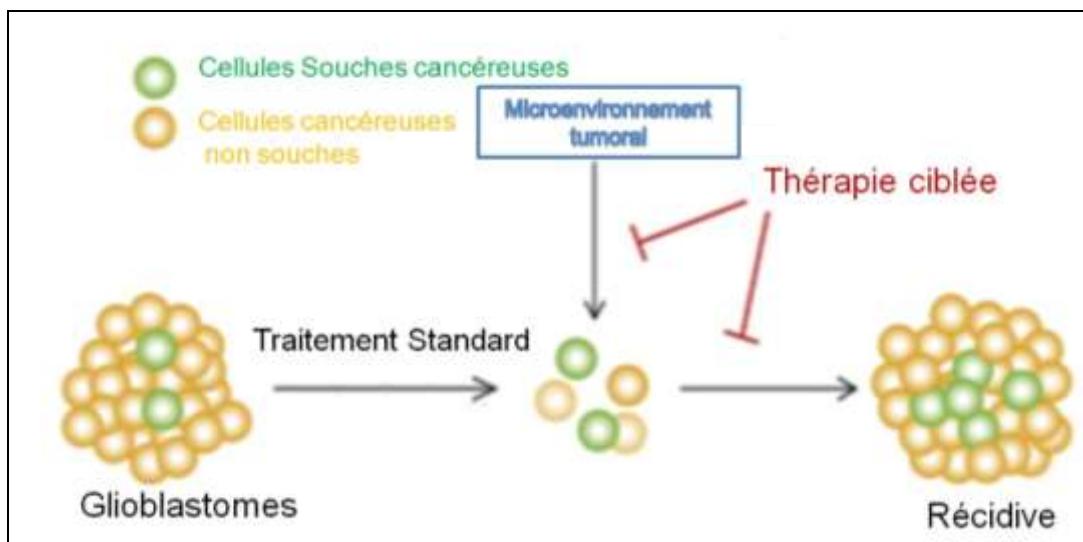


Figure 13 : La thérapie ciblée : de nouveaux espoirs au pronostic des GBMs ? (schéma adapté de PERSANO, RAMPAZZO, BASSO et al., 2013).

III.1. Cibler des molécules spécifiques de surface des CSCGs.

Les molécules de surface des CSCGs pourraient jouer un rôle important dans leur entretien et donc pourraient être des cibles idéales dans la lutte contre ces cellules. De plus, il ne serait pas nécessaire de traverser la membrane plasmique des CSCGs pour atteindre ces cibles.

CD133

CD133 interviendrait dans la régulation de la voie de signalisation PI3k-Akt des cellules souches cancéreuses des glioblastomes (WEI, JIANG, ZOU et al., 2013). Des études cliniques ciblant CD133 avec des anticorps sont en cours actuellement. Cependant, étant exprimé aussi dans de nombreuses cellules normales, CD133 comme cible aurait une limitation. Il en est de même, pour CD15, où sa fonction dans les CSCGs reste inconnue.

L1CAM

L'implication de L1CAM dans la survie et le maintien des CSCGs ainsi que sa forte surexpression dans ces cellules par rapport aux cellules tumorales non souches et aux cellules progénitrices neurales normales (BAO, WU, LI et al., 2008) en font une cible exploitable. Selon l'étude réalisée par Bao et collaborateurs (BAO, WU, LI et al., 2008), l'inhibition, via une *shRNA*, altère la croissance et la formation de neurosphères des CSCGs *in vitro*. Cette étude a montré que chez la souris xénotransplantée, l'inhibition de L1CAM supprime le développement tumoral et augmente sa survie. De même L1CAM semble participer au maintien des CSCGs via Olig2 (BAO, WU, LI et al., 2008). Cibler spécifiquement L1CAM des CSCGs pourrait donc contribuer à lutter contre leur résistance à la chimio et radiothérapie.

Les transporteurs de surfaces

Les cellules souches cancéreuses des glioblastomes sont résistantes aux agents chimiothérapeutique par une surexpression de transporteurs membranaires (HIRSCHMANN-JAX, FOSTER, WULF et al., 2004). Le ciblage de ces transporteurs pourrait aussi diminuer la résistance des CSCGs aux traitements actuels. L'axitinib bloque le transporteur ABCG2, mais ne modifie pas l'expression d'ABCG2 (WANG, MI, CHEN et al., 2012). Son blocage pourrait permettre d'augmenter la sensibilité des cellules souches cancéreuses des glioblastomes à la chimiothérapie standard.

III.2. Inhiber des voies de signalisations spécifiques des CSCGs

L'identification de voies de signalisations spécifiques impliquées dans le maintien, l'entretien et les fonctions des CSCGs permettrait également de cibler ces CSCGs en vue de combattre la résistance thérapeutique actuelle (ZHOU, ZHANG, DAMELIN et al., 2009).

➤ Voie EGFR-PI3k-Akt

Il a été démontré *in vitro* que l'inhibition de la voie de signalisation de l'EGFR (récepteur du facteur de croissance de l'épiderme) provoque un ralentissement de la croissance des CSCGs et la formation de neurosphères (GRIFFERO, DAGA, MARUBBI et al., 2009). L'activation des domaines à activité tyrosine-kinase de ce récepteur entraîne l'activation de plusieurs voies intracellulaires dont la voie PI3K-Akt qui est fortement associée aux propriétés des CSCGs (DREESEN et BRIVANLOU, 2007).

Une recherche (EYLER, FOO, LAFIURA et al., 2008) a mis en évidence une plus grande dépendance des CSCGs par rapport aux cellules cancéreuses non souches à la signalisation Akt. Selon cette étude réalisée *in vitro*, l'inhibition d'Akt via SH-6 ou LY294002 altère la formation des neurosphères, provoque l'apoptose et diminue la migration ainsi que l'invasion des CSCGs. Par ailleurs, cette inhibition d'Akt ralentit fortement l'initiation tumorale intracrânienne des CSCGs chez les souris transgéniques. Ces résultats ont été confirmés notamment par Gallia et ses collaborateurs (GALLIA, TYLER, HANN et al., 2009). En effet, il a été rapporté que A-443654, un inhibiteur spécifique de Akt arrête la croissance des CSCGs *in vitro* et *in vivo* (GALLIA, TYLER, HANN et al., 2009). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, les essais cliniques portant sur les inhibiteurs de l'EGFR ne sont pas concluant. NVP-BKM120 a augmenté l'espérance de survie de souris xénotransplantée sans être cytotoxique (KOUL, FU, SHEN et al., 2012) et l'inhibiteur PX-866 n'a pas causé d'effet secondaire (KOUL, SHEN, KIM et al., 2010). Peut-être qu'une association avec des inhibiteurs de PI3K tels que NVP-BKM 120 ou PX-866 donneraient de meilleurs résultats.

➤ Voie de signalisation Notch

Notch est un récepteur qui se trouve à la surface des cellules. Il est impliqué dans le maintien des cellules souches neurales chez l'adulte et des cellules cancéreuses. Son activation par des ligands spécifiques entraîne une activation de l'expression des gènes

impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules (HU, ZHENG, CHENG et al., 2011).

Le signal Notch est anormalement surexprimé dans les CSCGs des glioblastomes. Le blocage de ce signal réduit la formation de neurosphères (FAN, KHAKI, ZHU et al., 2010), inhibe la prolifération et conduit à l'apoptose des CSCGs (WANG, WANG, MENQ et al., 2012). L'inhibition de la γ -sécrétase, l'enzyme responsable du clivage de Notch, par une sulfonamide (le GSI-18 ([11-endo]-N-(5, 6, 7, 8, 9, 10- hexahydro-6,9-methanobenzo[9][8] annulen-11-yl)-thiophene-2 sulfonamide)), diminue le nombre de CSCGs et augmente la survie des souris xénotransplantées (FAN, KHAKI, ZHU et al., 2010). La signalisation Notch est également impliquée dans la radiorésistance des CSCGs (WANG, WANG, MENQ et al., 2012). Son ciblage permettrait alors d'agir aussi bien sur le maintien des CSCGs que sur leur radiorésistance. Par ailleurs, DLL4 (*Notch Ligand Delta-Like 4*), un des ligands de Notch, intervient également dans la régulation de la croissance tumorale (SUN, XIA, LAL et al., 2009). Les anticorps anti-DLL4 ont montré une efficacité sur les CSCGs (HOEY, YEN, AXELROD et al., 2009). Malheureusement à long terme, ces anti-DLL4 pourraient induire des néoplasies (YAN, CALLAHAN, BEYER et al., 2010). D'autres essais cliniques sur l'inhibition de la γ -sécrétase sont en cours afin de pouvoir cibler spécifiquement les CSCGs via le blocage de la signalisation Notch (SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014).

➤ Voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh)

La voie de signalisation Hedgehog est impliquée dans la régulation des cellules souches. Lorsque cette voie est anormalement activée, elle devient un facteur de tumorigénicité et confère une résistance à la radiothérapie ou à la chimiothérapie (HANG, ZHUAN-SUN, ZHUANG et al., 2012).

Des dysfonctionnements de la voie de signalisation Sonic Hedgehog ont été rapportés dans les gliomes (SHAHI, LORENTE et CASTRESANA, 2008). Comme nous l'avons vu précédemment, les chercheurs s'accordent à dire que ce signal Shh régule l'auto-renouvellement et le potentiel tumorigène des CSCGs (CLEMENT, SANCHEZ, DE TRIBOLET et al., 2007).

L'inhibition du signal Shh par le cyclopamine dans les CSCGs semble entraîner la perte de la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération (RUDIN, HANN, LATERRA et al., 2009). Cette inhibition provoque également l'apoptose des CSCGs. Selon la même étude, cette inhibition potentialise l'action du TMZ sur les CSCGs (RUDIN, HANN, LATERRA et al., 2009). *In vivo*, Rudin et ses collaborateurs (RUDIN, HANN, LATERRA et al., 2009) ont mis en évidence un arrêt de la croissance tumorale des CSCGs suite à l'inhibition du signal

Sonic Hedgehog. De plus, ils ont relevé que ces cellules perdent la capacité de propagation tumorale *in vivo*. Une autre étude (LARSSON, 2011) a révélé une action de Shh sur la motilité et l'invasion des CSCGs, ce qui participerait à la croissance tumorale. De plus, son inhibition diminue le pouvoir migratoire des cellules CD133⁺ (UCHIDA, ARITA, YUNOUUE et al., 2011). Par ailleurs la cyclopamine, sensibilise les CSCGs aux irradiations. D'une manière générale, ces études montrent clairement que le signal Shh joue un rôle clé dans le maintien des CSCGs. Cibler cette voie par des inhibiteurs peut arrêter la croissance des CSCGs et augmenter l'efficacité des traitements actuels contre les GBMs. Il faudrait néanmoins prendre en compte les effets néfastes de tels inhibiteurs sur les CSNs. Ainsi, des études cliniques sur l'inhibiteur GDC-0449 de la voie Shh révèle une bonne tolérance et donne beaucoup d'espoirs (VON HOFF, LORUSSO, RUDIN et al., 2009).

➤ Voie de signalisation STAT3

Le facteur de transcription STAT3 (*Transducteurs du Signal et Activateurs de Transcription 3*) est anormalement surexprimé dans les tumeurs (CARRO, LIM, ALVAREZ et al., 2010). Le rôle du signal STAT3 dans la biologie des GBMs, le maintien et la tumorigénérité des CSCGs fait de moins en moins de doutes (CARRO, LIM, ALVAREZ et al., 2010). La voie de signalisation STAT3 devient oncogène lors d'une constante phosphorylation de sa tyrosine 705 (CAO, LATHIA, EYLER et al., 2010).

Auparavant il a été montré que l'inhibition de STAT3 dans les CSCGs altère la prolifération et le maintien des CSCGs (WANG, LATHIA, WU et al., 2009). En outre, dans les CSCGs, STAT3 est phosphorylé au niveau de la tyrosine 705 et de la sérine 727. Mais encore, l'induction de la différenciation des CSCGs diminue considérablement l'activation de STAT3 (WANG, LATHIA, WU et al., 2009). Yang et ses collaborateurs (YANG, CHANG, HUANG et al., 2012) ont démontré que l'inhibition du facteur STAT3 par des *ShRNA* ou l'exposition au resveratrol se traduit par l'inhibition du phénotype souche et de la radiorésistance des cellules de glioblastomes CD133⁺. Ces mêmes auteurs ont rapporté aussi que l'inhibition de STAT3 chez l'animal, augmenterait la sensibilité des cellules souches de glioblastomes à la radiothérapie.

L'*interleukin-6* (IL6), l'*erythropoietin* et Notch sont des signaux en amont de la voie de signalisation de STAT3. Leur inhibition dans les CSCGs inhibe le signal STAT3, la croissance et l'auto-renouvellement de ces cellules (WEI, BARR, KONG, et al., 2010). En outre, STAT3 intervient dans la régulation de la réponse immunitaire des CSCGs (JIANG, GUO, LIANG et al., 2005). Vue sa forte implication dans la biologie des cellules cancéreuses en générale, plusieurs inhibiteurs de STAT3 font l'objet d'essais cliniques. Cependant,

STAT3 participe aussi activement au maintien, à la réponse immunitaire et bien d'autres fonctions dans les CSNs. Cibler les CSCGs par STAT3 risquerait alors de toucher également les CSNs. De ce fait, cibler spécifiquement les CSCGs par STAT3 semble donc peu réalisable.

➤ **Signalisation Wnt/β-caténine**

La voie Wnt/β-caténie semble être impliquée dans plusieurs étapes de l'oncogenèse. Ainsi, le signal Wnt/β-caténine joue un rôle important dans les CSCs (ADACHI, MIRZADEH, SAKAGUCHI et *al.*, 2007). Wnt régule le développement, la prolifération et l'auto-renouvellement des CSNs (KALANI, CHESHIER, CORD et *al.*, 2008). Une recherche de 2007 (WOODWARD, CHEN, BEHBOD et *al.*, 2007) postule que la voie de signalisation Wnt/β-caténine pourrait être impliquée dans la radiorésistance des CSCs. Wnt serait également impliqué dans l'invasion et l'entretien des CSCGs (JIN, JEON, JOO et *al.*, 2011). Dans les CSCs du sein, l'inhibition de ce signal arrête la croissance tumorale (LIN, LU, ZHAI et *al.*, 2011). Selon une autre recherche (LIU, WANG, ZHAO et *al.*, 2011), en plus d'arrêter la croissance tumorale, une telle inhibition induit l'apoptose des CSCGs. Dans ses expériences portant sur l'inhibition de Wnt/ β-caténie, Pu et ses collaborateurs (PU, ZHANG, KANG et *al.*, 2009) ont montré un ralentissement de la progression tumorale *in vivo*. Même si le rôle de ce signal dans le maintien et la radiorésistance des CSCGs n'est pas encore clairement établi, il pourrait être une cible prometteuse dans la lutte contre la résistance des GBMs aux traitements actuels.

III.3. Cibler les facteurs de transcriptions impliqués dans le maintien des CSCGs

Les facteurs de transcription Sox2, Oct4, Nanog, c-Myc, Olig2 et Bmi1 sont fortement impliqués dans le maintien des propriétés des CSCGs.

Sox2, Oct4 et Nanog

Les facteurs Sox2, Oct4 et Nanog sont surexprimés dans les CSCGs. Parallèlement à leur rôle de maintien dans les CSNs, ces facteurs pourraient intervenir de façon similaire, dans l'entretien des CSCGs (IKUSHIMA, TODO, INO et al., 2009). Cibler ces facteurs pourrait alors perturber le maintien et induire la différenciation des CSCGs.

c-Myc

Des travaux de 2008 (WANG, WANG, ZHIZHONG et al., 2008) ont montré que c-Myc est fortement impliqué dans la prolifération des CSNs et CSCs, et que c-Myc pourrait avoir un rôle central dans la tumorigénéité des CSCs. Par ailleurs, la recherche de Jensen et ses collaborateurs (JENSEN, PEDERSEN, LIHME et al., 2003) a révélé une forte expression de c-Myc dans les CSCGs. Ce facteur est nécessaire pour le maintien des CSCGs *in vitro* et pour la tumorigénéité de ces cellules *in vivo* (JENSEN, PEDERSEN, LIHME et al., 2003).

Dans ce contexte, une autre étude (ZHENG, YING, YAN et al., 2008) a approuvé que la surexpression de c-Myc dans des astrocytes de souris engendre des tumeurs cérébrales proches de celles des GBMs humains. De plus, il semble que c-Myc bloque la différenciation cellulaire et favoriser le renouvellement autonome de cellules cancéreuses issues d'un modèle de souris (LU, SUN, ZHU et al., 2002). Ainsi, c-Myc participerait activement au maintien des CSCGs. Cibler spécifiquement les CSCGs via c-Myc paraît néanmoins délicat vu également son rôle clé dans la physiologie normale.

Olig2

Olig2 est fortement exprimé dans les astrocytomes. Cette expression d'Olig2 est nécessaire à l'initiation et à la croissance tumorale (LIGON, HUILLARD, MEHTA et al., 2007). L'équipe de Bao (BAO, WU, McLENDON et al., 2006) a retrouvé une expression similaire de ce facteur dans des CSCGs issues de différents GBMs. Olig2 semble donc être un marqueur spécifique des CSCGs. Il est indispensable pour la conservation de la multipotentialité des CSCGs (LIGON, HUILLARD, MEHTA et al., 2007). Olig2 participe à la prolifération des CSCGs en bloquant notamment un important régulateur du cycle cellulaire

(p21WAF1/CIP1) (BAO, WU, LI et al., 2008). N'étant exprimé que dans les CSNs, cellules progénitrices neurales et CSCGs, le facteur de transcription Olig2 pourrait être ciblé pour atteindre les CSCGs.

Bmi1

Bmi1 est nécessaire lors de la cancérisation aussi bien d'une CSN que d'un astrocyte (ABDOUH, FACCHINO, CHATOO et al., 2009). Chiba et ses collaborateurs (CHIBA, MIYAGI, SARAYA et al., 2008) ont montré *in vivo* que la modification de Bmi1 dans des CSNs aboutit à l'obtention d'un gliome de grade avancé alors que des CSNs possédant un déficit en Bmi1 n'aboutissent qu'à des gliomes de grade inférieur avec moins de cellules présentant un phénotype souche. Bmi1 est souvent surexprimé dans les gliomes mais aussi dans les CSCGs et il est nécessaire à leur renouvellement autonome (CHIBA, MIYAGI, SARAYA et al., 2008). L'étude de Zheng et ses collaborateurs (ZHENG, YING, YAN et al., 2008) a mis en évidence la forte implication de Bmi1 dans le maintien des CSCs de carcinome hépatocellulaire. Ce facteur pourrait donc être une cible potentielle pour atteindre les CSCGs.

REST

Le répresseur neural majeur REST (*repressor element 1 silencing transcription factor*) ou NRSF (*neuron-restricted silencing factor*) est fortement impliqué dans l'entretien des CSNs en bloquant la différenciation cellulaire (BLOM, TYNNINEN, PUPUTTI et al., 2006). REST est surexprimé dans les GBMs (LIETZ, CICCHETTI et THIEL, 1998). Sa dégradation favorise la différenciation cellulaire (MOLOFSKY, PARDAL, IWASHITA et al., 2003). L'équipe de Cheng (CHENG, BAO et RICH, 2010) a identifié une surexpression de REST dans certaines CSCGs. Le ciblage de ce répresseur de transcription REST pourrait alors pousser ces CSCGs à se différencier et ainsi devenir inoffensives.

III.4. Thérapie différenciatrice

La multipotentialité est une des propriétés des CSCGs partagée avec les CSNs (CHENG, BAO et RICH, 2010). Les CSCGs sont capables de se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et en neurones en exprimant leurs marqueurs caractéristiques (BAO, WU, McLENDON et al., 2006). Une fois différencierées, ces cellules perdent *in vivo* leur capacité de régénération tumorale à long terme et leur capacité de propagation tumorale. Le fait de forcer les cellules souches cancéreuses à devenir non souches et inoffensives s'appelle la thérapie différenciatrice.

La neurogénine 2

Guichet et ses collaborateurs (GUICHET, BIECHE, TEIGELL et al., 2013) ont surexprimé une protéine différenciatrice, la neurogénine 2, dans des cultures de CSCGs. Cette équipe a montré que la neurogénine 2 provoque la maturation terminale des CSCGs et induit la conversion de ces cellules en cellules nerveuses. La surexpression de cette protéine a conduit à une forte apoptose et une inhibition de la prolifération des CSCGs rescapées. Ainsi, induire la différenciation des CSCGs pourrait être un moyen non cytotoxique de lutter efficacement contre les GBMs. Nous connaissons aujourd’hui des voies de signalisation impliquées dans la différenciation des CSNs.

Bone morphogenetic protein (BMP)

BMP inhibe la prolifération des CSCGs et induit la différenciation des CSCGs en astrocyte et en neurone (PICCIRILLO, REYNOLDS, ZANETTI et al., 2006). *In vivo*, BMP4 arrête la croissance des GBMs et réduit l’invasion tumorale (PICCIRILLO, REYNOLDS, ZANETTI et al., 2006).

L’implication de BMP dans la différenciation des CSCGs en cellules gliales a été confirmée lors de travaux menés en 2008 (LEE, SON, WOOLARD et al., 2008). Dans les mêmes conditions, une autre étude (CHIRASANI, STERNJAK, WEND et al., 2010) a montré que BMP7 réprime la prolifération, l’auto-renouvellement et l’initiation tumorale des CSCGs *in vivo* et *in vitro*. Récemment une équipe de chercheurs (TATE, PALLINI, RICCI-VITIANI et al., 2012) a réussi à inhiber la croissance de GBMs *in vitro* et *in vivo* via une variante de BMP7. Cependant, pour échapper à la différenciation forcée par BMP, les CSCGs sont capables de modifier le récepteur à BMP (BMPR1B) (LEE, SON, WOOLARD et al., 2008). Le rétablissement de l’expression de BMPR1B dans les CSCGs permet à BMP4 d’induire leur différenciation (LEE, SON, WOOLARD et al., 2008). Ainsi BMP en association avec des

modulateurs épigénétiques pourrait contribuer efficacement au ciblage des CSCGs en induisant leur différenciation, et donc de mieux lutter contre les glioblastomes et leur résistance thérapeutique actuelle. Il existe d'autres facteurs impliqués dans la différenciation des CSCGs tels que GSK3- β , PTEN ou encore SOX11.

GSK3- β

Cette enzyme intervient notamment dans la régulation de la différenciation des CSNs (CHENG, BAO et RICH, 2010). GSK3- β serait impliquée dans la différenciation des CSCGs (JENSEN, 2009). La réduction de l'activité de GSK3- β (par *shRNA*, l'inhibiteur SB216763 ou encore le chlorure de lithium) induit la différenciation des CSCGs et diminue l'expression des marqueurs Sox2 et Myc (JENSEN, 2009). De plus, nous savons aujourd'hui qu'une diminution de Bmi1 réduit l'expression de GSK- β dans les CSCGs (JENSEN, 2009). Avec tous les inhibiteurs de GSK3- β disponibles, une plus grande exploration du signal GSK3- β permettrait d'ajouter une solution supplémentaire à l'éradication des CSCGs.

PTEN

Selon l'étude de Hide et ses collaborateurs (HIDE, TAKEZAKI, NAKATANI et al., 2009), l'inhibition de la phosphatase *PTEN* (gène suppresseur de tumeur) participe au maintien des CSCGs dans leur état indifférencié. Il est admis que la perte du gène *PTEN* est liée à la tumorigénicité des GBMs. L'inhibition de *PTEN* entraîne une forte expression de Myc, jouant un rôle clé dans le maintien de la prolifération et le renouvellement autonome des CSCGs. L'étude approfondie de *PTEN* pourrait donc aider à mieux comprendre la différenciation des CSCGs et identifier de nouvelles molécules pouvant traiter les glioblastomes.

SOX11

Le facteur SOX11 est également impliqué dans la différenciation des CSCGs. La surexpression de Sox11 semble bloquer la tumorigénèse des CSCGs en induisant leur différenciation cellulaire (CONTI, AQUENNOUZ, LA TORRE, 2009). De plus Sox11 a été retrouvé inhibé dans des CSCGs (SUNAYAMA, SATO, MATSUDA et al., 2011).

Ces facteurs sont impliqués dans la différenciation des CSCGs et leur utilisation permettrait certainement d'atteindre cette population de cellules, une perspective pour mieux traiter les cancers. La figure 14 décrit les différentes options de traitements des glioblastomes

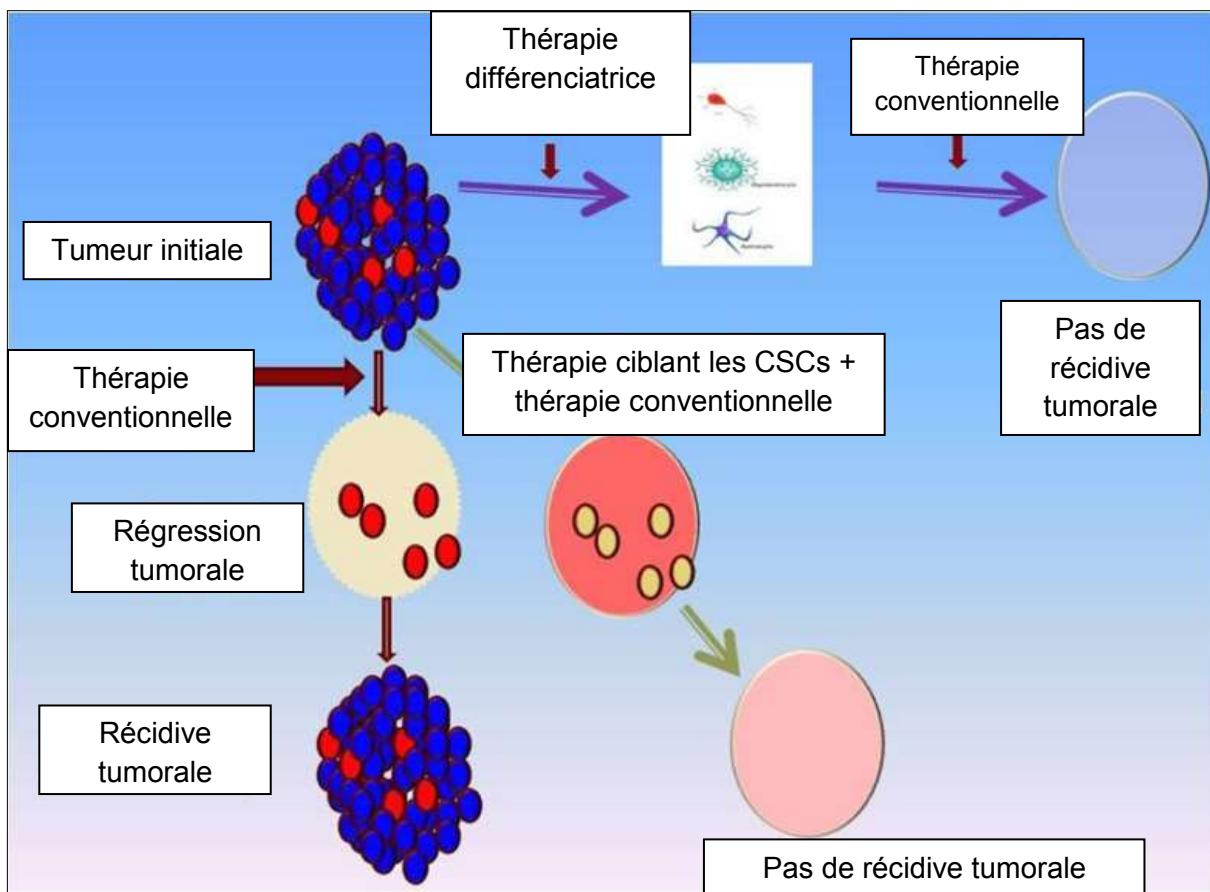


Figure 14 : Différentes options de traitements des glioblastomes, schéma adapté de JHANWAR-UNIYAL, LABAGNARA, FRIEDMAN et al., 2015.

Cependant par dédifférenciation, les cellules différencierées pourraient réacquérir le phénotype souche. En effet, Dufour et ses collaborateurs (DUFOUR, CADUSSEAU, VARLET et al., 2009) ont montré *in vitro*, une dédifférenciation des astrocytes sous l'influence de stimuli. L'efficacité du ciblage des CSCGs, nécessite également la neutralisation des divers stimuli responsables du maintien des propriétés souches des CSCGs, y compris ceux envoyés par la niche.

III.5. Cibler le microenvironnement des CSCGs

Comme il a été mentionné précédemment, des niches tant vasculaires que hypoxiques pourraient participer à l'entretien des CSCGs et au développement tumoral.

➤ L'hypoxie

L'hypoxie favorise l'angiogénèse et la croissance tumorale, ainsi que la radiorésistance des GBMs aux traitements actuels (PIETRAS, GISSELSSON, ORA et al., 2008). Il a été suggéré que les niches hypoxiques étaient probablement impliquées dans l'entretien des cellules souches cancéreuses en général (LI, BAO, WU et al., 2009). Dans ce contexte, les CSCGs ont été identifiées dans les zones nécrotiques des GBMs (LI, BAO, WU et al., 2009). Soeda et ses collaborateurs (SOEDA, PARK, LEE et al., 2009) ont montré que l'hypoxie favorisait le maintien du phénotype souche des CSCGs. Une autre étude a signalé que l'hypoxie augmente l'expression des marqueurs des CSCGs, l'auto-renouvellement et la croissance tumorale (HEDDLESTON, LI, McLENDON et al., 2009). Ainsi, le microenvironnement des CSCGs, comme les niches hypoxiques pourraient être une cible thérapeutique afin de contribuer à lutter contre la résistance des GBMs.

La différence entre les cellules cancéreuses souches et non souches en termes de réponse à l'hypoxie a été observée dans plusieurs études. Dans les cellules cancéreuses non souches des GBMs, l'hypoxie induit uniquement le facteur de transcription HIF1- α , alors que dans les CSCGs, ce sont HIF1- α et HIF2- α qui sont induits (LI, BAO, WU et al., 2009). De plus, HIF2- α ne semble pas être exprimé dans les cellules progénitrices neurales normales, et de ce fait, son ciblage pourrait alors permettre d'atteindre spécifiquement les CSCGs.

L'hypoxie favorise l'expression de gènes spécifiques des CSCGs ainsi que l'expression de VEGF et HIF2- α . A leur tour, les cibles transcriptionnelles de HIF2- α telles qu'Oct4, Glut1 et Serpin B9 sont aussi surexprimées en milieu hypoxique (LI, BAO, WU et al., 2009).

L'étude de Soeda a également montré que HIF1- α intervenait dans l'expansion des CSCGs lors d'une hypoxie induite (SOEDA, PARK, LEE et al., 2009). Selon la base de données REMBRANDT de la NCI (*National Cancer Institute*), un fort taux d'expression de HIF2- α est lié à un mauvais pronostic de survie des patients atteint de GBMs

(HEDDLESTON, LI, McLENDON et al., 2009). De plus, la surexpression de HIF2- α favorise le maintien du caractère souches des CSCGs (HEDDLESTON, LI, McLENDON et al., 2009).

De plus comme vu précédemment, la niche hypoxique favorise également la migration des CSCGs via la promotion de récepteurs tels que CXCR4 (COMA, SHIMIZU et KLAGSBRUN, 2011). Le blocage de CXCR4 entraînerait une réduction de la croissance tumorale de la souris xénogreffée (PERSANO, RAMPAZZO, BASSO et al., 2013). CXCR4, surexprimé dans les CSCGs serait donc une cible thérapeutique potentielle.

➤ La niche vasculaire

Une autre stratégie serait de déloger les cellules souches cancéreuses de leurs niches, ce qui les forcerait à se différencier. Suite à cette différenciation, elles deviendraient sensibles aux traitements actuels.

Le ciblage de la niche vasculaire où se trouvent les CSCGs, pourrait permettre d'atteindre efficacement ce type de cellules (CHARLES et HOLLAND, 2010). En effet, l'apport nutritif des CSCGs serait alors bloqué. Nous savons que la fixation du ligand *stroma-cell-derived 1* (SDF-1 ou CXCL12) à son récepteur CXCR4 participe à la néoangiogénèse tumorale (TSENG, VASQUEZ-MEDRANO et BROWN, 2011). Selon Kioi et ses collaborateurs (KIOI, VOGEL, SCHULTZ et al., 2010), l'inhibition de cette fixation (par plerixafor) inhibe la vascularisation *in vivo*.

Le ciblage de VEGF présent en grande quantité dans ces niches par bévacizumab inhibe la capacité angiogénique des CSCGs *in vitro* et *in vivo* (BAO, WU, SATHORNSUMETEE et al., 2006).

Il existe des interactions mutuelles et complexes entre les CSCGs et le système vasculaire. Calabrese et ses collaborateurs (CALABRESE, POPPLETON, KOCAK et al., 2007) ont montré que le ciblage vasculaire des GBMs par bévacizumab diminuait le nombre de CSCGs. Selon une autre équipe (FOLKINS, MAN, XU et al., 2007), une chimiothérapie visant spécifiquement la vascularisation des GBMs réduit la formation de neurosphères des CSCGs.

Une thérapie ciblant l'angiogénèse des GBMs pourrait perturber les niches vasculaires (impliquées dans l'entretien des CSCGs) et alors mieux combattre la résistance thérapeutique de ces cellules. Ainsi, tant la niche hypoxique que la niche périvasculaire pourraient être des cibles prometteuses dans le traitement des GBMs. Mais il serait nécessaire d'identifier les mécanismes spécifiques aux cellules souches cancéreuses pour épargner les cellules souches saines.

Nous savons que l'environnement cellulaire et les facteurs de la niche participent à la régulation des CSCGs. Il existe également des mécanismes génétiques et épigénétiques qui régulent les CSCGs (figure 15). Une autre stratégie dans le ciblage des CSCGs pourrait être la régulation de l'expression de gènes de ce type de cellule par des miARNs.

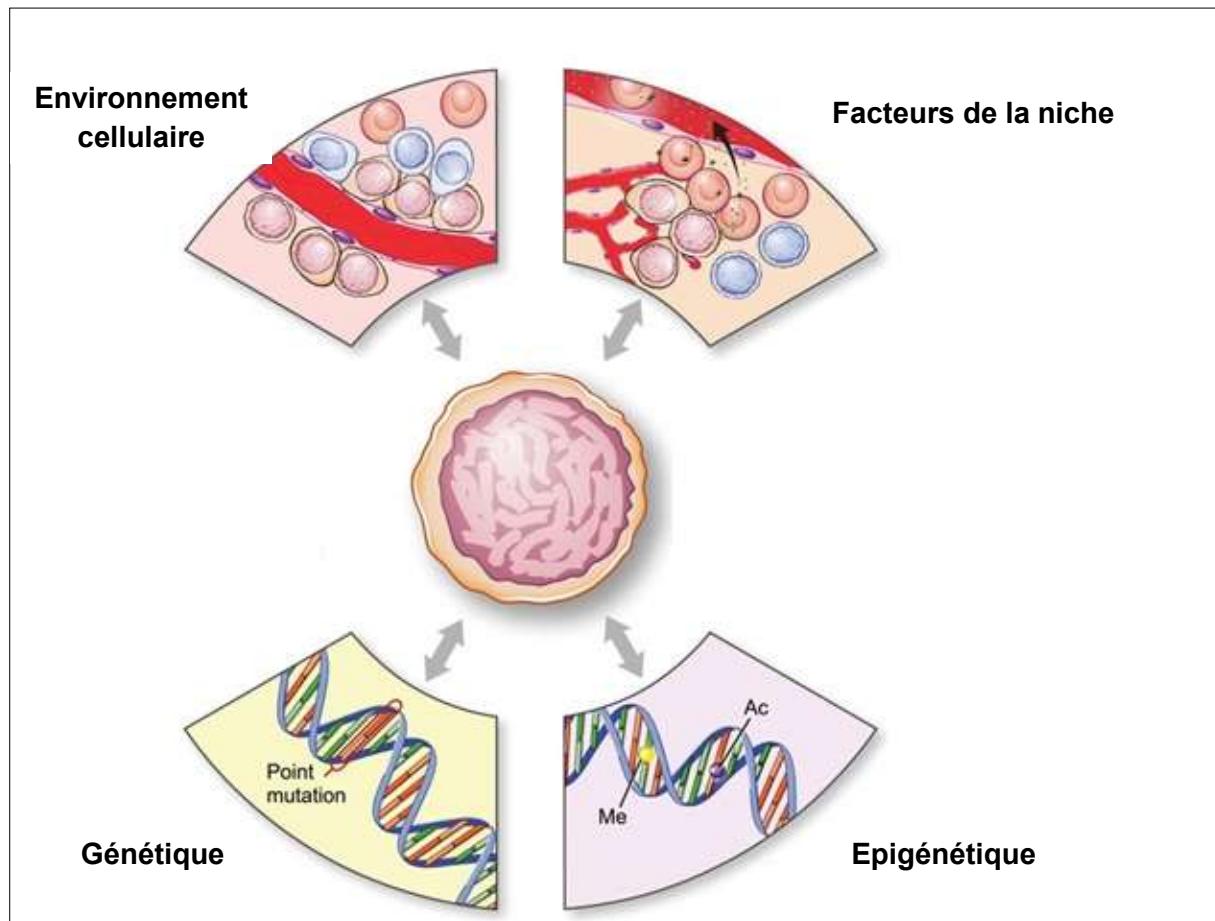


Figure 15 : Facteurs régulant les CSCGs, schéma adapté de LATHIA, MACK, MULKEARNS-HUBERT et al., 2015.

III.6. Réguler les CSCGs par des microARN (miARNs)

Les miARNs sont de petits ARN (de 18 à 25 nucléotides) non codant, capables d'inhiber l'expression de gènes par modification post-transcriptionel d'ARNm cibles. Un seul miARN est capable de cibler une dizaine d'ARNm distincts. Les miARNs sont de puissants régulateurs d'expression de gènes. Les miARNs semblent jouer un rôle clé dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Dans la plupart des cancers, les régions chromosomiques comportant des aberrations génétiques contiennent plus de 50% des gènes codant pour les microARN (CALIN, SEVIGNANI, DUMITRU et al., 2004) ce qui aboutit à la dérégulation de l'expression de ces gènes y compris ceux des gliomes (LAGES, GUTTIN, EL ATIFI et al., 2011). Il a été montré qu'un miARN peut être oncogène ou suppresseur de tumeur. Les miARNs pro-cancéreux sont appelés oncomir. Parmi les microARN qui ont suscité un grand intérêt, on note :

Mir-9

La diminution de la phosphorylation de STAT3 (KIM, HUANG, PARK et al., 2011) dans les CSCGs CD133+ lors d'une exposition à mir-9 seul a été observée par Kim et ses collaborateurs. Cette étude suggère que mir-9 bloque la différenciation des CSCGs. De plus, lors de travaux réalisé en 2011 sur des CSCGs CD133⁺ et CD133⁻ (SCHRAIVOGEL, WEINMANN, BEIER et al., 2011), il a été découvert que mir-9 inhibait la différenciation de CSCGs et participait au maintien de leurs propriétés souches via le suppresseur de tumeur *calmodulin-binding transcription activator1* (CAMT1). De même, une récente étude (GOMEZ, VOLINIA, CROCE et al., 2014) a prouvé que mir-9 participerait à la croissance tumorale via FOXP1. Ainsi, mir-9 pourrait être une cible dans la lutte contre les CSCGs.

Mir-124

Mir-124 est sous-exprimé dans les CSCGs (LANG, YANG, ZHAO et al., 2012). Une étude (LEE, FINNISS, CAZACU et al., 2013) a révélé qu'une expression de mir-124 dans les CSCGs réduit leur migration et inhibe leur auto-renouvellement.

L'étude de l'équipe de Yang et ses collaborateurs (YANG, MENON, BLACK et al., 2010) a montré que la surexpression de mir-124 dans les CSCGs CD133⁺ diminue la formation de neurosphères et inhibe l'expression des marqueurs de cellules souches BMI1 et nestine.

D'après une étude menée en 2007 (MAKEYEV, ZHANG, CARRASCO et al., 2007), mir-124 est fortement impliqué dans la différenciation et la maturation des progéniteurs

neuraux. De plus, il existe une corrélation inverse entre l'expression de mir-124 et celle de PTBP1 (*polypyrimidine tract-binding protein 1*), protéine conservant l'immaturité des cellules souches dans les GBMs (FERRARESE, HARSH, YADAV et al., 2014). Augmenter l'expression de mir-124 dans les CSCGs pourrait donc être une stratégie exploitable dans la lutte contre les GBMs.

Mir-128

L'expression de mir-128 est fortement réprimée dans les CSCGs (LANG, YANG, ZHAO et al., 2012). Mir-128 inhiberait directement BMi1 (GODLEWSKI, NOWICKI, BRONISZ et al., 2008), un facteur de transcription fortement impliqué dans l'auto-renouvellement des CSCGs (BRUGGEMAN, HULSMAN, TANGER et al., 2007). Selon une autre étude, PVP-LDE-225 inhiberait l'auto-renouvellement des CSCGs en induisant entre autre une expression de mir-128 et une répression de BMi1 (FU, RODOVA, NANTA et al., 2013).

Mir-128 inhibe également RTK et EGFR, 2 récepteurs essentiels à l'auto-renouvellement (PAPAGIANNAKOPOULOS, FRIEDMANN-MORVINSKI, NEVEU et al., 2012). L'expression de mir-128 dans les CSCGs permettrait donc d'altérer l'auto-renouvellement des CSCGs et ainsi diminuer leur nombre.

Mir-10

Mir-10 est surexprimé dans les GBMs et dans les CSCGs (GUESSOUS, ALVARADO-VELEZ, MARCINKIEWICZ et al., 2013) ; il a été établi que l'inhibition de mir-10 dans les CSCGs xénotransplantées ralentit considérablement leur prolifération, leur invasion et leur migration (GUESSOUS, ALVARADO-VELEZ, MARCINKIEWICZ et al., 2013). Mir-10 pourrait donc être une des cibles thérapeutiques prometteuses dans la lutte contre les GBMs.

Mir-33

Selon Wang et ses collaborateurs (WANG, SUN, HU et al., 2014) mir-33 est surexprimé dans les CSCGs. Ce microARN participerait à la croissance et à l'auto-renouvellement de ces cellules. D'après cette même étude, chez la souris, le blocage de mir-33 réduit l'auto-renouvellement des CSCGs ainsi que la croissance tumorale. Une surexpression induite de mir-33 dans les cellules tumorales non souches engendre l'expression de caractère souche. Ainsi, mir-33 contribuerait au phénotype des CSCGs (WANG, SUN, HU et al., 2014). Mir-33 pourrait donc être également une cible potentielle pour atteindre les CSCGs.

Mir-138

Pour Chan et son équipe (CHAN, NAMA, GOPAL et *al.*, 2012), mir-138 est surexprimé dans les CSCGs par rapport aux CSNs. La différenciation forcée de CSCGs réduit l'expression de mir-138. Si nous nous référons aux mêmes travaux de cette équipe, le blocage de mir-138 dans les CSCGs induit l'apoptose de ces cellules *in vivo*. Ainsi Mir-138 serait une piste intéressante dans la lutte contre les CSCGs.

Mir-34

Une recherche effectuée en 2014 (VISANI, DE BIASE, MARUCCI et *al.*, 2014) a souligné une expression de mir-34 réduite dans les GBMs. Ce microARN pourrait jouer un rôle clé dans les CSCGs (RATHOD, RANI, KHAN et *al.*, 2014). Mir-34 inhibe directement Notch (GUESSOUS, ZHANG, KOFMAN et *al.*, 2010), cette voie de signalisation vue précédemment et fortement impliquée dans l'entretien des CSCGs. L'expression de mir-34 dans ces CSCGs inhibe la prolifération, la survie et la migration cellulaire (GUESSOUS, ZHANG, KOFMAN et *al.*, 2010). Ainsi, la surexpression de mir-34 dans les CSCGs pourrait permettre de mieux combattre les GBMs.

Mir-451

L'expression de mir-451 est diminuée dans les CSCGs CD133⁺ (GAL, PANDI, KANNER et *al.*, 2008). Dans l'étude de Gal et ses collaborateurs (GAL, PANDI, KANNER et *al.*, 2008), mir-451 altère les neurosphères de CSCGs et inhibe la croissance tumorale. Ainsi ce mir-451 pourrait être impliqué dans la tumorigénéité des CSCGs.

La liste des microARN impliqués dans le cancer ne cessent d'augmenter. Le tableau IV référence les principaux microARN retrouvés dérégulés dans les cellules souches cancéreuses des glioblastomes et leur(s) fonction(s). La dérégulation de l'expression des microARN dans le cancer et leur rôle en tant que oncomir ou suppresseurs de tumeur font d'eux une cible thérapeutique innovante. Ils pourraient également être utilisés comme des marqueurs biologiques pour établir le diagnostic thérapeutique.

Tableau IV : MicroARN dérégulés dans les CSCGs et leur(s) fonction(s), tableau adapté YANG, XING et JOHNSON, 2015.

<u>MicroARN</u>	<u>Expression</u>	<u>Fonction(s)</u>
Mir-9	Surexprimé	Prolifération (+), différenciation (-)
Mir-10	Surexprimé	Prolifération(+), migration (+)
Mir-155	Surexprimé	Prolifération (+), différenciation (-), migration (+)
Mir-124	Sous-exprimé	Différenciation (+), prolifération (-), invasion (-)
Mir-1275	Surexprimé	Différenciation (-), prolifération (+)
Mir-128	Sous-exprimé	Différenciation (+), prolifération (-)
Mir-137	Sous-exprimé	Différenciation (+), prolifération (-)
Mir-138	Sous-exprimé	Différenciation (-), prolifération (+), apoptose (-)
Mir-148	Surexprimé	Différenciation (-), prolifération (+)
Mir-204	Sous-exprimé	Différenciation(+), prolifération (-), invasion (-)
Mir-302-367	Sous-exprimé	Différenciation (+), prolifération (-), invasion (-)
Mir-33	surexprimé	Différenciation (-), prolifération (+)
Mir-34	Sous-exprimé	Différenciation (+), prolifération (-), apoptose (-)
Mir-451	Surexprimé	Différenciation (-), prolifération (+), apoptose (-)

(+) : *promotion*,

(-) : *inhibition*

III.7. Essais cliniques ciblant les CSCGs en cours de développement

L'implication des CSCGs dans la résistance thérapeutique et la récidive des GBMs fait de moins en moins de doutes (PISTOLLATO, ABBADI, RAMPAZZO et al., 2010). Aujourd'hui, il est largement admis que les cellules souches cancéreuses participent à la récidive tumorale, ce malgré une thérapie conventionnelle incluant chirurgie, radiothérapie, et chimiothérapie. Par conséquent, il y a un besoin urgent de développer des thérapies plus efficaces, basées sur le ciblage spécifique des CSCGs.

Nous avons vu que les molécules de surface des CSCGs pourraient jouer un rôle important dans leur entretien. Une étude clinique de phase II ciblant spécifiquement des antigènes associés au maintien des CSCGs à l'aide d'un vaccin est actuellement en cours (SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014).

Nous avons pris connaissance de l'existence des voies de signalisation impliquées dans l'entretien des CSCGs. Le signal Shh régule l'auto-renouvellement et le potentiel tumorigène des CSCGs (CLEMENT, SANCHEZ, DE TRIBOLET et al., 2007). Une étude clinique de phase II démontrant l'inhibition des CSCGs par le ciblage de la signalisation Shh via l'inhibiteur vismodegib vient de s'achever (SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014). Une autre étude clinique incluant notamment cet inhibiteur du signal Shh dans le ciblage de CSCGs est en phase initiale de développement (SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014).

Comme constaté précédemment, le signal Notch est anormalement surexprimé dans les CSCGs des glioblastomes (FAN, KHAKI, ZHU et al., 2010). Une étude de phase II non randomisée ciblant la γ -sécrétase, l'enzyme responsable du clivage de Notch, via RO4929097 est actuellement en cours (SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014). De plus, la signalisation Notch est également impliquée dans la radiorésistance des CSCGs (WANG, WAKEMAN, LATHIA et al., 2010). Une étude de phase I utilisant RO4929097 en combinaison avec TMZ et radiothérapie est actuellement en cours (SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014). Un autre composé, le RO4929097 est également en cours d'étude en phase I et III randomisée en association avec bevacizumab (SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014).

Par ailleurs, une thérapie ciblant l'angiogénèse des GBMs pourrait perturber les niches vasculaires (impliquées dans l'entretien des CSCGs). Les essais cliniques ciblant l'angiogénèse des GBMs à l'aide du bevacizumab (BATCHELOR, SORENSEN, DI TOMASO et al., 2007) ou du cediranib (inhibiteurs de VEGFR) (FRIEDMAN, PRADOS, WEN et al., 2009) ont montré leur efficacité. De même, le Vandetanib, un inhibiteur du récepteur à VEGF

et EGF, est actuellement en phase I d'étude clinique en association avec le TMZ (DRAPPATZ, NORDEN, WONG et al., 2010). Le tableau V résume certains essais cliniques ciblant les CSCs dans le traitement des GBMs.

Tableau V : Essais cliniques en cours ciblant les CSCs dans le traitement des GBMs, tableau adapté de SUNDAR, HSIEH, MANJILA et al., 2014.

<u>Conception de l'essai</u>	<u>Agent (cible)</u>	<u>Résultats</u>
Phase I, un seul bras	ICT-107, vaccin autologue à base de cellule dendritique pulsée (antigènes associés à la tumeur, surexprimés dans les CSCGs)	21 patients au total ; non toxique ; 33% de taux de réponse immunitaire ; tendance non significative vers une augmentation de la survie sans aggravation de la maladie, mais pas de survie globale, pour les personnes répondant au vaccin
Phase 0/II, randomisée	Vismodegib (signalisation Shh)	40 patients au total ; bien toléré ; aucune différence de survie sans aggravation de la maladie ni de survie globale à 6 mois en monothérapie ; concentration intratumorale atteinte ; signalisation Shh diminuée ; prolifération et auto-renouvellement des CSCGs diminués
Phase II, randomisée	ICT-107 (antigènes associés à la tumeur)	En cours
Phase II, non randomisée	R04929097 (voie de signalisation γ -secrétase, Notch)	En cours
Phase I, un seul bras	R04929097 en combinaison avec TMZ et radiothérapie (voie de signalisation γ -secrétase, Notch)	En cours
Phase I/II, randomisée	R04929097 avec bevacizumab (voie de signalisation γ -secrétase, Notch)	En cours

Même si de nombreuses molécules ont démontré une forte efficacité lors des études précliniques, aucune ou seulement peu d'entre elles ont eu les mêmes effets sur les essais cliniques et ce, dû à une activité anti-tumorale limitée ou des effets secondaires puissants. Cela pourrait être imputé à l'hétérogénéité propre des GBMs, et pour cette raison, la compréhension du comportement, du phénotype et des voies de signalisation des CSCGs doit être approfondie. Pour cela, les futures thérapies devront être validées par rapport aux CSCGs plutôt qu'aux cellules cancéreuses différenciées. Cela permettrait de développer des stratégies anti-cellules souches cancéreuses et anti-tumorales plus efficaces et plus ciblées. Le tableau VI résume les différentes stratégies sur lesquelles nous nous sommes arrêtées dans cette partie. Dans ce contexte, l'appel aux approches des « omics » : transcriptomiques, protéomiques, métabolomiques aideraient à mieux identifier les altérations génétiques d'une panoplie de gènes impliqués dans l'activité des CSCGs et de ce fait dans la progression et le maintien des glioblastomes.

Tableau VI : Stratégies thérapeutiques pour atteindre les CSCs des glioblastomes.

<u>Stratégies thérapeutiques</u>	<u>Cibles</u>
Cibler des molécules spécifiques de surface des CSCGs	CD133 ; L1CAM ; les transporteurs de surfaces.
Inhiber des voies de signalisations spécifiques des CSCGs	EGFR-PI3k-Akt ; Notch ; Shh ; STAT3 ; Wnt/β-caténine.
Cibler les facteurs de transcriptions impliqués dans le maintien des CSCGs	Sox2 ; Oct4 ; Nanog ; c-Myc ; Olig2 ; Bmi1 ; REST.
Forcer la différenciation des CSCGs	Neurogénine2 ; BMP ; GSK-β ; PTEN ; SOX11.
Cibler le microenvironnement des CSCGs	HIF2-α ; CXCR4 ; VEGF.
Réguler les CSCGs par des miARNs	Mir9 ; mir-124 ; mir-128 ; mir-10 ; mir-33 ; mir-138 ; mir-34 ; mir-451.

CONCLUSION

Conclusion

Aussi rares soient-ils, les glioblastomes n'en restent pas moins agressifs, très infiltrants et récidivent inexorablement. Les méthodes classiques de traitement des glioblastomes finissent dans la plupart des cas par un échec thérapeutique qui conduit, à court terme, aux décès des patients.

Grâce aux nouveaux progrès scientifiques, notamment dans le domaine de la biologie moléculaire et cellulaire ainsi que de la génétique, de plus en plus d'études soulèvent l'hypothèse d'une seule sous-population de cellules à l'origine de l'initiation, du développement et de la récidive de la tumeur. Ces cellules, qui ne sont autres que les cellules souches cancéreuses, semblent également détenir un rôle clé dans les mécanismes de résistance des glioblastomes à la chimiothérapie et radiothérapie. C'est par leurs pompes d'efflux, leur activation des mécanismes de réparation de l'ADN et de voies de signalisation que les cellules souches cancéreuses pourraient intervenir dans la résistance thérapeutique. La niche, un endroit hypoxique très vascularisé où sont logées les cellules souches cancéreuses, participerait également à la résistance aux thérapies actuelles. Contre cette résistance thérapeutique en ciblant les cellules souches cancéreuses et leurs niches donneraient certainement de nouveaux espoirs dans la lutte contre ce type de cancer.

Même si la découverte de ces cellules est une avancée majeure, d'autres études seront nécessaires pour les caractériser et comprendre leur comportement. A l'heure actuelle, il n'existe en effet aucun marqueur spécifique et/ou exclusif aux CSCGs. Pour la majorité des marqueurs utilisés, leur fonction reste inconnue comme l'illustre l'exemple du marqueur de surface CD133 dont l'utilisation est controversée. De plus, l'hypothèse selon laquelle un seul contingent au sein de la tumeur serait responsable de la tumorigénéité ne recueille pas un consensus absolu en raison de l'hétérogénéité des glioblastomes. Par ailleurs, la validation de cette hypothèse est d'autant plus difficile à obtenir que les procédures expérimentales varient selon les laboratoires et aboutissent ainsi à des résultats contradictoires. Enfin, une autre limite a pu être constatée concernant cette hypothèse : étant donné que les CSCGs se caractérisent par un potentiel tumorigène et la propriété d'interagir avec leur microenvironnement, la xénotransplantation pratiquée chez la souris ne permet pas d'obtenir des résultats transposables à l'homme.

En dépit de ces limites principalement d'ordre technique, la théorie des cellules souches cancéreuses nous offre de nouvelles perspectives en vue de contrer la résistance thérapeutique des glioblastomes. De ce fait, il devient urgent d'identifier des marqueurs fiables pour ces cellules et de connaître les processus moléculaires qui sont responsables de leur maintien et de leur survie. Cela permettrait de développer des stratégies anti-cellules souches cancéreuses et anti-tumorales plus efficaces et plus ciblées.

Ainsi, cibler des molécules spécifiques de surface, inhiber des voies de signalisation spécifiques ou encore cibler des facteurs de transcriptions impliqués dans l'entretien et la résistance des cellules souches cancéreuses des glioblastomes sont des stratégies actuellement en cours d'étude. Réguler les cellules souches cancéreuses des glioblastomes par des microARN, cibler leur niche et les forcer à se différencier sont également d'autres pistes de recherche prometteuses.

Dans les années à venir, des stratégies de ciblage des cellules souches cancéreuses seront sans doute approuvées et permettront de concevoir de nouveaux traitements efficaces contre cette maladie encore quasiment incurable aujourd'hui.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

ABDOUH M, FACCHINO S, CHATOO W et al. *BMI1 Sustains Human Glioblastoma Multiforme Stem Cell Renewal*. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29 (28): 8884-96.

ADACHI K, MIRZADEH Z, SAKAGUCHI M et al. *Beta-Catenin Signaling Promotes Proliferation of Progenitor Cells in the Adult Mouse Subventricular Zone*. *Stem Cells*. 2007; 25 (11): 2827-36.

ALBRECHTSEN N, DORNREITER I, GROSSE F et al. *Maintenance of Genomic Integrity by p53: Complementary Roles for Activated and Non-Activated p53*. *Oncogene*. 1999;18 (53): 7706-17.

AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A et al. *Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100 (7): 3983-88.

ALISON MR, LIM SM et NICHOLSON LJ. *Cancer Stem Cells: Problems for Therapy?* *The Journal of Pathology*. 2011; 223 (2): 147-61.

ARLT MJ, NOVAK-HOFER I, GAST D et al. *Efficient Inhibition of Intra-Peritoneal Tumor Growth and Dissemination of Human Ovarian Carcinoma Cells in Nude Mice by Anti-L1-Cell Adhesion Molecule Monoclonal Antibody Treatment*. *Cancer Research*. 2006; 66 (2): 936-43.

BAKER M. *Cancer Stem Cells Tracked*. *Nature*. 2012; 488 (7409): 13-14.

BLADI I, HUCHET A, BAUCHET L et al. *[Epidemiology of glioblastoma]*. *Neuro-Chirurgie*. 2010;56 (6): 433-40.

BAO S, WU Q, LI Z et al. *Targeting Cancer Stem Cells through L1CAM Suppresses Glioma Growth*. *Cancer Research*. 2008; 68 (15): 6043-48.

BAO S, WU Q, McLENDON RE et al. *Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response*. *Nature*. 2006;444 (7120): 756-60.

BAO S, WU Q, SATHORNSUMETEE S et al. *Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor*. *Cancer Researc*. 2006; 66 (16): 7843-48.

BATCHELOR TT, SORENSEN AG, DI TOMASO E, et al. *AZD2171, a Pan-VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Normalizes Tumor Vasculature and Alleviates Edema in Glioblastoma Patients*. *Cancer Cell*. 2007;11 (1): 83-95.

BECHER OJ, HAMBARDZUMYAN D, FOMCHENKO EI et al. *Gli Activity Correlates with Tumor Grade in Platelet-Derived Growth Factor-Induced Gliomas*. *Cancer Research*. 2008; 68 (7): 2241-49.

BEIER D, HAU P, PROESCHOLDT M et al. *CD133(+) and CD133(-) Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles*. *Cancer Research*. 2007;67 (9): 4010-15.

BENEKE S, DIEFENBACH J et BURKLE. *Poly(ADP-Ribosyl)ation Inhibitors: Promising Drug Candidates for a Wide Variety of Pathophysiologic Conditions*. *International Journal of Cancer*. 2004;111 (6): 813-18.

BHATIA M, WANG JC, KAPP U et al. *Purification of Primitive Human Hematopoietic Cells Capable of Repopulating Immune-Deficient Mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94 (10): 5320-25.

BLOM T, TYNNINEN O, PUPUTTI M, et al. *Molecular Genetic Analysis of the REST/NRSF Gene in Nervous System Tumors*. *Acta Neuropathologica*. 2006; 112 (4): 483-90.

BLOUGH MD, ZLATESCU MC et CAIRNCROSS JG. *O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Regulation by p53 in Astrocytic Cells*. *Cancer Research*. 2007;67 (2): 580-84.

BONNET D et DICK JE. *Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell*. *Nature Medicine*. 1997; 3 (7): 730-37.

BOTA DA, DESJARDINS A, QUINN JA et al. *Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel®) wafers in the treatment of malignant gliomas*. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2007;3 (5): 707-15.

BRAT DJ et VAN MEIR EG. *Glomeruloid Microvascular Proliferation Orchestrated by VPF/VEGF*. *The American Journal of Pathology*. 2001; 158 (3): 789-96.

BREDEL M. *Anticancer Drug Resistance in Primary Human Brain Tumors* *Brain Research Reviews*. 2001; 35 (2): 161-204.

BRUCE WR et VAN DER GAAG. *A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO*. *Nature*. 1963;199 : 79-80.

BRUGGEMAN SW, HULSMAN D, TANGER E et al. *Bmi1 Controls Tumor Development in an Ink4a/Arf-Independent Manner in a Mouse Model for Glioma*. *Cancer Cell*. 2007; 12 (4): 328-41.

CALABRESE C, POPPLETON H, KOCAK M et al. *A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells*. *Cancer Cell* . 2007; 11 (1): 69-82.

CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD et al. *Human microRNA Genes Are Frequently Located at Fragile Sites and Genomic Regions Involved in Cancers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101 (9): 2999-3004.

CAO T, LATHIA JD, EYLER CE et al. *Erythropoietin Receptor Signaling Through STAT3 Is Required For Glioma Stem Cell Maintenance*. *Genes & Cancer*. 2010; 1 (1): 50-61.

CAPELA A et TEMPLE S. *LeX/ssea-1 Is Expressed by Adult Mouse CNS Stem Cells, Identifying Them as Nonependymal*. *Neuron*. 2002; 35 (5): 865-75.

CARRO MS, LIM WK, ALVAREZ MJ et al. *The Transcriptional Network for Mesenchymal Transformation of Brain Tumours*. *Nature*. 2010;463 (7279): 318-25.

CHAKRAVARTI A, DICKER A et MEHTA M. *The Contribution of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Pathway to Radioresistance in Human Gliomas: A Review of Preclinical and Correlative Clinical Data*. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2004;58 (3): 927-31.

CHAN KS, ESPINOSA I, CHAO M et al. *Identification, Molecular Characterization, Clinical Prognosis, and Therapeutic Targeting of Human Bladder Tumor-Initiating Cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106 (33): 14016-21.

CHAN XH, NAMA S, GOPAL F et al. *Targeting Glioma Stem Cells by Functional Inhibition of a Prosurvival oncomiR-138 in Malignant Gliomas*. *Cell Reports*. 2012; 2 (3): 591-602.

CHARLES N et HOLLAND EC. *The Perivascular Niche Microenvironment in Brain Tumor Progression*. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. 2010; 9 (15): 3012-21.

CHENG L, BAO S et RICH JN. *Potential Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells in Glioblastoma*. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 80 (5): 654-65.

CHENG L, HUANG Z, ZHOU W et al. *Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth*. 2013; *Cell* 153 (1): 139-52.

CHEN J, YANJIAO L, TZONG-SHIUE Y et al. *A Restricted Cell Population Propagates Glioblastoma Growth after Chemotherapy*. *Nature*. 2012;488 (7412): 522-26.

CHEN J, McKAY RM et PARADA LF. *Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells*. *Cell*. 2012;149 (1): 36-47.

CHIARUGI P et GIANNONI E. *Anoikis: A Necessary Death Program for Anchorage-Dependent Cells*. *Biochemical Pharmacology*. 2008; 76 (11): 1352-64.

CHIBA T, MIYAGI S, SARAYA A et al. *The Polycomb Gene Product BMI1 Contributes to the Maintenance of Tumor-Initiating Side Population Cells in Hepatocellular Carcinoma*. *Cancer Research*. 2008; 68 (19): 7742-49.

CHIRASANI SR, STERNJAK A, WEND P et al. *Bone Morphogenetic Protein-7 Release from Endogenous Neural Precursor Cells Suppresses the Tumourigenicity of Stem-like Glioblastoma Cells*. 2010; *Brain: A Journal of Neurology* 133 (Pt 7): 1961-72.

CHONG YK, TOH TB, ZAIDEN N et al. *Cryopreservation of Neurospheres Derived from Human Glioblastoma Multiforme*. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2009; 27 (1): 29-39.

CHU CT, EVERISS KD, WIKSTRAND CJ et al. *Receptor Dimerization Is Not a Factor in the Signalling Activity of a Transforming Variant Epidermal Growth Factor Receptor (EGFRvIII)*. *The Biochemical Journal*. 1997;324 (Pt 3) : 855-61.

CLARKE J, BUTOWSKI N et CHANG S. *Recent Advances in Therapy for Glioblastoma*. *Archives of Neurology*. 2010;67 (3): 279-83.

CLARKE MF, DICK JE, DIRKS PB et al. *Cancer Stem Cells--Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells*. *Cancer Research*. 2006;66 (19): 9339-44.

CLEMENT V, SANCHEZ P, DE TRIBOLET N et al. *HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal and tumorigenicity*. *Current biology : CB*. 2007;17 (2): 165-72.

COHEN MH, SHEN YL, KEEGAN P et al. *FDA Drug Approval Summary: Bévacizumab (Avastin) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme*. *The Oncologist*. 2009; 14 (11): 1131-38.

COLIN C, BAEZA N, TONG S et al. *In Vitro Identification and Functional Characterization of Glial Precursor Cells in Human Gliomas*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2006;32 (2): 189-202.

COLLINS AT, BERRY PA, HYDE C et al. *Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells*. *Cancer Research*. 2005;65 (23): 10946-51.

COMA S, SHIMIZU A et KLAGSBRUN M. *Hypoxia Induces Tumor and Endothelial Cell Migration in a Semaphorin 3F- and VEGF-Dependent Manner via Transcriptional Repression of Their Common Receptor Neuropilin 2*. *Cell Adhesion & Migration*. 2011;5 (3): 266-75.

CONTI A, AQUENNOUZ M, LA TORRE D et al. *miR-21 and 221 Upregulation and miR-181b Downregulation in Human Grade II-IV Astrocytic Tumors*. *Journal of Neuro-Oncology*. 2009;93 (3): 325-32.

CRUCERU ML, NEAGU M, DEMOULIN JB et al. *Therapy Targets in Glioblastoma and Cancer Stem Cells: Lessons from Haematopoietic Neoplasms*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2013;17 (10): 1218-35.

DE BENEDICTIS A, MORITZ-GASSER S et DUFFAU H. *Awake Mapping Optimizes the Extent of Resection for Low-Grade Gliomas in Eloquent Areas*. *Neurosurgery*. 2010;66 (6): 1074-84.

DELL'ALBANI. *Stem Cell Markers in Gliomas*. *Neurochemical Research*. 2008; 33 (12): 2407-15.

DRAPPATZ J, NORDEN AD, WONG ET et al. *Phase I Study of Vandetanib with Radiotherapy and Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma*. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2010;78 (1): 85-90.

DREESEN O et BRIVANLOU AH. *Signaling Pathways in Cancer and Embryonic Stem Cells*. *Stem Cell Reviews*. 2007; 3 (1): 7-17.

DUFOUR C, CADUSSEAU J, VARLET P. *Astrocytes Reverted to a Neural Progenitor-like State with Transforming Growth Factor Alpha Are Sensitized to Cancerous Transformation*. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27 (10): 2373-82.

DUZGUN Z, EROGLU Z et BIRAY AVCI C. *role of mTOR in glioblastome*. *Gene*. 2016; 10;575(2 Pt1):187-90.

EHTESHAM M, MAPARA KY, STEVENSON CB et al. *CXCR4 Mediates the Proliferation of Glioblastoma Progenitor Cells*. *Cancer Letters* 274 (2): 305-12.

EYLER CE, FOO WC, LAFIURA KM et al. *Brain Cancer Stem Cells Display Preferential Sensitivity to Akt Inhibition*. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26 (12): 3027-36.

FAN X, KHAKI L, ZHU TS et al. *NOTCH Pathway Blockade Depletes CD133-Positive Glioblastoma Cells and Inhibits Growth of Tumor Neurospheres and Xenografts*. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2010;28 (1): 5-16.

FERRARESE R, HARSH GR, YADAV AK et al. *Lineage-Specific Splicing of a Brain-Enriched Alternative Exon Promotes Glioblastoma Progression*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124 (7): 2861-76.

FIALKOW PJ, DENMAN AM, JACOBSON RJ et al. *Chronic Myelocytic Leukemia*. *Journal of Clinical Investigation*. 1978;62 (4): 815-23.

FILATOVA A, ACKER T et GARVALOV BK. *The Cancer Stem Cell Niche(s): The Crosstalk between Glioma Stem Cells and Their Microenvironment*. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2013;1830 (2): 2496-2508.

FOLKINS C, MAN S, XU P et al. *Anticancer Therapies Combining Antiangiogenic and Tumor Cell Cytotoxic Effects Reduce the Tumor Stem-like Cell Fraction in Glioma Xenograft Tumors*. *Cancer Research*. 2007;67 (8): 3560-64.

FOLKINS C, SHAKED Y, MAN S et al. *Glioma Tumor Stem-like Cells Promote Tumor Angiogenesis and Vasculogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor and Stromal-Derived Factor 1*. *Cancer Research*. 2009; 69 (18): 7243-51.

FRANCESCHI E, CAVALLO G, SCOPECE L et al. *Phase II Trial of Carboplatin and Etoposide for Patients with Recurrent High-Grade Glioma*. *British Journal of Cancer*. 2004;91 (6): 1038-44.

FRIEDMAN HS, PRADOS MD, WEN PY et al. *Bévacizumab Alone and in Combination with Irinotecan in Recurrent Glioblastoma*. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27 (28): 4733-40.

FRIEDMAN HS, KERBY T et CALVERT H. *Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma*. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6 (7): 2585-97.

FRIEDMANN-MORVINSKI D, BUSHONG EA, KE E et al. *Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice*. *Science (New York, N.Y.)*. 2012;338 (6110): 1080-84.

FURNARI FB, FENTON T, BACHOO RM et al. *Malignant Astrocytic Glioma: Genetics, Biology, and Paths to Treatment*. *Genes & Development*. 2007;21 (21): 2683-2710.

GAL H, PANDI G, KANNER AA et al. *MIR-451 and Imatinib Mesylate Inhibit Tumor Growth of Glioblastoma Stem Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;376 (1): 86-90.

GALLIA GL, TYLER BM, HANN CL et al. *Inhibition of Akt Inhibits Growth of Glioblastoma and Glioblastoma Stem-like Cells*. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009; 8 (2): 386-93.

GALLI R, BINDA E, ORFANELLI U et al. *Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma*. *Cancer Research*. 2004;64 (19): 7011-21.

GANGEMI RM, GRIFFERO F, MARUBBI D et al. *SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity*. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27 (1): 40-48.

GERSON SL. *MGMT: Its Role in Cancer Aetiology and Cancer Therapeutics*. *Nature Reviews. Cancer*. 2004;4 (4): 296-307.

GINESTIER C, HUR MH, CHARAFE-JAUFFRET E et al. *ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome*. *Cell Stem Cell*. 2007;1 (5): 555-67.

GLADSON CL, PRAYSON RA et LIU WM. *The Pathobiology of Glioma Tumors*. *Annual Review of Pathology*. 2010;5: 33-50.

GODLEWSKI J, NOWICKI MO, BRONISZ A et al. *Targeting of the Bmi-1 Oncogene/stem Cell Renewal Factor by microRNA-128 Inhibits Glioma Proliferation and Self-Renewal*. *Cancer Research*. 2008;68 (22): 9125-30.

GOMEZ GG, VOLINIA S, CROCE CM et al. *Suppression of MicroRNA-9 by Mutant EGFR Signaling Upregulates FOXP1 to Enhance Glioblastoma Tumorigenicity*. *Cancer research*. 2014;74 (5): 1429-39.

GOODELL MA, BROSE K, PARADIS G et al. *Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells That Are Replicating in Vivo*. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;183 (4): 1797-1806.

GRAHAM V, KHUDYAKOV J, ELLIS P et al. *SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity*. *Neuron*. 2003;39 (5): 749-65.

GRIFFERO F, DAGA A, MARUBBI D et al. *Different Response of Human Glioma Tumor-initiating Cells to Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284 (11): 7138-48.

GRIGUER CE, OLIVA CR, GOBIN E et al. *CD133 Is a Marker of Bioenergetic Stress in Human Glioma*. *PLoS ONE*. 2008;3 (11).

GROTHENHUIS BA, WIJNHOVEN BP et VAN LANSCHOT JJ. *Cancer Stem Cells and Their Potential Implications for the Treatment of Solid Tumors*. *Journal of Surgical Oncology*. 2012;106 (2): 209-15.

GUESSOUS F, ZHANG Y, KOFMAN A et al. *microRNA-34a Is Tumor Suppressive in Brain Tumors and Glioma Stem Cells*. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. 2010;9 (6): 1031-36.

GUICHET PO, BIECHE I, TEIGELL M et al. *Cell Death and Neuronal Differentiation of Glioblastoma Stem-like Cells Induced by Neurogenic Transcription Factors*. *Gli.* 2013; 61 (2): 225-39.

GUISE CP, ABBATTISTA MR, SINGLETON RS et al. *The Bioreductive Prodrug PR-104A Is Activated under Aerobic Conditions by Human Aldo-Keto Reductase 1C3*. *Cancer Research*. 2010;70 (4): 1573-84.

HADNAGY A, GABOURY, BEAULIEU R et al. *SP Analysis May Be Used to Identify Cancer Stem Cell Populations*. *Experimental Cell Research*. 2006;312 (19): 3701-10.

HAMBARDZUMYAN D, BECHER OJ, ROSENBLUM MK et al. *PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo*. *Genes*. 2008; 22(4):436-448.

HART MG, GRANT R, GARSIDE R et al. *Chemotherapy Wafers for High Grade Glioma*. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011; (3): CD007294.

HEDDLESTON JM, LI Z, McLENDON RE et al. *The Hypoxic Microenvironment Maintains Glioblastoma Stem Cells and Promotes Reprogramming towards a Cancer Stem Cell Phenotype*. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. 2009;8 (20): 3274-84.

HEGI ME, DISERENS AC, GORLIA T et al. *MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma*. *The New England Journal of Medicine*. 2005;352 (10): 997-1003.

HEMMATI HD, NAKANO I, LAZAREFF JA et al. *Cancerous Stem Cells Can Arise from Pediatric Brain Tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100 (25): 15178-83.

HIDE T, TAKEZAKI T, NAKATANI Y et al. *Sox11 Prevents Tumorigenesis of Glioma-Initiating Cells by Inducing Neuronal Differentiation*. *Cancer Research*. 2009;69 (20): 7953-59.

HIRSCHMANN-JAX C, FOSTER AE, WULF GC et al. *A Distinct “Side Population” of Cells with High Drug Efflux Capacity in Human Tumor Cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101 (39): 14228-33.

HOEY T, YEN WC, AXELROD F et al. *DLL4 Blockade Inhibits Tumor Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency*. *Cell Stem Cell*. 2009;5 (2): 168-77.

HOLLAND H, KOSCHNY T, AHNERT P et al. *WHO Grade-Specific Comparative Genomic Hybridization Pattern of Astrocytoma - a Meta-Analysis*. *Pathology, Research and Practice*. 2010;206 (10): 663-68.

HUANG FT, ZHUAN-SUN YX, ZHUANG YY et al. *Inhibition of Hedgehog Signaling Depresses Self-Renewal of Pancreatic Cancer Stem Cells and Reverses Chemoresistance*. *International Journal of Oncology*. 2012;41 (5): 1707-14.

HU YY, ZHENG MH, CHENG G et al. *Notch signaling contributes to the maintenance of both normal neural stem cells and patient-derived glioma stem cells*. *BMC Cancer*. 2011;11: 82.

ICHIMURA K, VOGAZIANOU AP, LIU L et al. *1p36 Is a Preferential Target of Chromosome 1 Deletions in Astrocytic Tumours and Homozygously Deleted in a Subset of Glioblastomas*. *Oncogene*. 2008;27 (14): 2097-2108.

IDOATE MA, DIEZ VALLE R, ECHEVESTE J et al. *Pathological Characterization of the Glioblastoma Border as Shown during Surgery Using 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence*. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2011;31 (6): 575-82.

IGNATOVA TN, KUKEKOV VG, LAYWELL ED et al. *Human Cortical Glial Tumors Contain Neural Stem-like Cells Expressing Astroglial and Neuronal Markers in Vitro*. *Glia* 39 (3): 193-206.

IKUSHIMA H, TODO T, INO Y et al. *Autocrine TGF-Beta Signaling Maintains Tumorigenicity of Glioma-Initiating Cells through Sry-Related HMG-Box Factors*. *Cell Stem Cell*. 2009;5 (5): 504-14.

INFANGER DW, CHO Y, LOPEZ BS et al. *Glioblastoma Stem Cells Are Regulated by Interleukin-8 Signaling in a Tumoral Perivascular Niche*. *Cancer Research*. 2013;73 (23): 7079-89.

JAMAL M, RATH BH, TSANG PS et al. *The Brain Microenvironment Preferentially Enhances the Radioresistance of CD133(+) Glioblastoma Stem-like Cells*. *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 2012;14 (2): 150-58.

JENSEN NA, PEDERSEN KM, LIHME F et al. *Astroglial c-Myc Overexpression Predisposes Mice to Primary Malignant Gliomas*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278 (10): 8300-8308.

JENSEN RL. *Brain Tumor Hypoxia: Tumorigenesis, Angiogenesis, Imaging, Pseudoprogression, and as a Therapeutic Target*. *Journal of Neuro-Oncology*. 2009;92 (3): 317-35.

JIANG H, GUO W, LIANG X et al. *Both the Establishment and the Maintenance of Neuronal Polarity Require Active Mechanisms: Critical Roles of GSK-3beta and Its Upstream Regulators*. *Cell*. 2005;120 (1): 123-35.

JIANG Z, PORE N, CERNIGLIA GJ et al. *Phosphatase and Tensin Homologue Deficiency in Glioblastoma Confers Resistance to Radiation and Temozolomide That Is Reversed by the Protease Inhibitor Nelfinavir*. *Cancer Research*. 2007;67 (9): 4467-73.

JIN X, JEON HY, JOO KM et al. *Frizzled 4 Regulates Stemness and Invasiveness of Migrating Glioma Cells Established by Serial Intracranial Transplantation*. *Cancer Research*. 2011;71 (8): 3066-75.

JORDAN MA, HIMES RH et WILSON L. *Comparison of the Effects of Vinblastine, Vincristine, Vindesine, and Vinepidine on Microtubule Dynamics and Cell Proliferation in Vitro*. *Cancer Research*. 1985;45 (6): 2741-47.

KALANI MY, CHESIER, SH CORD BJ et al. *Wnt-Mediated Self-Renewal of Neural Stem/progenitor Cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105 (44): 16970-75.

KANIA G, CORBEIL D, FUCHS J et al. *Somatic Stem Cell Marker Prominin-1/CD133 Is Expressed in Embryonic Stem Cell-Derived Progenitors*. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2005;23 (6): 791-804.

KARTNER N, RIORDAN JR et LING V. *Cell Surface P-Glycoprotein Associated with Multidrug Resistance in Mammalian Cell Lines*. *Science (New York, N.Y.)*. 1983;221 (4617): 1285-88.

KEIME-GUIBERT F, CHINOT O, TAILLANDIER L et al. *Radiotherapy for Glioblastoma in the Elderly*. *The New England Journal of Medicine* 356 (15): 1527-35.

KELES GE, LAMBORN KR, CHANG SM et al. *Volume of Residual Disease as a Predictor of Outcome in Adult Patients with Recurrent Supratentorial Glioblastomas Multiforme Who Are Undergoing Chemotherapy*. *Journal of Neurosurgery*. 2004;100 (1): 41-46.

KHAN MZ, BRANDIMARTI R, MUSSER BJ et al. *The Chemokine Receptor CXCR4 Regulates Cell-Cycle Proteins in Neurons*. *Journal of Neurovirology* 9 (3): 300-314.

KIEFEL H, BONDONG S, HAZIN J et al. *L1CAM*. *Cell Adhesion & Migration*. 2012;6 (4): 374-84.

KIM TM, HUANG W, PARK R et al. *A Developmental Taxonomy of Glioblastoma Defined and Maintained by MicroRNAs*. *Cancer Research*. 2011;71 (9): 3387-99.

KIM Y, KIM KH, LEE J et al. *Wnt Activation Is Implicated in Glioblastoma Radioresistance*. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 2012; 92 (3): 466-73.

KIOI M, VOGEL H, SCHULTZ G et al. *Inhibition of Vasculogenesis, but Not Angiogenesis, Prevents the Recurrence of Glioblastoma after Irradiation in Mice*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120 (3): 694-705.

KOUL D, FU J, SHEN R et al. *Antitumor Activity of NVP-BKM120--a Selective Pan Class I PI3 Kinase Inhibitor Showed Differential Forms of Cell Death Based on p53 Status of Glioma Cells*. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18 (1): 184-95.

KOUL D, SHEN R, KIM YW et al. *Cellular and in Vivo Activity of a Novel PI3K Inhibitor, PX-866, against Human Glioblastoma*. *Neuro-Oncology*. 2010;12 (6): 559-69.

LARGES E, GUTTIN A, EL ATIFI M et al. *MicroRNA and Target Protein Patterns Reveal Physiopathological Features of Glioma Subtypes*. *PLoS ONE* 2011;6 (5): e20600.

LANG MF, YANG S, ZHAO C et al. *Genome-Wide Profiling Identified a Set of miRNAs That Are Differentially Expressed in Glioblastoma Stem Cells and Normal Neural Stem Cells*. *PloS One*. 2012 (4): e36248.

LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J et al. *A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice*. *Nature*. 1994;367 (6464): 645-48.

LARSEN C. *[Genetic and molecular abnormalities of glioblastomas (GBM)]*. *Bulletin Du Cancer*. 2010;97 (11): 1389-1407.

LARSSON LG. *Oncogene- and Tumor Suppressor Gene-Mediated Suppression of Cellular Senescence*. *Seminars in Cancer Biology*. 2011;21 (6): 367-76.

LATHIA JD, GALLAGHER J, HEDDLESTON JM et al. *Integrin Alpha 6 Regulates Glioblastoma Stem Cells*. *Cell Stem Cell*. 2010;6 (5): 421-32.

LATHIA JD, LI M, HALL PE et al. *Laminin Alpha 2 Enables Glioblastoma Stem Cell Growth*. *Annals of Neurology*. 2012;72 (5): 766-78.

LATHIA JD, LI M, SINYUK M et al. *High-Throughput Flow Cytometry Screening Reveals a Role for Junctional Adhesion Molecule a as a Cancer Stem Cell Maintenance Factor*. *Cell Reports*. 2014;6 (1): 117-29.

LEE HK, FINNISS S, CAZACU S et al. *Mesenchymal Stem Cells Deliver Synthetic microRNA Mimics to Glioma Cells and Glioma Stem Cells and Inhibit Their Cell Migration and Self-Renewal*. *Oncotarget*. 2013;4 (2): 346-61.

LEE J, SON MJ, WOOLARD K et al. *Epigenetic-Mediated Dysfunction of the Bone Morphogenetic Protein Pathway Inhibits Differentiation of Glioblastoma-Initiating Cells*. *Cancer Cell*. 2008;13 (1): 69-80.

LIETZ M, CICCHETTI P et THIEL G. *Inverse Expression Pattern of REST and Synapsin I in Human Neuroblastoma Cells*. *Biological Chemistry*. 1998;379 (10): 1301-4.

LIGON KL, HUILLARD E, MEHTA S et al. *Olig2-Regulated Lineage-Restricted Pathway Controls Replication Competence in Neural Stem Cells and Malignant Glioma*. *Neuron*. 2007;53 (4): 503-17.

LIN C, LU W, ZHAI L et al. *Mesd Is a General Inhibitor of Different Wnt Ligands in Wnt/LRP Signaling and Inhibits PC-3 Tumor Growth in Vivo*. *FEBS Letters*. 2011;585 (19): 3120-25.

LUI G, YUAN X, ZENG Z et al. *Analysis of Gene Expression and Chemosensitivity of CD133+ Cancer Stem Cells in Glioblastoma*. *Molecular Cancer*. 2006;5: 67.

LIU X, WANG L, ZHAO S et al. *β -Catenin Overexpression in Malignant Glioma and Its Role in Proliferation and Apoptosis in Glioblastoma Cells*. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*. 2011;28 (2): 608-14.

LI Z, BAO S, WU Q et al. *Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells*. *Cancer Cell*. 2009;15 (6): 501-13.

LOUIS DN. *Molecular Pathology of Malignant Gliomas*. *Annual Review of Pathology*. 2006;1: 97-117.

LOUIS DN. *The p53 Gene and Protein in Human Brain Tumors*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1994;53 (1): 11-21.

LU QR, SUN T, ZHU Z et al. *Common Developmental Requirement for Olig Function Indicates a Motor Neuron/oligodendrocyte Connection*. *Cell*. 2002;109 (1): 75-86.

MAGNI M, SHAMMAH S, SCHIRO R et al. *Induction of Cyclophosphamide-Resistance by Aldehyde-Dehydrogenase Gene Transfer*. *Blood*. 1996; 87 (3): 1097-1103.

MAKEYEV EV, ZHANG J, CARRASCO MA et al. *The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-mRNA Splicing*. *Molecular Cell*. 2007;27 (3): 435-48.

MAO XG, YAN M, XUE XY et al. *Overexpression of ZNF217 in Glioblastoma Contributes to the Maintenance of Glioma Stem Cells Regulated by Hypoxia-Inducible Factors*. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 2011; 91 (7): 1068-78.

MARET D, GRUZGLIN E, SADR MS et al. *Surface Expression of Precursor N-Cadherin Promotes Tumor Cell Invasion* ». *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 2010;12 (12): 1066-80.

MELLINGHOFF IK, CLOUGHESY TF et MISCHEL PS. *PTEN-Mediated Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors*. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13 (2 Pt 1): 378-81.

MESSAM CA, HOU J et MAJOR EO. *Coexpression of Nestin in Neural and Glial Cells in the Developing Human CNS Defined by a Human-Specific Anti-Nestin Antibody*. *Experimental Neurology*. 2000;161 (2): 585-96.

MOLOFSKY AV, PARDAL R, IWASHITA T et al. *mi-1 Dependence Distinguishes Neural Stem Cell Self-Renewal from Progenitor Proliferation*. *Nature*. 2003;425 (6961): 962-67.

MURACCIOLE X, ROMAIN S, DUFOUR H et al. *PAI-1 and EGFR Expression in Adult Glioma Tumors: Toward a Molecular Prognostic Classification*. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2002;52 (3): 592-98.

MURPHY C, PICKLES T, KNOWLING M et al. *Concurrent Modified PCV Chemotherapy and Radiotherapy in Newly Diagnosed Grade IV Astrocytoma*. *Journal of Neuro-Oncology*. 2002;57 (3): 215-20.

NAGPAL S, HARSH G et RECHT L. *Bévacizumab Improves Quality of Life in Patients with Recurrent Glioblastoma*. *Chemotherapy Research and Practice* 2011; 2011:602812.

NAKADA M, NAMBU E, FURUYAMA N et al. *Integrin α 3 Is Overexpressed in Glioma Stem-like Cells and Promotes Invasion*. *British Journal of Cancer*. 2013;108 (12): 2516-24.

NEMOTO Y, MARUO T, SATO T et al. *Identification of Cancer Stem Cells Derived from a Canine Lung Adenocarcinoma Cell Line*. *Veterinary Pathology*. 2011;48 (5): 1029-34.

NIEDER C, ANDRATSCHKE N, WIEDENMANN N et al. *Radiotherapy for High-Grade Gliomas. Does Altered Fractionation Improve the Outcome?*. Strahlenther Onkol. 2004; 180(7):401-7.

OGDEN AT, WAZIRI AE, LOCHHEA RA et al. *Identification of A2B5+CD133- Tumor-Initiating Cells in Adult Human Gliomas*. Neurosurgery. 2008; 62 (2): 505-14.

OHGAKI H, DESSEN P, JOURDE B et al. *Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study*. Cancer Research. 2004;64 (19): 6892-99.

OHGAKI H et KLEIHUES P. *Epidemiology and Etiology of Gliomas*. Acta Neuropathologica1. 2005;09 (1): 93-108.

OWENS DM et WATT FM. *Contribution of Stem Cells and Differentiated Cells to Epidermal Tumours*. Nature Reviews. Cancer. 2003;3 (6): 444-51.

PAPAGIANNAKOPOULOS T, FRIEDMANN-MORVINSKI D, NEVEU P et al. *Pro-Neural miR-128 Is a Glioma Tumor Suppressor That Targets Mitogenic Kinases*. Oncogene. 2012;31 (15): 1884-95.

PARK CY, TSENG D et WEISSMAN IL. *Cancer Stem Cell-Directed Therapies: Recent Data from the Laboratory and Clinic*. Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 2009;17 (2): 219-30.

PARK DM et RICH JN. *Biology of Glioma Cancer Stem Cells*. Molecules and Cells. 2009;28 (1): 7-12.

PATRU C, ROMAO L, VARLET P et al. *CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or Side Populations Do Not Resemble Tumor-Initiating Properties of Long-Term Cultured Cancer Stem Cells from Human Malignant Glio-Neuronal Tumors*. BMC Cancer. 2010;10: 66.

PEARCE DJ, TAUSSIG D, SIMPSON C et al. *Characterization of Cells with a High Aldehyde Dehydrogenase Activity from Cord Blood and Acute Myeloid Leukemia Samples*. Stem Cells (Dayton, Ohio). 2005;23 (6): 752-60.

PERSANO L, RAMPOZZO E, BASSO G, et al. *Glioblastoma Cancer Stem Cells: Role of the Microenvironment and Therapeutic Targeting*. Biochemical Pharmacology. 2013;85 (5): 612-22.

PHI JH, PARK SH, KIM SK et al. *Sox2 Expression in Brain Tumors: A Reflection of the Neuroglial Differentiation Pathway*. The American Journal of Surgical Pathology. 2008;32 (1): 103-12.

PHILLIPS HS, KHARBANDA S, CHEN R et al. *Molecular Subclasses of High-Grade Glioma Predict Prognosis, Delineate a Pattern of Disease Progression, and Resemble Stages in Neurogenesis*. Cancer Cell. 2006;9 (3): 157-73.

PICCIRILLO SG, REYNOLDS BA, ZANETTI N et al. *Bone Morphogenetic Proteins Inhibit the Tumorigenic Potential of Human Brain Tumour-Initiating Cells*. Nature. 2006;444 (7120): 761-65.

PIETRAS A, GISSELSSON D, ORA I et al. *High Levels of HIF-2alpha Highlight an Immature Neural Crest-like Neuroblastoma Cell Cohort Located in a Perivascular Niche*. *The Journal of Pathology*. 2008;214 (4): 482-88.

PISTOLLATO F, ABBADI S, RAMPAZZO E et al. *Intratumoral Hypoxic Gradient Drives Stem Cells Distribution and MGMT Expression in Glioblastoma*. *Stem Cells*. 2010;(Dayton, Ohio) 28 (5): 851-62.

POUSSEGUR J, DAYAN F et MAZURE NM. *Hypoxia Signalling in Cancer and Approaches to Enforce Tumour Regression*. *Nature*. 2006;441 (7092): 437-43.

PRADOS MD, SCOTT C, CURRAN WJ JR et al. *Procarbazine, Lomustine, and Vincristine (PCV) Chemotherapy for Anaplastic Astrocytoma: A Retrospective Review of Radiation Therapy Oncology Group Protocols Comparing Survival with Carmustine or PCV Adjuvant Chemotherapy*. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17 (11): 3389-95.

PRESTEGARDEN L, SVENDSEN A, WANG J et al. *Glioma Cell Populations Grouped by Different Cell Type Markers Drive Brain Tumor Growth*. *Cancer Research*. 2010;70 (11): 4274-79.

PU P, ZHANG Z, KANG C et al. *Downregulation of Wnt2 and Beta-Catenin by siRNA Suppresses Malignant Glioma Cell Growth*. *Cancer Gene Therapy*. 2009;16 (4): 351-61.

QIAN XC et BRENT TP. *Methylation Hot Spots in the 5' Flanking Region Denote Silencing of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene*. *Cancer Research*. 1997;57 (17): 3672-77.

QUINN JA, JIANG SX, CARTER J et al. *Phase II Trial of Gliadel(R) plus O6-Benzylguanine (O6-BG) in Adults with Recurrent Glioblastoma Multiforme*. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15 (3): 1064-68.

RANUNCOLO SM, LADEDA V, SPECTERMAN S et al. *CD44 Expression in Human Gliomas*. *Journal of Surgical Oncology*. 2002;79 (1): 30-35

RAO JS. *Molecular Mechanisms of Glioma Invasiveness: The Role of Proteases*. *Nature Reviews. Cancer*. 2003;3 (7): 489-501.

RASPER M, SCHAFER A, PIONTEK G et al. *Aldehyde Dehydrogenase 1 Positive Glioblastoma Cells Show Brain Tumor Stem Cell Capacity*. *Neuro-Oncology*. 2010;12 (10): 1024-33.

RATHOD SS, RANI SB, KHAN M et al. *Tumor Suppressive miRNA-34a Suppresses Cell Proliferation and Tumor Growth of Glioma Stem Cells by Targeting Akt and Wnt Signaling Pathways*. *FEBS Open Bio*. 2014;4: 485-95.

REMONTET L, ESTEVE J, BOUVIER AM et al. *Cancer Incidence and Mortality in France over the Period 1978-2000*. *Revue D'épidémiologie Et De Santé Publique*. 2003;51 (1 Pt 1): 3-30.

REYNOLDS BA et WEISS S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science (New York, N.Y.)*. 1992;255 (5052): 1707-10.

RICCI-VITIANI L, FABRIZI E, PALIO E et al. *Colon Cancer Stem Cells. Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. 2009;87 (11): 1097-1104.

RICCI-VITIANI L, PALLINI R, BIFFONI M et al. *Tumour Vascularization via Endothelial Differentiation of Glioblastoma Stem-like Cells. Nature*. 2010; 468 (7325): 824-28.

RONG Y, DURDEN DL, VAN MEIR EG et al. "Pseudopalisading" Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2006;65 (6): 529-39.

RUDIN CM, HANN CL, LATERRA J et al. *Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. The New England Journal of Medicine*. 2009;361 (12): 1173-78.

RUIZ IAA, SAHNCHEZ P et DAHMANE N. *Gli and Hedgehog in Cancer: Tumours, Embryos and Stem Cells. Nature Reviews. Cancer*. 2002;2 (5): 361-72.

RUSSO AL, KWON HC, BURGAN WE et al. *In Vitro and in Vivo Radiosensitization of Glioblastoma Cells by the Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor E7016. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15 (2): 607-12.

SCHMALZ PGR, SHEN MJ et PARK JKSchmalz. *Treatment Resistance Mechanisms of Malignant Glioma Tumor Stem Cells. Cancers*. 2011;3 (1): 621-35.

SCHRAIVOGL D, WEINMANN L, BEIER D et al. *CAMTA1 Is a Novel Tumour Suppressor Regulated by miR-9/9* in Glioblastoma Stem Cells. The EMBO Journal*. 2011;30 (20): 4309-22.

SCOPPELLITI A, CAMMARERI P, CATALANO V et al. *Therapeutic Implications of Cancer Initiating Cells. Expert Opinion on Biological Therapy*. 2009;9 (8): 1005-16.

SCOTT CB, SCARANTINO C, URTASUN R et al. *Validation and Predictive Power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) Recursive Partitioning Analysis Classes for Malignant Glioma Patients: A Report Using RTOG 90-06. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1998;40 (1): 51-55.

SEIDEL S, GARVALOV BK, WIRTA V et al. A Hypoxic Niche Regulates Glioblastoma Stem Cells through Hypoxia Inducible Factor 2 Alpha. *Brain: A Journal of Neurology*. 2010;133 (Pt 4): 983-95.

SELL S. *On the Stem Cell Origin of Cancer. The American Journal of Pathology*. 2010;176 (6): 2584-2494.

SEMENZA GL. *Targeting HIF-1 for Cancer Therapy. Nature Reviews. Cancer*. 2003;3 (10): 721-32.

SHAHI MH, LORENTE A et CASTRESANA JS. *Hedgehog Signalling in Medulloblastoma, Glioblastoma and Neuroblastoma*. *Oncology Reports*. 2008;19 (3): 681-88.

SIBILIA M, KROISMAYR R, LICHTENBERGER BM et al. *The Epidermal Growth Factor Receptor: From Development to Tumorigenesis. Differentiation; Research in Biological Diversity*. 2007;75 (9): 770-87.

SINGH SK, HAWKINS C, CLARKE ID et al. *Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells*. *Nature*. 2004; 432 (7015): 396-401.

SNEDDON JB et WERB Z. *Location, Location, Location: The Cancer Stem Cell Niche* ». *Cell Stem Cell*. 2007;1 (6): 607-11.

SOEDA A, PARK M, LEE D et al. *Hypoxia Promotes Expansion of the CD133-Positive Glioma Stem Cells through Activation of HIF-1alpha*. *Oncogene*. 2009;28 (45): 3949-59.

SON MJ, WOOLARD K, NAM DH et al. *SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma*. *Cell Stem Cell*. 2009;4 (5): 440-52.

SOUHAMI L, SEIFERHELD W, BRACHMAN D et al. *Randomized Comparison of Stereotactic Radiosurgery Followed by Conventional Radiotherapy with Carmustine to Conventional Radiotherapy with Carmustine for Patients with Glioblastoma Multiforme: Report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 Protocol*. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2004;60 (3): 853-60.

STROJNIK T, ROSLAND GV, SAKARIASSEN PO et al. *Neural Stem Cell Markers, Nestin and Musashi Proteins, in the Progression of Human Glioma: Correlation of Nestin with Prognosis of Patient Survival*. *Surgical Neurology*. 2007;68 (2): 133-43.

STUPP R, DIETRICH PY, OSTERMANN KRALJEVOC S et al. *Promising Survival for Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme Treated with Concomitant Radiation plus Temozolomide Followed by Adjuvant Temozolomide*. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20 (5): 1375-82.

STUPP R et HEGI ME. *Methylguanine Methyltransferase Testing in Glioblastoma: When and How?* *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25 (12): 1459-60.

STUPP R, HEGI ME, MASON WP et al. *Effects of Radiotherapy with Concomitant and Adjuvant Temozolomide versus Radiotherapy Alone on Survival in Glioblastoma in a Randomised Phase III Study: 5-Year Analysis of the EORTC-NCIC Trial*. *The Lancet. Oncology*. 2009;10 (5): 459-66.

STUPP R, MASSON WP, VAN DEN BENT MJ et al. *Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma*. *The New England Journal of Medicine*. 2005, 352 (10): 987-96.

SUNAYAMA J, SATO A, MATSUDA K et al. *FoxO3a Functions as a Key Integrator of Cellular Signals That Control Glioblastoma Stem-like Cell Differentiation and Tumorigenicity*. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2011;29 (9): 1327-37.

SUNDAR SJ, HSIEH JK, MANJILA S et al. *The Role of Cancer Stem Cells in Glioblastoma*. *Neurosurgical Focus*. 2014;37 (6): E6.

SUN P, XIA S, LAL B et al. *DNER, an Epigenetically Modulated Gene, Regulates Glioblastoma-Derived Neurosphere Cell Differentiation and Tumor Propagation*. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27 (7): 1473-86.

SUZUKI A, NAKAUCHI H et TANIGUCHI H. *Prospective Isolation of Multipotent Pancreatic Progenitors Using Flow-Cytometric Cell Sorting*. *Diabetes*. 2004;53 (8): 2143-52.

SZOTEK PP, PIERETTI-VANMARCKE R, MASIAKOS PT et al. *Ovarian Cancer Side Population Defines Cells with Stem Cell-like Characteristics and Mullerian Inhibiting Substance Responsiveness*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103 (30): 11154-59.

TATE CM, PALLINI R, RICCI-VITIANI L et al. *A BMP7 Variant Inhibits the Tumorigenic Potential of Glioblastoma Stem-like Cells*. *Cell Death and Differentiation* 19 (10): 1644-54.

TCHOGHANDJIAN A, BAEZA N, COLIN C et al. *A2B5 Cells from Human Glioblastoma Have Cancer Stem Cell Properties*. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*. 2010;20 (1): 211-21.

TSENG D, VASQUEZ-MEDRANO DA et BRAWN JM. *Targeting SDF-1/CXCR4 to Inhibit Tumour Vasculature for Treatment of Glioblastomas*. *British Journal of Cancer* 104 (12): 1805-9.

TURPIN A, SHARIF A, STOVEN L et al. *La niche des cellules souches tumorales dans le glioblastome : des aspects fondamentaux au ciblage thérapeutique*. *Bulletin du Cancer*. 2014;102 (1): 24-33.

UCHIDA H, ARITA K, YUNOUE S et al. *Role of Sonic Hedgehog Signaling in Migration of Cell Lines Established from CD133-Positive Malignant Glioma Cells*. *Journal of Neuro-Oncology*. 2011;104 (3): 697-704.

UCKUN FM. *Severe Combined Immunodeficient Mouse Models of Human Leukemia*. *Blood*. 1996;88 (4): 1135-46.

VAJKOCZY P, FARHADI M, GAUMANN A et al. *Microtumor Growth Initiates Angiogenic Sprouting with Simultaneous Expression of VEGF, VEGF Receptor-2, and Angiopoietin-2*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;109 (6): 777-85.

VERHAAK RG, HOADLEY KA, PURDOM E et al. *Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. *Cancer Cell*. 2010;17 (1): 98-110.

VERHOEFF JJ, VAN TELLINGEN O, CLAES A et al. *Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme*. *BMC Cancer*. 2009; 9 : 444.

VESELSKA R, KUGLIK P, CEJPEK P et al. *Nestin Expression in the Cell Lines Derived from Glioblastoma Multiforme*. *BMC Cancer* 6: 32.

VISANI M, DE BIASE D, MARUCCI G et al. *Expression of 19 microRNAs in Glioblastoma and Comparison with Other Brain Neoplasia of Grades I-III*. *Molecular Oncology*. 2014;8 (2): 417-30.

VISVADER JE et LINDEMAN GJ. *Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities*. *Cell Stem Cell*. 2012;10 (6): 717-28.

VLASHI E, McBRIDE WH et PAJONK F. *Radiation Responses of Cancer Stem Cells*. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009;108 (2): 339-42.

VON HOFF DD, LoRUSSO PM, RUDIN CM et al. *Inhibition of the Hedgehog Pathway in Advanced Basal-Cell Carcinoma*. *The New England Journal of Medicine*. 2009;361 (12): 1164-72.

VOUSDEN KH et LU X. *Live or Let Die: The Cell's Response to p53*. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2 (8): 594-604.

VRIES RG, HUCH M et CLEVERS H. *Stem Cells and Cancer of the Stomach and Intestine*. *Molecular Oncology*. 2010;4 (5): 373-84.

WAGLE N, NGHIEMPHU L, LAI A et al. *Update and developments in the treatment of glioblastoma multiforme – focus on bevacizumab*. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. 2010;3: 79-85.

WALKER LM et HARDY JD. *Philadelphia Chromosome in Acute Leukemia: Case Report*. *Cancer*. 1976;38 (4): 1619-24.

WANG F, MI YJ, CHEN XG et al. *Axitinib Targeted Cancer Stemlike Cells to Enhance Efficacy of Chemotherapeutic Drugs via Inhibiting the Drug Transport Function of ABCG2*. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*. 2012;18: 887-98.

WANG H, LATHIA JD, WU Q et al. *Targeting Interleukin 6 Signaling Suppresses Glioma Stem Cell Survival and Tumor Growth*. *Stem cells*. 2009;27 (10): 2393-2404.

WANG H, SUN T, HU J et al. *miR-33a Promotes Glioma-Initiating Cell Self-Renewal via PKA and NOTCH Pathways*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124 (10): 4489-4502.

WANG J, WAKEMAN TP, LATHIA JD et al. *Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells*. *Stem Cells*. 2010;28 (1): 17-28.

WANG J, WANG H, LI Z et al. *c-Myc Is Required for Maintenance of Glioma Cancer Stem Cells*. *PLoS ONE*. 2008;3 (11): e3769

WANG J, WANG C, MENQ Q et al. *siRNA Targeting Notch-1 Decreases Glioma Stem Cell Proliferation and Tumor Growth*. *Molecular Biology Reports*. 2012;39 (3): 2497-2503.

WANG J, SAKARIASSEN P, TSINKALOVSKY O et al. *CD133 Negative Glioma Cells Form Tumors in Nude Rats and Give Rise to CD133 Positive Cells*. *International Journal of Cancer*. 2008; 122 (4): 761-8.

- WANG K, PAN L, CHE X et al. *Sonic Hedgehog/GLI₁ Signaling Pathway Inhibition Restricts Cell Migration and Invasion in Human Gliomas*. *Neurological Research*. 2010;32 (9): 975-80.
- WANG R, CHADALAVADA K, WILSHIRE J et al. *Glioblastoma Stem-like Cells Give Rise to Tumour Endothelium*. *Nature*. 2010;468 (7325): 829-33.
- WANG SI, PUC J, LI J et al. *Somatic Mutations of PTEN in Glioblastoma Multiforme*. *Cancer Research*. 1997;57 (19): 4183-86.
- WANG Y et ARMSTRING SA. *Cancer: Inappropriate Expression of Stem Cell Programs?* *Cell Stem Cell*. 2008;2 (4): 297-99.
- WATANABE T, NAKAMURA M, KROS JM et al. *Phenotype versus Genotype Correlation in Oligodendrogiomas and Low-Grade Diffuse Astrocytoma*. *Acta Neuropathologica*. 2002;103 (3): 267-75.
- WEI J, BARR J, KONG LY et al. *Glioblastoma Cancer-Initiating Cells Inhibit T-Cell Proliferation and Effector Responses by the Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Pathway*. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2010;9 (1): 67-78.
- WEI KC, HUANG CY, CHEN PY et al. *Evaluation of the Prognostic Value of CD44 in Glioblastoma Multiforme*. *Anticancer Research*. 2010;30 (1): 253-59.
- WEI Y, JIANG Y, ZOU F et al. *Activation of PI3K/Akt Pathway by CD133-p85 Interaction Promotes Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (17): 6829-34.
- WIKSTRAND CJ, REIST CJ, ARCHER GE et al. *The Class III Variant of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFRvIII): Characterization and Utilization as an Immunotherapeutic Target*. *Journal of Neurovirology*. 1998 ;4 (2): 148-58.
- WOODWARD WA, CHEN MS, BEHBOD F et al. *WNT/beta-Catenin Mediates Radiation Resistance of Mouse Mammary Progenitor Cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (2): 618-23.
- WULF GG, WANG RY, KUEHNLE I et al. *A Leukemic Stem Cell with Intrinsic Drug Efflux Capacity in Acute Myeloid Leukemia*. *Blood*. 2001; 98 (4): 1166-73.
- WURTH R, BARBIERI F et FLORIO T. *New Molecules and Old Drugs as Emerging Approaches to Selectively Target Human Glioblastoma Cancer Stem Cells*. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 126586.
- XU Y, STAMENKOVIC I et YU Q. *CD44 Attenuates Activation of the Hippo Signaling Pathway and Is a Prime Therapeutic Target for Glioblastoma*. *Cancer Research* 70 (6): 2455-64.
- YANG HW, MENON LG, BLACK PM et al. *SNAI2/Slug Promotes Growth and Invasion in Human Gliomas*. *BMC Cancer*. 2010;10: 301.

YANG YP, CHANG YL, HUANG PI et al. *Resveratrol Suppresses Tumorigenicity and Enhances Radiosensitivity in Primary Glioblastoma Tumor Initiating Cells by Inhibiting the STAT3 Axis*. *Journal of Cellular Physiology*. 2012; 227 (3): 976-93.

YAN H, PARSONS DW, JIN G et al. *IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas*. *The New England Journal of Medicine*. 2009; 360 (8): 765-73.

YAN M, CALLAHAN CA, BEYER JC et al. *Chronic DLL4 Blockade Induces Vascular Neoplasms*. *Nature*. 2010; 463 (7282): E6-7.

YING H, ZHENG H, SCOTT K et al. *Mig-6 Controls EGFR Trafficking and Suppresses Gliomagenesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107 (15): 6912-17.

YU X, MINTER-DYKHOUSE K, MALUREANU L et al. *Chfr Is Required for Tumor Suppression and Aurora A Regulation*. *Nature Genetics*. 2005; 37 (4): 401-6.

ZHANG M, SONG T, YANG L et al. *Nestin and CD133: Valuable Stem Cell-Specific Markers for Determining Clinical Outcome of Glioma Patients*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*. 2008; 27: 85.

ZHENG H, YING H, YAN H et al. *p53 and Pten Control Neural and Glioma Stem/progenitor Cell Renewal and Differentiation*. *Nature*. 2008; 455 (7216): 1129-33.

ZHENG H, YING H, YAN H et al. *Pten and p53 Converge on c-Myc to Control Differentiation, Self-Renewal, and Transformation of Normal and Neoplastic Stem Cells in Glioblastoma*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73: 427-37.

ZHENG X, SHEN G, YANG X et al. *Most C6 Cells Are Cancer Stem Cells: Evidence from Clonal and Population Analyses*. *Cancer Research*. 2007; 67 (8): 3691-97.

ZHOU BB, ZHANG H, DAMELIN M et al. *Tumour-Initiating Cells: Challenges and Opportunities for Anticancer Drug Discovery*. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2009; 8 (10): 806-23.

ZHOU S, SCHUETZ JD, BUNTING KD et al. *The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 Is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and Is a Molecular Determinant of the Side-Population Phenotype*. *Nature Medicine*. 2001; 7 (9): 1028-34.

ZHU TS, COSTELLO MA, TALSMA CE et al. *Endothelial Cells Create a Stem Cell Niche in Glioblastoma by Providing NOTCH Ligands That Nurture Self-Renewal of Cancer Stem-like Cells*. *Cancer Research*. 2011; 71 (18): 6061-72.

ZOUAOUI KB, DAHER J, VAN ANTWERPEN P. *Exposure of Endothelial Cells to Physiological Levels of Myeloperoxidase-Modified LDL Delays Pericellular Fibrinolysis*. *PLoS ONE* 7 (6) : e38810

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 1^{er} février 2016DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par : Yassine AZIEZ

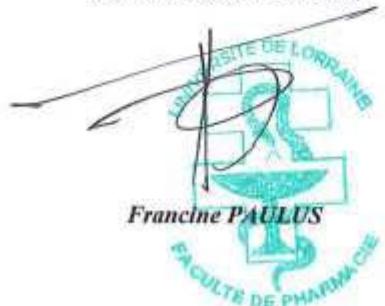
Sujet : CELLULES SOUCHES DU GLIOBLASTOME : CIBLES
THERAPEUTIQUES PROMETTEUSES

Jury :

Président : M. Bertrand RIHN, Professeur
 Directeur : M. Mohamed ZAIOU, Maître de Conférences
 Juges : M. Alain LE FAOU, Professeur
 Mme Véronique DECOT-MAILLERT, Maître de Conférences
 M. Joël COULON, Maître de Conférences

Vu et approuvé,

Nancy, le 8 01. 2016

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Vu,

Nancy, le 04/01/2015

Président du Jury

Professeur B. RIHN
Université de Lorraine

M. Bertrand RIHN

Directeur de Thèse

M. Mohamed ZAIOU

Vu,

Nancy, le

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 9048.

N° d'identification :

TITRE

CELLULES SOUCHES DU GLIOBLASTOME : CIBLES THERAPEUTIQUES PROMETTEUSES

Thèse soutenue le lundi 1^{er} février 2016 à 16h30

Par Monsieur Yassine AZIEZ

RESUME :

Le fort taux de rechute dans les glioblastomes après une chirurgie, une radiothérapie et une chimiothérapie montre les limites des traitements standards. Durant ces dernières années, l'hypothèse de l'existence d'un contingent cellulaire « cellules souches » qui jouerait un rôle central dans la résistance tumorale est de plus en plus acceptée. Cette population de cellules souches cancéreuses de glioblastomes utilise un certain nombre de facteurs pour favoriser le développement tumoral (niche cellulaire, voies de signalisation, facteurs de transcription...). Cependant, cette théorie rencontre des freins notamment dans la spécificité des marqueurs utilisés pour identifier ces cellules, les procédures expérimentales et le modèle étudié. Ainsi, il devient nécessaire de mieux comprendre les cellules souches cancéreuses des glioblastomes pour mieux cibler les traitements. De ce fait, les prochaines années seront fondamentales pour développer de nouvelles stratégies de ciblage de ces cellules souches cancéreuses afin de contrer le glioblastome.

MOTS CLES : CANCER, CELLULES SOUCHES, MARQUEURS, NICHE VASCULAIRE,

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mohamed Zaiou	Centre de Recherche en Automatique de Nancy	<input type="checkbox"/> Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème

Thèmes 1 – Sciences fondamentales 2 – Hygiène/Environnement
 3 – Médicament 4 – Alimentation – Nutrition
 5 - Biologie 6 – Pratique professionnelle