

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Thématique 524 Biologie, Santé, « BioSanté »

FACULTE de Médecine et de Pharmacie

Equipe de recherche EA3842, Homéostasie Cellulaire et Pathologies

Année : 2011

Thèse N° [-----]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire, oncologie

présentée et soutenue publiquement par

Mathilde CHERAY

le 7 Décembre 2011

**Définition d'une glyco-signature spécifique des cellules
souches tumorales de glioblastome et développement
d'outils pour la caractérisation cellulaire**

Thèse dirigée par le Dr. Fabrice LALLOUE et le Dr. Serge BATTU

JURY :

M. Jean-Marc MULLER	Professeur, Univ. Poitiers	Président
M. Philippe DELANNOY	Professeur, Univ. Lille	Rapporteur
M. François VALLETTE	D.R., Inserm, Nantes	Rapporteur
M. Serge BATTU	M.C.U., Univ. Limoges	Examineur
M. Fabrice LALLOUE	M.C.U., Univ. Limoges	Examineur
M. François GALLET	M.C.U., Univ. Limoges	Invité
Mme Marie-Odile JAUBERTEAU	Professeur, Univ. Limoges	Invitée

*A Arnaud,
J'ai toujours pensé que tu serais là le jour « J »,
La vie en a décidé autrement,
Tu me manques...*

Remerciements

A Madame Le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier au Laboratoire d'Immunologie

Faculté de Médecine, Université de Limoges

Directrice de l'EA 3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies.

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir intégrée dans votre laboratoire. Je vous remercie par ailleurs d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Soyez assurée, Madame, de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur Le Professeur Jean-Marc MULLER

Professeur des Universités à l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires

Faculté des Sciences et Techniques, Université de Poitiers

UMR 6187

Recevez, Monsieur, mes plus sincères remerciements pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur Le Professeur Philippe DELANNOY

Directeur de l'équipe Régulation de la glycosylation terminale

Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle

Université des Sciences et Techniques de Lille

UMR CNRS 8576

Veillez recevoir, Monsieur, mes remerciements les plus respectueux pour m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être le rapporteur. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en ayant accepté de faire partie de ce jury et je tiens à vous exprimer l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Le Docteur François VALLETTE

Directeur de Recherche Inserm, Directeur de l'équipe 9 de l'UMR-S 892
Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers
UMR-S 892

Je suis très touchée de l'honneur que tu me fais en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je garde un très bon souvenir de mon passage dans ton équipe ce qui m'a motivée pour poursuivre mes études par une thèse. Je te remercie pour ta présence dans ce jury et sois assuré de tout mon respect et de ma plus profonde gratitude.

A Monsieur Le Docteur François GALLET

Maître de Conférences des Universités
Unité de Génétique Moléculaire Animale
Faculté des Sciences et Techniques, Université de Limoges
INRA UMR 1061

Je suis très sensible à l'honneur que tu me fais en acceptant de participer à ce jury de thèse. Sache que même si nos réunions de travail ont souvent duré plus longtemps que prévu, j'apprécie toujours de discuter et d'échanger avec toi. Et puis d'ailleurs tes petites touches d'humour ont permis de ne pas voir le temps passer ! Sois assuré de mon plus profond respect.

Enfin à mes deux directeurs de thèse préférés... :

A Monsieur Le Docteur Serge BATTU

Maître de Conférences des Universités
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges
EA 3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies
Directeur de thèse.

Et oui déjà trois ans... Que le temps passe vite ! En même temps lorsque l'on apprécie ce que l'on fait ainsi que les gens avec qui l'on travaille on ne voit pas le temps passer, et bien sur tu fais partie des personnes qui m'ont permis d'apprécier ces trois années. Je te remercie d'avoir voulu plus qu'une relation entre simples collègues, j'apprécie fortement cette relation amicale que l'on a établi. Je te remercie aussi d'avoir été là dans les moments difficiles en espérant t'avoir soutenue du mieux possible de mon côté aussi. J'espère que pour toi ces trois années n'ont pas été trop dures, surtout pour supporter mon petit caractère... En même temps le tien n'est pas mal non plus! Merci pour ces moments de

sérieux à partager tes connaissances scientifiques et aussi pour tes moments de délire qui m'ont mené à éponger plus d'une fois le sol du labo... ! Merci pour tout.

A Monsieur Le Docteur Fabrice LALLOUE

Maître de Conférences des Universités

Faculté de Médecine, Université de Limoges

EA 3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies

Directeur de thèse.

Fabrice, moi qui ne suis pas originaire du Limousin, j'ai pu grâce à toi découvrir un vrai Creusois ! Je te remercie d'avoir codirigé cette thèse et d'avoir eu confiance en moi durant ces trois années. Ton emploi du temps plus que chargé m'a permis d'acquérir une certaine autonomie mais tu as toujours su trouver un peu de temps (je ne sais pas vraiment comment d'ailleurs !) pour partager des discussions scientifiques toujours très intéressantes. Je suis admirative de ton côté humain et de ton grand cœur. J'ai su apprécier aussi tes moments d'égarement à me raconter des anecdotes toujours plus farfelues les unes que les autres ou encore tes imitations réalisées à la perfection ! Sois assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

Je remercie aussi tout particulièrement le Conseil Régional du Limousin ainsi que la Ligue contre le cancer pour leurs soutiens financiers au cours de ces trois années de thèse.

Merci à Monsieur le Docteur Ricardo Sanchez Prieto de m'avoir accueillie au sein de son équipe (Lab. Of Molecular Oncology, University of Castilla La Mancha, Albacete) pour un stage de deux mois en Espagne. Merci à Laura pour son accueil et son aide lors de ce séjour à Albacete. Enfin merci au programme ELIARE NETWORK SUDOE pour son soutien financier m'ayant permis d'effectuer ce stage.

Les remerciements suivants sont pour toute l'équipe ainsi que les personnes de la faculté de Médecine et de Pharmacie de Limoges.

Tout d'abord merci aux étudiants devenus docteurs ou en voie de l'être : Elodie, Thomas, Hussein, Sofiane, Pierre, Soha, Lydie, Kim et aux moins étudiants : Aurélie P, Aurélie L et Philippe.

Un merci tout particulier à Carole qui a le cœur sur la main et bien plus encore, à quand le prochain câlin ? Merci à Romain maître des œufs et fan invétéré d'Hello Kitty (c'est bizarre tout ça...) tes blagues pourries ont quand même du succès. Merci à mon petit Rara des bois (tu te reconnaitras !) ton humour à toute épreuve nous aurait manqué si tu n'avais pas migré dans le couloir d'à côté !

Merci à Marie-Claude, repartie dans sa Guyane natale. C'est marrant comme deux personnalités opposées peuvent s'apprécier ! Je pense que les sucreries y ont beaucoup joué ! Grâce à toi j'ai pu découvrir Paul, BB et la Louisiane et faire aussi des overdoses de fraises Tagada !

Merci à Gaëlle qui à mon arrivée m'a accueillie à bras ouverts et m'a permis de découvrir une femme au grand cœur (et qui a une bonne descente aussi ! moi je dis respect madame !). Merci aussi à Steph et je t'assure, je n'ai pas le vertige...

Merci à ma collègue de bureau préférée ! Barbara, tu le sais, tu es bien plus qu'une simple collègue... Nos débuts imposés lors d'un séjour à Berlin ont permis de mettre en place une grande amitié. Merci pour ton soutien dans les moments difficiles, pour tes coups de gueule (qui sont de plus en plus rares) et pour m'avoir supportée lors de mes moments grognons ! Je te souhaite que du bonheur et je croise les doigts pour ton avenir...

Merci aux statutaires qui malgré des emplois du temps chargés participent au bon fonctionnement de l'équipe.

Merci à Steph' et Pierre pour nos pauses café toujours enrichissantes ... Flo pour ton grand cœur et tes difficultés à former une phrase en entier !

Merci à Ludo et Linda pour nos séances footing (d'ailleurs va falloir s'y remettre), nos soirées à râler pour nous défouler et nos matchs de foot de haut niveau !! Le foot se jouant à 10 je remercie donc aussi David, Lolo, Nico, Auré, Anne, Mika, j'espère que vos chevilles n'ont pas trop souffert, je ne maîtrise pas encore toutes les subtilités de ce sport !

Enfin, merci à mes amis et à ma famille.

Ma petite Camille (ou ma petite fleur du Sahara !) merci pour ton soutien, ta compréhension dans les moments où je ne donne plus de nouvelles et ton amitié à toute épreuve... J'espère pouvoir t'accorder plus de temps à l'avenir car la vie est trop courte...

Un grand merci aussi à Cyril, Cécile, Milou, Aude, Luc, Jérémy et Carole.

Merci à mes parents, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, merci pour votre soutien, merci d'avoir supporté ces longues, très longues années d'étude et merci pour votre amour... Merci aussi à ma sœur Emilie et son mari Fred (qui comprendras tout à fait ce cap !) et Romane, et à mon frère Julien, sa compagne Aurélie ainsi qu'à Léna et Léo. Même si nos moments tous ensemble sont de plus en plus rares, je vous remercie de vous intéresser à ce que je fais sans en comprendre un mot !

Le meilleur pour la fin...

Youness, mon compagnon de galère, j'avais un peu d'appréhension à me dire que l'on allait rédiger nos thèses en même temps, et puis finalement le plus dur a été fait sans encombre ! Tu as été présent dans les moments de tristesse, tu m'as supportée dans mes moments de coups de gueules et surtout tu m'as fait grandir et découvrir que la vie à deux vaut vraiment le coup... Les galères ne sont surement pas toutes derrière nous mais j'espère que l'on continuera à les affronter à deux...

Sommaire

SOMMAIRE	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	14
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	18
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	22
I. GLIOMES	23
A. Introduction	23
B. Classification actuelle des gliomes	27
a. La classification des gliomes selon l'OMS	30
b. La classification des gliomes selon l'hôpital Sainte-Anne	32
C. Anomalies génétiques et moléculaires caractéristiques des gliomes.....	33
1. Perte d'hétérozygotie 1p/19q	35
2. L'EGFR, le PDGF et les récepteurs à tyrosine kinase	35
3. La voie de p53	36
4. La voie de Rb	36
5. Méthylation du promoteur de la MGMT (O6 méthyl-guanine-méthyltransférase)	37
II. GLIOBLASTOMES MULTIFORMES (GBMS)	38
A. Introduction	38
B. Traitements	39
1. Neurochirurgie	40
2. Radiothérapie	40
3. Chimiothérapie.....	41
4. Autres types de traitements : molécules inhibitrices des RTKs et GBMs.....	42
C. Résistance thérapeutique des GBMs	43
III. EXISTENCE DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES DANS LE GLIOBLASTOME.....	45
A. Mise en évidence des cellules souches cancéreuses.....	45
B. Origine des cellules souches cancéreuses de glioblastome	46
1. Les cellules souches neurales à l'origine des CSCs ?	47
2. Les cellules souches cancéreuses découlent des cellules progéniteurs ?	48
3. Les cellules souches cancéreuses : des cellules dédifférenciées ?	49
C. Caractéristiques des Cellules souches cancéreuses des GBMs	50
1. L'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses.....	50
2. Caractère multipotentiel des cellules souches cancéreuses	52
3. Cellules souches cancéreuses et propagation tumorale	53
4. Les cellules souches cancéreuses : des cellules quiescentes ?.....	56

5.	Les cellules souches cancéreuses sont des cellules indifférenciées.....	56
D.	<i>Le rôle des CSCs dans la résistance thérapeutique des GBMs</i>	58
1.	CSCs et résistance à l'irradiation	58
2.	CSCs et résistance à la chimiothérapie.....	61
3.	Les CSCs et leur rôle dans le mécanisme d'angiogenèse	64
IV.	INSTRUMENTATION : DEVELOPPEMENT DE METHODES DE TRI ET DE CARACTERISATION CELLULAIRES.....	67
A.	<i>Analyse des propriétés diélectriques des cellules par l'utilisation de biocapteurs</i>	68
1.	Contexte	69
2.	Développement de biocapteurs adaptés à l'analyse cellulaire.....	70
B.	<i>Tri cellulaire par la technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (SdFFF)</i>	73
1.	Introduction	73
2.	Principe et fonctionnement de la SdFFF	74
V.	ROLE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DANS LES GLIOBLASTOMES	80
A.	<i>Les modifications post-traductionnelles dans les différents types cancers</i>	80
a.	La phosphorylation.....	80
b.	L'acétylation et la désacétylation des histones.....	82
c.	La méthylation.....	83
B.	<i>Implication de la glycosylation dans les cancers</i>	85
a.	Mécanisme et définitions.....	85
b.	Biosynthèse des gangliosides.....	88
c.	La N-glycosylation	91
d.	Glycosylation et cancers.....	93
e.	Glycosylation et GBMs	97
	• Une nouvelle approche de la classification des tumeurs cérébrales : la glycosylation	97
	• Glycosylation et caractère invasif des GBMs	98
	• Contrôle de l'expression de CD133 par la glycosylation	99
	BUT DU TRAVAIL DE THESE	102
	MATERIELS ET METHODES	104
I.	CULTURE CELLULAIRE	105
A.	<i>Lignées cellulaires</i>	105
B.	<i>Conditions de culture</i>	105
C.	<i>Culture des cellules en milieu défini</i>	105
D.	<i>Différenciation des neurosphères secondaires</i>	106

II.	ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE PAR TAQMAN LOW DENSITY ARRAY (TLDA).....	107
A.	<i>Extraction d'ARN</i>	107
B.	<i>Rétrotranscription des ARNs</i>	107
C.	<i>qPCR par TLDA</i>	107
III.	ANALYSE PROTÉIQUE	108
A.	<i>Immunocytochimie par immunofluorescence indirecte</i>	108
a.	Principe.....	108
b.	Les contrôles	110
B.	<i>Analyse de l'expression protéique par western blot</i>	110
a.	Préparation des échantillons protéiques	111
b.	Dosage de Bradford.....	111
c.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide	111
d.	Transfert des protéines sur membrane de PVDF	111
e.	Immunodétection des protéines.....	112
IV.	EXTINCTION DE GENES PAR SHRNA	113
A.	<i>Amplification du plasmide porteur de la séquence d'intérêt</i>	114
B.	<i>Transfection des cellules HEK293T</i>	115
C.	<i>Infection lentivirale des cellules U87-MG</i>	116
V.	ÉTUDE DU CARACTERE « SOUCHE » DES CELLULES.....	117
A.	<i>Capacité des cellules à former des sphères : test de clonogénicité en Agar/agarose</i>	117
a.	Préparation du gel d'agar.....	118
b.	Préparation du gel d'agarose	118
B.	<i>Capacité des cellules à former des tumeurs : greffes de cellules sur la membrane choroallantoïdienne d'embryon de poulet (CAM)</i>	119
a.	Principe.....	119
b.	Préparation des œufs.....	119
c.	Préparation des cellules et greffes.....	120
d.	Suivi des greffes.....	120
e.	Analyse immunohistochimique des tumeurs obtenues après greffe sur la CAM	121
VI.	INSTRUMENTATION	121
A.	<i>Analyse cellulaire par l'utilisation de biocapteurs</i>	121
a.	Principe.....	121
b.	Préparation des cellules	122
B.	<i>Tri cellulaire par la technique de couplage flux/force de sédimentation (SdFFF)</i>	123
a.	Principe.....	123

b. Préparation des cellules et tri cellulaire	124
RESULTATS.....	125
I. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GENES DE LA GLYCOSYLATION SELON LE STATUT DE DIFFERENCIATION DE CELLULES DE GBMS.....	126
A. <i>Résumé de l'article 1</i> :	126
B. <i>Conclusion de l'article 1</i> :.....	137
II. ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE GENES DE LA GLYCOSYLATION DANS LE CARACTERE INDIFFERENCIE DES CELLULES DE LA LIGNEE HUMAINE U87-MG.....	139
A. <i>Extinction de gènes par la mise en place de shRNA via l'utilisation de vecteurs lentiviraux</i>	139
a. Mise en place de lignées inactivées et vérification de l'efficacité d'extinction	139
b. Changements phénotypiques survenant dans les lignées modifiées.....	141
B. <i>L'extinction des gènes induit des modifications du phénotype cellulaire</i>	142
a. Analyse de l'expression des principaux marqueurs spécifiques de la lignée U87MG dans les lignées modifiées	142
b. Etude du profil d'éluion des lignées modifiées triées par SdFFF	146
C. <i>Etude de l'effet de l'extinction des gènes de la glycosylation sur le caractère indifférencié ou sur les caractéristiques « souches » des cellules U87-MG</i>	150
a. Etude de la clonogénicité des cellules U87-MG	150
b. Etude du caractère tumorigène des cellules U87-MG	153
c. Effet des inactivations de gènes sur l'angiogenèse tumorale	155
d. Etude de la prolifération cellulaire des tumeurs issues des différentes lignées greffées sur la CAM	160
D. <i>Conclusion</i>	162
III. ÉTUDE DES PROPRIETES DIELECTRIQUES DES CELLULES DE GLIOBLASTOMES PAR LE DEVELOPPEMENT DE BIOCAPTEURS	165
A. <i>Résumé de l'article 2</i> :	165
B. <i>Résumé de l'article 3</i> :	171
C. <i>Conclusion des articles 2 et 3</i> :.....	181
DISCUSSION GENERALE	182
I. LE NIVEAU D'EXPRESSION DE GENES DE LA GLYCOSYLATION EST LIE AU CARACTERE INDIFFERENCIE DES CELLULES DE GLIOBLASTOME	185
II. L'INACTIVATION DES GENES <i>CHI3L1</i> , <i>KLRC3</i> ET <i>PRUNE2</i> MODIFIE LES CARACTERISTIQUES « SOUCHES » DES CELLULES DE LA LIGNEE CELLULAIRE U87-MG.....	188

III. LES BIOCAPTEURS PERMETTENT D’OBTENIR UNE SIGNATURE ELECTROMAGNETIQUE PROPRE A CHAQUE CELLULE ANALYSEE	192
CONCLUSIONS/PERSPECTIVES.....	194
I. LES GENES DE LA GLYCOSYLATION : VERS UNE ETUDE A L’ECHELLE DU PATIENT	195
II. SdFFF ET BIOCAPTEURS, COUPLAGE DE DEUX TECHNIQUES POUR LE DEVELOPPEMENT D’UN OUTIL DE TRI CELLULAIRE EN MICROFLUIDIQUE	196
BIBLIOGRAPHIE	198

Liste des abréviations

A

ABC	ATP Binding Cassette
ABCB1	Autre nom de MDR1 ou de la P-glycoprotéine
ABCG2	Autre nom de la BCRP
ACNU	Autre nom de la Nimustine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALDH1	Adehyde dehydrogenase 1
ARN	Acide Ribonucléique
ATHL1	Acid trehalase-like protein 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated

B

BCNU	1,3-Bis(2-Chloroéthyl)-1-NitrosoUrée, autre nom de la Carmustine
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BIK	Bcl-2 Interacting Killer
BioMEMS	Biological Micro-Electro-Mechanical Systems
BRCA1	Breast Cancer susceptibility gene 1
BSA	Bovine Serum Albumine

C

CAM	Chorio-allantoic membrane
CCNU	Autre nom de la Lomustine
CD133	Cluster of Differentiation 133 (aussi appelé Prominin-1)
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CHI3L1	Chitinase 3 like 1
Chk	Checkpoint kinase
Ct	Cycle Threshold

D

DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
DNET	Tumeur neuro-épithéliale dysembryoplasique

E

ECM	Extracellular Matrix
ED	Embryonic Day
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular Regulated Kinase

F

FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
-------------	------------------------------------

G

GAA	Lysosomal alpha glucosidase
GBM	Glioblastome Multiforme
GD3S	Alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase
GLT25D2	Galactosyltransferase 25 domain containing 2
Gy	Gray

H

HAT	Histone Acetyltransferase
------------	---------------------------

HDAC	Histone Deacetylase
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Horseradish Peroxydase
I	
IFI	Immunocytochimie par immunofluorescence indirecte
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ITSS	Insulin-Transferrin-Sodium Selenite
K	
KLRC3	NKG2-E type II integral membrane protein
L	
LAM	Leucémie Aigue Myéloïde
LB	Luria Broth
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LOH	Loss Of Heterozygosity
M	
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MAP kinase	Mitogen Activated Protein kinase
MDM2	Murine Double Minute 2
MDR	Multidrug Resistance
MGMT	Méthylguanine-méthyltransférase
N	
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
nm	nanomètre
NOD/SCID	Non Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficient
NSC	Neural Stem Cell
O	
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin homologue
PNET	Tumeurs neuro-ectodermiques primitives
PRUNE 2	Protein prune homolog 2
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
R	
RB	Retinoblastoma
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
RQ	Relative Quantification
Rpm	Round per minute

S

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SdFFF	Sedimentation Field Flow Fractionation
shRNA	short hairpin RNA
SP	Side Population
SSEA-1	Stage-Specific Embryonic Antigen-1
ST3GAL5	Lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription protein 3
SVF	Sérum de Veau Foetal
SVZ	Zone Sous-Ventriculaire

T

TACA	Tumor Associated Carbohydrate Antigen
TBS	Tris Buffer Saline
TLDA	Taqman Low Density Array
TMZ	Témozolomide

V

VEGF	Vascular endothelial growth factor
-------------	------------------------------------

W

WHO	World Health Organization
------------	---------------------------

Liste des figures et **tableaux**

Liste des figures

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	22
FIGURE 1 : CAPACITES ACQUISES DANS LES CANCERS.	23
FIGURE 2 : CANCERISATION CELLULAIRE.....	24
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL. 28	28
FIGURE 4 : VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUEES DANS LE DEVELOPPEMENT DES GLIOMES.	34
FIGURE 5 : DISTRIBUTION DES GLIOMES PRIMAIRES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.	38
FIGURE 6 : DEUX MODELES GENERALISTES DE L’HETEROGENEITE DES CANCERS SOLIDES.	44
FIGURE 7 : LES DIFFERENTES HYPOTHESES QUANT A L’ORIGINE DES CSCs ET LA GENERATION DES GBMs.....	47
FIGURE 8 : LA DIVISION ET L’AUTORENOUVELLEMENT DES CELLULES SOUCHES.....	51
FIGURE 9 : LE SYSTEME DES NEUROSPHERES (OU « NEUROSPHERE ASSAY »).	52
FIGURE 10 : LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES SONT MULTIPOTENTES.	53
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CARACTERISTIQUES DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES DE GLIOBLASTOMES.	55
FIGURE 12 : LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES PRESENTENT UNE RESISTANCE A L’IRRADIATION DUE A L’ACTIVATION PREFERENTIELLE DES POINTS DE CONTROLE DES DOMMAGES A L’ADN.	60
FIGURE 13 : IDENTIFICATION DE LA « SIDE POPULATION » A PARTIR D’UNE LIGNEE CELLULAIRE DE GLIOBLASTOME. 62	62
FIGURE 14 : LES NICHES DE CELLULES SOUCHES NEURALES NORMALES ET CANCEREUSES.	65
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D’UN BIOCAPTEUR.....	71
FIGURE 16 : LE BIOCAPTEUR ET SA RESONNANCE A VIDE.	72
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D’UN CANAL DE SdFFF.	75
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE D’ELUTION DES CELLULES EN SdFFF.	76
FIGURE 19 : FRACTOGRAMME OBTENU LORS D’UN TRI DE CELLULES U87-MG PAR SdFFF.	77
FIGURE 20 : COMPOSITION DE L’APPAREILLAGE DE SdFFF.....	78
FIGURE 21 : REPRESENTATION DU PROCESSUS DE GLYCOSYLATION.....	86
FIGURE 22 : PRINCIPALES CLASSES DE GLYCOCONJUGUES ET DE GLYCANNES.....	87
FIGURE 23 : VOIES DE BIOSYNTHESE DES GANGLIOSIDES.	90
FIGURE 24 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES CLASSES DE N-GLYCANNES.....	92
FIGURE 25 : LA GLYCOSYLATION DEFINIT LA MALIGNITE (TUMEURS AU PHENOTYPE INVASIF ET METASTATIQUE).....	94
FIGURE 26 : LES GLYCANNES PARTICIPENT AUX EVENEMENTS PATHOPHYSIOLOGIQUES DURANT LA PROGRESSION TUMORALE.....	95

FIGURE 27 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PROTEINE TRANSMEMBRANAIRE CD133 ET DE SES SITES DE N-GLYCOSYLATION.	100
FIGURE 28 : REPRESENTATION DE LA TOPOLOGIE DU CD133 ET DE L'HYPOTHESE CONCERNANT LA FIXATION DES ANTICORPS PERMETTANT DE SUIVRE L'EXPRESSION DE CD133.	101
MATERIELS ET METHODES	104
FIGURE M1 : CARTE DU VECTEUR PLKO.1 UTILISE POUR L'EXTINCTION DE GENES PAR SHRNA.	114
FIGURE M2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF EMPLOYE POUR LE DEVELOPPEMENT DES CEUFS FECONDES.	120
FIGURE M3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES BIOCAPTEURS UTILISES POUR L'ANALYSE DES PROPRIETES DIELECTRIQUE DES CELLULES.	122
FIGURE M4 : REPRESENTATION DE L'APPAREILLAGE COMPOSANT LA MACHINE DE SdFFF.	124
RESULTATS	125
FIGURE R1 : ETUDE DU NIVEAU D'EXPRESSION DES PROTEINES CORRESPONDANT AUX GENES INACTIVES PAR SHRNA.	140
FIGURE R2 : ASPECT MORPHOLOGIQUE DE LA LIGNEE U87-MG MODIFIEE OU NON PAR SHRNA.	141
FIGURE R3 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA B-TUBULINE III DANS LES DIFFERENTES LIGNEES U87.	143
FIGURE R4 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE S100B DANS LES DIFFERENTES LIGNEES U87.	144
FIGURE R5 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA VIMENTINE DANS LES DIFFERENTES LIGNEES U87.	145
FIGURE R6 : ETUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA LIGNEE U87-MG TRIEE PAR SdFFF.	147
FIGURE R7 : FRACTOGRAMMES DE SdFFF PRESENTANT LES DIFFERENTS PROFILS OBTENUS AVEC LES LIGNEES MODIFIEES.	148
FIGURE R8 : CLONOGENICITE DES CELLULES U87-MG CONTROLE ET MODIFIEES PAR SHRNA.	151
FIGURE R9 : ETUDE DU NOMBRE MOYEN DE SPHERES FORMEES ET DE LA DISTRIBUTION DU NOMBRE DE SPHERES EN FONCTION DE LEUR TAILLE OBTENUES PAR TEST DE CLONOGENICITE.	152
FIGURE R10 : GREFFES DES CELLULES U87-MG (MODIFIEES OU NON) SUR LA CAM.	154
FIGURE R11 : ETUDE DE LA VASCULARISATION DES TUMEURS OBTENUES PAR GREFFE SUR LA CAM.	157
FIGURE R12 : ETUDE DE LA VASCULARISATION AU POURTOUR DE LA TUMEUR FORMEE PAR GREFFE DE CELLULES U87 SH <i>CHI3L1</i>	159
FIGURE R13 : VARIATION DU TAUX DE PROLIFERATION DES CELLULES AU SEIN DES TUMEURS EN FONCTION DE LA NATURE DES CELLULES GREFFEES SUR LA CAM.	161

Liste des tableaux

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	22
TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DES TUMEURS CEREBRALES.	26
TABLEAU 2 : CLASSIFICATION DES SOUS-TYPES DE GLIOMES SELON LEUR TYPE CELLULAIRE D'ORIGINE.	30
TABLEAU 3 : CLASSIFICATION DES GLIOMES SELON L'OMS.	31
MATERIELS ET METHODES	104
TABLEAU M1 : COMPOSITION DU MILIEU DEFINI.....	106
TABLEAU M2 : LISTE DES ANTICORPS UTILISES EN IMMUNOCYTOCHIMIE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.	109
TABLEAU M3 : LISTE DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES EN IMMUNOCYTOCHIMIE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.....	110
TABLEAU M4 : ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT.	112
TABLEAU M5 : ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT.	113

Introduction

bibliographique

I. Gliomes

A. Introduction

Le cancer est l'une des causes majeures de mortalité dans le monde, il représente d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) environ 13 % de la mortalité mondiale. Le cancer se définit comme une tumeur maligne caractérisée par une prolifération anarchique des cellules ou d'un tissu concernant l'ensemble des organes. Cette prolifération anarchique est la conséquence d'une accumulation progressive d'altérations de gènes impliqués dans différents processus (contrôle du cycle cellulaire, apoptose, réponse à des facteurs de croissance, différenciation cellulaire, réparation de l'ADN...) qui sont représentées figure 1 (1).

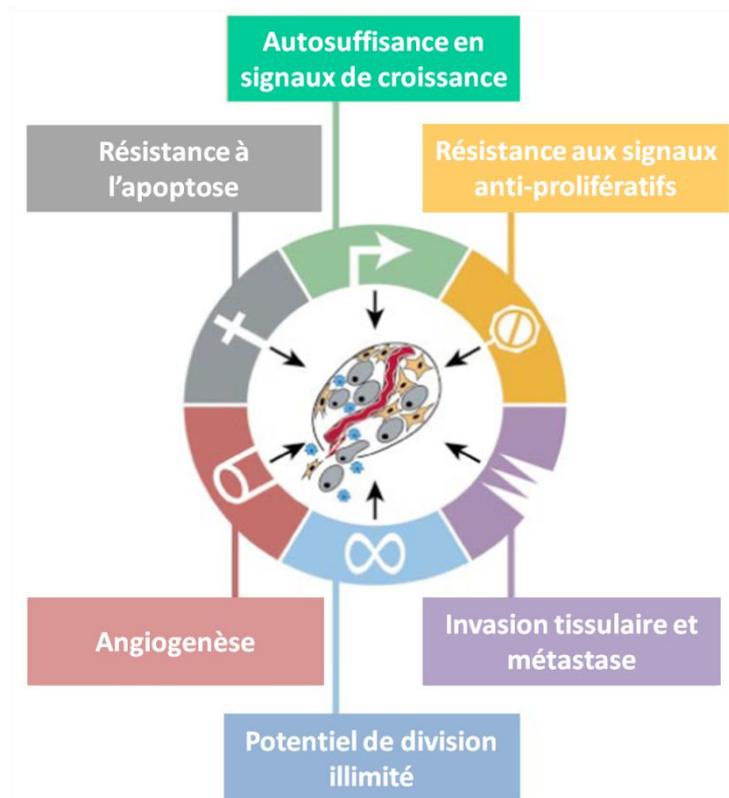


Figure 1 : Capacités acquises dans les cancers. La plupart sinon tous les cancers ont acquis le même ensemble de capacités fonctionnelles au cours de leur développement, mais grâce à des stratégies mécanistiques différentes. Adapté de Hanahan and Weinberg, "The hallmarks of cancer", 2000, Cell (1).

Ces altérations induites par des stress environnementaux (rayons ultra violets, stress oxydatif, etc.) ou génétiques sont donc à l'origine de modifications au sein de la cellule. L'accumulation de ces modifications et l'incapacité de la cellule à les réparer entraîne l'apparition de tumeurs. Ces mécanismes de cancérisation sont représentés figure 2.

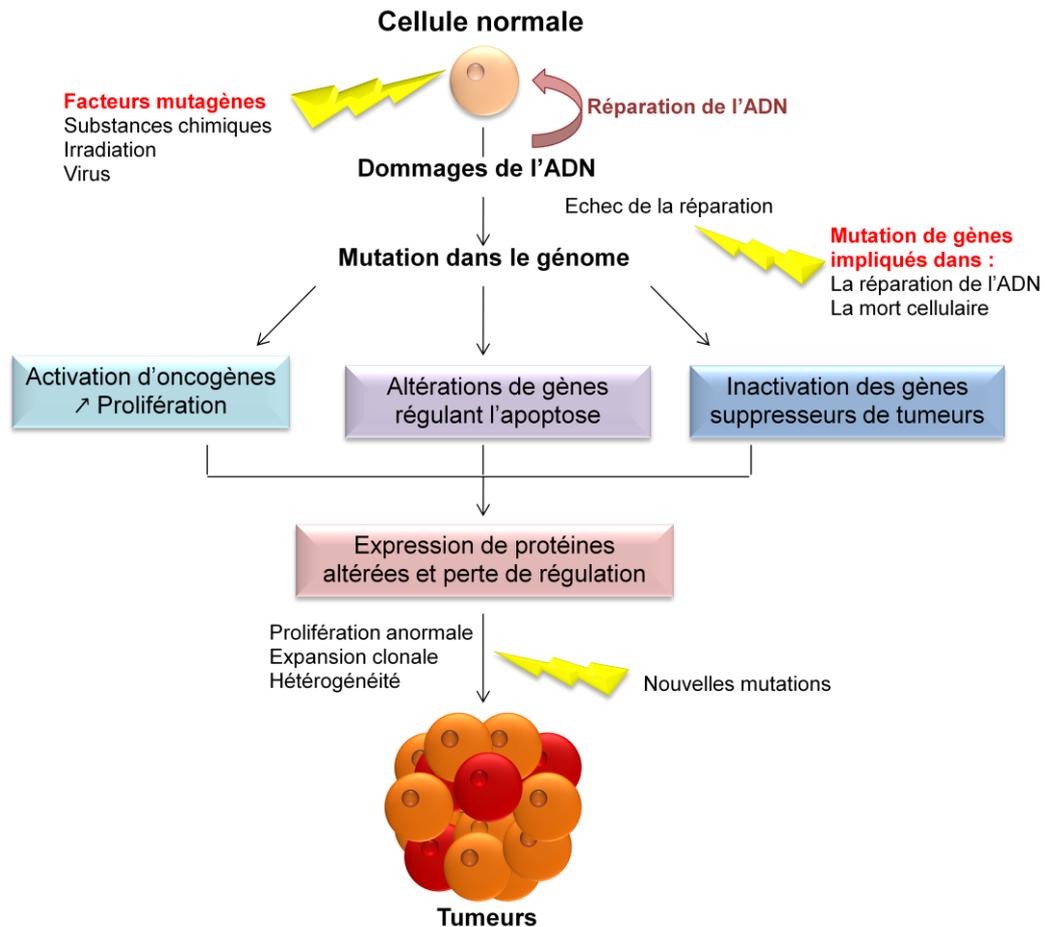


Figure 2 : Cancérisation cellulaire. Une cellule normale de l'organisme peut être l'objet d'attaques d'agents mutagènes de l'environnement. Ces agents induisent des dommages de l'ADN qui seront ou non réparés. Si des mutations interviennent au niveau de gènes régulant le cycle cellulaire et l'apoptose, la cellule ne pourra pas réparer ses dommages ni être éliminée. Ces mutations seront la source de dérégulations de processus tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Les conséquences seront l'acquisition d'un potentiel de réplication illimitée, non contrôlée et conduiront à la formation de tumeurs.

Si le développement des thérapies anticancéreuses a permis l'amélioration des traitements d'une partie considérable des cancers, certaines formes de tumeurs demeurent encore d'un pronostic très pessimiste.

Selon l'OMS, les tumeurs cérébrales représentent moins de 2% des cancers. Cependant, ces cancers sont parmi les plus dramatiques, en raison des fonctions et de la fragilité du tissu cérébral, ainsi que de la résistance de ces cancers aux différentes thérapies. En effet, si l'incidence des tumeurs cérébrales primitives n'est pas très élevée, de l'ordre de 10 à 15 cas / 100 000 personnes / an, ces tumeurs et plus particulièrement les gliomes de haut grade ont un pourcentage de survie à 5 ans de 2%.

Les tumeurs primitives du système nerveux central correspondent à un ensemble de tumeurs hétérogènes qui ont pour lieu d'origine et de développement le cerveau et représentent 2% des cancers. Ces tumeurs primitives sont beaucoup moins fréquentes que les tumeurs secondaires (25 à 30%) qui se développent au sein d'un autre organe et migrent vers le cerveau. Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés aux glioblastomes multiformes qui sont une forme de tumeurs cérébrales se développant principalement chez l'adulte. Les tumeurs cérébrales de l'enfant, bien que non négligeables de par leur fréquence, représentent 20% des cancers et viennent au second rang des cancers pédiatriques après les leucémies (30% des cancers).

L'incidence des tumeurs intracrâniennes primitives de l'adulte est d'environ 10/100.000 habitants / an. Les gliomes représentent 30 à 40% de la totalité des tumeurs cérébrales et sont les plus fréquentes après les méningiomes. Le tableau 1 présente les différents types de tumeurs cérébrales.

<p style="text-align: center;"><u>Gliomes</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs astrocytaires : <ul style="list-style-type: none"> ○ Astrocytome pilocytique (grade I) ○ Astrocytome diffus (grade II) ○ Astrocytome anaplasique (grade III) ○ Glioblastome (grade IV) • Tumeurs oligodendrogiales : <ul style="list-style-type: none"> ○ Oligodendrogliome (grade II) ○ Oligodendrogliome anaplasique (grade III) • Gliomes mixtes : <ul style="list-style-type: none"> ○ Oligo-astrocytomes (grade II et III) 	<p style="text-align: center;"><u>Tumeurs méningées primitives</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Méningiome <hr/> <p style="text-align: center;"><u>Lymphome primitif du système nerveux central</u></p> <hr/> <p style="text-align: center;"><u>Tumeurs de la région sellaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adénome et carcinome hypophysaire • Craniopharyngiome
<p style="text-align: center;"><u>Autres tumeurs</u></p> <ol style="list-style-type: none"> a. Tumeurs épendymaires b. Tumeurs neuronales et glioneuronales : <ul style="list-style-type: none"> ○ Gangliocytome, gangliogliome ○ Tumeur neuro-épithéliale dysembryoplasique (DNET) c. Tumeurs pinéales d. Tumeurs embryonnaires : <ul style="list-style-type: none"> ○ Médulloblastome ○ Tumeurs neuro-ectodermiques primitives (PNET) 	<p style="text-align: center;"><u>Métastases intracrâniennes</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cérébrales • Durales • Méningées

Tableau 1 : Classification des tumeurs cérébrales.

D'après Louis et al., « The 2007 WHO Classification of tumours of the central nervous system », 2007, (2).

Selon leur étiologie, seulement 1 à 5% des gliomes seraient héréditaires (2). La plus grande majorité des gliomes sont sporadiques et leur cause est inconnue dans la plupart des cas. Les seuls facteurs de risque seraient les radiations ionisantes (2). Par ailleurs, certaines études récentes suggèrent qu'il existerait un lien entre développement de gliomes et utilisation du téléphone portable (3; 4).

L'origine même des gliomes reste difficile à établir en raison de l'hétérogénéité cellulaire de ces derniers. Ce constat explique pour partie la difficulté de prise en charge de ce type de tumeurs ainsi que l'absence de diagnostic précoce. L'absence de critères fiables pour identifier les différents sous-types de tumeurs gliales rend complexe le diagnostic et la

prise en charge thérapeutique, conduisant très souvent à l'échec des traitements chimio-et radio-thérapeutiques. Afin d'améliorer ces différents points, il est nécessaire de développer la classification histologique des gliomes et de l'étendre à une classification histo-moléculaire (5; 6).

B. Classification actuelle des gliomes

Le système nerveux central est composé de deux grands groupes cellulaires : les neurones et les cellules gliales. Les gliomes sont des tumeurs touchant principalement les cellules de la glie ou cellules gliales. Ces dernières possèdent des fonctions très variées dans le système nerveux central (SNC) allant du maintien de l'homéostasie cellulaire à la protection du tissu nerveux. Les deux types de cellules gliales représentées dans le SNC sont la macroglie composée par les astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes et la microglie constituée de macrophages. Les cellules à l'origine des gliomes dériveraient de la macro-glie (Figure 3).

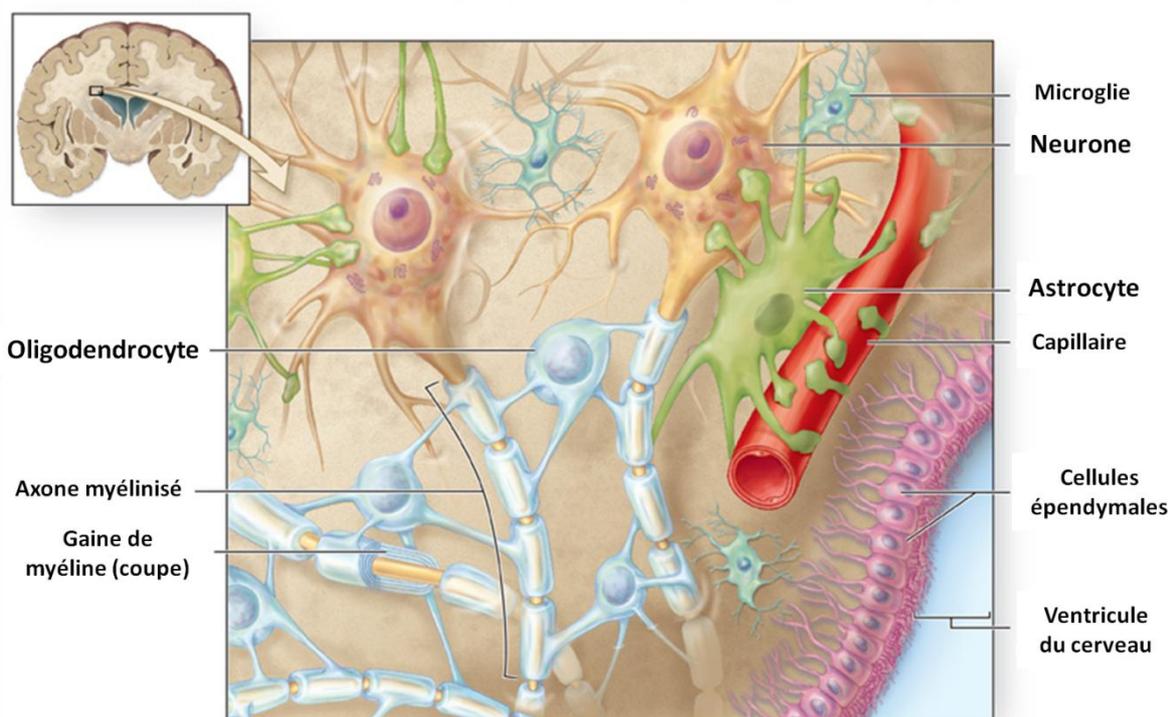


Figure 3 : Représentation schématique des différents types cellulaires du système nerveux central. La glie est constituée de 2 grandes parties : la microglie et la macroglie. Les différents types cellulaires de la glie interagissent avec les neurones et les vaisseaux sanguins environnants. Les oligodendrocytes produisent la gaine de myéline afin d'accroître la vitesse de propagation de l'influx nerveux le long de l'axone. Les astrocytes entourent les vaisseaux sanguins et les synapses. La microglie protège le cerveau des dommages et infections.

Les astrocytes sont de taille inférieure aux neurones. Ils possèdent une forme étoilée et des extrémités présentant un prolongement nommé pied astrocytaire qui leur permet d'établir des interactions avec leur environnement. Il existe deux grands types d'astrocytes : les astrocytes de type 1 établissent des contacts avec les capillaires sanguins et participent ainsi à la formation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les astrocytes de type 2 entourent les neurones et la fente synaptique pour permettre la recapture des neurotransmetteurs contrôlant ainsi l'intensité de la transmission synaptique. Ils garantissent le maintien de l'équilibre électrolytique du neurone, délimitant hermétiquement les fentes synaptiques, prévenant ainsi la propagation des neuromédiateurs. Enfin, les astrocytes assurent le soutien métabolique des neurones, leur apportant les nutriments essentiels (glucose et oxygène) et évacuant leurs déchets métaboliques.

Les oligodendrocytes sont de taille plus réduite et présentent moins de prolongements. Ces cellules jouent un rôle primordial dans la conduction du signal

électrique le long de l'axone neuronal puisqu'elles forment la gaine de myéline à leur surface et les nœuds de Ranvier, responsables de l'accélération du message nerveux. Elles sont l'équivalent des cellules de Schwann du système nerveux périphérique.

Les épendymocytes sont des cellules ciliées cuboïdes qui délimitent les cavités du système ventriculaire cérébral et spinal en formant des *epithelia* simples. Les cellules épendymaires spécialisées qui fabriquent le liquide céphalo-rachidien (LCR) sont organisées en structures appelées plexus choroïde. Ces cellules sont liées entre elles, par des jonctions qui laissent passer le LCR entre les ventricules et le parenchyme cérébral, qu'une simple lame basale sépare de cette couche épendymocytaire. Les battements de leurs cils participeraient à la circulation du LCR dans les différents ventricules et le canal de l'épendyme.

Les gliomes se divisent en sous-catégories tumorales correspondant à l'un des types cellulaires dont ils découlent. En effet, les astrocytomes sont des lésions qui touchent principalement les astrocytes, les oligodendrogliomes dérivent des cellules qui produisent les gaines des fibres nerveuses et les épendymomes ont pour origine les cellules du revêtement des ventricules qui contiennent le liquide céphalo-rachidien. Ces différents types tumoraux et leurs sous-groupes respectifs sont regroupés dans le tableau 2.

Tumeurs astrocytaires	Tumeurs oligodendrogiales
Astrocytome pilocytique <ul style="list-style-type: none"> • Astrocytome pilomixoïde 	Oligodendrogliome Oligodendrogliome anaplasique
Astrocytome subépendymal à cellules géantes	Tumeurs oligoastrocytaires Oligoastrocytome
Xanthoastrocytome pléomorphe	Oligoastrocytome anaplasique
Astrocytome diffus <ul style="list-style-type: none"> • Astrocytome fibrillaire • Astrocytome gémistocytaire • Astrocytome protoplasmique 	Tumeurs épendymaires Subépendymome
Astrocytome anaplasique	Ependymome myxopapillaire
Glioblastome <ul style="list-style-type: none"> • Glioblastome à cellules géantes • Gliosarcome 	Ependymome <ul style="list-style-type: none"> • Cellulaire • Papillaire • Cellule claire • Tanycytaire
Gliomatose cérébrale	Ependymome anaplasique

Tableau 2 : Classification des sous-types de gliomes selon leur type cellulaire d'origine.
Adapté de Louis et al., « The 2007 WHO Classification of tumours of the central nervous system », 2007, (2).

Les différents types de gliomes sont différenciables les uns des autres selon leurs caractères cellulaires et tissulaires. Cependant, il existe un réel problème concernant la classification des différents grades au sein d'une même classe de tumeurs ce qui rend plus difficile la prise en charge thérapeutique du patient. Il existe actuellement deux types de classifications des tumeurs cérébrales.

a. La classification des gliomes selon l'OMS

La classification OMS a pour but d'utiliser une référence unique concernant les différentes tumeurs cérébrales afin d'adopter une démarche thérapeutique la plus adaptée pour chaque type tumoral. Afin d'établir une classification et une graduation des tumeurs humaines, il a été créé en 1979 par Zülch une classification histologique des tumeurs du système nerveux central (7). Cette première classification a ensuite été réadaptée en fonction de l'apparition de nouvelles technologies permettant une étude plus précise de

chaque tissu tumoral. En effet, Kleihues et collaborateurs en 1993 ont apporté l'utilisation de l'immunohistochimie afin d'établir un diagnostic concernant la pathologie (8). Par la suite, il a été ajouté à la classification l'utilisation de profils génétiques afin de définir plus spécifiquement les sous-types tumoraux ainsi que des détails concernant l'épidémiologie, les signes cliniques, le pronostic ainsi que les facteurs prédictifs (9). La classification OMS divise les gliomes en quatre sous-groupes de malignité croissante du grade I au grade IV (tableau 3).

Grade	Astrocytome	Oligodendrogliome	Gliome mixte
I	Astrocytome pilocytique		
II	Astrocytome	Oligodendrogliome	Oligoastrocytome
III	Astrocytome anaplasique	Oligodendrogliome anaplasique	Oligoastrocytome anaplasique
IV	Glioblastome		

Tableau 3 : Classification des gliomes selon l'OMS.

Le grade I correspond à des lésions bénignes, peu prolifératives, qui peuvent être soignées par résection chirurgicale seule. Le grade II inclut des lésions qui peuvent progresser vers des grades plus élevés, avec une activité mitotique faible et une tendance à l'infiltration. Le traitement des tumeurs de grade II sont la résection chirurgicale ou la biopsie suivies ou non de radiothérapie en fonction de l'évolution de la maladie. Les tumeurs du grade III présentent quant à elles une grande activité mitotique, des anaplasies et un caractère infiltrant important. Pour ce type de tumeurs, une résection chirurgicale est effectuée et un traitement radio-thérapeutique ou chimio-thérapeutique est administré. Enfin, le grade le plus malin (grade IV) regroupe les tumeurs présentant des zones nécrotiques ainsi qu'une forte activité mitotique, associée à une évolution rapide de la maladie et à une angiogenèse importante. Ces tumeurs très agressives sont traitées par une résection chirurgicale associée à un traitement radio-thérapeutique et chimio-thérapeutique (10-13).

La classification de l'OMS mise à jour en 2007 (2) est celle reconnue internationalement mais reste très controversée car se trouve face à un problème de reproductibilité. Cette classification reste imparfaite car elle ne prend pas en compte l'hétérogénéité tumorale. En effet, les tumeurs gliales peuvent être composées de plusieurs grades de malignité au sein d'une même masse tumorale et, de la même manière, une biopsie ne permet pas à elle seule de définir la malignité d'une masse totale. Enfin, cette

classification ne tient pas compte des données cliniques et de l'imagerie. Un second type de classification a été créé afin de palier à ces problèmes.

b. La classification des gliomes selon l'hôpital Sainte-Anne

Contrairement à la classification OMS, la classification selon l'hôpital Sainte-Anne se base sur l'étude de biopsies stéréotaxiques associée aux données du scanner ou de l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Les résultats apportés par l'étude de l'analyse des images IRM permet de voir les signes de nécrose et de néo-vascularisation caractéristiques des gliomes de haut grade (14). Cette classification se porte sur la structure des gliomes qui peuvent être infiltrants, solides purs ou mixtes ainsi que sur le mode de croissance de ces tumeurs (15).

A partir des données cliniques, deux composantes distinctes sont retrouvées dans les gliomes :

- Le tissu tumoral solide n'est formé que de cellules tumorales. Cela s'accompagne d'une micro-angiogenèse qui se caractérise par une prise de contraste à l'imagerie.

- La présence de cellules tumorales isolées où dans ce cas le parenchyme est intact. Il n'y a pas de prise de contraste à l'imagerie ce qui est dû à l'absence d'angiogenèse. Cependant, l'œdème fréquemment présent entraîne l'apparition d'une hypodensité au scanner.

Selon les différents grades tumoraux, les tumeurs ne sont pas composées d'un tissu similaire. Par exemple, les astrocytomes pilocytiques sont composés uniquement de tissu tumoral en opposition avec les glioblastomes qui sont composés de tissu tumoral et de cellules isolées. Enfin, les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes peuvent présenter une structure mixte mais sont en général au début de leur formation composés de cellules isolées.

La classification Sainte-Anne plus souvent utilisée en France divise donc les gliomes en trois sous-groupes (16) :

- **Les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A**, caractérisés par une absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste. Ils possèdent une médiane de survie de 11 ans.

- **Les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B**, caractérisés par une présence d'hyperplasies et/ou de prise de contraste avec une médiane de survie de 3,5 ans.

- **Les glioblastomes**

Cette classification repose en partie sur la présence d'hyperplasie endothéliale. Cette caractéristique correspond à la présence, dans au moins un champ du microscope, de vaisseaux dont les cellules endothéliales possèdent des noyaux qui se touchent caractérisant la micro-angiogenèse. Ce phénomène de micro-angiogenèse est capital dans l'évolution de la tumeur puisqu'il s'agit d'une caractéristique des grades les plus agressifs ou de l'évolution d'une tumeur vers des stades plus malins.

Bien que reconnue internationalement, la classification OMS n'est pas totalement validée puisqu'elle pose des problèmes de reproductibilité. De la même manière la classification Sainte-Anne n'est pas consensuelle. L'objectif actuel est donc d'harmoniser la classification des gliomes et de l'enrichir de l'approche moléculaire afin d'avoir une classification unique indispensable pour améliorer la prise en charge.

Dans notre étude nous ferons référence à la classification OMS car elle est considérée comme la classification de référence et, à ce titre, est majoritairement citée dans les revues et articles scientifiques.

C. Anomalies génétiques et moléculaires caractéristiques des gliomes

Les gliomes sont en général diagnostiqués relativement tardivement. En effet les signes cliniques n'apparaissent en général que lorsque la masse tumorale atteint une taille critique conduisant à la formation d'un œdème cérébral. L'œdème péri-tumoral qui accompagne l'expansion de la masse tumorale aboutit à un syndrome d'hypertension intracrânienne à l'origine de divers symptômes neurologiques : perte somato-sensorielle, cécité, aphasie, mais aussi des céphalées, nausées, vomissements et perte de conscience. Les crises comitiales sont caractéristiques des gliomes de bas grades (13). Malgré l'existence de ces signes cliniques, seulement 7% des patients ayant un glioblastome ont eu des symptômes pendant plus d'un an au moment du diagnostic (13).

Les difficultés diagnostiques rencontrées dans les gliomes peuvent être dues notamment aux modifications biologiques et génétiques qui sont particulièrement nombreuses. En effet, les gliomes possèdent un panel d'altérations génomiques telles que des pertes d'hétérozygotie (dérivé de l'expression anglo-saxonne LOH pour Loss Of Heterozygosity) ou des gains chromosomiques, responsables d'inhibition ou de surexpressions géniques (17) qui sont à l'origine de leur développement et de leurs caractéristiques cliniques. Les avancées technologiques ont permis d'étudier génétiquement de larges panels de tumeurs cérébrales. Les mutations génétiques associées aux tumeurs cérébrales ont ainsi pu être corrélées aux différents stades de malignité des gliomes et faciliter leur diagnostic (Figure 4). Cette signature génomique reposant sur les altérations chromosomiques des gliomes peut donc être corrélée à l'agressivité tumorale mais aussi à la résistance aux traitements chimio ou radio-thérapeutiques actuels.

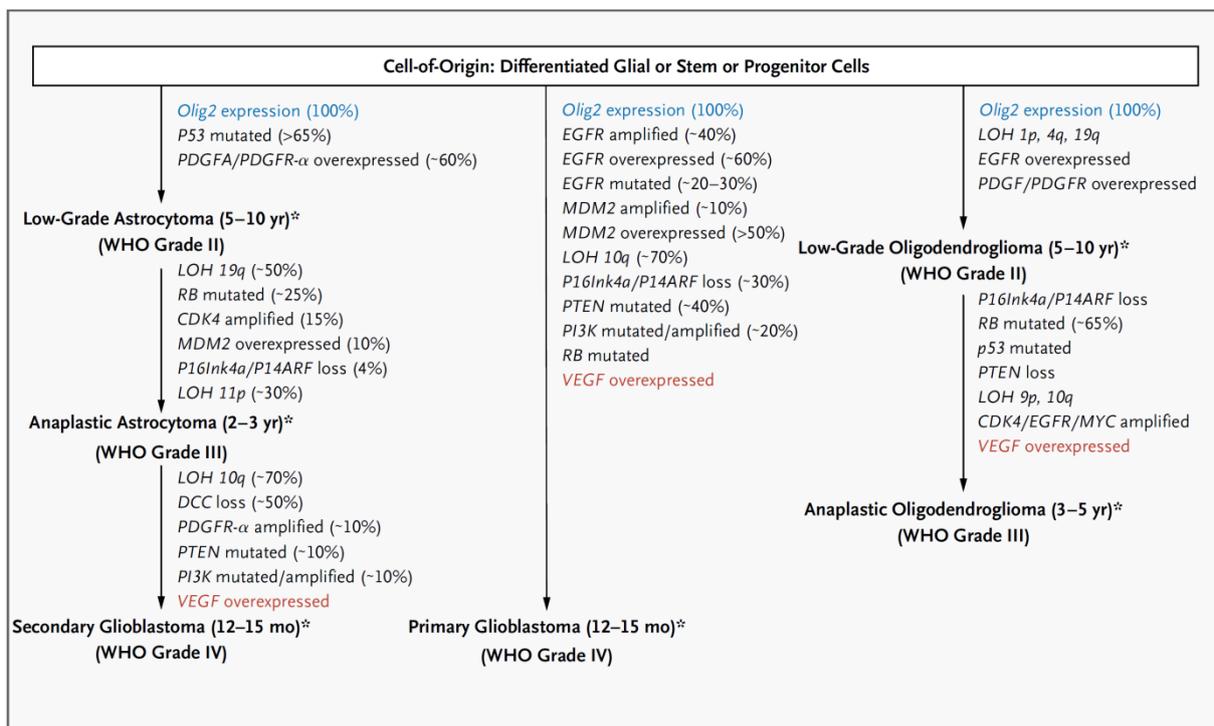


Figure 4 : Voies de signalisations impliquées dans le développement des gliomes. Les altérations chromosomiques et génétiques dans le développement des gliomes sont représentées. Oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) (en bleu) et le Vascular endothelial growth factor (VEGF) (en rouge) sont exprimés dans tous les gliomes de haut grade. Les astérisques représentent les médianes de survie des patients. Un slash (/) représente l'un ou l'autre ou les deux. DCC : Deleted in Colorectal Carcinoma, EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor, LOH : Loss of Heterozygosity, MDM2 : Murine Double Minute 2, PDGF : Platelet Derived Growth Factor, PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor, PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase, PTEN : Phosphatase and Tensin homologue, et RB : Retinoblastoma. D'après Wen et Kesari, « Malignant gliomas in adults », 2008, (18).

1. Perte d'hétérozygotie 1p/19q

Les oligodendrogliomes présentent une particularité cytogénétique : la perte d'hétérozygotie des bras chromosomiques 1p et 19q. Il a été montré que les oligodendrogliomes ayant une perte du bras court du chromosome 1 (1p) sont préférentiellement plus sensibles à la chimiothérapie et à la radiothérapie (19-22). De plus, les patients ayant des tumeurs comprenant une co-délétion 1p avec le bras long du chromosome 19 (19q) présentent une médiane de survie plus importante (22). La co-délétion 1p/19q est retrouvée dans 80 à 90% des oligodendrogliomes de grade II et dans 50 à 70% des oligodendrogliomes de grade III (23). L'étude des tumeurs oligodendrogliales co-délétées 1p/19q démontre que ces dernières sont différentes des autres types de gliomes en ce qui concerne la progression tumorale, le pronostic ainsi que de la réponse aux traitements (23; 24). Leur chimio-sensibilité pourrait donc résulter de l'absence d'expression de certains gènes, dits de résistance, des régions chromosomiques 1p et 19q manquantes. Bien que la région 19q ait été fortement étudiée (25), les gènes mis en jeu n'ont pas encore été identifiés.

2. L'EGFR, le PDGF et les récepteurs à tyrosine kinase

L'activation et la régulation d'un grand nombre de voies de signalisation mitogéniques représentent l'une des caractéristiques communes à l'ensemble des cancers. Dans les gliomes, les voies les plus étudiées sont celles mettant en jeu le PDGF (Platelet Derived Growth Factor Receptor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) qui jouent un rôle primordial dans la gliomagenèse. Le PDGF-R et le récepteur à l'EGF (EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor) sont ainsi surexprimés dans les gliomes de bas grade et dans les glioblastomes multiformes (GBMs). L'implication de ces facteurs de croissance met en évidence le rôle des voies de signalisation activées par ces récepteurs à tyrosine kinase: la cascade des MAP kinase (Mitogen Activated Protein kinase) ainsi que la voie PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3-kinase) (26). Ces voies de signalisation sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la migration et la stimulation des cytokines (27). De plus, 40 à 50% des GBMs présentent une mutation ou une perte du gène suppresseur de tumeurs PTEN (28). Cette mutation due à la perte du bras long du chromosome 10 retrouvée dans 75 à 90% des tumeurs de haut grade

(29) entraîne l'absence d'inhibition de la voie PI3K/AKT. Ces données mettent en évidence l'importance des voies des récepteurs à tyrosine kinase dans la gliomagenèse.

3. La voie de p53

Le gène suppresseur de tumeur *p53* permet l'arrêt de la propagation des cellules ayant un génome instable en entraînant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou en activant la mort cellulaire *via* l'apoptose (30). La perte de *p53* via différentes mutations entraînant l'inhibition de la liaison à l'ADN ou la perte du chromosome 17p est un évènement précoce fréquemment observé dans les gliomes de bas grade, les astrocytomes anaplasiques ainsi que dans les GBMs suggérant que l'inactivation de *p53* intervient précocement dans le processus de gliomagenèse (31). La perte de ce gène suppresseur de tumeur serait associée à une instabilité génomique qui favoriserait l'apparition de mutations génétiques successives responsables d'un accroissement entraînant une progression tumorale.

4. La voie de Rb

Dans les cellules quiescentes, l'hypophosphorylation de Rb (Rétinoblastome) bloque le processus de prolifération via la séquestration du facteur de transcription E2F qui prévient la transactivation de gènes essentiels pour la progression dans le cycle cellulaire (32). Au cours de la progression de la malignité des gliomes (passage du bas grade au grade intermédiaire), il a été mis en évidence des mutations au niveau des acteurs clé de la voie de Rb (33; 34). En effet, l'amplification du gène *CDK4* dans environ 15% des gliomes de haut grade et celle de *CDK6* à une plus faible fréquence entraînent l'inactivation fonctionnelle de Rb (35; 36) et conduisent ainsi à une absence de contrôle du passage G1/S.

5. Méthylation du promoteur de la MGMT (O6 méthyl-guanine-méthyltransférase)

L'épigénétique est définie comme « l'étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN » (37). La régulation de l'expression des gènes par des mécanismes épigénétiques est très finement contrôlée et est déterminante au cours du développement. La méthylation de l'ADN est l'une des modifications épigénétiques ayant différents effets sur le génome des mammifères tels que la répression de la transcription, la modulation de la structure de la chromatine ou l'inactivation du chromosome X (38). Elle peut par exemple directement inhiber la liaison à l'ADN de protéines régulant la transcription en attirant des protéines qui se lient spécifiquement à l'ADN méthylé (39). Des changements épigénétiques majeurs sont associés à l'oncogenèse, notamment des méthylations aberrantes de l'ADN au niveau de dinucléotides CpG ainsi que des modifications post-traductionnelles des extrémités aminotermiales des histones. Dans le cas des gliomes, le mode d'action cytotoxique de certains agents chimio-thérapeutiques tels que le témozolomide (TMZ) dépend de mécanismes épigénétiques. Le TMZ induit en effet un transfert d'adduit O6-méthylguanine à l'ADN responsable d'un appariement aberrant des bases lors de la réplication de l'ADN provoquant une cassure de l'ADN double brin à l'origine de la mort cellulaire. L'enzyme de réparation O6-méthylguanine-méthyltransférase (MGMT) s'oppose directement à l'action des agents alkylants de la classe des imidotétrazines tels que le TMZ, réduisant ainsi l'efficacité de ce type de chimiothérapie (40). L'expression du gène codant pour la MGMT est réprimée suite à la méthylation des îlots CpG situés en 5' de son promoteur. Le statut de méthylation du promoteur du gène de la MGMT ainsi que son niveau d'expression représentent une valeur prédictive de la réponse aux traitements (41; 42). Enfin, le statut de méthylation du gène de la MGMT apparaît comme un marqueur pronostique dans le cas de glioblastome *de novo* du sujet âgé (43).

L'ensemble des anomalies génétiques et chromosomiques survenant dans les gliomes démontre la grande hétérogénéité et complexité de ce groupe de tumeurs cérébrales et permet de prendre conscience des difficultés de prise en charge des gliomes. Néanmoins dans ce groupe très hétérogène, certains sous types se distinguent des autres, c'est le cas notamment du glioblastome multiforme (GBM) qui est considéré comme tumeur hautement agressive avec une médiane de survie à 15 mois. Ce type de tumeur présente

donc un intérêt lorsqu'il s'agit d'étudier les cellules les plus agressives. La poursuite de mon travail s'est donc focalisée sur le GBM.

II. Glioblastomes multiformes (GBMs)

A. Introduction

Les glioblastomes multiformes (GBMs) ou astrocytomes de grade IV sont les gliomes les plus fréquents et les plus agressifs chez l'adulte. Ils représentent plus de 50% des gliomes primitifs (Figure 5) et sont de très mauvais pronostic.

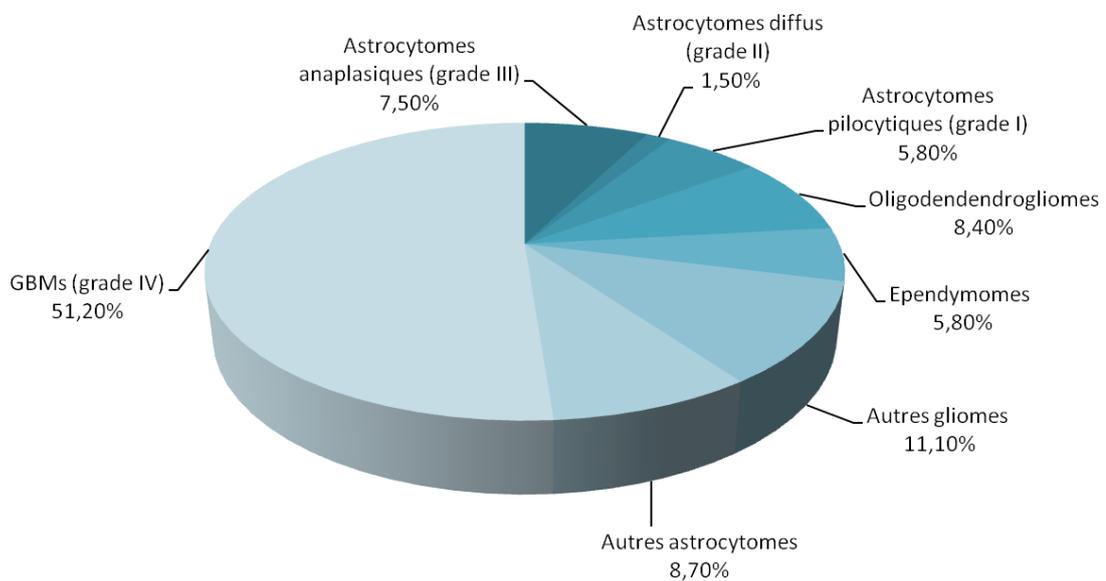


Figure 5 : Distribution des gliomes primaires du système nerveux central. Le graphique permet de visualiser la répartition des gliomes primaires sur un pool de 26630 patients aux Etats-Unis. Adapté de Adamson et al., "Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going", 2009, (44).

Bien que l'incidence des tumeurs malignes de type astrocytomes de grade IV soit relativement faible par rapport à d'autres types de cancers, environ 2000 nouveaux cas/an, leur pronostic est relativement sombre avec une survie médiane de 12 à 15 mois avec un traitement optimal (45). Les symptômes les plus fréquents retrouvés dans le cas des glioblastomes sont une perte progressive de la mémoire, une dégradation de la personnalité ou un déficit neurologique dus à des lésions des lobes frontal et temporal. Les différents types de symptômes dépendent essentiellement de la localisation de la tumeur et le

diagnostic final d'un GBM suspecté lors d'un scanner ou d'une IRM est établi à l'aide d'une biopsie ou d'une craniotomie.

Ces tumeurs peuvent se développer à tout âge mais sont le plus souvent diagnostiquées chez des patients de plus de 50 ans (46). L'incidence des GBMs est plus élevée chez les hommes (1,5 à 2 fois supérieure) que chez les femmes. Cette différence est probablement due aux hormones sexuelles féminines car l'apparition des GBMs augmente à partir de la ménopause suggérant un rôle protecteur des oestrogènes (47).

On distingue deux types de GBMs : primaires et secondaires sur la base de leurs différences biologiques et génétiques.

Les GBMs primaires sont les plus fréquents puisqu'ils représentent plus de 90% des GBMs. Ils apparaissent chez des patients de plus de 50 ans et sont caractérisés par des mutations et amplifications de l'EGFR, une perte d'hétérozygotie du chromosome 10q, une délétion de PTEN et p16 (48). Ce sous-type de GBM se caractérise par une histoire clinique courte (inférieure à 3 mois) et sans connaissance antérieure de gliome de grade inférieur.

Les GBMs secondaires sont beaucoup plus rares et résultent de la transformation anaplasique d'un gliome infiltrant de grade inférieur (grade II ou III) sur plusieurs années. Ce sous type de GBM est retrouvé chez des patients plus jeunes (en moyenne 45 ans) et est de meilleur pronostic que les GBMs primaires (48). Ces tumeurs sont caractérisées par des mutations de p53, une surexpression du PDGFR, des aberrations au niveau des voies de signalisation de p16 et de Rb et enfin une perte d'hétérozygotie du chromosome 10q (48). Par ailleurs, les GBMs secondaires présentent des anomalies du nombre de copies d'ADN ce qui diffère des GBMs primaires.

Les deux sous-types de GBMs sont morphologiquement similaires (malgré leurs différences génétiques) et répondent de la même manière aux thérapies conventionnelles mais peuvent réagir différemment aux thérapies ciblées.

B. Traitements

Le traitement actuel des GBMs nouvellement diagnostiqués repose sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. En effet, la résection chirurgicale complète étant souvent impossible, celle-ci est associée à une radio-chimiothérapie concomitante suivie d'une chimiothérapie adjuvante au Témzolomide (Témodal[®]) selon le protocole de Stupp (45).

1. Neurochirurgie

La chirurgie est la première étape du traitement des GBMs. Lorsqu'elle est possible (zone accessible), elle permet d'obtenir d'une part un diagnostic histologique de la tumeur, et d'autre part, une diminution de la pression intracrânienne induite par le développement de la masse tumorale. La résection complète de la tumeur est généralement recherchée mais reste difficile à effectuer étant donné le caractère infiltrant des GBMs et leur localisation.

Ainsi, des études démontrent l'intérêt d'une exérèse large afin d'améliorer la survie des patients. L'étude de Stupp apporte la preuve que l'étendue de la résection chirurgicale constituerait un facteur pronostique indépendant puisque l'exérèse large entraîne une survie médiane de 18,8 mois contre 13,5 mois pour une exérèse partielle et seulement 9,4 mois en cas de simple biopsie (49). Une chirurgie large est désormais plus souvent effectuée du fait de l'évolution des techniques neurochirurgicales (neuronavigation, résection guidée par la fluorescence...) permettant de diminuer fortement les complications postopératoires faisant suite à une exérèse macroscopiquement complète.

L'exérèse chirurgicale est un facteur clé afin d'améliorer la survie des patients mais n'est souvent pas suffisante pour éradiquer les cellules tumorales présentes dans des zones résiduelles inaccessibles et/ou les récives fréquentes. En deuxième intention, les GBMs sont donc après contrôle très souvent traités par radiothérapie.

2. Radiothérapie

Le traitement par rayonnements ionisants suite à l'exérèse tumorale permet une augmentation de la survie des patients qui passe de 3-4 mois à 7-12 mois (45). Les patients en fonction de leur âge et de leur état général sont pris en charge différemment par radiothérapie. Cependant, le schéma de référence est une radiothérapie conformationnelle à la dose totale de 60 Gy en 6 semaines délivrée 5 jours par semaine à raison de 30-35 fractions de 1,8 à 2 Gy. Malgré ce traitement, la récive au niveau du site original de la tumeur a été observée dans 90% des cas.

Différentes méthodes ont été testées afin d'augmenter la quantité d'irradiation au niveau du site tumoral. Ainsi, la radiothérapie hyper-fractionnée permet de délivrer des doses totales d'irradiation élevées par un traitement à dose réduite qui est effectué plusieurs fois

par jour. Cependant, aucun avantage concernant cette technique n'a été établi par comparaison avec la radiothérapie classique (50). Il en fut de même avec la radiothérapie stéréotaxique qui a pour but de soumettre la zone tumorale à une dose unique entre 15 et 25 Gy. Cette approche stéréotaxique n'améliore pas la qualité de vie des patients et ne diminue pas le risque de récurrence (50).

Les modalités d'irradiation restent toujours discutées en raison notamment du caractère invasif des GBMs qui pose problème quant à l'évaluation du volume de la masse tumorale à traiter et par conséquent de la dose à appliquer.

3. Chimiothérapie

Bien que des études récentes comparant une radiothérapie seule ou une radiothérapie associée à une chimiothérapie à base de nitrosourées (BCNU : Carmustine, ACNU : Nimustine, CCNU : Lomustine) n'aient pas démontré de bénéfice quant à la survie des patients (51; 52), la chimiothérapie joue tout de même un rôle croissant au niveau de la prise en charge thérapeutique des patients atteints de GBMs.

En effet, l'étude clinique de phase III de Stupp (étude EORTC : « European Organisation for Research and Treatment of Cancer » et NCIC : « National Cancer Institute of Canada ») comparant la radiothérapie seule et radiothérapie avec traitement concomitant par Témzolomide (75 mg/m² pendant les 6 semaines de radiothérapie puis 150-200 mg/m² en 6 cycles) montre une augmentation de la survie médiane chez les patients doublement traités (14,6 mois contre 12,1 mois pour les patients traités par radiothérapie seule) (45). De la même manière, le taux de survie à 2 ans était supérieur chez les patients traités par radio et chimiothérapie (26,5% contre 10,4% chez les patients traités avec une radiothérapie seule) (45).

Le Témzolomide (TMZ) est un agent alkylant qui permet le transfert d'un adduit O⁶-méthylguanine sur l'ADN entraînant un appariement aberrant des bases au cours de la réplication de l'ADN méthylé. Cette aberration conduit à une cassure du brin d'ADN puis une mort cellulaire par apoptose. Le TMZ a pour avantage d'être de nature lipophile ce qui lui permet de traverser facilement la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Une autre approche chimiothérapeutique consiste en l'implantation de polymères biodégradables contenant de la carmustine (BCNU) (Gliadel[®], MGI Pharma) au sein du lit de

la tumeur après résection de celle-ci. Ce traitement a pour but de tuer les cellules tumorales résiduelles après résection par libération de carmustine sur plusieurs semaines. Ce traitement a montré une légère augmentation de la médiane de survie des patients traités (de 11,6 mois à 13,9 mois) contre des patients ayant reçu un placebo (53).

4. Autres types de traitements : molécules inhibitrices des RTKs et GBMs

Le développement des thérapies ciblées met en jeu des molécules qui agissent sur des ligands ou des récepteurs de type RTK (récepteur tyrosine Kinase) impliqués dans des voies de signalisation aboutissant à la prolifération cellulaire ou à l'activation de gènes impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Les principaux ligands et récepteurs aux tyrosines kinases sont l'EGFR (54), le PDGFR (55), le VEGF-A et son récepteur le VEGFR (56). D'autres inhibiteurs ont ciblé la voie impliquant la PI3K. Ces traitements n'ont pour le moment pas montré d'effet prometteur sur la survie des patients cela s'expliquant par la co-activation de tyrosines kinases multiples au sein des GBMs (57) ainsi que la mauvaise pénétration de ces agents au niveau de la BHE. Les GBMs sont des tumeurs très vascularisées, le développement de thérapies anti-angiogéniques consistant à utiliser des anticorps anti-VEGF tels que le Bévacicumab (Avastin®) ont montré des effets prometteurs. Ce dernier induit en effet une diminution du volume tumoral ainsi qu'une augmentation du taux de survie à 6 mois qui passe de 21% pour le Témzolomide à 46% pour un traitement au Bévacicumab (58).

Malgré l'évolution de la prise en charge thérapeutique des patients atteints de GBMs ainsi que l'apparition de nouveaux traitements beaucoup plus ciblés, le taux de survie des GBMs reste très faible et la récurrence est quasi systématique. Le phénomène d'échappement thérapeutique joue un rôle clé dans le mécanisme de récurrence. Il dépend directement de la résistance aux traitements de certaines cellules tumorales ainsi que de leur caractère invasif.

C. Résistance thérapeutique des GBMs

Malgré les différentes approches mises en place concernant le traitement des GBMs, il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement efficace. En effet, bien que l'utilisation de traitements combinés tels que la chirurgie associée à la radio ou chimiothérapie permette d'éradiquer la plupart des masses tumorales, la résistance et la récurrence qui s'ensuit sont les principales causes d'une faible efficacité du traitement. Ce phénomène d'échappement thérapeutique pourrait être directement lié à la nature des cellules composant la tumeur ainsi qu'à leurs caractéristiques biologiques. En effet, les cellules tumorales possèdent des caractéristiques moléculaires qui leur permettent de résister aux thérapeutiques actuelles.

La composition cellulaire des GBMs semble déterminante dans la résistance aux traitements. Les glioblastomes sont des tumeurs hétérogènes qui sont formées par différents types cellulaires. L'une des hypothèses en faveur de l'échappement thérapeutique repose sur la présence d'une sous-population cellulaire dont l'agressivité et la résistance aux traitements seraient supérieures aux autres cellules constituant la masse tumorale. Cette hypothèse est avancée en 2001 par Reya et coll. qui proposent deux modèles pouvant expliquer la formation de tumeurs ainsi que la récurrence tumorale (59), le modèle stochastique et le modèle hiérarchique (Figure 6) :

- Le modèle stochastique prédit que toutes les cellules composant une tumeur détiennent le même potentiel tumorigénique et possèdent la même capacité à régénérer la masse tumorale.
- Le modèle hiérarchique propose que seul un nombre réduit de cellules au sein de la masse tumorale possèdent ce pouvoir de régénération de nouvelles tumeurs.

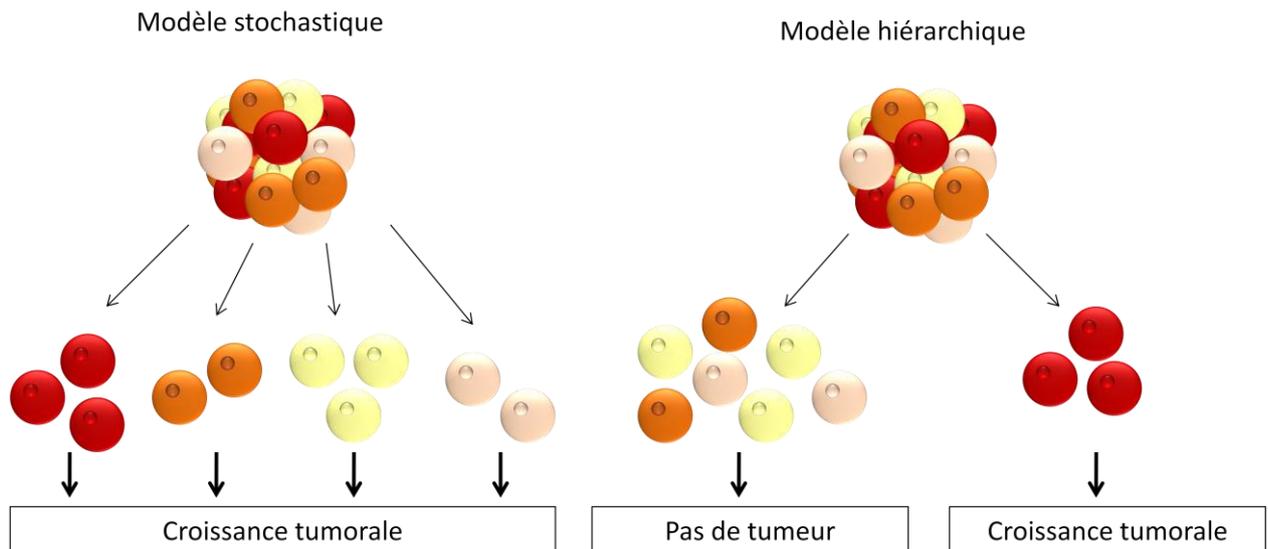


Figure 6 : Deux modèles généralistes de l'hétérogénéité des cancers solides. *Le modèle stochastique (gauche) décrit les cellules tumorales comme hétérogènes et toutes les cellules ont la capacité de proliférer et de former des nouvelles tumeurs. Le modèle hiérarchique (droite) décrit les cellules tumorales comme hétérogènes mais seulement une partie des cellules ont la capacité de proliférer et de former de nouvelles tumeurs. Adapté de Reya et al., « Stem cells, cancer, and cancer stem cells », 2001, (59).*

Le modèle hiérarchique permet d'expliquer la récurrence tumorale puisque seule une rare sous-population de cellules a la capacité de former de nouvelles tumeurs mais aussi de résister aux traitements actuels. Le modèle hiérarchique permet d'introduire la notion de population cellulaire résistante aux traitements chimio- et radio-thérapeutiques. L'hétérogénéité des GBMs pourrait donc dépendre d'un type cellulaire spécifique qui posséderait des propriétés proches des cellules souches neurales normales. Les différents types cellulaires composant la tumeur dériveraient donc de ces cellules nommées cellules souches cancéreuses (CSCs).

III. Existence de cellules souches cancéreuses dans le glioblastome

A. Mise en évidence des cellules souches cancéreuses

Durant de nombreuses années, la seule théorie proposée reposait sur le modèle stochastique. Les tumeurs étaient considérées comme une masse de cellules relativement homogènes qui possédaient toutes la même capacité à régénérer la tumeur. Il faudra attendre 1963 pour que l'équipe de Bruce mette en évidence que seule une faible proportion de cellules sanguines isolées de patients atteints de leucémie avaient la capacité de proliférer et de se différencier *in vivo* (60). Les avancées en biologie moléculaire ont ensuite permis de démontrer que ces cellules étaient d'origine clonale suggérant qu'un petit groupe de cellules précurseurs donnaient lieu à la majorité des cellules leucémiques hétérogènes (61). En effet, dans leur étude, Bonnet et collaborateurs ont pu montrer que les cellules souches de Leucémie Aigue Myéloïde (LAM) peuvent être purifiées via leurs caractéristiques CD34⁺/CD38⁻ à partir d'échantillons de patients (61). Malgré le fait que ces cellules représentent une très faible proportion de cellules souches, elles sont les seules cellules capables d'initier une LAM chez des souris immunodéficientes NOD/SCID (Non Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficient). Cela exclut donc la première hypothèse qui reposait sur le fait que toutes les cellules de LAM avaient la même capacité clonogénique et démontre donc, au contraire, que seule une petite sous-population cellulaire a la capacité de proliférer et de transmettre la pathologie.

La découverte des cellules souches leucémiques représente l'un des événements initiateurs de la recherche de cellules souches cancéreuses dans d'autres types de tumeurs, en particulier les tumeurs solides. Les découvertes concernant la LAM ont permis d'émettre l'hypothèse qu'une hiérarchie cellulaire existait au sein de la tumeur. Cette hiérarchie dépendrait de la présence des cellules souches cancéreuses qui prolifèrent et génèrent l'ensemble des cellules de la tumeur. Ce modèle hiérarchique a ensuite été étendu aux tumeurs solides et a permis de mettre en évidence l'existence d'une sous-population de cellules dans de nombreux tissus cancéreux humains qui étaient capables de générer une nouvelle tumeur après transplantation : sein (62), pancréas (63), prostate (64), cancer de la tête et du cou (65), et colon (66). De plus, il a été montré que 1 cellule sur 1000 à 1 cellule sur 5000 provenant de cancer du poumon, des ovaires ou d'un neuroblastome étaient capable de former des colonies en soft agar, démontrant ainsi leur propriété clonogénique

(67). Ces observations ont permis de conclure que seulement une partie des cellules cancéreuses étaient tumorigéniques et que comme dans le cas de la LAM, ces cellules tumorigéniques pouvaient être considérées comme des cellules souches cancéreuses.

L'existence de cellules souches cancéreuses au sein des glioblastomes a été mise en évidence par Ignatova et collaborateurs via l'utilisation du « Neurosphere assay ». Ce test habituellement utilisé pour l'isolement des cellules souches neurales normales (Neural Stem cells ou NSCs) a permis de démontrer qu'une fraction cellulaire de glioblastome possédait également la capacité de former des neurosphères (68). A travers différentes expérimentations, l'équipe de Galli a pu établir que les cellules issues de GBMs humains qui étaient capables de produire des neurosphères avaient également le pouvoir de se différencier en l'un des 3 types cellulaires du SNC (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) et donc pouvaient être considérés comme des cellules souches (69). Enfin, des cellules souches dérivant de glioblastome humain injectées dans une souris immunodéprimée ont la capacité unique de régénérer la tumeur humaine d'origine en respectant ses caractères histologiques, cytologiques ainsi que son mode d'organisation, même après plusieurs passages de ces cellules *in vitro* (69).

Bien que de nombreuses recherches aient été entreprises afin de répondre à la question concernant l'origine de ces cellules, cette dernière est restée sans réponse précise. Plusieurs hypothèses ont cependant été émises.

B. Origine des cellules souches cancéreuses de glioblastome

Différentes hypothèses majeures coexistent quant à l'origine des CSCs et sont représentées par la figure 7.

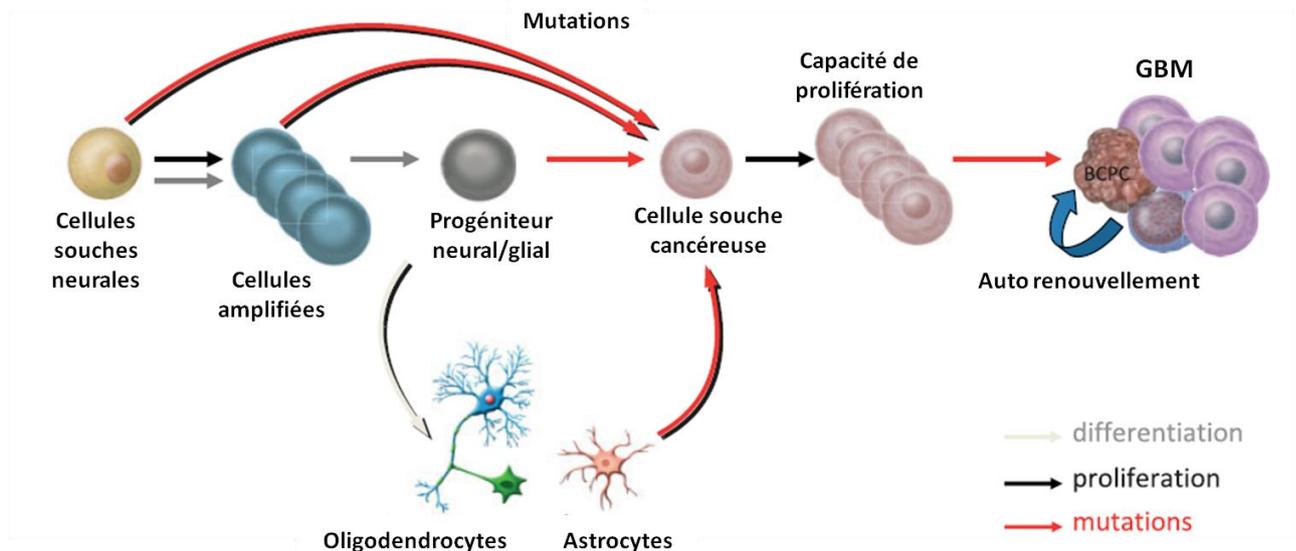


Figure 7 : Les différentes hypothèses quant à l'origine des CSCs et la génération des GBMs. Lors de la différenciation normale du système nerveux central, les cellules souches neurales passent par une étape d'amplification afin de produire des cellules progénitrices amplifiées qui se différencieront ensuite en progéniteur glial ou neural. Ces cellules progénitrices ont la capacité de produire une descendance selon le lignage lui appartenant : neuronal ou glial (oligodendrocyte ou astrocyte) mais pas les deux. Les mutations à l'origine des GBMs peuvent se produire à n'importe quel niveau et engendrer l'apparition de cellules souches cancéreuses. Des événements de dédifférenciation peuvent aussi générer des cellules souches cancéreuses provenant d'astrocytes ou d'oligodendrocytes. Adapté de Van Meir et al., « Exciting new advances in neuro-oncology, The avenue to a cure for malignant glioma », 2010, (70).

Les cellules souches cancéreuses de GBMs démontrent des propriétés similaires aux cellules souches neurales normales suggérant que la source potentielle des CSCs pourrait être les NSCs qui auraient subi des mutations au niveau des oncogènes et/ou au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs. L'hypothèse de phénomènes de dédifférenciation conduit à penser que l'acquisition des caractères spécifiques des CSCs pourrait être due à des mutations survenant au niveau de cellules en voie de différenciation telles que des progéniteurs voire même des astrocytes.

1. Les cellules souches neurales à l'origine des CSCs ?

Une explication possible quant à la formation des gliomes serait qu'ils se développent à partir d'une cellule unique ou cellule souche neurale (NSC pour neural stem cell). L'existence des cellules souches neurales et d'un mécanisme de neurogenèse chez l'adulte a été confirmée dans le système nerveux central et plus particulièrement dans la région

hippocampique à la fin des années 90 (71-74). Ces cellules possèdent plusieurs critères originaux qui permettent de les distinguer des autres cellules différenciées plus en aval dans le lignage cellulaire : une capacité d'auto-renouvellement, une prolifération quasi-illimitée, un caractère indifférencié et la propriété de générer n'importe quel type de cellules différenciées du SNC à la demande : neurones, astrocytes ou oligodendrocytes (75). La découverte de ces cellules et de leurs propriétés est venue balayer le dogme de Ramon y Cajal en 1902 qui affirmait que le cerveau était incapable de produire de nouveaux neurones après la naissance ce qui a permis de poser les fondements d'un nouveau type de plasticité cérébrale chez l'adulte. Les principales régions possédant des cellules souches neurales et capables d'une neurogenèse tout au long de la vie sont la zone sous-ventriculaire (ZSV) et la région du gyrus denté de l'hippocampe. Dans ces 2 régions, les cellules souches persistent et ont la capacité de se différencier en neurones et cellules gliales en cas de lésions (71). Ces cellules souches neurales possèdent des marqueurs de surface communs avec les cellules de lignage hématopoïétique tels que le CD133 ou le CD24 ainsi que la capacité de former des colonies à partir d'une cellule unique, les neurosphères (76; 77).

Ces cellules présentant également des capacités de prolifération quasi-illimitée et de migration, il est probable qu'à la suite de mutations, ces dernières pourraient se développer de façon anarchique et conduire à la formation d'une tumeur. Les mutations pourraient amplifier le potentiel migratoire de ces cellules souches neurales comme cela a été prouvé dans le processus d'embryogenèse en réponse à un ajout d'EGF (Epidermal Growth Factor) exogène chez la souris adulte (78; 79).

2. Les cellules souches cancéreuses découlent des cellules progéniteurs ?

Le lignage cellulaire, à partir d'une cellule souche neurale vers une cellule différenciée (neurone, oligodendrocyte ou astrocyte), fait intervenir plusieurs types cellulaires intermédiaires (progéniteurs multipotentiels, progéniteurs neuronaux...). Ces cellules appelées progéniteurs ou cellules précurseurs, situées en aval dans le lignage sont plus abondantes au sein du tissu adulte que ne le sont les cellules souches. Ce sont des cellules en partie différenciées présentes dans le tissu fœtal et adulte qui se divisent afin de produire des cellules matures. Cependant elles conservent tout de même une capacité partielle

d'auto-renouvellement. Cette propriété a mené à l'hypothèse que ces cellules progénitrices pouvaient être une source possible des cellules souches cancéreuses (80).

3. Les cellules souches cancéreuses : des cellules dédifférenciées ?

La dernière hypothèse repose sur le principe de dédifférenciation, c'est-à-dire sur la capacité d'une cellule différenciée à régresser dans le lignage cellulaire afin de générer des types cellulaires se situant en amont de sa position. Un progéniteur pourrait ainsi redonner une cellule souche. Si on applique cette dernière hypothèse au cas des gliomes, on peut considérer qu'un astrocyte ou un oligodendrocyte mature serait capable de se dédifférencier pour donner une cellule souche cancéreuse. Ce mécanisme pourrait mettre en jeu des mutations génétiques. Le concept de « dédifférenciation » repose sur le fait que les gliomes sont des tumeurs hétérogènes composées de cellules exprimant des marqueurs d'immaturité (cellules indifférenciées) et de différenciation (cellules différenciées). De plus, les gliomes présentent des caractéristiques morphogénétiques propres aux cellules gliales ou aux progéniteurs gliaux dont ils dérivent (81; 82). Les astrocytes pourraient donc être la cible de stimuli capables de déclencher une dédifférenciation de ces derniers en progéniteurs neuraux (83). Les cellules matures pourraient donc être l'une des cibles majeures de la gliomagenèse.

Au cours du développement du système nerveux central, l'évènement majeur correspond à la différenciation de la glie radiaire en astrocytes qui fait suite à la migration de la zone ventriculaire germinative jusqu'au cortex des neuroblastes et des cellules gliales (84). Bien que la différenciation de la glie radiaire soit considérée comme processus ultime lors de la mise en place des couches corticales, il a pu être montré *in vitro* que les astrocytes matures dérivant de la glie radiaire pouvaient subir un mécanisme de dédifférenciation et acquérir un phénotype comparable à celui de la glie radiaire après addition d'un milieu conditionné par des explants de cerveaux embryonnaires (85; 86). Ce phénomène de dédifférenciation est également constaté dans un cortex de souris adulte suite à des lésions d'un nombre limité de neurones (87; 88).

Dans le cas de la gliomagenèse, les mutations génétiques seraient à l'origine de la conversion des astrocytes matures vers des stades cellulaires plus immatures ce qui leur

confère des capacités de prolifération et de migration indispensables afin de devenir des cellules tumorales capables de générer un gliome.

La diversité des stratégies susceptibles d'aboutir au développement de la masse tumorale permet de mieux comprendre comment le modèle hiérarchique peut s'établir et ainsi donner naissance à une forte hétérogénéité cellulaire au sein de la tumeur. Cette hétérogénéité représente cependant un problème majeur au niveau diagnostic mais également au niveau de la prise en charge. L'objectif principal de la recherche est donc actuellement d'identifier les cellules responsables de cette diversité cellulaire dans le but d'en faire de nouvelles cibles thérapeutiques. L'hypothèse des cellules souches cancéreuses semble être la plus attractive afin d'expliquer la formation de la tumeur. Il apparaît indispensable de les étudier et de connaître leurs caractéristiques pour améliorer nos connaissances des mécanismes oncogéniques.

C. Caractéristiques des Cellules souches cancéreuses des GBMs

Les cellules souches cancéreuses sont actuellement beaucoup étudiées dans les glioblastomes. Du fait de leur localisation cérébrale et souvent des difficultés d'accès, l'étude des CSCs reste relativement difficile. Cependant, ces cellules arborent tout de même les principales caractéristiques des cellules souches neurales normales. Par analogie avec les cellules souches normales, les CSCs sont définies comme une petite sous-population cellulaire au sein de la tumeur possédant des propriétés d'auto-renouvellement, nécessaire afin de maintenir le pool de cellules souches, une capacité de prolifération quasi-illimitée ainsi qu'une capacité de différenciation en cellules hétérogènes (n'initiant pas la tumeur) permettant de régénérer la masse tumorale.

1. L'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses

Comme dans le développement normal, la question de l'auto-renouvellement est centrale. Afin d'entretenir son pool et de conserver une capacité à produire de nouvelles cellules, une cellule souche cancéreuse doit garder la capacité de s'auto-renouveler par division symétrique ou asymétrique et donner lieu au moins à une cellule fille qui possède les

mêmes capacités de cellule souche que la cellule mère (Figure 8). Si la cellule souche prolifère mais ne s'auto-renouvelle pas, le pool de cellules souches sera appauvri (Figure 8).

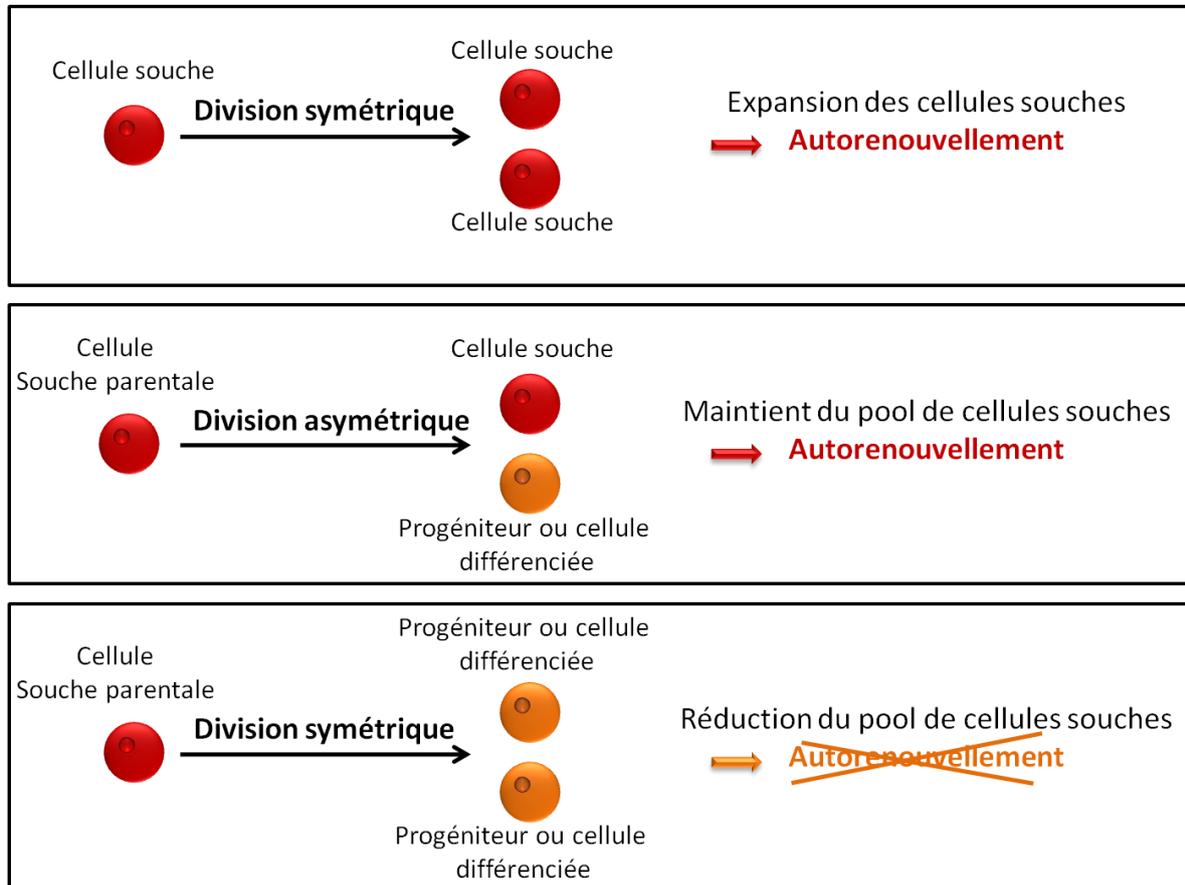


Figure 8 : La division et l'autorenouvellement des cellules souches. Afin de s'autorenouveler, une cellule souche doit donner au moins une cellule souche fille par division symétrique (rectangle du haut) ou asymétrique (rectangle du milieu). Ces deux possibilités permettent de maintenir un pool de cellules souches. La division symétrique d'une cellule souche en deux cellules filles progéniteurs ou cellules encore plus différenciées ne permet pas de maintenir l'autorenouvellement et donc entraîne la diminution du pool de cellules souches (rectangle du bas). Adapté de Sulman et al., "Brain tumor stem cells", 2008, (89).

Afin d'étudier le potentiel d'auto-renouvellement des CSCs, une approche de remise en culture des tumeurs a été utilisée. Après résection tumorale, la tumeur est dissociée afin d'obtenir des cellules isolées qui sont remises en culture dans du milieu sans sérum, et supplémenté par des facteurs de croissance, principalement de l'EGF et du bFGF (basic Fibroblast Growth Factor). La formation d'agrégats nommés neurosphères est caractéristique de la présence de cellules ayant un pouvoir d'auto-renouvellement et de prolifération. De plus, afin de confirmer la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération

illimitée de ces cellules, les neurosphères sont dissociées et remises en culture (68; 69; 90). Cette méthode aussi appelée « Neurosphere assay » (Figure 9) est originellement utilisée pour isoler et amplifier des cellules souches neurales normales provenant du système nerveux embryonnaire et adulte (71; 77).

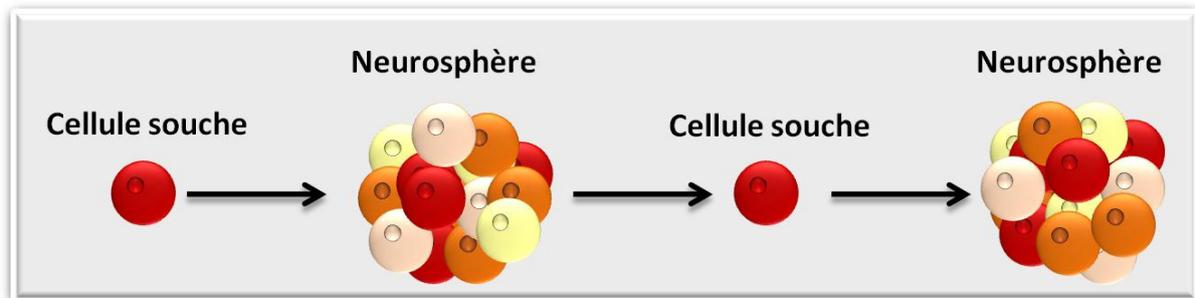


Figure 9 : Le système des neurosphères (ou « Neurosphere assay »). Le système des neurosphères a été développé pour l'expansion des cellules souches embryonnaires et adultes provenant du cerveau. Ce test a ensuite été adapté pour l'isolation des cellules souches cancéreuses du cerveau. Brièvement, le tissu est dissocié afin d'obtenir des cellules isolées dont une partie sont capables de proliférer et de s'autorenouveler en formant des neurosphères. Ces neurosphères peuvent ensuite être dissociées à nouveau et reformer des neurosphères après remise en culture. Adapté de Sulman et al., "Brain tumor stem cells", 2008, (89).

Enfin, la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses peut être quantifiée *in vitro* en ensemençant les cellules issues d'une tumeur à une dilution limite. Cette approche encore appelée « test de clonogénicité » consiste à ensemencher une cellule unique par puits afin de déterminer le pourcentage de cellules ayant la capacité de former une neurosphère. On évalue dans chaque puits le nombre et la taille des neurosphères formées (91).

2. Caractère multipotentiel des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches neurales au cours du développement se différencient afin de générer des cellules matures appartenant aux différents lignages (gliaux ou neuronaux) dans le but de structurer et d'organiser le tissu adulte. Chez l'adulte, cette capacité à produire n'importe quel type cellulaire différencié d'un tissu donné est appelée multipotentialité et représente l'une des caractéristiques majeures des CSNs. Afin de valider l'hypothèse des cellules souches cancéreuses, les cellules isolées par clonogénicité voient leur potentiel de différenciation évalué. Singh et collaborateurs ainsi que d'autres équipes ont pu montrer que

ces cellules isolées avaient la capacité de former des neurosphères mais aussi de se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et neurones lorsqu'elle sont placées après culture dans un milieu contenant du sérum de veau foetal (Figure 10) (69; 92).

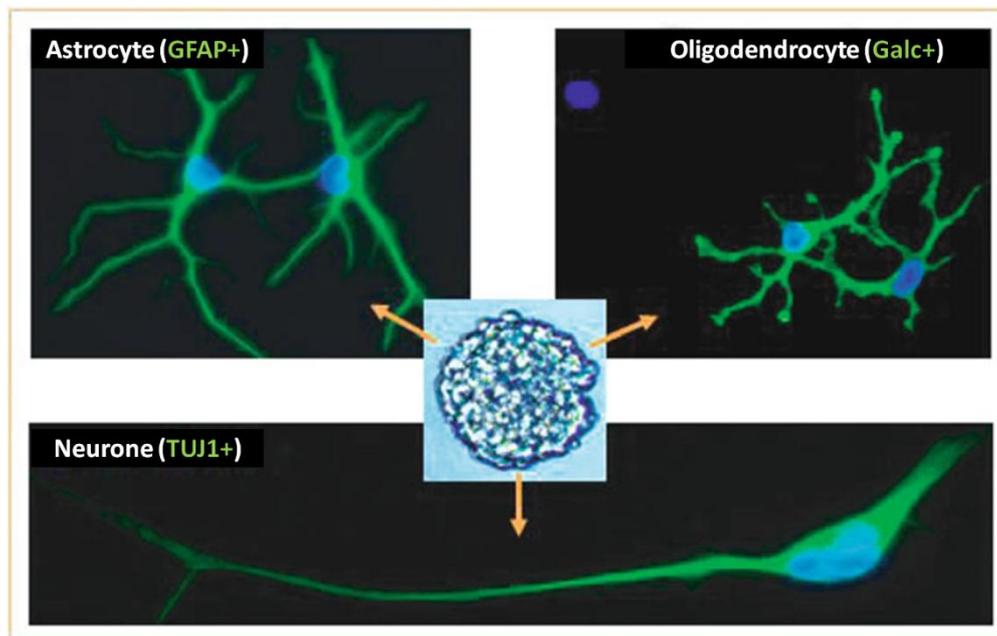


Figure 10 : Les cellules souches cancéreuses sont multipotentes. *Les cellules souches cancéreuses issues d'un glioblastome forment des neurosphères (au centre) et ont la capacité de se différencier en cellules exprimant des marqueurs d'astrocyte (GFAP+), d'oligodendrocyte (Galc+) et de neurone (TUJ1+) suite à l'induction de la différenciation par l'ajout de SVF. D'après Huang et al., « Cancer stem cell in glioblastoma – molecular signaling and therapeutic targeting », 2010, (93).*

3. Cellules souches cancéreuses et propagation tumorale

L'une des caractéristiques majeures des CSCs reste la propagation tumorale. En effet, les CSCs sont les cellules à l'origine des tumeurs et doivent donc posséder la capacité de produire *de novo* ou de régénérer la masse tumorale. En utilisant un protocole de dilution limite afin de sélectionner les cellules d'intérêt, Singh et coll. ont démontré qu'un nombre minimal de cellules était requis pour former une nouvelle masse tumorale en réalisant des greffes orthotopiques avec des quantités décroissantes de cellules souches (94). Cette étude, ainsi que celle de Bao et collaborateurs en 2006, a permis de montrer qu'un pool de 100 à 1000 cellules souches cancéreuses issues de tumeurs de patients était capable de former une tumeur après greffe (94; 95).

En résumé, les caractéristiques des cellules souches sont multiples et présentent des similarités avec les propriétés spécifiques des cellules souches neurales normales. En effet, il a été montré que les CSCs dérivant de GBMs pouvaient être caractérisées par l'expression de marqueurs d'immatunité propres aux NSCs tels que la nestine, Oct4 ou encore Sox2 à partir de marquages effectués sur des neurosphères issues de GBMs et cryoconservées (96-98). Les grandes caractéristiques des cellules souches cancéreuses de GBMs sont représentées figure 11.

Autorenouveaulement:

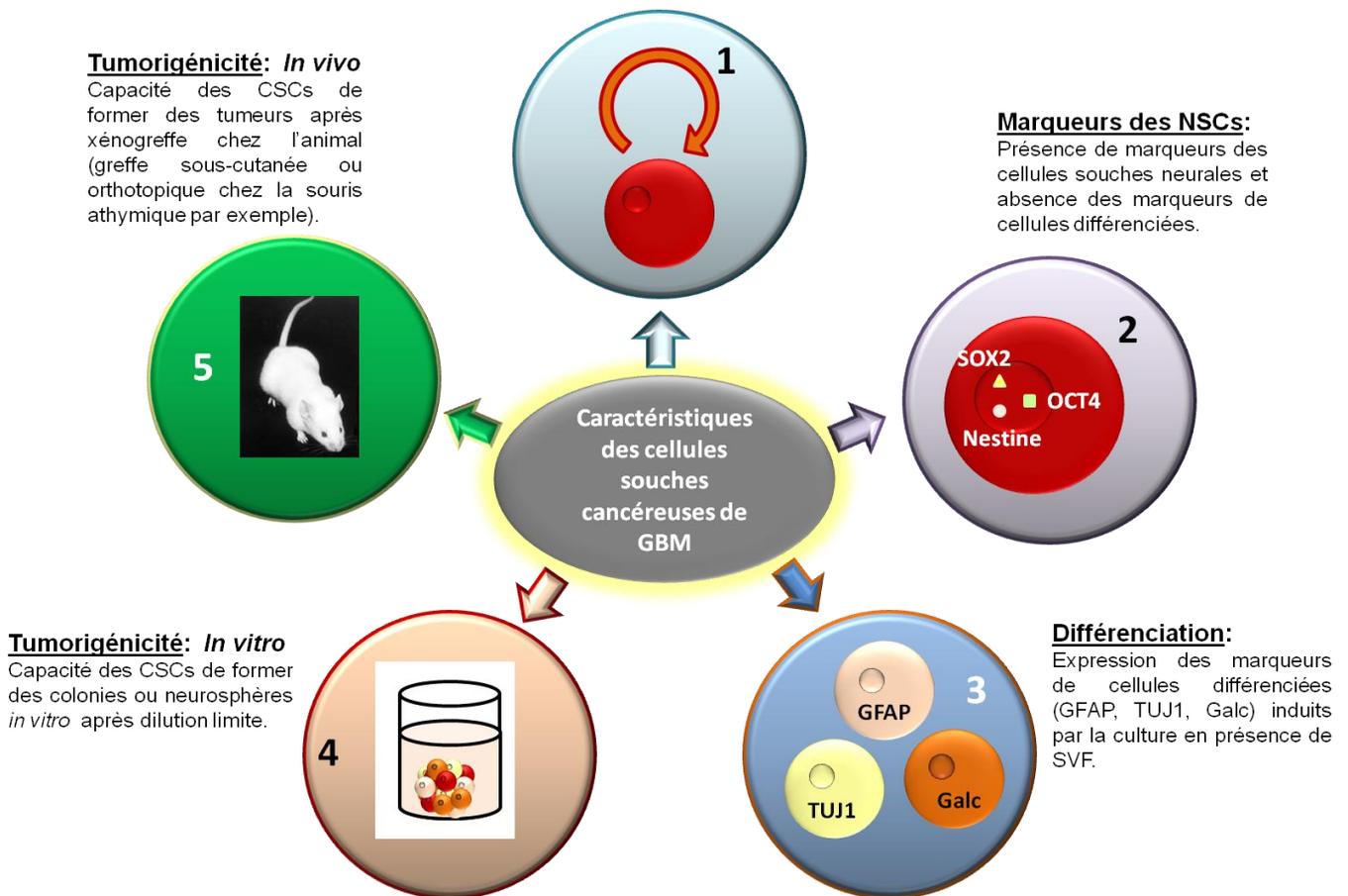
L'autorenouveaulement est la division symétrique d'une cellule souche en deux cellules filles identiques. Cela permet aux cellules souches de reproduire la copie originale indéfiniment.

Tumorigénicité: *In vivo*

Capacité des CSCs de former des tumeurs après xénotgreffe chez l'animal (greffe sous-cutanée ou orthotopique chez la souris athymique par exemple).

Marqueurs des NSCs:

Présence de marqueurs des cellules souches neurales et absence des marqueurs de cellules différenciées.



Tumorigénicité: *In vitro*

Capacité des CSCs de former des colonies ou neurosphères *in vitro* après dilution limite.

Différenciation:

Expression des marqueurs de cellules différenciées (GFAP, TUJ1, Galc) induits par la culture en présence de SVF.

Figure 11 : Représentation schématique des caractéristiques des cellules souches cancéreuses de glioblastomes. Les différentes propriétés des CSCs issues de glioblastomes sont : 1) L'autorenouveaulement ; 2) L'expression de marqueurs de cellules souches neurales tels que SOX2, OCT4 et la Nestine ; 3) La capacité de se différencier selon différentes populations cellulaires que sont les astrocytes (GFAP), les oligodendrocytes (Galc) et les neurones (TUJ1) ; 4) La conservation de la capacité de tumorigénicité *in vitro* via la production de neurosphères et enfin 5) La capacité de former des tumeurs à partir de xénotreffes chez la souris athymique. Adapté de Gürsel et al., "Glioblastoma stem-like cells – Biology and therapeutic implications", 2011, (98).

4. Les cellules souches cancéreuses : des cellules quiescentes ?

Les cellules souches neurales normales ainsi que les cellules leucémiques ont la capacité de proliférer de manière quasi-illimitée. Néanmoins, il a été clairement démontré que les cellules souches leucémiques existent aussi dans un état quiescent (99). Cette observation soulève la question de la capacité de prolifération des cellules souches cancéreuses. Dans des études *ex vivo*, les cellules souches cancéreuses de glioblastome sont en prolifération mais cela peut être en réponse aux conditions de culture utilisées. Les cellules souches cancéreuses sont supposées quiescentes puisque semblables aux cellules souches normales. De plus, cette hypothèse est renforcée par la capacité des CSCs à être résistantes aux traitements chimio-thérapeutiques. Les principaux agents chimio-thérapeutiques ciblent uniquement les cellules en division puisque leur mode d'action passe par l'ajout d'adduits à l'ADN induisant des cassures lors de la duplication de ce dernier ce qui aboutit à la mort de la cellule. La résistance serait donc attribuée en partie au phénotype quiescent de ces cellules qui leur permettrait d'échapper à la mort induite par les dommages à l'ADN découlant du traitement. Les études confirmant la quiescence des CSCs de glioblastome sont très restreintes, cependant ce critère est actuellement considéré comme celui fournissant une explication plausible de la résistance et de l'échappement thérapeutique des CSCs quelque soit le type tumoral (100; 101).

5. Les cellules souches cancéreuses sont des cellules indifférenciées

L'un des principaux objectifs de la recherche actuellement est la caractérisation et l'isolement des CSCs afin de les étudier et de découvrir de nouvelles cibles dans le but de les éradiquer et d'éviter ainsi la récurrence tumorale. Néanmoins, les CSCs ont comme caractéristique d'être des cellules non engagées dans une voie de différenciation comme les cellules souches neurales normales. Elles sont indifférenciées et n'expriment par conséquent que très peu de marqueurs de différenciation. Il existe néanmoins un certain nombre de marqueurs généralistes des CSCs dont le chef de file est prominin-1 (CD133). Leur caractérisation *via* ce marqueur est cependant sujette à de nombreuses controverses et pourrait nécessiter le développement de nouvelles approches technologiques.

L'équipe de Singh a mis en évidence que les cellules isolées de tumeurs de patients possédant les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation *in vitro* exprimaient le marqueur des NSCs CD133 (Cluster of Differentiation 133 ou Prominin-1) (92). Cette glycoprotéine à 5 segments transmembranaires décrite en premier lieu comme marqueur des précurseurs hématopoïétiques a aussi été décrite au sein des précurseurs endothéliaux CD34+/VEGFR2+ (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) (102-104).

Le CD133 a été utilisé en premier lieu comme marqueur permettant l'enrichissement des cellules capables de régénérer la tumeur dans des leucémies (105; 106) ainsi que comme marqueur pronostic dans ces cancers (107). L'expression du marqueur CD133 étant déjà connue au sein des cellules souches et progéniteurs neuraux (76; 108; 109), les études concernant ce marqueur ont été étendues aux cellules souches cancéreuses de GBMs. Le rôle du CD133 en tant que marqueur potentiel des CSCs a été préalablement démontré par Singh (92; 94). Ces travaux ont permis de montrer que seule une petite fraction de cellules exprimant CD133⁺ avait la capacité de former des neurosphères *in vitro* et de produire des tumeurs *in vivo*. Un nombre restreint de cellules semble suffisant pour reformer une masse tumorale comme le montre les expériences d'injections réalisées sur des cerveaux de souris immunodéprimées. 100 cellules CD133⁺ suffisent à former une tumeur tandis qu'avec 1000 fois plus de cellules CD133⁻ aucune tumeur ne se développe suggérant ainsi que le CD133 représente un nouveau marqueur spécifique des CSCs dans un modèle de glioblastome (94).

La découverte de CD133 a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives et d'initier de nombreuses études sur les CSCs de glioblastomes. Son utilisation simplifie leur isolement. Néanmoins, des études récentes alimentent la controverse et remettent en question l'utilisation du CD133 comme marqueur de référence des CSCs de glioblastome. En effet, ce marqueur permettait à la base d'isoler des cellules cancéreuses ayant des caractères de cellules souches au détriment de cellules CD133⁻ ne possédant pas ces caractéristiques. Différentes études ont démontré que des cellules CD133⁻ isolées à partir de tumeurs de patients possédaient des caractéristiques de cellules souches cancéreuses et avaient le pouvoir de régénérer *in vivo* une masse tumorale au même titre que les cellules CD133⁺ (110; 111). Ces cellules n'exprimant pas CD133 auraient de plus la capacité après division de redonner des cellules CD133⁺ ce qui va totalement à l'encontre des caractéristiques des CSCs (110). Ces observations remettent en cause la validité de CD133 en tant que marqueur valide des CSCs de glioblastome et conduisent au développement d'une

controverse. Néanmoins, face à la difficulté de caractérisation d'autres marqueurs, CD133 reste le marqueur de référence le plus utilisé dans la littérature.

Le caractère indifférencié des CSCs rend relativement complexe leur tri et leur enrichissement. L'agressivité des cellules exprimant CD133 semble indiquer qu'il s'agit bien des CSCs. Etant donné les controverses et les difficultés rencontrées pour les isoler, il est nécessaire de compléter l'analyse des marqueurs au sein des GBMs par une étude des propriétés de résistance aux traitements de ces cellules ainsi que par l'analyse de leur potentiel à accroître la récurrence tumorale.

D. Le rôle des CSCs dans la résistance thérapeutique des GBMs

Les GBMs sont donc présentés comme des tumeurs hétérogènes composées de cellules à différents stades de différenciation. La mise en évidence de l'existence des cellules souches cancéreuses au sein des GBMs a permis d'expliquer en partie l'échec de la radiothérapie ou de la chimiothérapie ainsi que la récurrence tumorale. En effet, si une sous-population de cellules a la capacité d'initier et de maintenir la tumeur (ce qui correspond aux caractéristiques attendues des CSCs), et que les GBMs présentent un fort taux de récurrence après traitement thérapeutique, cela suggère que les CSCs sont les cellules qui confèrent la capacité de résistance à la tumeur.

1. CSCs et résistance à l'irradiation

Bien que le traitement des GBMs par irradiation soit le plus efficace des traitements non chirurgicaux, les tumeurs réapparaissent après irradiation conduisant au décès des patients. L'étude des mécanismes de réponse à la radiothérapie a été effectuée à partir de xénogreffes de cellules issues de tumeurs de patients enrichies ou non en CSCs par Bao et collaborateurs (95). Il a été démontré que la population de cellules enrichie en CSCs augmentait suite à l'irradiation. De plus, les CSCs irradiées avaient une capacité de survie supérieure à la population de cellules non CSCs. Enfin, les tumeurs les plus radio-résistantes étaient composées d'un nombre beaucoup plus important de cellules CD133⁺ (95). Cette radio-résistance des cellules souches issues de GBMs serait due à une activation accrue des points de contrôle des dommages à l'ADN ainsi qu'une augmentation de

l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN après irradiation. Ainsi, les cellules CD133⁺ isolées de xénogreffes de GBMs ou directement de tumeurs de patients activent préférentiellement leurs mécanismes de points de contrôle des dommages à l'ADN après irradiation et réparent plus efficacement les dommages à l'ADN dus à l'irradiation que les cellules CD133⁻ (95; 112). Les CSCs subissent donc les mêmes dommages dus aux rayonnements ionisants que les autres cellules composant la tumeur. Cependant, les CSCs ont une capacité de réparation des dommages plus rapide et efficace que les autres cellules cancéreuses.

Les cellules cancéreuses comme les autres cellules répondent aux dommages de l'ADN par l'activation de mécanismes complexes de détection et de réparation de ces dommages ou points de contrôle.

Ces points de contrôle dépendent de plusieurs protéines telles que ATM (pour Ataxia Telangiectasia Mutated) ou encore Chk1 et Chk2 (pour checkpoint kinases 1 et 2). Ces différentes protéines sont activées suite à un stress afin d'initier un arrêt du cycle cellulaire pour tenter de réparer les dommages à l'ADN ou, si les dommages sont trop importants, d'induire l'apoptose dans les cellules normales. ATM ainsi que les kinases Chk1 et Chk2 semblent significativement activées dans les cellules CD133⁺ en réponse à l'irradiation (95). Le caractère radiorésistant des cellules CD133⁺ issues de tumeurs de patients peut être annihilé en utilisant un inhibiteur spécifique des kinases Chk1 et Chk2 suggérant ainsi leur rôle clé dans la résistance au traitement des CSCs exprimant CD133⁺ (95). Une comparaison des mécanismes de radiorésistance propres aux CSCs et aux cellules tumorales différenciées est présentée schématiquement dans la figure 12.

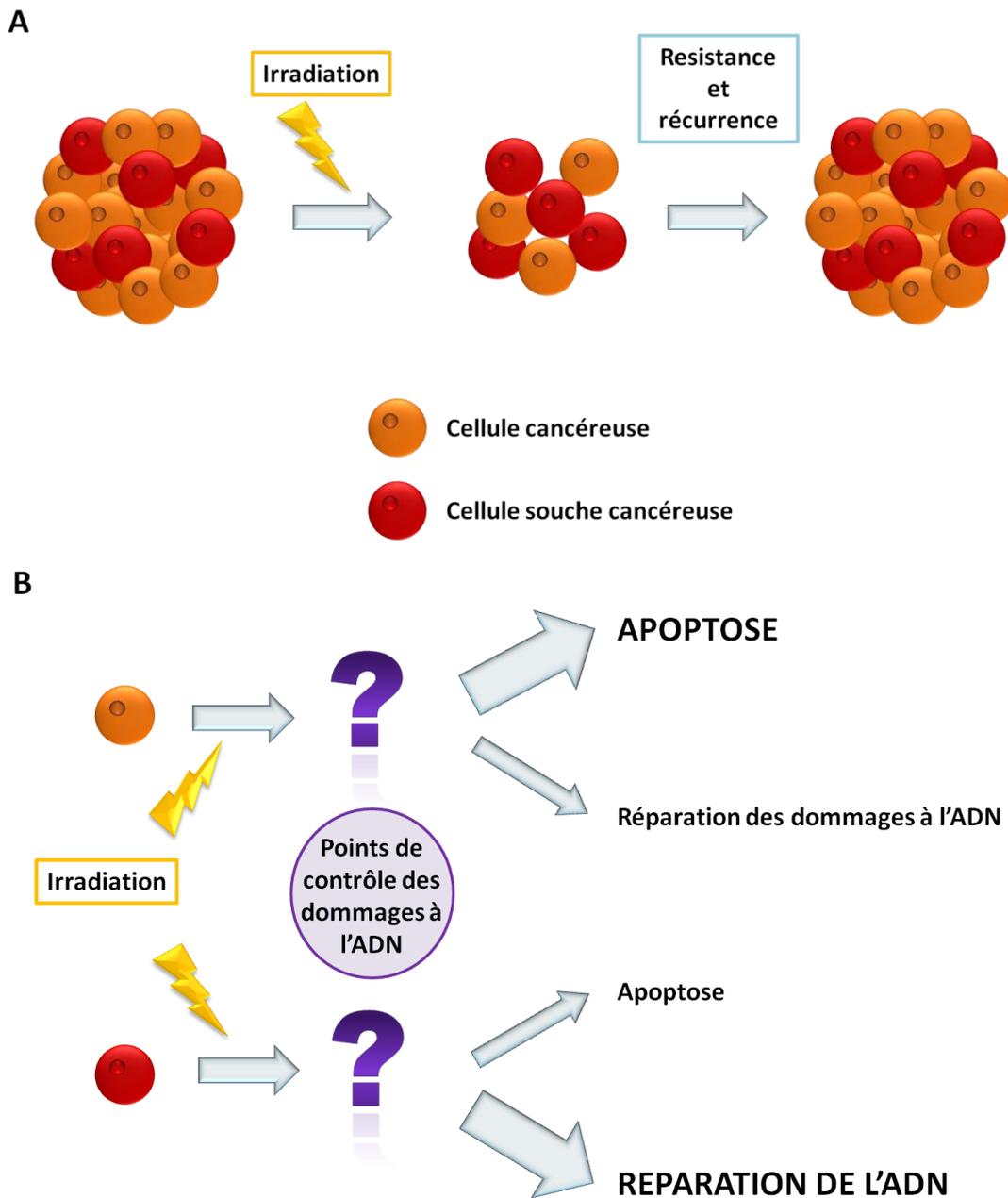


Figure 12 : Les cellules souches cancéreuses présentent une résistance à l'irradiation due à l'activation préférentielle des points de contrôle des dommages à l'ADN. **A** : Le traitement par irradiation entraîne l'enrichissement en CSCs. Les tumeurs traitées par irradiation présentent une augmentation significative en CSCs due au faible taux d'apoptose au sein de ces cellules après irradiation. Les CSCs restantes après irradiation ont la capacité de repeupler la tumeur. **B** : Les CSCs activent les points de contrôle des dommages à l'ADN suite à l'irradiation plus efficacement que les autres cellules cancéreuses. L'activation de ces points de contrôle permet à la cellule de déterminer si une réparation est possible via la réparation de son ADN ou si elle doit induire l'apoptose. Après irradiation les CSCs se dirigent plus spécifiquement vers une voie de survie et de réparation des dommages tandis que les cellules cancéreuses non souches sont plus susceptibles d'entrer en apoptose. Adapté de Gürsel et al., "Glioblastoma Stem-Like Cells—Biology and Therapeutic Implications", 2011, (98).

En plus de l'implication d'ATM ainsi que de Chk1 et Chk2 dans la résistance à l'irradiation des CSCs, des études ont pu mettre en évidence le rôle d'autres acteurs dans ce mécanisme de résistance. En effet, il a été récemment démontré que la voie de Wnt/ β -caténine jouait un rôle dans la radiorésistance des CSCs dans le cancer du sein (113; 114). Wnt et la β -caténine ont des rôles clairement définis dans le développement des cellules souche normales ainsi que dans les cancers (115), ce qui laisse supposer leur implication importante dans la radiorésistance des CSCs dans les glioblastomes. Il paraît probable que d'autres voies de signalisation des cellules souches permettent la résistance des CSCs aux dommages de l'ADN. Ainsi, dans des mammosphères, la voie Notch serait activée suite à l'irradiation de lignées cellulaires de cancer du sein (116). Dans le glioblastome, l'inhibition des voies Shh et Notch augmenterait la sensibilité des CSCs CD133⁺ au traitement par le témozolomide. En conclusion, les voies de Shh et Gli (117), la perte de PTEN (118; 119) et l'EGFR (120) apparaissent donc déterminants dans la radiorésistance des CSCs des glioblastomes.

2. CSCs et résistance à la chimiothérapie

La majorité des thérapies utilisées dans le cas du GBM, hormis la neurochirurgie, engendrent des dommages à l'ADN ou perturbent la mitose pour induire la mort cellulaire des cellules cancéreuses les plus prolifératives. La résistance des CSCs aux dommages à l'ADN induits par l'irradiation suggère que les CSCs pourraient résister à d'autres types de traitements tels que la chimiothérapie.

L'un des mécanismes les plus importants dans la résistance des CSCs à la chimiothérapie est le « Multidrug resistance ». En effet, l'une des particularités des cellules souches normales et des CSCs est leur forte expression de pompes à efflux tel que la famille des transporteurs à « ATP binding cassette » (transporteurs ABC). Cette famille de transporteurs inclut MDR1 (pour Multidrug resistance transporteur 1 aussi nommé ABCB1 ou P-glycoprotéine) qui est une pompe active responsable de l'efflux de divers composés lipophiles dont les drogues de chimiothérapie (121; 122) ainsi que la protéine BCRP (pour Breast Cancer Resistance Protein aussi nommée ABCG2) (123). Le taux d'expression élevé de ces protéines dans les CSCs confère à cette population une capacité d'efflux importante caractérisée par le rejet du marqueur fluorescent Hoechst 33342. Cette propriété unique permet aux CSCs de se protéger contre les agents cytotoxiques notamment grâce à la

protéine ABCG2. Cette capacité de rejet du Hoechst a été probablement mise en évidence dans des cellules souches hématopoïétiques ce qui a amené à employer le terme de « Side population » (124). Le terme side population ou cellules SP fait référence au fait que lorsque les cellules sont analysées par cytométrie en flux, la population de CSCs ou SP population est visualisée comme des cellules non marquées du côté (ou « side ») opposé au reste de la population cellulaire positive donc marquée. Afin de valider l'authenticité des cellules formant la « side population », les transporteurs permettant l'efflux du hoechst sont bloqués à l'aide du vérapamil et les résultats obtenus sont comparés à la population cellulaire non traitée au vérapamil (Figure 13).

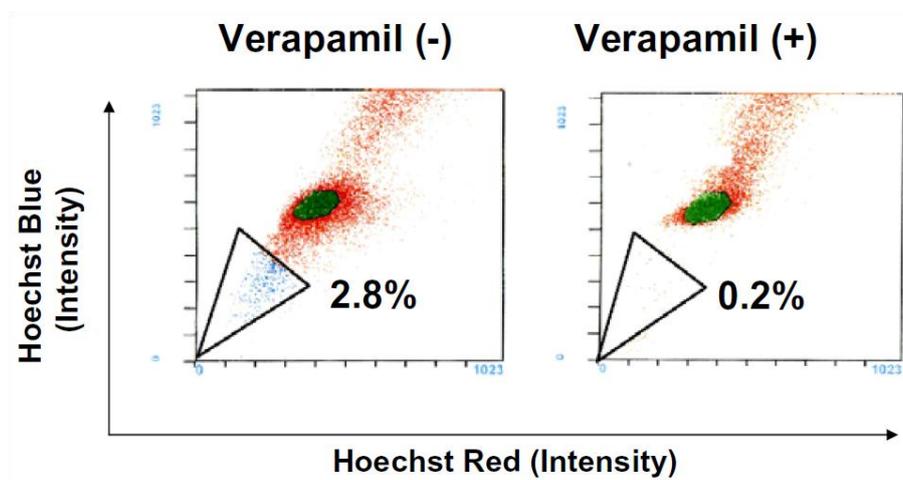


Figure 13 : Identification de la « side population » à partir d'une lignée cellulaire de glioblastome. Les cellules issues d'une lignée cellulaire de glioblastome sont marquées au Hoechst 33342 sont analysées par cytométrie en flux. La partie de droite présente les résultats obtenus lorsque les cellules sont traitées au vérapamil durant le marquage au hoechst ce qui les empêche de relarguer le hoechst. La « side population », qui disparaît donc en présence de vérapamil, est entourée (triangle noir) et représentée en pourcentage de la population totale analysée (2,8%). Issu de Fukaya et al., « Isolation of cancer stem-like cells from a side population of a human glioblastoma cell line, SK-MG-1 », 2010, (125).

La « side population » a été isolée dans de nombreux tissus tels que le cerveau, le sein, le poumon, le cœur, le pancréas, les testicules, la peau et le foie, et ces cellules peuvent représenter les cellules souches correspondant à un lignage spécifique (123; 124; 126-132). Les cellules de la « side population » leucémique ont un potentiel accru de relargage des agents chimio-thérapeutiques tels que la daunorubicine et le mitoxantrone hors de la cellule. Ces données suggèrent qu'une augmentation de cette capacité d'efflux contribue à la résistance des CSCs aux agents chimio-thérapeutiques (133). Dans les

GBMs, la side population est également présente et on constate que les CSCs issues de glioblastomes expriment de forts taux des protéines impliquées dans les mécanismes d'efflux de drogues (134; 135). Liu et coll. ont analysé la sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques des CSCs dans les GBMs (136). Ils démontrent que dans les cellules CD133⁺ le niveau d'expression des gènes associés à la chimiorésistance tels que *BCRP1* et *MGMT* est supérieur à celui des cellules n'exprimant pas le marqueur (137). De plus, les cellules CD133⁺ présentent une résistance plus grande aux chimiothérapies multiples incluant le Témazolomide que les cellules CD133⁻ (136). Les transporteurs ABC que sont BCRP et MDR1 sont donc impliqués spécifiquement dans le rejet des agents chimiothérapeutiques hors de la cellule et constituent donc des facteurs déterminants dans le mécanisme de chimiorésistance au sein CSCs.

Les CSCs ne possèdent pas uniquement des propriétés de rejet des traitements chimio-thérapeutiques exacerbées mais elles expriment aussi des médiateurs moléculaires du métabolisme comme l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ou ALDH1) qui est connue pour induire une résistance au cyclophosphamide dans les cellules souches normales (138). L'activité de l'ALDH1 semble également potentialisée dans des CSCs leucémiques où elle pourrait jouer un rôle dans leur résistance aux agents alkylants tels que le cyclophosphamide (139). Dans le cancer du sein, l'expression de l'ALDH1 dans les CSCs est associée à un mauvais pronostic (140) suggérant ainsi que les mécanismes favorisant la résistance à la chimiothérapie dans les CSCs auraient un impact direct sur la survie des patients. Peu d'études ont porté sur l'expression d'ALDH1 dans les glioblastomes. Néanmoins, une étude récente a montré que des cellules issues de GBMs exprimant ALDH1 avaient des caractéristiques semblables aux CSCs (141) ce qui permet de supposer que les CSCs de glioblastomes expriment l'ALDH1 et que cette expression est corrélée à la résistance aux traitements chimio-thérapeutiques.

Les cellules souches cancéreuses semblent au cœur des mécanismes de résistance à la chimiothérapie ainsi qu'à la radiothérapie. Il existe néanmoins d'autres agents anticancéreux susceptibles de réduire l'activité tumorale et de favoriser l'éradication de la tumeur. Parmi ceux-ci, on trouve notamment les agents ciblant l'angiogenèse tumorale. On peut par conséquent s'interroger sur le rôle des CSCs dans l'angiogenèse tumorale ainsi que sur leur capacité de résistance à ce type de molécules anticancéreuses.

3. Les CSCs et leur rôle dans le mécanisme d'angiogenèse

Les glioblastomes sont des tumeurs très vascularisées et cette vascularisation est une caractéristique des grades les plus malins des gliomes. En effet, la vascularisation des tumeurs fait partie des caractères histologiques permettant de classer une tumeur comme étant un glioblastome. L'un des critères de malignité d'un gliome réside dans la surexpression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Figure 4). Ce facteur pro-angiogénique produit par les astrocytes tumoraux est requis pour activer et entretenir l'angiogenèse tumorale des GBMs (142). Les CSCs représentent une source importante de facteurs pro-angiogéniques et participent ainsi activement au mécanisme d'angiogenèse tumorale (143). Le niveau de vascularisation des tumeurs formées provenant de xénogreffe de CSCs (CD133⁺) chez des souris nude a été comparé à celui de tumeurs générées à partir de cellules CD133⁻. Les observations montrent que les tumeurs formées à partir des CSCs sont significativement plus volumineuses et présentent une vascularisation plus dense, avec des zones nécrotiques, ainsi que des régions hémorragiques (143). Les cellules CD133⁺ possèderaient également un niveau d'expression basal de VEGF supérieur aux cellules CD133⁻. Celui-ci est significativement augmenté dans des conditions qui sont censées mimer les conditions intra-tumorales (143). Les CSCs interagissent donc avec la niche vasculaire et activent l'angiogenèse tumorale en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques.

L'implication des CSCs dans la vascularisation tumorale restait jusqu'à présent indirecte *via* la sécrétion de facteurs de croissance. Des travaux antérieurs avaient cependant démontré que les cellules souches neurales normales étaient capables de se différencier en cellules endothéliales fonctionnelles (144). Plus récemment, la preuve a été faite dans les GBMs que les CSCs participaient de façon directe à la vascularisation tumorale en se différenciant en cellules endothéliales ce qui permet d'expliquer la présence de cellules endothéliales dérivant de la tumeur (cancer-derived endothelial-like cells) au sein d'un grand nombre de tumeurs (145). En effet, ce nouveau mécanisme angiogénique tumoral n'est pas spécifique du glioblastome puisqu'il a pu être mis en évidence dans les cancers ovariens (146).

La sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les CSCs ainsi que la capacité de ces dernières à se différencier en cellules endothéliales dérivant de la tumeur vont contribuer activement au mécanisme d'angiogenèse tumorale. Ces différents processus entraînent de plus une néo-vascularisation anormale, structurellement et fonctionnellement, qui est

responsable de la formation de zones hypoxiques et contribue à la création d'un microenvironnement spécifique au sein de la tumeur.

Les interactions croisées entre les CSCs et le réseau vasculaire sont donc déterminantes dans l'initiation et la progression tumorale et ces données doivent être prises en compte lors de l'établissement de stratégies thérapeutiques. Ainsi, si les CSCs ont la capacité de participer activement à l'angiogenèse, cette dernière semble à son tour indispensable afin de maintenir le pool de CSCs *via* la mise en place de niches hypoxiques similaires à celles observées dans les cellules souches neurales normales (147) (Figure 14).

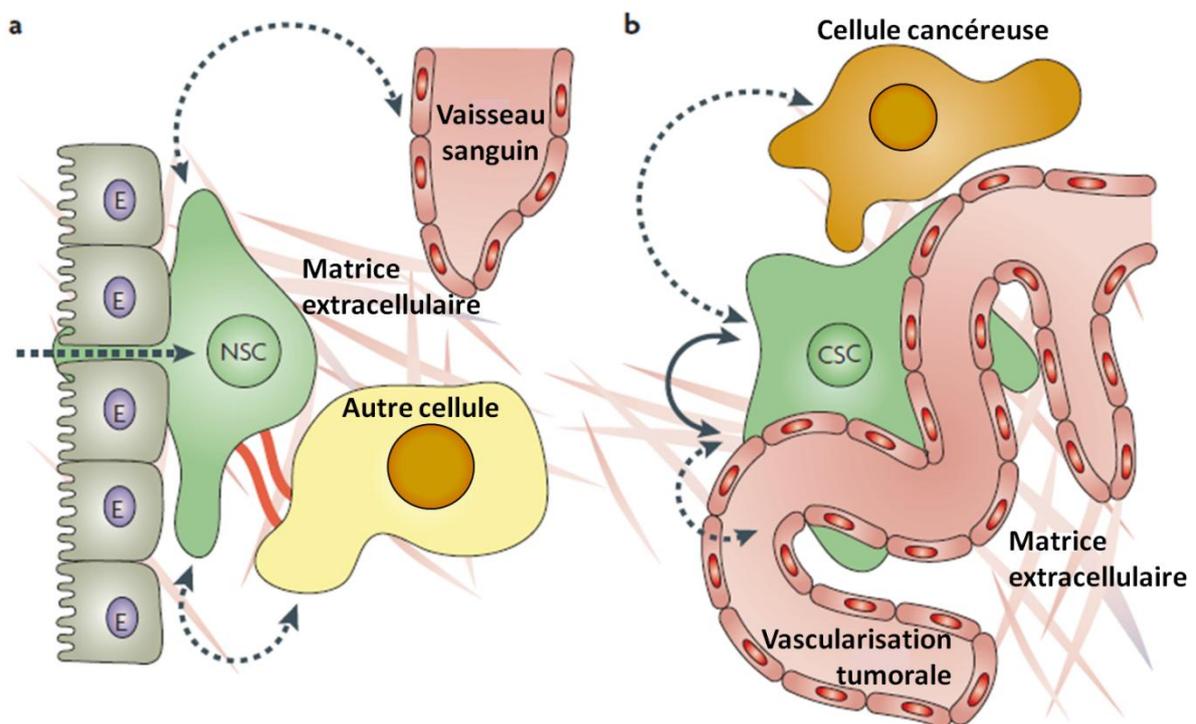


Figure 14 : Les niches de cellules souches neurales normales et cancéreuses. **a :** Représentation schématique de la niche des cellules souches neurales normales : la zone sous-ventriculaire ou SVZ (pour Subventricular Zone). Les cellules souches neurales (notées NSC) interagissent intimement avec les cellules épendymales (notées E), les vaisseaux sanguins et d'autres types cellulaires variés tels que des progéniteurs ou des cellules de soutien. Les fonctions des NSC sont régulées par différents facteurs dérivant des cellules environnantes tels que le liquide cébro-spinal (flèches pointillées, par exemple facteurs de croissance). Une autre régulation peut se faire directement par contacts cellulaires (traits rouges) ou par la matrice extracellulaire. **b :** Les cellules souches cancéreuses de glioblastomes (notées CSC) sont en contact direct avec la vascularisation tumorale aberrante. Les CSCs peuvent sécréter des facteurs de croissance tels que le VEGF qui permet le recrutement de la vascularisation tumorale dans la niche. De la même manière, les vaisseaux tumoraux et les autres cellules cancéreuses sécrètent des facteurs permettant le maintien de l'autorenouvellement des CSCs. Des mutations au sien des CSCs permet aussi de maintenir un niveau d'autorenouvellement intrinsèque (représenté par la flèche noire pleine). Adapté de Gilbertson et al., « Making a tumour's bed : glioblastoma stem cells and the vascular niche », 2007, (147).

Dans les tumeurs cérébrales, le lien étroit existant entre CSCs et cellules endothéliales au sein même de la tumeur est reflété par la corrélation existant entre le nombre de CSCs et le nombre de vaisseaux (148). *In vitro*, le nombre des neurosphères formées à partir de CSCs augmente en présence de cellules endothéliales suggérant ainsi l'existence d'une dépendance entre ces différentes entités cellulaires. *In vivo*, la co-injection intracérébrale dans un modèle murin de cellules endothéliales permet d'augmenter l'initiation de la tumeur à partir de xénogreffes de cellules CD133⁺, mais aussi d'accroître la fraction des CSCs (148). Ces données suggèrent donc que les CSCs résident dans une niche qui les maintient à l'état souche (maintien de la « souchitude » connu sous le nom de « stemness ») similaire à la niche vasculaire primaire permettant le maintien des cellules souches neurales normales dans le cerveau et favorisant la croissance tumorale (149).

Les cellules souches cancéreuses représentent donc une sous-population restreinte de cellules hautement agressives, au caractère indifférencié, capables d'agir sur leur microenvironnement et d'adapter ce dernier selon leurs besoins. Elles possèdent de plus des propriétés de résistance accrues aux différents types de traitements anticancéreux ainsi que le pouvoir d'induire la récurrence tumorale. Leur étude s'avère donc nécessaire afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de les détruire. La caractérisation des CSCs représente un point clé dans l'étude de ces cellules mais également dans le cadre de la démarche diagnostique. Cette identification des CSCs semble cependant poser de nombreux problèmes en raison notamment du manque de spécificité des marqueurs génériques de ce type de cellules.

L'identification de biomarqueurs spécifiques de ces cellules souches cancéreuses dans le glioblastome permettrait : 1) de disposer de nouvelles cibles thérapeutiques ; 2) de développer des nouveaux outils d'études et d'analyse pour la recherche et 3) de servir de facteurs prédictifs ou pronostics de la réponse thérapeutique.

L'hétérogénéité cellulaire des glioblastomes et le caractère indifférencié des CSCs, représentent les deux principales difficultés à surmonter dans la démarche d'isolement et de caractérisation des CSCs. Le développement et l'utilisation d'approches instrumentales d'isolement et de caractérisation des CSCs ont fait l'objet d'une partie de mon travail. Plusieurs stratégies ont été développées pour améliorer le tri cellulaire et l'isolement des CSCs et sont présentées dans le contexte de développement d'outils de tri cellulaire.

Dans un second temps, une approche transcriptomique dont l'objectif était d'étudier les changements d'expression des gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles (glycosylation) a permis d'identifier de nouveaux bio-marqueurs des cellules indifférenciées.

IV. Instrumentation : développement de méthodes de tri et de caractérisation cellulaires

Au cours de ma thèse, j'ai participé au développement de deux techniques différentes de tri et de caractérisation cellulaires. La première approche repose sur l'étude des propriétés diélectriques des cellules à l'aide de biocapteurs. Ces biocapteurs ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe MINACOM (Micro et Nanotechnologies pour Composants Optoélectroniques et Microondes, UMR CNRS 6172) située à XLIM et plus particulièrement au cours de la thèse de Claire Dalmay. La seconde approche est en développement depuis plusieurs années au sein de notre laboratoire et correspond à un tri cellulaire par couplage flux/force de sédimentation connu sous le nom de SdFFF (pour Sedimentation Field Flow Fractionation) qui a été récemment adaptée au tri des CSCs.

Actuellement, les méthodes de tri ou d'analyses cellulaires passent par une étape de marquage par des anticorps se fixant sur des cibles spécifiques de chaque type cellulaire étudié. La technique de choix pour le tri de cellules est actuellement l'immunomarquage par un anticorps spécifique lié à un fluorochrome auquel fait suite un tri des cellules exprimant ou non le marqueur utilisé par FACS (ou Fluorescent Activated Cell Sorting). Une autre méthode de tri, le tri magnétique (ou MACS pour Magnetic Activated Cell Sorting), basée sur ce même principe utilise des anticorps couplés à des billes, les cellules sont alors triées à l'aide d'un aimant retenant les cellules marquées qui sont ainsi séparées des cellules non marquées.

Ces méthodes ont l'avantage de s'effectuer sur cellules vivantes et permettent donc de récupérer les cellules d'intérêt et de pouvoir les réutiliser pour différentes expérimentations. L'inconvénient majeur de ces techniques réside dans la nécessité d'effectuer un marquage préalable spécifique des cellules. Le caractère immature des CSCs

ainsi que la très grande hétérogénéité cellulaire du tissu dans lequel elles se trouvent rendent très complexe l'isolement de ces cellules par des méthodes de tri traditionnelles. Actuellement, le principal marqueur utilisé pour isoler les CSCs issues de glioblastome reste l'antigène de surface CD133. Bien que ce marqueur fût validé dans un premier temps (94), il a été fortement remis en cause et est désormais très controversé (110). Il est donc actuellement relativement complexe d'isoler les CSCs à partir de l'utilisation d'anticorps spécifiques en s'appuyant sur les techniques de tri conventionnelles. L'étape d'immunomarquage peut induire une différenciation des cellules les plus immatures ou encore modifier l'intégrité physiologique de la cellule remettant en cause le caractère souche de ces cellules et leur intérêt lors de la réalisation de greffes.

Le développement d'approches permettant une caractérisation et un tri cellulaires s'affranchissant d'un marquage immunologique préalable spécifique de la cellule analysée représenterait donc une avancée technologique dans l'étude des cellules possédant un phénotype complexe, telles que les cellules souches cancéreuses. Ce type de développement préalable s'avère nécessaire afin d'améliorer nos connaissances des CSCs et ainsi de favoriser la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques ou bien de mettre en place de nouvelles thérapies anti-tumorales ciblant avec précision cette population cellulaire.

A. Analyse des propriétés diélectriques des cellules par l'utilisation de biocapteurs

Etant donné que les tissus biologiques sont principalement constitués d'eau, ils se comportent comme un matériau diélectrique à pertes. Les principaux paramètres électriques mesurés sensibles aux variations de la fréquence des champs électriques appliqués sont la permittivité et la conductivité. Jusqu'à présent, les principaux travaux réalisés ont été effectués sur des tissus entiers (sang, muscle, graisse) et les permittivités et conductivités de ces tissus correspondent à des valeurs macroscopiques qui ne décrivent pas des phénomènes microscopiques tels qu'ils peuvent être observés à l'échelle cellulaire. Ainsi, Gabriel et coll. ont décrit les propriétés électromagnétiques de plus de 45 tissus différents (150-152).

La définition d'une signature électromagnétique spécifique des CSCs représentait donc un nouveau défi qui a été relevé en collaboration avec une équipe de physiciens

spécialistes dans le développement de biocapteurs basés sur une méthode de détection électrique (équipe MINACOM : Micro et Nanotechnologies pour Composants Optoélectroniques et Microondes, UMR CNRS 6172, située à XLIM). Ces nouvelles technologies sont de plus en plus développées ces dernières années et de nombreuses applications des micro-technologies aux domaines biologique et biomédical ou BioMEMS (pour Biological Micro-Electro-Mechanical Systems) font leur apparition.

1. Contexte

L'étude des propriétés électriques des cellules existe depuis de nombreuses années. En effet, au début du XXème siècle, Höber a étudié l'évolution de la résistivité d'un échantillon de sang. L'étude de cette résistivité aux basses et hautes fréquences a permis de mettre en évidence la présence, autour des érythrocytes, d'une membrane forçant le courant à contourner les cellules aux basses fréquences. Aux hautes fréquences, le milieu intracellulaire participe au phénomène de conduction du courant. L'obtention de résultats totalement différents avec de basses et hautes fréquences électriques a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence d'une membrane cellulaire à partir d'une expérience purement électrique (153). Enfin, Fricke en 1932 a proposé un modèle de représentation de la cellule en fonction de son comportement diélectrique où la membrane de la cellule est comparable à un condensateur tandis que les milieux intra et extracellulaires sont considérés comme électrolytes liquides (154). En résumé, la cellule peut-être comparée à un circuit électrique où chaque élément engendre une diminution ou une augmentation de la transmission du courant électrique. L'intérêt de l'étude des propriétés diélectriques des cellules a donc été mis en évidence depuis de nombreuses années. Elle fût d'un grand intérêt dans la compréhension des mécanismes électro-physiologiques. De plus, cette approche transdisciplinaire complémentaire des méthodes classiques utilisées en biologie a permis d'appréhender différemment certains phénomènes biologiques.

L'utilisation des fréquences radio- et micro-ondes paraît idéale étant donné qu'à ces fréquences, la membrane cellulaire est considérée comme transparente aux ondes permettant ainsi de focaliser l'étude sur les propriétés diélectriques du milieu intracellulaire et de ses composés.

L'étude des propriétés diélectriques des tissus biologiques permet, par des approches totalement novatrices, de compléter et d'apporter de nouvelles données

indispensables pour permettre la caractérisation des tissus. Cependant, un enjeu majeur depuis quelques années réside dans l'obtention de dispositifs d'analyse miniaturisés. En effet, le développement de biocapteurs de taille réduite permettrait de travailler non plus à l'échelle du tissu mais à l'échelle de la cellule directement. Comme pour le modèle des glioblastomes, différentes pathologies ont un besoin grandissant d'analyser un tissu spécifique à l'échelle de la cellule unique. Les approches actuelles permettent seulement une observation sur un grand nombre de cellules, et les cellules d'intérêt, souvent rares, se trouvent noyées dans l'effet de masse. Les signaux obtenus ne sont pas représentatifs et correspondent à une moyenne de l'ensemble de la population analysée.

Le développement des micro-technologies a permis l'apparition de très petits résonateurs compatibles avec l'analyse de cellule unique. Ces avancées techniques ont permis le développement des technologies BioMEMS qui sont actuellement très utilisées dans le domaine de la recherche. En effet, différentes méthodes très utilisées à présent sont apparues ces dernières années dans le domaine de la détection et la caractérisation des cellules. Parmi celles-ci, les puces à ADN (155) ont permis de grandes avancées dans la caractérisation des glioblastomes puisqu'elles permettent d'étudier l'expression de gènes à très grande échelle.

A partir de ces avancées technologiques, des biocapteurs ont été développés afin de permettre la mesure des propriétés diélectriques à l'échelle de la cellule unique.

2. Développement de biocapteurs adaptés à l'analyse cellulaire

L'étude des propriétés diélectriques des cellules par l'utilisation de biocapteurs s'est faite en différentes étapes mais avait pour but principal de pouvoir différencier des cellules selon les propriétés physiques. Pour cela, un biocapteur a été développé. Celui-ci est composé d'une résine spécifique qui a été testée pour sa biocompatibilité avec les cellules (résine SU8), de micro chambres de culture pour le dépôt et la mesure des cellules et d'un substrat de verre permettant au capteur de ne pas flotter lorsqu'il est immergé dans du milieu de culture (Figure 15).

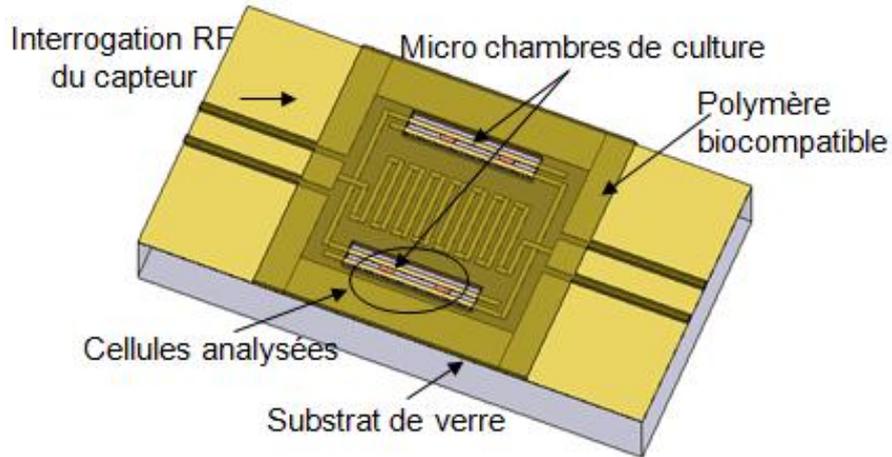


Figure 15 : Représentation schématique d'un biocapteur. Les cellules analysées sont déposées ou ont poussé au niveau des micro-chambres de culture. Au niveau des ces chambres, les électrodes sont accessibles tandis que le reste du biocapteur et les autres électrodes sont recouverts de polymère biocompatible. Les mesures du capteur se font par ses extrémités (Interrogation du capteur). Enfin, le substrat de verre permet la manipulation plus facile du capteur ainsi que son immersion lorsqu'il est déposé en milieu de culture.

Le principe du biocapteur est basé sur le phénomène de résonance. Ce phénomène engendre l'apparition d'un pic d'absorption du signal électromagnétique en fonction de la fréquence soumise (Figure 16). A partir de ces observations, la présence de cellules sur le biocapteur le perturbe et modifie sa fréquence de résonance de base. Cette modification de fréquence peut-être associée au nombre de cellules présentes sur le capteur, à la position spécifique des cellules sur le capteur, à la taille des cellules et surtout au contenu des cellules présentes sur le capteur. Le but étant donc de relier cette modification de fréquence au type cellulaire analysé. La phase d'expérimentation requiert donc une mesure de référence ou mesure du biocapteur à vide (sans cellule) (Figure 16).

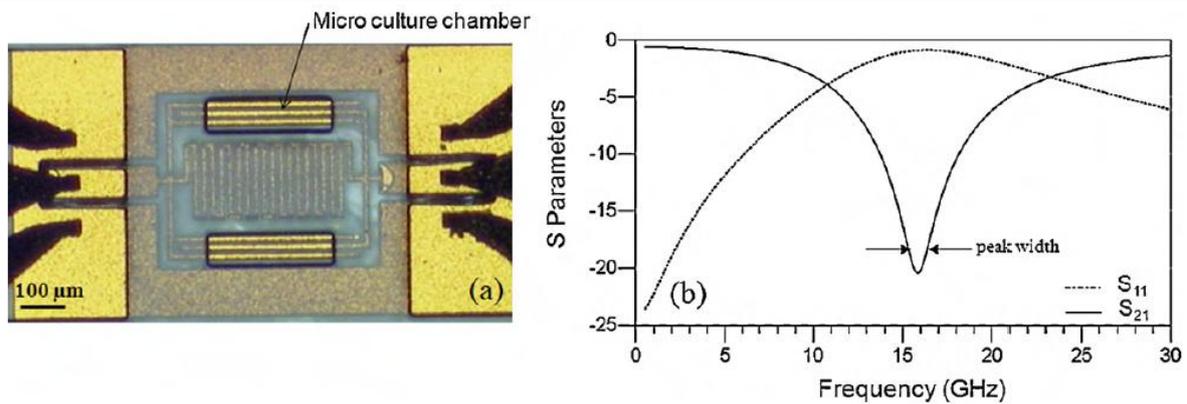


Figure 16 : Le biocapteur et sa résonance à vide. **a** : La photographie du biocapteur présente les chambres de culture où sont mesurées les cellules (Micro culture chamber) ainsi que les pattes permettant la mesure de résonance (aux extrémités gauche et droite). **b** : La mesure de la résonance du capteur à vide permet l'obtention d'un pic d'absorption du signal électromagnétique en fonction de la fréquence soumise. D'après Dalmay et al., « Ultra sensitive biosensor based on impedance spectroscopy at microwave frequencies for cell scale analysis », 2010, (156).

L'obtention de deux signatures électromagnétiques distinctes a permis de valider les propriétés d'analyse et de discrimination du biocapteur sur deux lignées cellulaires : une lignée de neuroblastomes (SHSY5Y) et une lignée de glioblastomes (U87-MG) (156). Par la suite, l'objectif était de développer un outil extrêmement innovant et performant d'identification cellulaire afin d'effectuer des mesures plus spécifiques permettant de s'approcher de l'échelle d'une cellule unique ou encore de comparer des cellules issues d'une même lignée mais à des stades de différenciation différents. Les protocoles de mesures ou les biocapteurs eux-mêmes ont du être réadaptés pour une étude optimale (mesure de cellules flottantes, diminution de la taille des gaps entre les électrodes adaptée aux cellules de plus petite taille...). Ces études restent pour le moment préliminaires.

Cette approche utilisant une technologie innovante permettra donc de définir une signature électromagnétique spécifique d'un type cellulaire ou d'un état de différenciation d'une cellule au sein d'une population. En effet, le biocapteur permet de mesurer des paramètres cellulaires spécifiques aux CSCs. Cette approche nous permettra donc de caractériser ces cellules afin de comprendre les mécanismes responsables de leur activation et donc d'élaborer des stratégies les ciblant spécifiquement et, de façon similaire, elle contribuera à améliorer le diagnostic clinique en complétant la classification actuelle des tumeurs cérébrales. De plus, l'accumulation de signatures électromagnétiques spécifiques d'un type cellulaire a pour but de former une base de données de référence répertoriant les cellules analysées et leurs caractéristiques correspondantes. Cette banque de données

pourrait faciliter le diagnostic de certaines pathologies telles que les cancers en permettant d'avoir une vision plus précise de la carte d'identité de la tumeur afin d'apporter une réponse thérapeutique adaptée, mieux ciblée, et propre à chaque patient.

Le biocapteur permet une discrimination rapide et efficace des cellules à condition que les cellules aient subi un enrichissement préalable. L'approche de tri cellulaire par SdFFF qui est développée depuis plusieurs années a pu être adaptée au tri de cellules vivantes et pourrait fournir un complément majeur dans la mise au point d'une solution intégrée résultant du couplage SdFFF et biocapteur.

B. Tri cellulaire par la technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (SdFFF)

L'isolement de sous populations cellulaires est actuellement basé sur les marqueurs spécifiques exprimés à la surface des cellules d'intérêt. En effet comme nous l'avons abordé auparavant, les méthodes actuelles sont basées sur le tri de cellules grâce à la reconnaissance du marquage effectué au préalable. La sous-population de cellules souches cancéreuses présente au sein d'un GBM étant relativement rare, il paraît primordial de pouvoir isoler et enrichir cette population pour l'étudier. Néanmoins, le marquage préalable des cellules, à l'aide d'anticorps spécifiques, peut engendrer des modifications cellulaires telles que l'activation de la différenciation, ce qui apporterait un biais à l'étude des cellules d'intérêt. A partir de ces observations, et de la maîtrise de la technique de SdFFF au sein du laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de cette technique pour isoler et enrichir les cellules souches cancéreuses, ainsi que pour étudier leur profil de différenciation.

1. Introduction

La SdFFF (Sedimentation Field Flow Fractionation) se définit comme une méthode analytique ou préparative, non invasive, respectant l'intégrité fonctionnelle des cellules étudiées (viabilité, spécificité métabolique, état de maturation). La place de la SdFFF dans les biotechnologies est désormais clairement définie (157-160). Elle a été développée et est

utilisée dans de nombreux domaines tels que la microbiologie au sens large, l'hématologie, la neurologie (développée au sein de notre équipe), la cancérologie ou le domaine des cellules souches (159; 161-180).

La SdFFF est une technique que l'on pourrait apparenter à la chromatographie en phase liquide. Elle permet de fractionner une population cellulaire en fonction de deux caractéristiques majeures : la taille et la densité des cellules analysées. Cette méthode non invasive ne modifie pas la viabilité des cellules, et n'altère ni le stade de différenciation, ni la maturation des cellules. De plus, grâce à cette technique, les sous-populations cellulaires isolées peuvent être remises en culture et étudiées ultérieurement sans risque de modification due à la présence d'anticorps par exemple.

En plus d'avoir des avantages au niveau de la préparation des cellules (absence de marquage au préalable), la SdFFF présente des spécificités de tri qui ne sont pas retrouvées avec les méthodes actuelles. En effet, sur une lignée de neuroblastomes, l'équipe a pu montrer que la SdFFF permettait de trier et donc de séparer des sous-populations cellulaires non différenciables lors d'une étude par cytométrie en flux (181). Cette technique est donc relativement intéressante dans l'étude des CSCs puisque l'isolation de ces cellules reste tout de même l'un des problèmes majeurs concernant leur étude. Afin de mieux comprendre le fonctionnement de la SdFFF, nous allons détailler son principe de fonctionnement.

2. Principe et fonctionnement de la SdFFF

Les méthodes de séparation par couplage flux-force telles que la SdFFF sont similaires à la chromatographie liquide. Néanmoins, dans le cas de la SdFFF, la colonne de chromatographie est remplacée par un canal en forme de ruban de très faible épaisseur (80-250 μm) en comparaison à sa largeur (1-2 cm) et sa longueur (50-90 cm).

Son principe est basé sur l'élution différentielle de diverses espèces microniques ($> 1 \mu\text{m}$) dans une phase mobile (par exemple, utilisation du PBS pour l'élution des cellules) qui passe dans un canal soumis à un champ externe gravitationnel perpendiculaire au canal. Le champ mutigravitationnel utilisé pour le tri est généré par la rotation du cylindre contenant le

canal. Cette technique utilisant la rotation du cylindre est utilisée préférentiellement pour séparer les espèces possédant une taille d'un ordre de grandeur du micron comme le sont les cellules. Un schéma du canal de SdFFF est représenté figure 17.

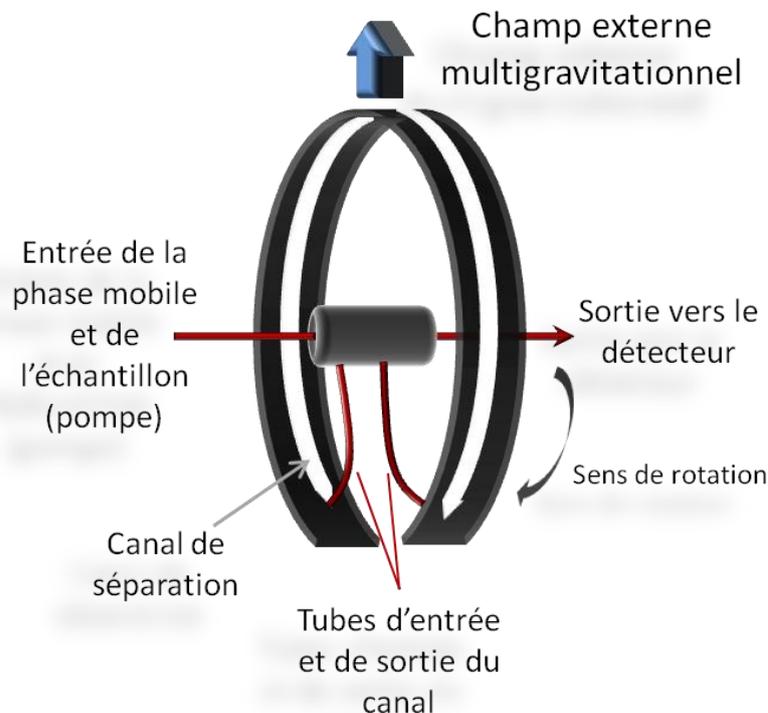


Figure 17 : Représentation schématique d'un canal de SdFFF. Lors d'un tri par SdFFF, les cellules sont injectées au niveau de l'entrée de la phase mobile et de l'échantillon. L'échantillon va alors entrer dans le canal de séparation via le tube d'entrée. Grâce au champ multigravitationnel et au sens de rotation, l'échantillon sera trié et pourra être collecté à la sortie du détecteur.

La difficulté majeure rencontrée lors du tri cellulaire concerne les phénomènes d'adsorption correspondant aux interactions entre les cellules et les parois du canal. Les cellules pourraient être altérées par les parois d'accumulation du canal ou bien encore ralenties lors d'interactions avec le canal ce qui aurait pour conséquence des altérations de l'intégrité cellulaire mais également une baisse d'efficacité du tri. Pour cela, le mode dit « inertiel » est utilisé. Celui-ci permet de faire circuler les cellules dans le canal sans que celles-ci n'interagissent avec la paroi d'accumulation du canal. La séparation des cellules *via* ce mode de tri dépend alors de leur sensibilité à deux forces antagonistes :

- Une force résultant d'un champ externe multigravitationnel généré par la rotation du canal à une vitesse donnée, spécifique de l'espèce ou du type cellulaire trié.

- Une force d'élévation d'origine hydrodynamique générée par un flux constant de la phase mobile (PBS pour le tri cellulaire) réglé à un débit donné, spécifique de l'espèce ou le type cellulaire trié.

La balance de ces deux forces permet la définition d'une position d'équilibre spécifique de chaque population triée. Cette position d'équilibre se trouve au centre du canal ce qui permet d'éviter tout contact avec les parois d'accumulation de celui-ci (Figure 18).

Le principe de tri se base alors sur les caractéristiques physiques des cellules. En effet, en mode inertiel, la SdFFF permet la séparation des cellules en fonction de leur taille, de leur densité et de leur forme. C'est-à-dire que pour des cellules de densité équivalente (et lorsque celles-ci sont en position d'équilibre au centre du canal), les particules de grande taille vont générer plus de forces hydrodynamiques et se placeront donc plus près du centre du canal. Ces particules de plus grandes tailles seront donc éluées plus rapidement et sortiront donc en premier. Inversement les particules les plus petites seront éluées en dernier (Figure 18).

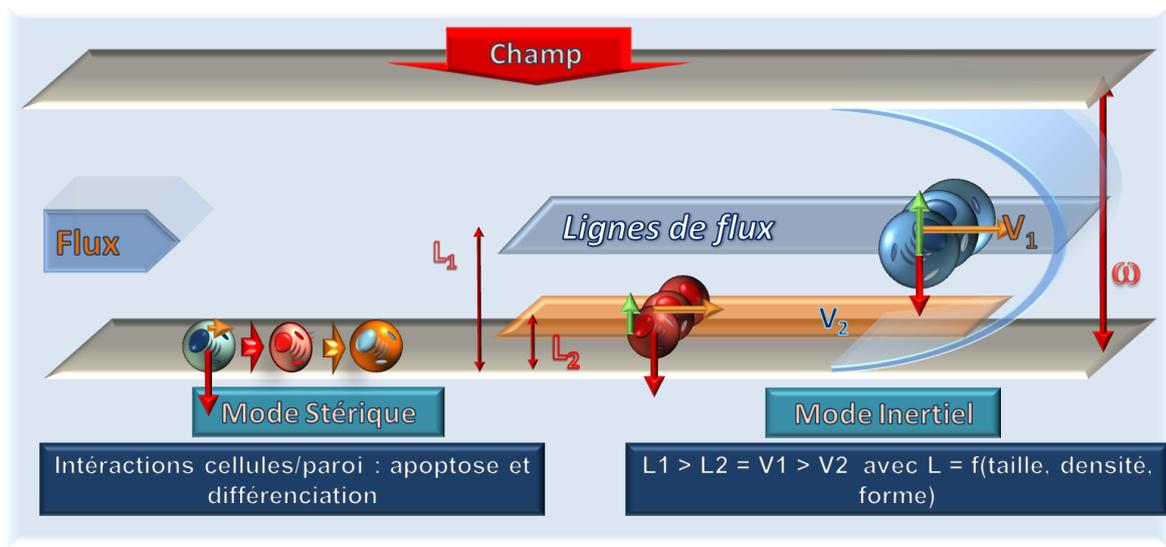


Figure 18 : Représentation schématique du principe d'élué des cellules en SdFFF. L'accumulation des forces (force hydrodynamique et force du champ due à la rotation du canal) ainsi que le flux constant adapté à l'échantillon permet de positionner les cellules au centre du canal. Ce positionnement rendu possible grâce au mode inertiel est idéal pour éviter que les particules ne touchent la paroi d'accumulation du canal et ne soient modifiées comme cela est représenté avec le mode stérique.

Les cellules injectées dans le canal vont alors se positionner au centre de celui-ci et être éluées. A la sortie du canal, les cellules peuvent être collectées. Le passage des

cellules dans le canal leur permet d'être triées et donc de sortir de ce dernier selon un ordre précis. En effet, les forces et le champ appliqués permettent d'éluer les plus grosses cellules en premier, suivies des cellules les plus petites éluées en dernier. Afin de pouvoir faire le suivi des cellules éluées, un détecteur situé en sortie du canal mesure la densité optique (DO) des particules qui le traverse à une longueur d'onde de 254 nm. Ce détecteur permet l'obtention d'un fractogramme sur lequel sont visualisés plusieurs pics correspondant aux différents types de cellules éluées. Les premières cellules éluées correspondent aux cellules les plus volumineuses et les plus denses (cellules différenciées) et les dernières cellules qui sortent du canal correspondent aux cellules les plus petites et les moins denses (cellules indifférenciées) (Figure 19).

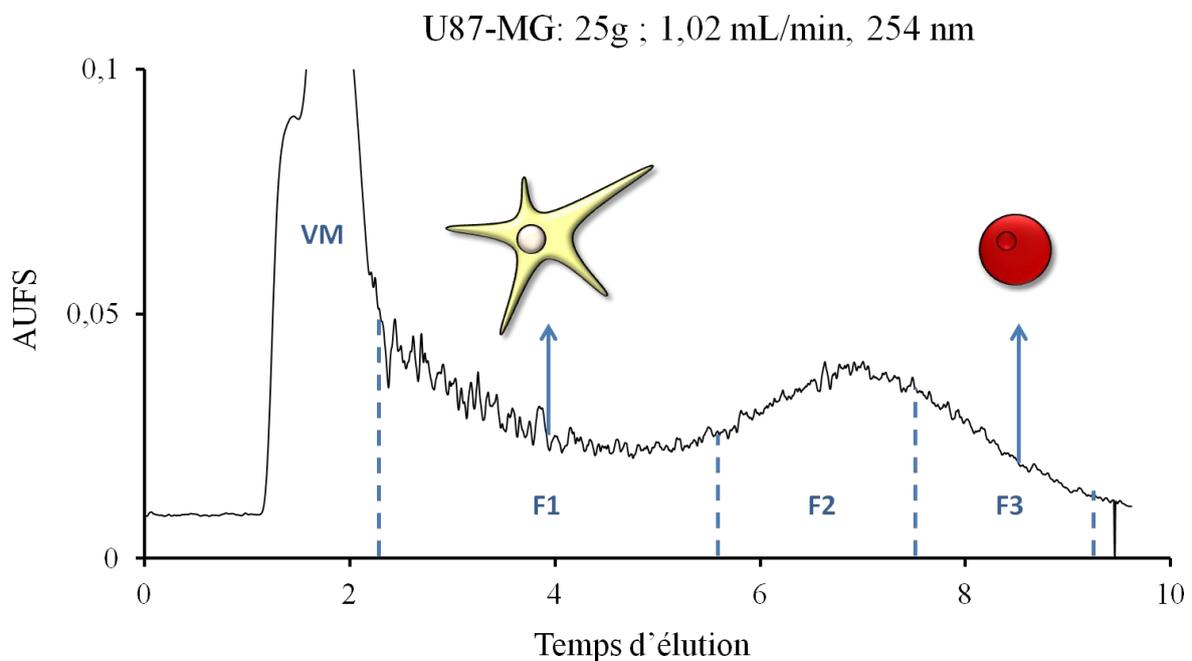


Figure 19 : Fractogramme obtenu lors d'un tri de cellules U87-MG par SdFFF. Les cellules U87-MG sont triées à une vitesse de rotation d'environ 400 rpm (correspondant à un champ externe d'environ 25g) et sous un flux d'environ 1mL/min. L'absorbance des cellules éluées va être mesurée à l'aide du détecteur (254nm) à la sortie du tri formant alors un fractogramme. Le fractogramme débute par le volume mort (ou VM) correspondant aux débris cellulaires, ensuite apparait le pic de cellules. Les fractions récoltées sont notées F1, F2 et F3, la fraction F1 correspondant aux grosses cellules différenciées et la fraction F3 aux petites cellules (indifférenciées). Temps d'élution en minutes et AUFS : Absorbance Unit Full Scale.

La SdFFF et son fonctionnement impliquent donc plusieurs éléments. Une pompe réglée sur un débit spécifique permet un flux constant et donc l'obtention d'une phase mobile de PBS participant aux différentes forces permettant le tri des cellules. Les cellules injectées vont alors se retrouver dans la phase mobile et le flux va permettre de les déplacer jusqu'au canal en rotation. La rotation du canal va permettre la séparation des cellules et leur sortie en fonction de leur taille et de leur densité. Celles-ci vont alors passer dans un détecteur qui va mesurer la densité optique des cellules qui vont le traverser. Le signal obtenu est visualisé sous la forme d'un fractogramme. L'appareillage de SdFFF est décrit figure 20.

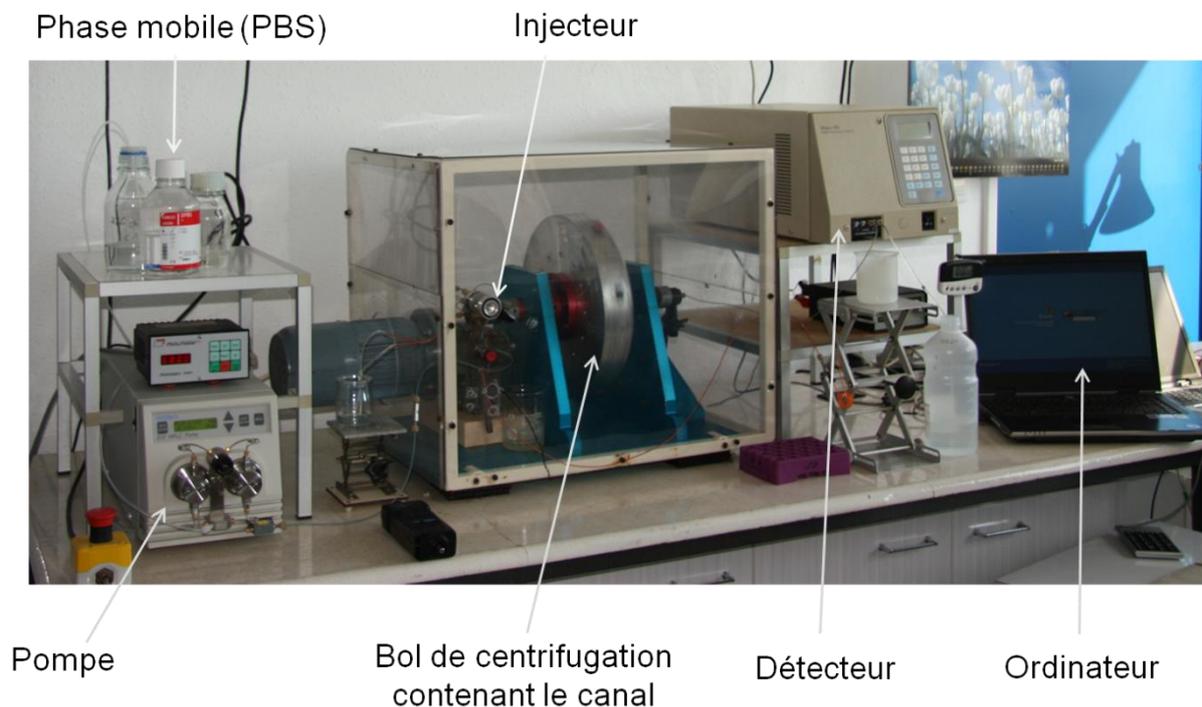


Figure 20 : Composition de l'appareillage de SdFFF.

Le principe de la technique de SdFFF reste relativement simple et présente plusieurs avantages. En effet, cette technique douce de tri permet de séparer des sous-populations cellulaires rares, sans marquage préalable. De plus, elle permet de ne pas modifier l'intégrité des cellules triées et donc d'obtenir une population de cellules viables, que l'on peut analyser directement ou remettre en culture. Cette technique semble donc présenter un intérêt afin d'isoler les CSCs.

Le développement des deux outils précédents devrait permettre d'améliorer la caractérisation des cellules les plus immatures de la tumeur ainsi que leur isolement. Il est probable que ces approches instrumentales ne suffiront pas à renforcer l'arsenal thérapeutique afin de permettre d'une part un suivi clinique de la progression ou de la régression tumorale et d'autre part la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce contexte, l'établissement de signatures moléculaires joue un rôle primordial en tant que valeur prédictive et pronostique d'ajustement de la réponse thérapeutique ainsi qu'afin d'éclairer la classification actuelle des gliomes. Ces approches reposent principalement sur des analyses transcriptomiques et protéomiques qui permettent actuellement d'identifier de nouveaux marqueurs d'agressivité. Leur corrélation avec d'autres marqueurs des différents types histologiques a pour objectif d'améliorer la classification histo-moléculaire des gliomes, indispensable dans la prise en charge et le suivi thérapeutique. L'amélioration de la classification histo-moléculaire des gliomes répond ainsi à 2 objectifs qui sont : (i) compléter les critères morphologiques, actuellement insuffisants pour établir un diagnostic anatomo-pathologique pour une prise en charge précoce, par des critères moléculaires (génétiques, épigénétiques, génomiques, transcriptomiques, protéomiques) ; (ii) Identifier de nouveaux marqueurs caractéristiques des cellules les plus indifférenciées apparentées aux CSCs.

Une étude approfondie des modifications post-traductionnelles des protéines survenant dans les cancers indiquent que ces processus sont majoritaires dans la plupart des tumeurs. Les observations laissent penser que ces modifications pourraient représenter d'excellents biomarqueurs des cancers.

V. Rôle des modifications post-traductionnelles dans les glioblastomes

Un grand nombre de processus post-traductionnels sont susceptibles d'engendrer des modifications de l'état cellulaire pouvant aboutir à des processus oncogéniques. Les travaux ont jusqu'à présent porté plus spécifiquement sur les modifications épigénétiques dans les cancers. L'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN semblent jouer un rôle important. Paradoxalement, les études portant sur l'implication de la glycosylation dans les tumeurs se sont focalisées sur l'analyse de certaines enzymes telles que les sialyltransférases sans rechercher l'expression des gènes impliqués dans la glycosylation. Les travaux de recherche menés en oncologie et plus spécifiquement sur les glioblastomes ont révélé le rôle clé des modifications post-traductionnelles dans le processus de carcinogénèse. Etant donné que les CSCs sont à l'origine des glioblastomes, l'étude de leurs modifications post-traductionnelles pourrait permettre d'une part de mieux les caractériser, et d'autre part d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

A. Les modifications post-traductionnelles dans les différents types cancers

Au cours de la synthèse protéique ou à la suite de celle-ci, les protéines en cours de maturation ou matures peuvent subir des modifications chimiques ou modifications post-traductionnelles. Ces modifications chimiques sont souvent réalisées par une enzyme et peuvent induire des changements au niveau de la protéine tels que des modifications de sa fonction, de son action, de sa demi-vie ou de sa localisation cellulaire. Il existe différents types de modifications post-traductionnelles (plus de 200), nous allons aborder certaines d'entre elles dans cette partie.

a. La phosphorylation

Cette modification post-traductionnelle dynamique intervient dans un grand nombre de processus cellulaires (différenciation, division, prolifération, apoptose...) et en particulier

dans les mécanismes de signalisation cellulaire. Le processus de phosphorylation est connu depuis plus d'un siècle (182). L'équipe de Lipmann a ensuite mis en évidence, en 1932, la présence d'une phosphosérine dans la vitelline (183). Enfin, l'équipe de Burnett a décrit pour la première fois la phosphorylation d'une protéine en 1954 dans un modèle de mitochondrie issue de foie de rat (184).

La phosphorylation entraîne des modifications de structure des protéines et donc des modifications fonctionnelles de celles-ci. Ces modifications majeures peuvent se traduire par : une augmentation ou une inhibition de l'activité enzymatique, un changement de la localisation cellulaire et/ou l'association avec d'autres protéines. Ce mécanisme de phosphorylation effectué par les kinases peut-être reversé par le mécanisme de déphosphorylation catalysée par les phosphatases. Le mécanisme de phosphorylation est indispensable à la vie cellulaire car il en régule tous les aspects (185). Il s'agit de la modification post-traductionnelle la plus courante puisqu'une protéine sur trois est retrouvée phosphorylée (185).

Le mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation est un système de régulation cellulaire idéal puisqu'il présente une réversibilité ainsi qu'une réponse relativement rapide aux stimuli. Cette modification intervient donc dans différents processus tels que dans les voies de transduction des signaux extracellulaires (186), dans l'activité enzymatique (187), la localisation et l'adressage des protéines (187) et la régulation du cycle cellulaire (188). Le mécanisme de phosphorylation correspond à l'ajout d'un ou plusieurs groupements phosphate apportés par une molécule d'ATP sur un acide aminé hydroxylé (sérine, thréonine ou tyrosine) d'une protéine. Cet apport de groupement phosphate va pouvoir engendrer une modification de la protéine cible qui va alors pouvoir activer d'autres protéines et donc entraîner une cascade d'activation. Ce phénomène est retrouvé dans différentes voies de signalisations telles que celles des MAPKs (189-191).

La phosphorylation des protéines peut entraîner l'activation de certaines voies de signalisation menant à la prolifération, l'activation de l'apoptose ou la transcription de gènes spécifiques. Si ces voies de signalisation ou si la phosphorylation de certaines protéines sont modifiées cela peut mener à l'apparition de cancers. En effet, il a été montré dans le cancer du poumon, l'existence d'un set de phosphorylation retrouvé dans les tissus cancéreux permettant de les distinguer des tissus sains (192). Cela a pu mener au développement d'une signature de phosphorylation des protéines et d'activation de certaines voies spécifiques au cancer du poumon (192). Par ailleurs, l'équipe de Takayama a montré que la diminution de l'expression de la β -caténine était corrélée à l'invasion tumorale et au

mécanisme de métastase dans le cancer colorectal. Cette diminution d'expression étant liée à l'augmentation de la phosphorylation de la β -caténine dans les cellules cancéreuses en comparaison avec l'épithélium sain (193). Enfin, des phosphorylations aberrantes ont aussi été retrouvées dans les GBMs. En effet, il a été montré que des patients atteints de GBMs possédant des forts taux de phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (ou Signal Transducer and Activator of Transcription protein 3) sur son résidu Tyrosine 705 ont un taux de survie inférieur à ceux dont STAT3 n'est pas ou peu phosphorylé (194). De plus, les cellules de GBMs expriment un mutant du récepteur à l'EGF : l'EGFRvIII (ou variant 3) qui possède une activité tyrosine kinase constitutive (195). Ce variant participe à la tumorigénicité des GBMs par induction d'une phosphorylation constitutive de ERK (ou Extracellular Regulated Kinases) et de PI3K dans les cellules de GBMs (195).

b. L'acétylation et la désacétylation des histones

L'acétylation correspond à l'addition d'un groupement $\text{CH}_3\text{-C=O}$ (ou groupement acétyle) sur les résidus lysine en position N-terminale ou au sein de la chaîne polypeptidique. Cette modification post-traductionnelle peut entraîner un changement de conformation des protéines ainsi que modifier leur interaction avec leurs cibles. Ce mécanisme est catalysé par des acétyltransférases ou HAT (pour Histones Acetyltransferases) et est réversible ou le clivage sera catalysé par des désacétylases ou HDAC (pour Histones Desacetylases). Ces modifications ont un impact sur la structure de la chromatine et jouent donc un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes. L'hyper-acétylation des histones est associée à l'activation de la transcription *via* l'augmentation de la compacité de la chromatine créant des sites de fixation pour des complexes d'activation de la transcription. La désacétylation des histones entraîne la répression de la transcription par des processus inverses.

Dans les cancers, une grande partie des protéines régulées par acétylation est impliquée dans la progression tumorale. En effet, des modifications d'expression et/ou d'activité d'enzymes impliquées dans l'acétylation ainsi qu'une modification de l'équilibre acétylation/désacétylation pourraient jouer un rôle clé dans la transformation cellulaire et l'acquisition d'un phénotype malin. Cela est confirmé par des activités aberrantes des HATs et des HDACs observées dans des cellules cancéreuses. L'activité HAT est modifiée dans un grand nombre de cancers où l'on observe amplification, surexpression ou mutation de

celle-ci. Par exemple, il a été montré la présence de mutations faux-sens ou une délétion de p300 dans des tumeurs colorectales et gastriques ainsi que dans d'autres cancers épithéliaux (196). De la même manière, les HDACs sont requises pour la croissance cellulaire et jouent un rôle dans le développement et la croissance des cancers en réprimant par exemple l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs. En effet, HDAC1 est retrouvée surexprimée dans des cellules du cancer de la prostate, HDAC2 est retrouvée surexprimée dans les carcinomes gastriques et colorectaux, dans les dysplasies cervicales ainsi que dans les sarcomes du stroma endométrial (197-200).

L'implication du mécanisme d'acétylation ou de désacétylation des histones dans la tumorigénicité a aussi été décrite dans les glioblastomes. Kim et coll. ont pu mettre en évidence l'implication de ce mécanisme dans la résistance aux traitements des GBMs. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC permet d'augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux dans un modèle de GBMs (201). De plus, l'analyse des transcrits et des protéines des différentes classes de HDACs révèle une corrélation négative entre l'expression des gènes des HDACs et le grade des gliomes étudiés, suggérant un rôle majeur des HDACs de classe II et IV dans la malignité des gliomes. L'évaluation des niveaux d'acétylation des histones permet de conclure que l'histone H3 est plus acétylée dans les GBMs que dans les tissus sains (202).

c. La méthylation

La méthylation de l'ADN correspond au transfert d'un groupement méthyle ($-CH_3$) sur des résidus cytosines en position 5' appartenant à des dinucléotides CG. On parlera alors de 5-méthylcytosine (5mC). La méthylation des acides aminés après leur incorporation dans la chaîne polypeptidique au cours de la traduction est catalysée par un groupe de trois enzymes appelées méthyltransférases. Ces méthyltransférases (DNMT1, DNMT3A et DNMT3B) vont transférer un groupement méthyle au niveau des cytosines de l'ADN qui précèdent des guanines (dinucléotides CpGs). Les dinucléotides CG ne sont pas répartis de façon uniforme dans le génome mais il existe un enrichissement dans de courtes régions appelées îlots CpGs. Ces îlots sont positionnés au niveau du promoteur et/ou du premier exon de plus de 60% des gènes humains et ces zones riches en CpGs sont généralement non méthylées dans les cellules normales. La méthylation de l'ADN a différents effets sur le

génomique des mammifères tels que la répression de la transcription, la modulation de la structure de la chromatine ou l'inactivation du chromosome X (38).

Différentes formes de méthylation anormale sont observées au niveau du génome des cellules cancéreuses :

- L'hyperméthylation qui induit la « mise sous silence » ou la diminution de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que des mutations.

- L'hypométhylation locale de gènes spécifiques induisant l'expression et/ou la surexpression d'oncogènes.

- L'hypométhylation globale de l'ADN qui entraîne l'instabilité génétique, des phénomènes de délétions, d'activation des retrotransposons ainsi que des réarrangements de la chromatine.

Il est décrit, par exemple, que le gène FHIT qui est un gène suppresseur de tumeur induisant l'apoptose *via* l'activation de la caspase 8, est retrouvé inactif dans des cellules de carcinome rénal. Cette inactivation étant due à son hyperméthylation (203). De même, Hanada et collaborateurs montrent en 1993 que le gène codant pour Bcl-2 est souvent hypométhylé dans des leucémies lymphoïdes chroniques. Cette hypométhylation entraîne la surexpression du proto-oncogène Bcl-2 dans ces leucémies (204). Dans le cas de cancers ovariens épithéliaux, l'hyperméthylation du gène codant pour la protéine BRCA1 (Breast Cancer susceptibility gene 1) induit la perte de son expression et l'hypométhylation globale augmente avec la malignité du grade, suggérant ainsi qu'une augmentation de l'hypométhylation globale entraîne une recombinaison entre des éléments homologues menant à des aberrations chromosomiques associées avec le cancer (205).

Dans le cas des gliomes, il a été montré en 2006 que le promoteur de BIK (pour Bcl-2 Interacting Killer), qui est un gène pro-apoptotique, est retrouvé hyperméthylé dans 30% des gliomes primaires étudiés, cela entraînant l'inhibition de sa fonction proapoptotique (206). De la même manière, des cas d'hypométhylations spécifiques de gènes ont été retrouvés dans les gliomes. En effet, le promoteur du gène codant pour la survivine est retrouvé déméthylé dans des cellules tumorales, alors qu'il est normalement hyperméthylé dans un tissu sain. Cette méthylation anormale observée dans des astrocytomes entraîne la surexpression de ce gène de survie cellulaire (207). Enfin, différentes hyperméthylations de gènes ont été utilisées comme marqueur pronostic de réponse à un traitement telle que la méthylation du gène de la MGMT (208) ou comme pronostic de survie (209).

Il existe beaucoup d'autres types de modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitinylation, la carboxylation... Cependant la glycosylation reste la modification post-traductionnelle la plus couramment rencontrée dans les tumeurs.

B. Implication de la glycosylation dans les cancers

La glycosylation est l'une des modifications post-traductionnelles des protéines la plus fréquente, ce mécanisme pourrait donc jouer un rôle clé dans les différentes étapes de la tumorigenèse. De nombreuses modifications de la glycosylation des chaînes oligosaccharidiques ont été constatées dans de nombreux cancers (210). Par ailleurs, les glycosphingolipides ont été de la même manière retrouvés impliqués dans différents cancers.

a. Mécanisme et définitions

La glycosylation est une modification post-traductionnelle qui permet l'ajout séquentiel d'un ou plusieurs monosaccharides sur des protéines (Figure 21). Les glycoprotéines sont ensuite destinées à être sécrétées ou ancrées dans la membrane plasmique. La détermination de la structure des glycoprotéines reste très complexe. En effet, chaque ose possède plusieurs hydroxyles libres et chacun d'entre eux peut établir une liaison avec d'autres oses ou composés. Ainsi, le nombre de combinaisons de polysaccharides en résultant est immense et la longueur des chaînes glycaniques est très variable puisque certaines ne sont constituées que d'un à dix monosaccharides tandis que les autres en possèdent une centaine.

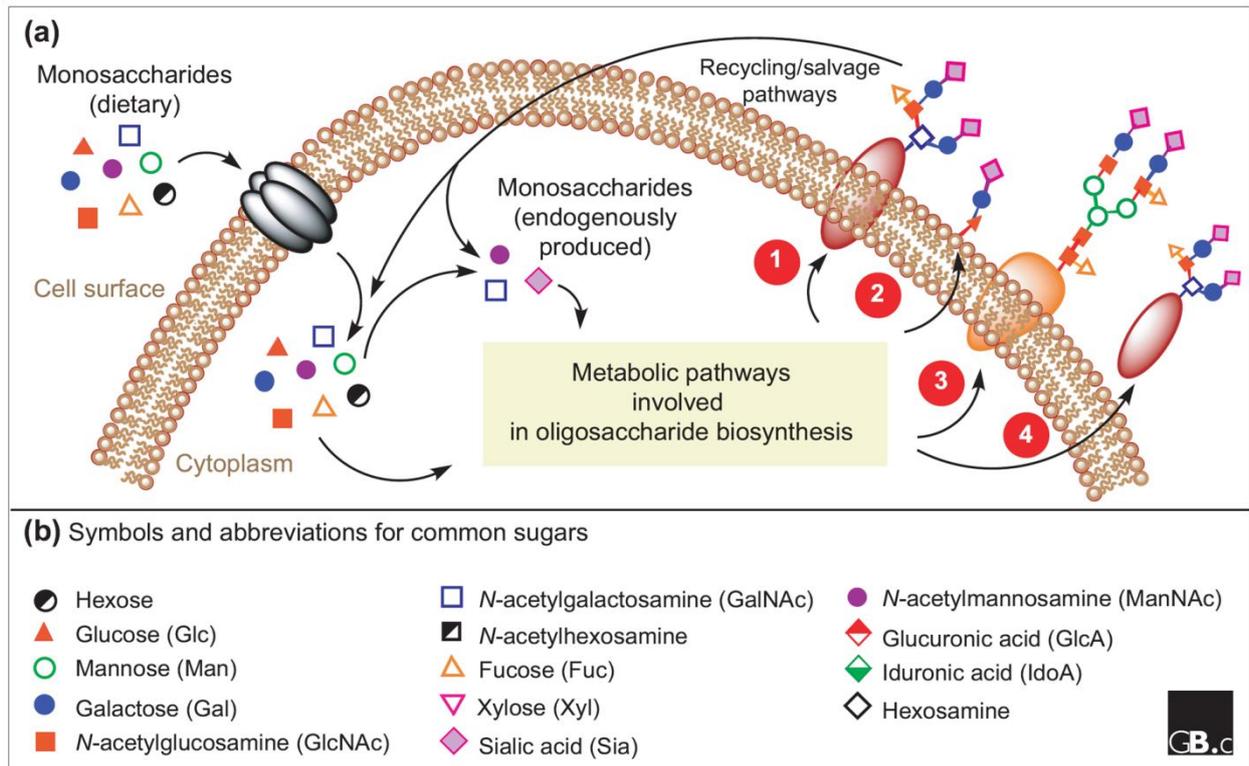


Figure 21 : Représentation du processus de glycosylation. **a** : Les carbohydrates complexes sont assemblés à partir de sucres obtenus de sources alimentaires, de la conversion endogène d'autres monosaccharides, ou à partir de voies de recyclage. Les oligosaccharides de composition diverse peuvent être attachés à différentes protéines intégrées dans la membrane plasmique (1 et 3) ou directement aux lipides (2). Collectivement, ces sucres de la surface cellulaire (1,2 et 3) donnent une identité moléculaire spécifique à chaque cellule. Les oligosaccharides peuvent aussi se fixer sur les protéines sécrétées (4). **b** : Symboles et abréviations utilisés communément pour les sucres. Issu de Yarema K.J. and Bertozzi C.R., « Characterizing glycosylation pathways », 2001, (211).

Le phénomène de glycosylation concerne à la fois les protéines et les lipides. La nature de la liaison réalisée entre le premier glycanne et la partie aglycone (partie non glucidique d'une glycoprotéine ou d'un glycolipide) permet de définir le type de glycosylation mais également les différentes classes de glycannes et de glycoconjugués (figure 22). Les chaînes d'oses sont liées aux protéines par des liaisons *O*-glycosidiques ou *N*-glycosidiques selon leur site d'ancrage. Les chaînes liées par des liaisons *O*-glycosidiques sont plus courtes (1 à 3 résidus d'oses) et plus variables que celles liées par les liaisons *N*-glycosidiques qui peuvent former des antennarisations. Les deux principaux types de glycosylation qui découlent de ce mode d'organisation sont donc la *O*-glycosylation et la *N*-glycosylation. Différentes modifications des résidus osidiques comme la phosphorylation, la sulfatation, la méthylation ou bien l'acétylation peuvent également augmenter la richesse des glycannes et influencer leurs fonctions biologiques (212).

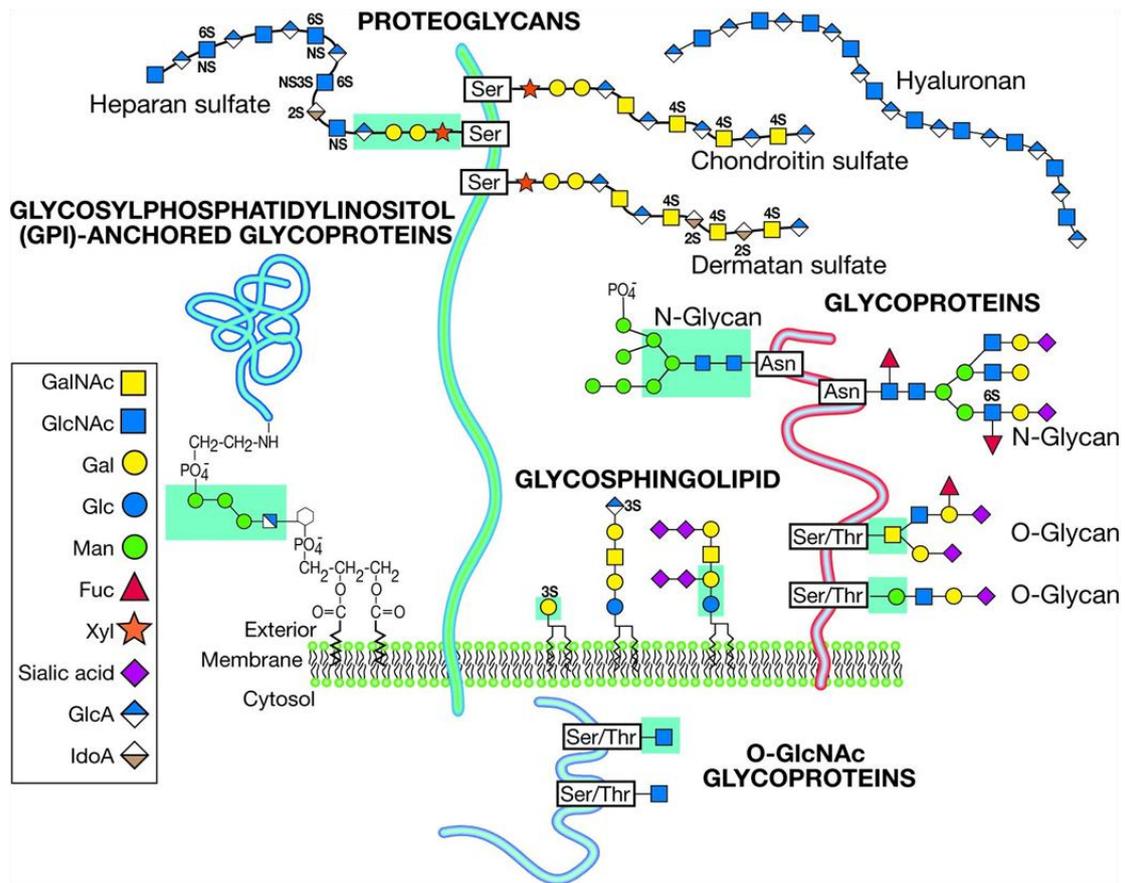


Figure 22 : Principales classes de glycoconjugués et de glycanes. *Extrait de Varki et al., « Essentials of Glycobiology, 2nd Edition », 2009, (212).*

La N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique rugueux de la cellule et se termine dans l'appareil de Golgi tandis que l'O-glycosylation, qui porte principalement sur des résidus hydroxylés, se déroule uniquement dans l'appareil de Golgi. Usuellement une glycoprotéine est un glycoconjugué dont la partie protéique porte un ou plusieurs oligosaccharides O- et/ou N-liés (212). De plus, une même protéine peut exister sous différents isoformes possédant entre eux une hétérogénéité de glycosylation. Ces isoformes sont alors appelés glycoformes (213).

Une grande partie des tumeurs présente des antigènes glycosylés (ou TACAs pour Tumor Associated Carbohydrate Antigens) surexprimés. La plupart de ces antigènes sont syalisés suggérant que l'augmentation d'expression des sialyltransférase pouvait être corrélée à l'expression des TACAs. Cette expression peut donc être utilisée comme marqueur de certains types de cancers puisque les glycosyltransferases catalysent les premières étapes de la biosynthèse des gangliosides. Ces derniers et plus particulièrement les séries b- et c- sont surexprimés dans différents cancers d'origine neuro-ectodermique,

dont le cancer du sein (214). Etant donné leur origine embryonnaire commune, il est probable que les gangliosides soient également surexprimés dans les tumeurs d'origine cérébrale telles que les gliomes et notamment le glioblastome.

La biosynthèse des gangliosides joue un rôle fondamental dans l'élaboration des glycoprotéines. Cette phase met en jeu de nombreux gènes impliqués dans la glycosylation. Une connaissance des étapes principales de cette biosynthèse semble déterminante afin d'analyser le rôle exact de la N-glycosylation et l'importance des gènes étudiés dans le processus de cancérisation.

b. Biosynthèse des gangliosides

Les gangliosides appartiennent à une famille hétérogène de lipides appelée glycosphingolipides (GSL). Les GSL sont des composés amphiphatiques de la membrane plasmique faisant partie du glycocalix qui la recouvre. Ils sont constitués d'une structure céramide hydrophobe ancrée dans la bicouche lipidique et d'une chaîne de sucres, hydrophile, exposée au milieu extracellulaire. Les GSL présentent une énorme hétérogénéité de structure, tant dans la partie céramide que dans la chaîne glycosidique. Cependant, malgré un grand nombre de combinaisons possibles, seul un nombre restreint de GSL est retrouvé dans les différents organismes. Ils sont regroupés en séries, définies par la composition et l'enchaînement de la chaîne oligosaccharidique qui fonde la classification des GSL. On distingue alors les GSL neutres, les sulfato-GSL et les gangliosides.

Les gangliosides sont des GSL dont le céramide est substitué par une chaîne glycanique contenant de l'acide sialique ou acide neuraminique. Ce résidu est généralement sous la forme d'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) ou N-glycolylneuraminique (NeuGc). L'ensemble des acides neuraminiques est regroupé sous le nom d'acide sialique. Ces derniers sont dénommés par des abréviations correspondant au nombre de résidus acides sialiques présents dans la molécule : GM pour monosialoganglioside, GD pour disialoganglioside, GT pour trisialoganglioside et par leur ordre de migration en chromatographie (GM3, GM2, GM1...).

Les gangliosides sont largement exprimés dans les tissus des mammifères, selon un profil spécifique de l'espèce, de l'organe ou du tissu considéré, de la cellule, ainsi que du stade de développement de l'organe ou de différenciation de la cellule. Ils sont

particulièrement abondants dans les tissus nerveux et le cerveau. On les retrouve cependant quasiment dans tous les tissus de l'organisme, principalement sous forme de GM3 et de GD3 (215).

D'une manière générale, la biosynthèse des gangliosides correspond à une glycosylation séquentielle du céramide. Les additions successives de résidus monosaccharidiques sont catalysées par différentes enzymes de la famille des glycosyltransférases. Chaque réaction implique le transfert d'un résidu monosaccharidique depuis un donneur nucléotide-sucre à un accepteur. Les différentes étapes de la biosynthèse des gangliosides s'accompagnent d'un transport intracellulaire de molécules de plus en plus grosses du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi puis à la membrane plasmique.

Le céramide formé dans le réticulum endoplasmique est d'abord transporté jusqu'à la face cytosolique de l'appareil de Golgi par des voies mettant en jeu des vésicules membranaires ou alternativement une protéine de transfert du céramide. La glucosylcéramide synthase lui transfère alors un résidu glucose depuis l'UDP-glucose. Toutes les autres enzymes de glycosylation de la biosynthèse des gangliosides se trouvant du côté luminal, le glucosylcéramide ainsi formé est transloqué. A ce niveau, une galactosyltransférase ajoute un résidu galactose sur le glucosylcéramide pour former le lactosylcéramide, précurseur commun de tous les gangliosides, mis à part le GM4 synthétisé directement à partir du glucosylcéramide (216) (Figure 23).

Les résidus monosaccharidiques suivants sont alors transférés à la chaîne glycanique par différentes étapes spécifiques au niveau de la face luminale du Golgi. Le lactosylcéramide et ses dérivés sialylés, GM3, GD3 et GT3, obtenus par l'action de sialyltransférases, servent de précurseurs pour la biosynthèse des gangliosides complexes des séries 0, a, b, c (Figure 23). Ces différentes séries sont caractérisées par l'absence (série-0), ou la présence d'un (série-a), de deux (série-b) ou trois (série-c) acides sialiques liés sur le premier résidu galactose.

Les sialyltransférases I, II et III catalysant les premières étapes de la biosynthèse des gangliosides (formation du GM3, GD3 et GT3) présentent une spécificité importante pour leur substrat. Les quantités relatives des glycolipides précurseurs LacCer, GM3, GD3 et GT3 semblent déterminer en partie les taux de gangliosides des séries 0, a, b et c qui en dérivent respectivement. En revanche, les glycosylations successives de ces précurseurs sont catalysées par des glycosyltransférases à faible spécificité, la N-acétylgalactosamine transférase (GalNAcT) et la galactosyltransférase II (GalT-II) ainsi que les deux

sialyltransférases ST-IV et ST-V. Elles transfèrent un résidu saccharidique sur des accepteurs qui diffèrent uniquement par le nombre d'acides sialiques liés au galactose, c'est à dire par leur série.

Les glycosyltransférases présentes et actives dans l'appareil de Golgi varient en fonction du type cellulaire, du stade de développement, ou d'un état pathologique (216). Cet équipement enzymatique conditionne la composition en gangliosides de la cellule. Les GM3, GD3 et GT3 synthèses revêtent une importance particulière car elles gouvernent respectivement l'entrée dans la voie de biosynthèse des séries-a, -b, et -c (figure 23).

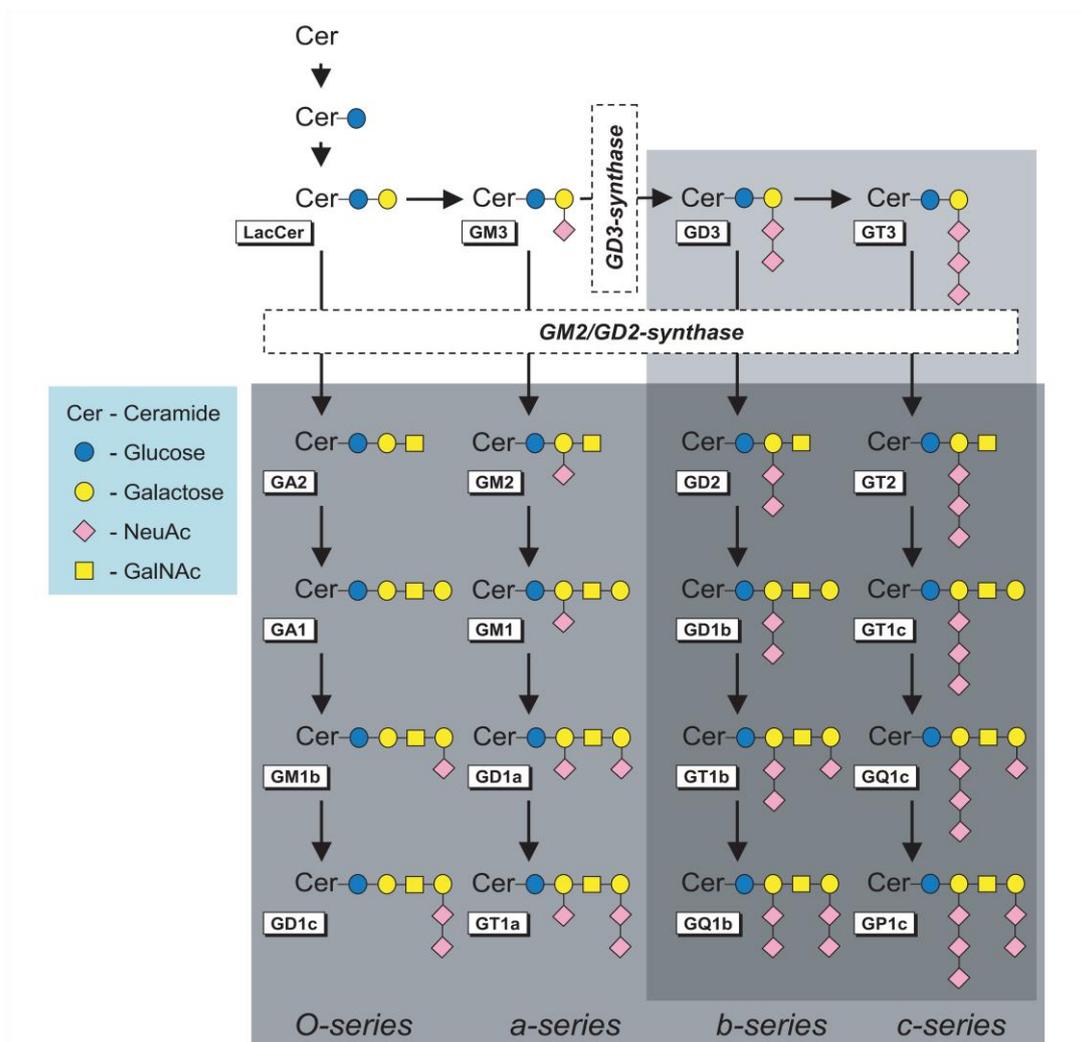


Figure 23 : Voies de biosynthèse des gangliosides. Les gangliosides sont représentés selon la nomenclature de Svennerholm (217). NeuAc, N-acetylneuraminic acid (= sialic acid); GalNAc, N-acetylgalactosamine. D'après Plomp et Willison, « Pathophysiological actions of neuropathy-related anti-ganglioside antibodies at the neuromuscular junction », 2009, (218).

Les gangliosides ont été rapportés comme impliqués dans différentes pathologies telles que le syndrome de Guillain-Barré ou la maladie de Tay Sachs entre autres (219). De plus, certains gangliosides sont considérés comme antigènes spécifiques de différentes tumeurs. Ainsi, l'expression du ganglioside GD3 est associée à un phénotype tumoral dans le cas du mélanome et celle-ci est augmentée dans des cellules métastatiques (220-222). Dans le cas du cancer du foie, les tumeurs expriment différents gangliosides (223), et le GD2 est considéré comme marqueur jouant un rôle dans l'acquisition du phénotype malin du cancer du foie à petites cellules (223). L'expression du ganglioside GD3S est aussi corrélée à un phénotype malin dans le cas du cancer du sein puisque semble participer à la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (224).

Dans le cas des tumeurs cérébrales, l'expression des gangliosides a été étudiée et corrélée à l'agressivité tumorale. Ainsi, un taux d'expression élevé de GD3S associé à une diminution de l'expression des GM2/GD2 synthases est corrélé avec une augmentation du taux de survie des patients atteints de gliomes (225).

Les changements d'expression des gangliosides dans les tumeurs cérébrales pourraient donc servir de marqueurs pronostiques ou diagnostiques au même titre que des modifications de N-glycosylation.

c. La N-glycosylation

La N-glycosylation se déroule pendant la traduction et correspond à la liaison d'un N-glycane par une liaison N-glycosidique entre un résidu asparagine, contenu dans la séquence Asn-X-Ser/Thr, et un résidu de GlcNAc. Ce mécanisme a lieu au niveau du réticulum endoplasmique granuleux (REG) (226), où les N-glycannes sont sous la forme de précurseurs oligosaccharidiques, et se termine au sein de la lumière de l'appareil de Golgi. Tous les N-glycannes possèdent en commun un « cœur » composé d'une séquence de sucres, et sont ensuite classés en trois groupes distincts (212) (figure 24) :

- N-glycannes de type oligomanosidique où seulement les résidus mannose sont attachés au « cœur ».
- N-glycannes de type complexe où les « antennes » initiées par des N-acétylglucosaminyltransférases (ou GlcNAcTs) sont attachées au « cœur ».

- N-glycannes de type hybride où seulement les résidus mannose sont attachés au bras Man_α1–6 du « cœur » et une ou deux antennes sur le bras Man_α1–3 du « cœur ».

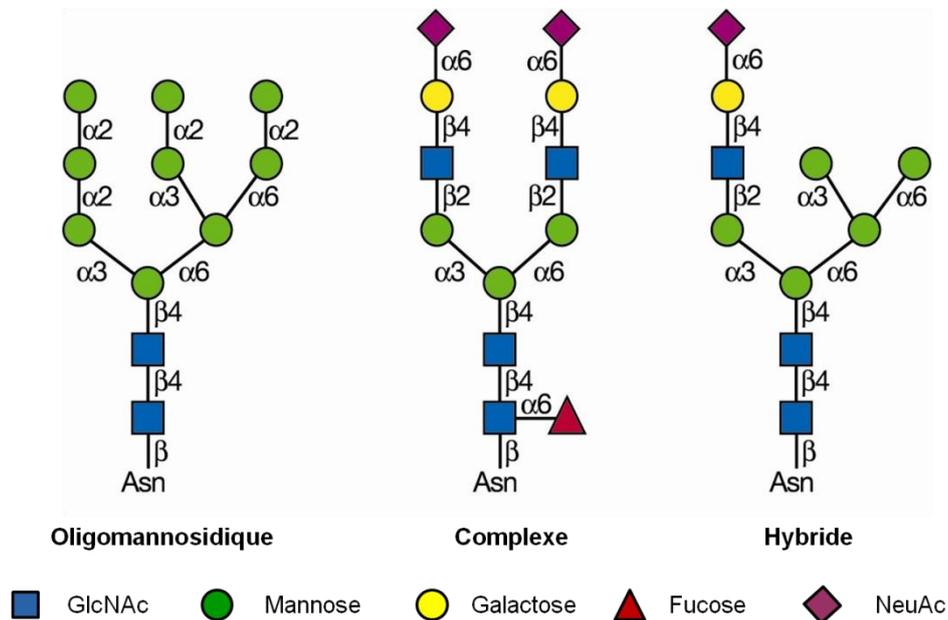


Figure 24 : Représentation schématique des différentes classes de N-glycannes. Les N-glycannes ajoutés aux protéines sur des séquences Asn-X-Ser/Thr sont de trois grands types sur une glycoprotéine mature : oligomannosidique, complexe et hybride. Chaque glycanne possédant le même cœur Man₃GlcNAc₂Asn. GlcNAc : N-acétylglucosamine ; NeuAc : Acide N-Acétylneuraminique. Adapté de Varki et al., « *Essentials of Glycobiology*, 2nd édition », 2009, (212).

Les glycoprotéines N-glycosylées présentent une grande diversité de structure. En effet, les différents sites d'une même protéine peuvent être glycosylés de diverses manières. La conformation de la protéine peut alors avoir une influence sur les étapes de la N-glycosylation se déroulant dans le REG et l'appareil de Golgi. Cela favorise ou non l'accessibilité du substrat aux diverses glycosyltransférases. D'autres facteurs tels que le métabolisme des nucléotides sucres, leur transport dans le REG ou l'appareil de Golgi, la localisation et le taux d'expression des différentes glycosyltransférases contribuent à la diversité des structures glycaniques des N-glycoprotéines.

L'altération des processus de modifications post-traductionnelles, ou des facteurs responsables de ces modifications, peut participer au développement tumoral et à l'agressivité des tumeurs. Tout changement survenant dans le mécanisme de glycosylation peut induire l'initiation et/ou la progression d'un phénotype tumoral.

d. Glycosylation et cancers

Les processus de glycosylation jouent un rôle clé dans les différentes étapes de la tumorigenèse (figure 25). En effet, une grande partie des glycanes sont sous forme de glycoconjugués ancrés à la membrane (comme le glycocalyx) ou sous forme de molécules sécrétées faisant partie intégrante de la matrice extracellulaire (ou ECM pour Extracellular Matrix). Les glycanes se trouvent donc dans une localisation leur permettant de participer à différents mécanismes tels que l'adhésion et la motilité cellulaire ainsi que la signalisation d'évènements intracellulaires (212). Des glycosylations aberrantes sont ainsi observées dans la plupart des tumeurs et sont généralement associées à une dérégulation des fonctions d'adhésion et de migration cellulaires normales conduisant aux processus tumoraux de métastase et d'invasion (227). L'expression de certains gènes de la glycosylation tels que les gènes des sialyltransférases pourrait jouer un rôle clé dans la levée de la résistance aux traitements et ainsi inhiber la formation de la tumeur (228).

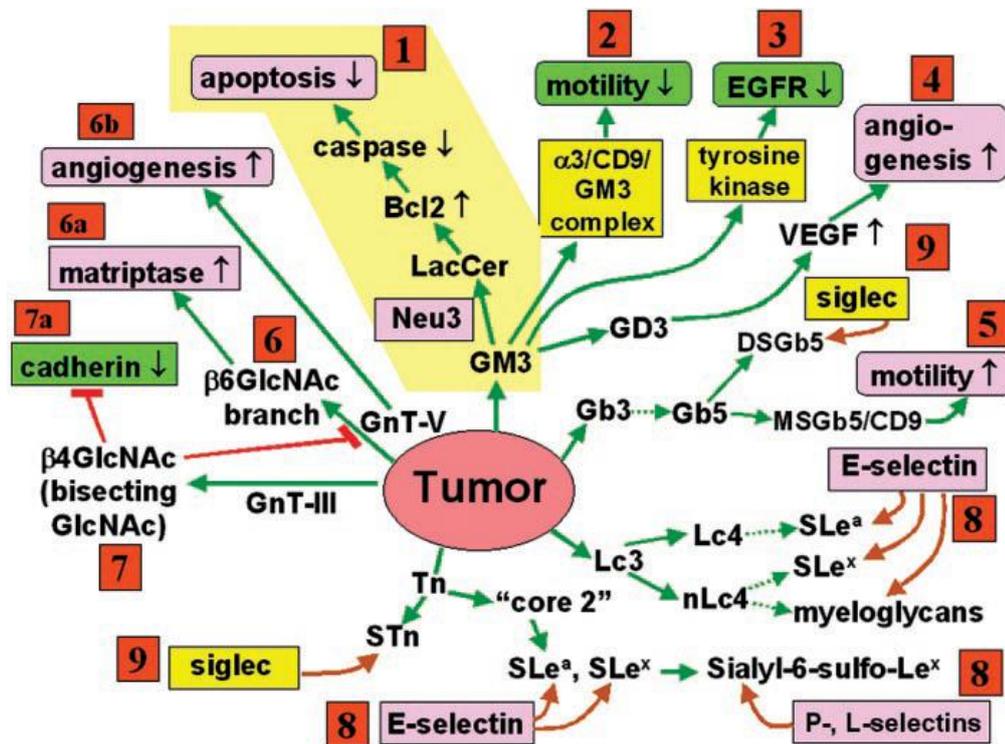


Figure 25 : La glycosylation définit la malignité (tumeurs au phénotype invasif et métastatique). La malignité de la cellule tumorale est définie par plusieurs phénotypes clés : l'apoptose (1), la motilité (2 et 5), l'EGFR (3), l'angiogenèse (4 et 6b), l'activité de la matriptase (matrix-destroying enzyme) (6a), l'adhésion cellulaire (via les cadhérines) (7a), l'adhésion à la matrice extracellulaire (via les intégrines), l'adhésion aux plaquettes (via la E- ou P-sélectine) (8), l'adhésion aux cellules sanguines et autres cellules du parenchyme (via les siglecs) (9). Chaque phénotype est sur- ou sous-réglé en fonction des différents statuts de glycosylation. Les phénotypes représentés par les cadres verts inhibent l'invasion tumorale. Ceux représentés en rose activent l'invasion tumorale. Les épitopes glycosylés capables de lier des ligands spécifiques (cadres roses sans flèche) participent à l'invasion. Les ligands représentés en jaune ont des effets variables ou pas clairement définis sur l'invasion. Il est important de noter qu'un phénotype spécifique est produit par différentes glycosylations et une glycosylation donnée produit différents phénotypes. Les modifications de phénotype ont des effets coopératifs sur la malignité. Par exemple, GM3 inhibe la motilité via des complexes $\alpha 3 / \text{CD}9$ et inhibe aussi l'EGFR (2 et 3). La diminution de GM3 inhibe l'apoptose (1) mais promeut la motilité et la prolifération (effets négatifs 2 et 3). Toutes les voies de glycosylation activent de multiples glycosyltransférases et leurs gènes sont connus. Cependant, le mécanisme par lequel chaque type de glycosylation affecte les différents phénotypes doit être encore étudié. S : sialyl ; MS : monosialyl ; DS : disialyl. D'après Hakomori, S., « Glycosylation defining cancer malignancy : new wine in an old bottle », 2002, (227).

Dans l'environnement tumoral, des modifications de glycosylation permettent aux cellules malignes d'éviter certains événements se déroulant au cours du développement (l'activation de récepteurs, l'adhésion et la motilité cellulaires par exemple) menant à l'invasion des cellules tumorales dans l'organisme (212). Des glycosylations aberrantes surviennent donc dans la majorité des cancers humains probablement dues au fait que les

glycannes participent aux évènements physiopathologiques majeurs impliqués dans la progression tumorale (figure 26) (229).

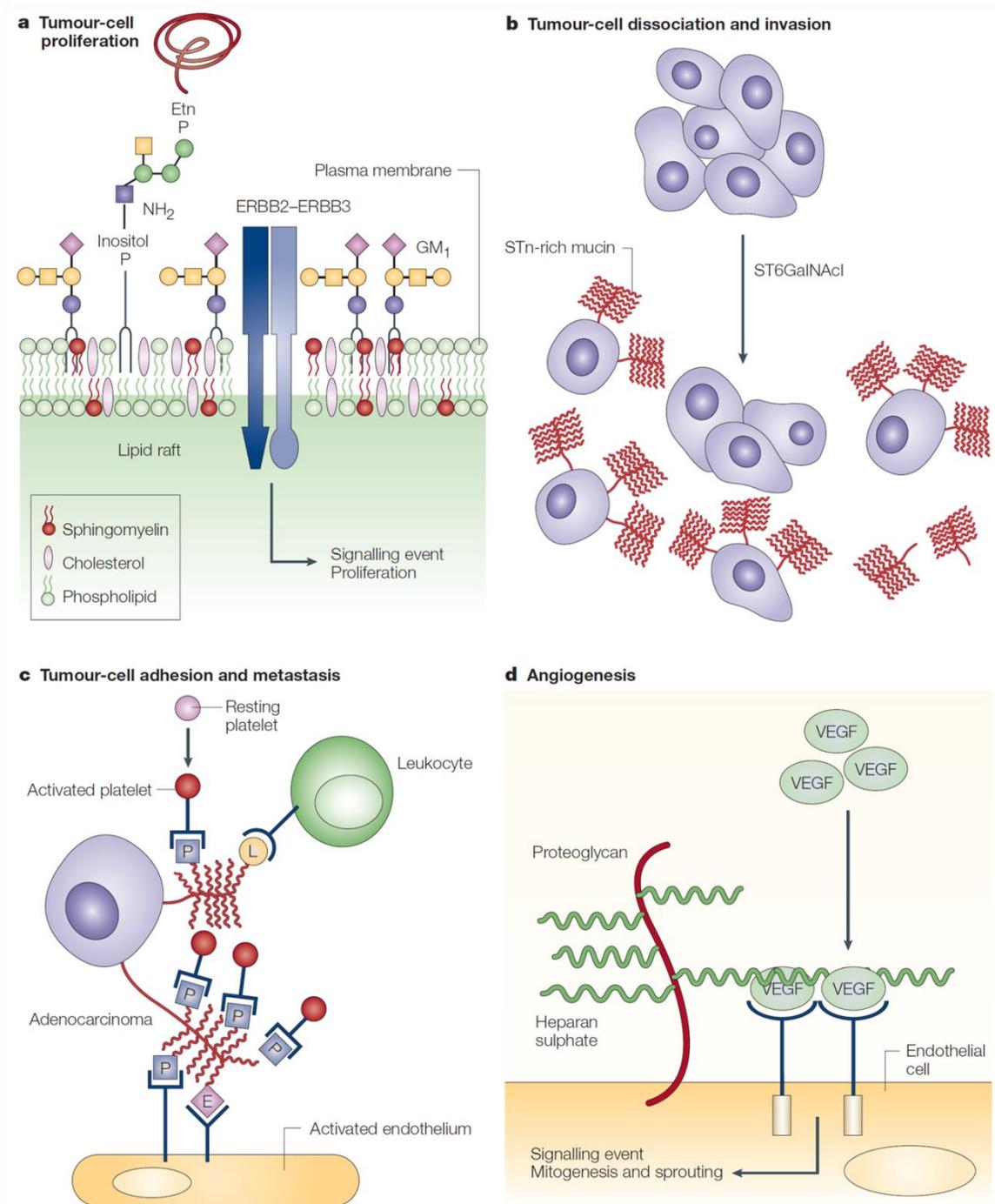


Figure 26 : Les glycannes participent aux évènements pathophysiologiques durant la progression tumorale. La prolifération tumorale est cruciale durant les stages précoces de progression et après l'étape de métastase, lorsque des tumeurs secondaires se forment à des sites éloignés de la tumeur initiale. **a** : Différents récepteurs aux facteurs de croissance sont modulés par les glycannes. Par exemple via l'oligomérisation de leurs récepteurs spécifiques à tyrosine kinase. La figure illustre la capacité du ganglioside GM₁ à promouvoir l'hétérodimérisation du récepteur ERBB2-ERBB3. **b** :

L'invasion tumorale a lieu lorsque les cellules acquièrent la capacité de dégrader et de migrer au travers de la membrane et de la matrice extracellulaire. L'invasion est aussi associée à l'expression de glycanes sialylés ce qui promeut la dissociation des cellules tumorales. STn est l'une des classes de glycanes sialylés surexprimés dans les cellules tumorales. c : La dissémination des cellules tumorales via la circulation sanguine est facilitée par les plaquettes et les lymphocytes. Les sélécines sont des récepteurs importants dans l'adhésion exprimés sur les plaquettes activées (P-sélécines), les leucocytes (L-sélécines) et les cellules endothéliales (E-sélécines) qui se lient sur des récepteurs spécifiques des glycanes. d : L'angiogenèse tumorale est requise pour la croissance tumorale et les métastases. Les héparanes sulfates présents à la surface des cellules endothéliales facilitent la liaison des facteurs de croissance et l'activation de récepteurs à tyrosine kinases endothéliaux. D'après Fuster M.M. and Esko J.D., « The sweet and sour of cancer : glycans as novel therapeutic targets », 2005, (229).

Des altérations au niveau de la glycosylation de glycolipides localisés à la surface de la cellule, de glycoprotéines associées à la membrane et de glycoprotéines sécrétées sont des modifications quasi universelles des cancers (230). Ces modifications ont été mises en évidence dans un premier temps par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les cellules cancéreuses qui reconnaissent des épitopes correspondant à des structures glycaniques anormales (231).

Dans le cancer du sein, dans de très nombreux cas, les cellules des tumeurs mammaires présentent des anomalies de glycosylation (232). Ces anomalies peuvent se manifester précocement et être décelées au niveau des carcinomes ainsi que sur des cellules appartenant à des lésions considérées comme bénignes. Ainsi, il a été montré l'existence de résidus GalNAc-O-a-ser/thr et N-acétyl-lactosamine dans des cas de fibroadénome suggérant que des modifications de structure des glycoconjugués membranaires peuvent précéder les anomalies caractéristiques de la transformation maligne (233). Des changements de composition et de nombre des glycoconjugués ont été corrélés au stade d'avancement de la maladie dans le cas de carcinomes canaux invasifs (234). Par ailleurs, l'une des modifications associée le plus fréquemment aux cancers est la glycosylation insuffisante des glycoprotéines menant à l'expression d'O-glycanes tronqués à la surface cellulaire (227; 235) correspondant à des antigènes Tn, Sialyl-Tn et T (236). Ceux-ci ont été retrouvés dans différents tissus cancéreux tels que des carcinomes du sein (237), de l'œsophage (238), du colon (239), du pancréas (240) entre autres. L'expression de ces antigènes a pu être corrélée à un mauvais pronostic dans le cas de patients atteints de carcinomes du sein (241), du colon (242) et de l'estomac (243).

Les modifications de glycosylation au niveau des glycoconjugués présents à la surface ou sécrétés par les cellules cancéreuses représentent une source potentiellement importante de biomarqueurs des cancers. Actuellement, les différents tests utilisés pour la

détection de cancers, le pronostic et la surveillance sont basés sur la quantification des glycoconjugués dans le sérum de patients atteints de cancer. Ces tests sérologiques détectent des antigènes carbohydratés tels que SLe^a et STn ou des glycoprotéines mucines telles que MUC1 et MUC16 (244-247). En général, la détection de ces biomarqueurs dans le sérum de patients atteints de cancer a apporté la preuve de leur utilité au niveau diagnostique et pronostic. L'expression de MUC16 est en effet retrouvée chez 80% des patients atteints de cancer de l'ovaire (245). Par ailleurs, l'augmentation ou la diminution de son expression est corrélée à la progression ou la régression tumorale.

Il ne s'agit pas ici de faire une liste exhaustive des altérations de la glycosylation ou des glycosyltransférases impliquées dans le développement des cancers et l'agressivité tumorale mais plus précisément d'étudier le rôle de la glycosylation dans le glioblastome.

e. Glycosylation et GBMs

Les changements de la glycosylation sont associés à différents événements normaux et pathologiques tels que la différenciation, la migration, l'invasion tumorale et les métastases, le trafic cellulaire et la signalisation (248). Par ailleurs, le cancer est associé à des aberrations au niveau des glycolipides et des glycoprotéines (249; 250). Les N-glycannes ont un rôle fonctionnel dans l'adhésion cellulaire, et peuvent être affectés dans les cancers, menant à l'invasion et aux métastases (251).

- Une nouvelle approche de la classification des tumeurs cérébrales : la glycosylation

Des glycosylations aberrantes sont également observées dans les glioblastomes. Le rôle de la glycosylation dans les GBMs a été décrit pour la première fois par Traylor et Hogan il y a environ 30 ans. Ces derniers ont pu montrer que la concentration totale en gangliosides était réduite dans les glioblastomes par comparaison avec du tissu sain. Cette diminution s'accompagnait d'une augmentation de la concentration en gangliosides simples et une diminution des formes complexes de polysialogangliosides (252). Ces observations

ont été confirmées par l'observation de structures différentes de gangliosides au sein de la tumeur (253). Par ailleurs, il a pu être mis en évidence plus récemment une corrélation entre la classe des glycosphingolipides détectés et le grade de la tumeur (254; 255). Ces travaux préliminaires ont engendré un intérêt soudain pour l'étude de la glycosylation dans les GBMs. L'analyse de l'expression spécifique de certains glycolipides a permis de développer un nouveau mode de classification des tumeurs cérébrales reposant sur ces marqueurs (256; 257). L'expression du ganglioside GD1b est corrélée avec le grade tumoral dans les astrocytomes (258; 259). De plus, le ganglioside GT1b est décrit comme marqueur des métastases cérébrales (260).

Certains marqueurs ne sont pas exclusivement destinés à effectuer du diagnostic mais peuvent être utilisés comme biomarqueurs prédictifs et pronostiques de la réponse thérapeutique. La surexpression de la protéine YKL-40 dans le sérum des patients atteints de GBMs est corrélée au grade tumoral et à la malignité (261). Dans le GBM, l'expression de cette glycoprotéine serait également corrélée à une diminution de la survie globale et constituerait une valeur pronostique négative de la réponse thérapeutique (262). A l'inverse, l'expression de certains gènes de la glycosylation, tels que les gènes des sialyltransférases, pourrait jouer un rôle clé dans la levée de la résistance aux traitements et ainsi inhiber la formation de la tumeur (228; 263).

- Glycosylation et caractère invasif des GBMs

L'une des modifications majeures retrouvées dans les glioblastomes est leur capacité d'invasion du tissu sain. Dans ce contexte, des glycoprotéines de la surface cellulaire ont été identifiées comme associées au potentiel invasif des GBMs. Le mécanisme à l'origine du caractère invasif des GBMs est relativement complexe puisqu'il fait intervenir différents processus cellulaires tels que la modification de la matrice extracellulaire et la migration dans le tissu cérébral sain. Ces processus sont influencés par des altérations dans le contenu en oligosaccharides ainsi que la structure des glycanes présents à la surface des cellules composant la masse tumorale. Ainsi, différentes molécules intervenant dans des mécanismes d'interaction peuvent être retrouvées modifiées dans les GBMs. Par exemple, le CD44 qui est une molécule d'adhésion transmembranaire impliquée dans les interactions entre cellules, est très fortement glycosylée (264). La polysialylation de NCAM (Neural Cell

Adhesion Molecule) (265; 266) et de certaines cadhérines (267-269) favorise l'émergence du caractère invasif.

- Contrôle de l'expression de CD133 par la glycosylation

CD133 est considéré comme le marqueur des cellules souches cancéreuses de glioblastome. Ce récepteur est cependant très controversé actuellement pour deux raisons majeures : (i) la preuve a été faite que des cellules CD133⁺ étaient capable de redonner une tumeur *in vivo* suggérant un défaut lors du tri (110) (ii) Des changements de son état de glycosylation pourraient engendrer une absence de reconnaissance par des anticorps prenant pour cible des épitopes glycosylés. Les anticorps les plus communément utilisés sont AC133 (CD133/1) et 293C/AC141 (CD133/2) (270). AC133 est fréquemment utilisé pour isoler les CSCs et il reconnaît spécifiquement un épitope glycosylé sur CD133 qui possède au total 8 sites de N-glycosylation (représentés figure 27) susceptibles d'être modifiés en fonction de l'état physiologique de la cellule et de son récepteur (271). Ainsi, l'expression de CD133 ne serait pas restreinte aux CSCs et les cellules tumorales différenciées pourraient également l'exprimer. Il a été proposé que des changements de l'état de glycosylation du récepteur entre cellules immatures (CSCs) et cellules matures (cellules tumorales différenciées) pourraient masquer l'épitope spécifique de CD133 en modifiant la conformation tridimensionnelle du récepteur et ainsi expliqueraient l'absence de reconnaissance (272).

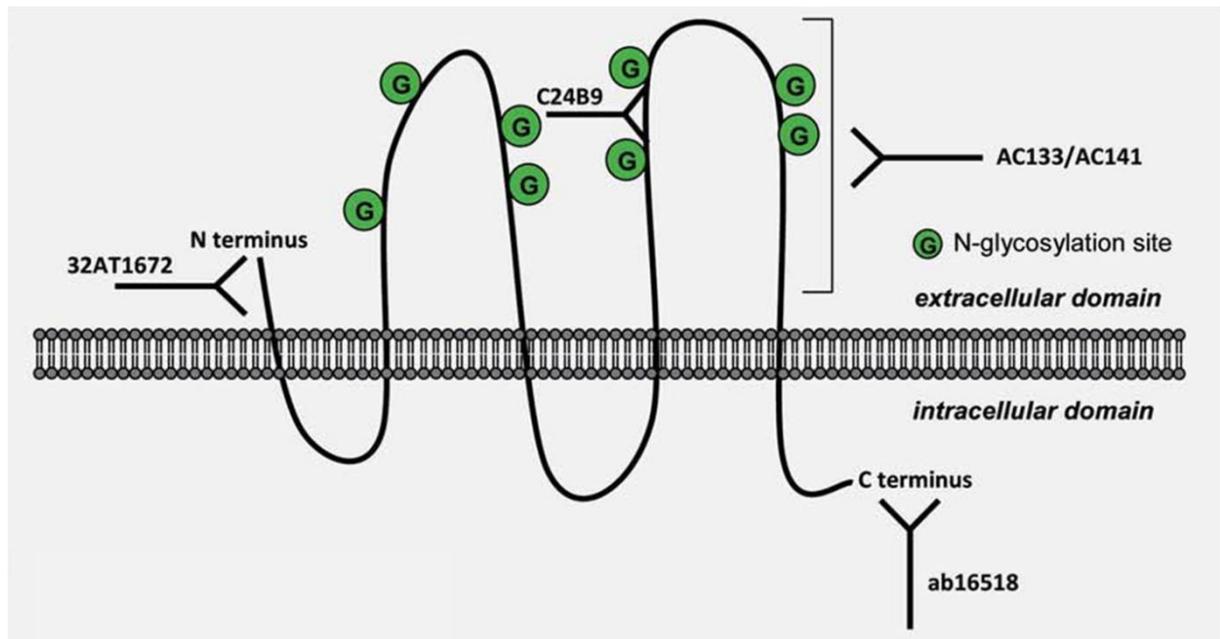


Figure 27 : Représentation schématique de la protéine transmembranaire CD133 et de ses sites de N-glycosylation. Les sites de N-glycosylation potentiels de la protéine à 5 segments transmembranaires CD133 sont représentés par des cercles verts. Les « Y » correspondent aux sites de liaison prédits de différents anticorps commerciaux. Issu de Campos and Herold-Mende, « Insight into the complex regulation of CD133 in glioma », 2011, (273).

L'état de glycosylation de CD133 semble déterminant dans le développement tumoral. L'utilisation d'anticorps dirigés contre des épitopes glycosylés constitue donc un facteur de risque lors de l'isolement de cellules spécifiques puisque ceux-ci peuvent être modifiés par glycosylation conduisant à des résultats erronés (Faux négatifs ou positifs) (Figure 28).

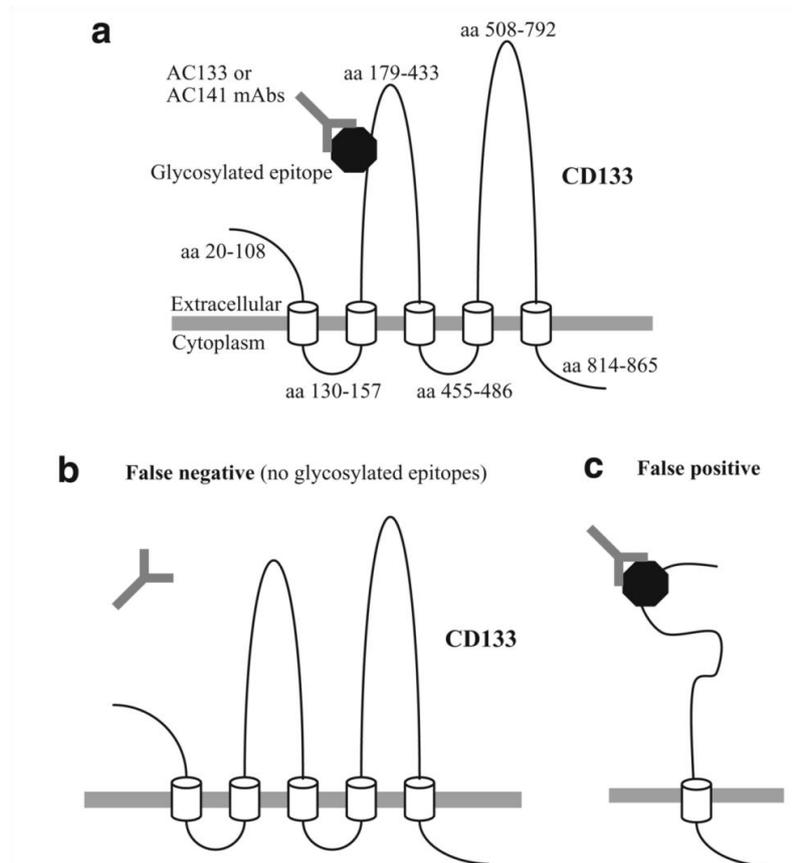


Figure 28 : Représentation de la topologie du CD133 et de l'hypothèse concernant la fixation des anticorps permettant de suivre l'expression de CD133. **a** : La topologie supposée du CD133 est représentée comme liant les anticorps AC133 et AC141 aux épitopes glycosylés sur la région extracellulaire du CD133. La localisation exacte de la liaison reste hypothétique puisqu'elle n'a jamais été décrite précisément. Les cylindres représentent les régions transmembranaires de la protéine. **b** : Représentation possible d'un résultat faux négatif. Si la protéine CD133 non glycosylée est présente, elle ne sera pas détectée par les anticorps AC133 et AC141. **c** : Représentation possible d'un résultat faux positif. Puisque la nature des épitopes glycosylés reconnus par AC133 et AC141 n'est pas clairement définie, il est possible que des épitopes glycosylés d'autres protéines que le CD133 puissent fixer les anticorps AC133 et AC141. Issu de Bidlingmaier et al., « The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells », 2008, (271).

L'état de glycosylation de certaines protéines ou l'expression de gènes impliqués dans le mécanisme de glycosylation sont donc déterminants dans l'initiation ou la progression des GBMs. L'état de glycosylation des cellules les plus immatures (CSCs) doit donc être différent de celui des cellules tumorales différenciées au sein de la tumeur. Les changements des motifs de glycosylation selon l'état de la cellule sont étroitement liés à l'expression des gènes impliqués dans la glycosylation. Par conséquent, l'étude des changements du niveau d'expression de ces gènes selon l'état de la cellule pourraient permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs des cellules les plus immatures au sein des GBMs et ainsi d'aboutir à une nouvelle signature moléculaire des CSCs.

But du travail de thèse

L'implication des cellules souches cancéreuses dans l'émergence et la récurrence tumorales ne fait plus actuellement aucun doute. Bien que ces cellules suscitent un intérêt grandissant dans la communauté scientifique, des travaux visant à améliorer leur caractérisation, à comprendre leur fonctionnement et à développer des thérapies ciblées peinent à émerger. Ces études ne peuvent être envisagées qu'après avoir isolé les CSCs. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au développement ou à l'utilisation de nouvelles approches de caractérisation et/ou d'isolement des CSCs dans le glioblastome avec pour objectif principal d'améliorer la caractérisation de ces cellules en définissant une nouvelle signature moléculaire, mais également en optimisant leur isolement par des techniques de type « Label free » qui permettent de s'affranchir des immuno-marquages.

La partie principale de ce travail repose sur une analyse transcriptomique différentielle du niveau d'expression des gènes de la glycosylation selon l'état de différenciation des cellules issues de 2 lignées de GBMs. Cette étude réalisée en collaboration avec l'UMR INRA 1061 à l'aide de la technique de Taqman Low Density Array (ou TLDA) a permis d'identifier des gènes spécifiquement exprimés dans les cellules indifférenciées par rapport aux cellules différenciées. Cette surexpression, observée dans des lignées cellulaires a été confirmée à partir de transcrits issus de tumeurs de patients. L'expression protéique des gènes étudiés a permis de confirmer nos résultats obtenus en complément de l'approche transcriptomique. Afin de vérifier l'implication des gènes isolés par TLDA sur le phénotype cellules indifférenciées, des lignées cellulaires stables inactivées pour chaque gène de la glycosylation sélectionné ont été réalisées. Ces lignées stables permettent de préciser le rôle de ces gènes de la glycosylation dans le maintien du caractère indifférencié des cellules.

Notre second objectif était le développement d'outils de tri cellulaire. Nous avons pu développer en collaboration avec une équipe de physiciens, un biocapteur permettant d'obtenir une signature électromagnétique des cellules les plus indifférenciées qui pourrait permettre à terme de s'affranchir des marquages immunologiques afin de trier ces cellules. Cette solution de tri pourra être couplée à une technologie de tri existant dans le laboratoire, la SdFFF.

Matériels et Méthodes

I. Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires

Les cellules U87-MG et U251 sont des cellules tumorales issues de glioblastome humain (American Type Culture Collection : ATCC, Manassas). Les cellules U87-MG sont cultivées dans du milieu MEM avec sels de Earls (Gibco) supplémenté avec 10% de serum de veau foetal (SVF) (Gibco) décomplémenté, 1,5 g/L de bicarbonate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 1mM de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non essentiels, 50 UI/mL de pénicilline et 50µg/mL de streptomycine (Gibco). Les cellules U251 sont cultivées dans du milieu DMEM avec Glutamax 4500mg/L de glucose (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF, 1mM de pyruvate de sodium, 3,7g/L de bicarbonate de sodium, 50 UI/mL de pénicilline et 50µg/mL de streptomycine (Gibco).

B. Conditions de culture

Ces lignées cellulaires sont composées de cellules adhérentes entretenues en flasques de 75cm² (Falcon) et maintenues dans un incubateur sous 5% de CO₂ et en atmosphère humide. Les cellules sont décollées des flasques par un traitement de 10 min au versène (Gibco) à 37°C. Après inactivation du versène par addition de milieu supplémenté en SVF, les cellules sont récupérées et centrifugées à 1200 rpm pendant 10 min puis réensemencées à différentes densités selon les expérimentations.

C. Culture des cellules en milieu défini

Les cellules U87-MG et U251 ont été cultivées en milieu défini dont la composition est présentée dans le tableau M1. Brièvement, après décollement et centrifugation des cellules, celles-ci sont réensemencées à une densité de 500000 cellules par flasque. Après 4 jours (U87-MG) ou 7 jours (U251) de culture, les cellules organisées en neurosphères flottantes sont reprises et dissociées mécaniquement. 500000 cellules par flasques sont

ensuites réensemencées afin d'obtenir des neurosphères secondaires qui seront utilisées lors des différentes expérimentations.

Composés	Fournisseurs	Concentration
DMEM / F12	Gibco	
Bicarbonate de sodium	Sigma Aldrich	1,2%
Glucose	Sigma Aldrich	0,6%
B27	Gibco	2%
HEPES	Sigma Aldrich	5 mM
Putrescine	Sigma Aldrich	9,6 mg/L
ITSS	Roche	10 mg/L
Progesterone	Sigma Aldrich	0,0629 mg/L
EGF	Sigma Aldrich	20 µg/L
bFGF	Sigma Aldrich	20 µg/L
Héparine	Sigma Aldrich	1,83 mg/L

Tableau M1 : Composition du milieu défini.

D. Différenciation des neurosphères secondaires

Après obtention des neurosphères secondaires, celles-ci sont reprises, dissociées et remises en culture à une densité de 500000 cellules par flasque dans un milieu différenciant correspondant au milieu défini sans EGF et supplémenté de 10% de SVF. Après 2 jours de culture les cellules adhèrent au support et se différencient et sont utilisables pour différentes expérimentations.

II. Analyse transcriptomique par Taqman Low Density Array (TLDA)

A. Extraction d'ARN

Après culture spécifique, les cellules sont récupérées, centrifugées, lavées 1 fois en PBS et culotées. L'extraction d'ARNs totaux est effectuée sur culot sec avec un kit RNeasy mini kit (Qiagen). La concentration en ARN est ensuite déterminée par lecture de la densité optique à 260 nm avec un Nanodrop (ND1000 Spectrophotometer, Labtech, France).

B. Rétrotranscription des ARNs

L'intégrité des ARNs extraits a été vérifiée par l'utilisation d'une puce RNA 6000 Labchip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Les ADNc sont ensuite générés par rétrotranscription de 3µg d'ARN total avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied biosystems, Courtaboeuf, France).

C. qPCR par TLDA

Les PCRs quantitative ont été effectuées avec des plaques de TLDA (Taqman Low Density Array) précoatées avec des sondes spécifiques des gènes de la glycosylation (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Chaque puits contient un set de primers prédéfinis ainsi qu'une sonde fluorescente TaqMan afin de suivre l'amplification des gènes étudiés. Les plaques permettent l'analyse de 559 gènes impliqués dans la dégradation des carbohydrates, le métabolisme des carbohydrates, le métabolisme du glycogène, la synthèse des glycolipides et des glycoprotéines, la dégradation des glycolipides et des glycoprotéines, la synthèse des glycosaminoglycanes et des glycoprotéines, la dégradation des glycosaminoglycanes et des glycoprotéines, le métabolisme ainsi que d'autres fonctions biologiques variées (Une liste complète des gènes analysés est visible dans la partie

supplementary data associée à l'article). La normalisation des niveaux d'ADNc dans les différents puits a été effectuée en utilisant l'ARN 18S comme référence.

Afin d'effectuer la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), deux ng d'ADNc sont distribués dans chaque puits par une centrifugation rapide (2 min, 260g). Après une première étape à 95°C pendant 10 min, la réaction d'amplification est effectuée durant 40 cycles (dénaturation de l'ADN et d'étapes d'hybridation/extension) de : 15s à 95°C et 1min à 60°C.

Les modifications de fluorescence des sondes TaqMan sont détectées par le système ABI-PRISM 7900HT et quantifiées par le logiciel SDS2.2 (Applied Biosystems) selon la méthode $\Delta\Delta C_t$. La quantification relative (RQ) des gènes d'un échantillon est déterminée par l'équation $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les échantillons correspondant aux cellules cultivées en milieu défini sont utilisés comme référence. Les valeurs de RQ ont été déterminées en utilisant 3 extractions d'ARN indépendantes nommées 1 à 3 pour chaque condition testée. A partir des 3 extractions, le niveau d'expression des gènes dans le milieu défini pour les échantillons 1 à 3 a été comparé à celui des échantillons 1 à 3 provenant des cellules en milieu différenciant. Pour chaque lignée cellulaire nous avons donc obtenu 9 conditions expérimentales différentes. La significativité d'expression de chaque gène a été calculée en comparant les 9 RQ expérimentaux avec les 9 valeurs de référence par test Student. Les valeurs ensuite moyennées afin de ne conserver qu'une valeur au lieu de neuf. Les différences d'expression sont considérées significatives à $p < 0,05$.

III. Analyse protéique

A. Immunocytochimie par immunofluorescence indirecte

Nous avons, *via* cette technique, étudié l'expression de certaines protéines dans les cellules triées par SdFFF ainsi qu'au niveau des cellules modifiées par shRNA.

a. Principe

L'expression de protéines, à l'état basal, a été étudiée par immunofluorescence sur la lignée humaine U87-MG. Les cellules, à raison de 50000 cellules par puits, ont été

ensemencées en plaques 24 puits (Falcon) où a été déposé au préalable une lamelle de verre. Après 48h de remise en culture, le milieu de culture est alors retiré et les cellules sont fixées grâce à une solution de PFA à 4% (Sigma Aldrich) dans du PBS pendant 20 min.

Pour les cellules triées par SdFFF, celles-ci sont collectées après tri, centrifugées, et déposées, à raison de 10000 cellules par dépôt dans 10µL de PBS, sur une lame en Téflon contenant 10 puits délimités. Après séchage, les cellules sont fixées en PFA 4% (Sigma Aldrich) dans du PBS pendant 20 min.

La suite du protocole est commune aux deux types d'ensemencement des cellules. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS, et sont perméabilisées (si besoin) par une solution de Triton X-100 à 0,1 % (Invitrogen) dans du PBS pendant 5 minutes à 4°C, afin de permettre la détection d'antigènes intra-cellulaires. Trois rinçages en PBS sont réalisés. Une saturation des sites de fixation non spécifiques est réalisée par incubation des cellules avec une solution de sérum de chèvre (Sigma Aldrich) dilué à 10 % dans du PBS ou de Bovin Serum Albumin (BSA) dilué à 4 % dans du PBS pendant 2 heures à température ambiante. Les cellules sont alors lavées 3 fois en PBS puis incubées avec des anticorps primaires dilués dans la solution de saturation. Cette incubation est réalisée sur la nuit à 4°C et sous agitation lente.

Les anticorps primaires utilisés, leur spécificité, leur dilution et les fournisseurs sont répertoriés dans le tableau M2.

Noms	Hôtes	Isotypes	Fournisseurs	Dilutions utilisées
βIII-Tubuline	Lapin	IgG	Lifespan Biosciences	1/200
GFAP	Souris	IgG1	Thermo scientific	1/100
Nanog	Souris	IgG1	Cell Signaling	1/1000
Nestine	Lapin	IgG	Lifespan Biosciences	1/200
S100β	Lapin	IgG	Millipore	1/100
Vimentine	souris	IgG1	Abcam	1/20

Tableau M2 : Liste des anticorps utilisés en Immunocytochimie par immunofluorescence indirecte.

Après 3 lavages au PBS, les anticorps secondaires anti-Ig de souris ou de lapin couplés à un fluorochrome (Tableau M3), sont incubés avec les cellules pendant 1h à température ambiante.

Spécificité	Hôtes	Fluorochrome	Fournisseurs	Dilutions utilisées
Ig totales de souris	chèvre	Alexa fluor 488	Invitrogen	1/5000
Ig totales de lapin	chèvre	Alexa fluor 488	Invitrogen	1/5000

Tableau M3 : Liste des anticorps secondaires utilisés en immunocytochimie par immunofluorescence indirecte.

Enfin, les cellules sont lavées par du PBS, 3 fois 20 min, rapidement rincées à l'eau puis fixées au glycérol-gélatine (Sigma Aldrich) entre lame et lamelle. Les lames sont observées grâce à un microscope à fluorescence (Leica DMRX).

b. Les contrôles

Un contrôle isotypique est effectué pour chaque anticorps primaire, avec selon les cas, des immunoglobulines Ig irrelevantes, IgG1 ou IgG2a purifiées chez la souris ou une fraction purifiée d'IgG de lapin.

De même, un contrôle systématique de chaque anticorps secondaire a été effectué afin de vérifier l'absence de fixation non spécifique. Pour cela, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire, sans incubation préalable à un anticorps primaire.

B. Analyse de l'expression protéique par western blot

Cette méthode nous a permis d'étudier l'expression des protéines correspondant aux transcrits analysés par TLDA ainsi que de valider l'efficacité d'inhibition de gènes via la méthode de shRNA par l'absence de la protéine correspondante.

a. Préparation des échantillons protéiques

Après un lavage en PBS, les cellules sont lysées dans du tampon de lyse (Cell Signaling) pendant 30 min à 4°C. Le lysat cellulaire est ensuite homogénéisé par aspiration et refoulement puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines cellulaires totales est alors récupéré et conservé à -80°C.

b. Dosage de Bradford

La concentration en protéines totales est déterminée selon un dosage colorimétrique basé sur l'utilisation du réactif de Bradford (Sigma). La gamme étalon de la réaction est réalisée à l'aide d'une solution de BSA (Sigma) de concentration connue. Les densités optiques obtenues pour chaque solution sont mesurées grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

c. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

30 µg de protéines ont été diluées au ½ dans du tampon laemmli (biorad) puis dénaturées 5 min à 95°C. Les lysats protéiques dénaturés sont ensuite déposés dans différents puits du système de migration et un marqueur de poids moléculaire (Magic Mark, invitrogen) est utilisé comme référence pour déterminer les poids moléculaires.

La séparation protéique est réalisée par migration électrophorétique en gel pré coulés de poly-acrylamide contenant du SDS (Bio Rad). La migration s'effectue pendant 1h30 (125 V) dans un tampon de migration Tris/Glycine/SDS (BioRad).

d. Transfert des protéines sur membrane de PVDF

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Pall) préalablement activée quelques secondes dans un bain de méthanol (Sigma) puis équilibrée dans le tampon de transfert (Tris/Glycine/méthanol, BioRad). Le gel de polyacrylamide est également équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du fabricant (BioRad). Le transfert s'effectue pendant 1h à 20V.

e. Immunodétection des protéines

Afin de bloquer les sites éventuels de fixation non spécifiques des anticorps sur la membrane, une saturation des membranes est effectuée avec une solution de TBS, 0,1% tween contenant 5% de lait écrémé pendant 1h sous agitation à température ambiante. Les membranes de PVDF sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire (Tableau M4) spécifique de la protéine d'intérêt, dilué dans du TBS, Tween, 5% lait.

Nom ou clone	Antigène	Hôte	Dilution	Fournisseur
ATHL1	Acid trehalase-like protein 1	Lapin	1/200	Abgent
CHI3L1	Chitinase 3 like 1	Lapin	1/1000	Abcam
GAA (3C6)	Lysosomal alpha glucosidase	Souris	1/400	Abnova
GD3S (C-14)	Alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase	Chèvre	1/100	Santa Cruz
GLT25D2 (E-16)	Galactosyltransferase 25 domain containing 2	Chèvre	1/100	Santa Cruz
KLRC3 (3D5)	NKG2-E type II integral membrane protein	Souris	1/500	Abnova
PRUNE 2	Protein prune homolog 2	Chèvre	1/600	Abnova
ST3GAL5	Lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase	Souris	1/1000	Abnova
β-Actin (AC-15)	β-Actin	Souris	1/10000	Sigma

Tableau M4 : Anticorps primaires utilisés en western blot.

Les membranes sont ensuite rincées en TBS/tween 3 fois 20 min puis incubées avec l'anticorps secondaire (tableau M5) couplé HRP (Horseradish Peroxydase) dilué en TBS/tween/lait 5% et correspondant à l'hôte de l'anticorps primaire utilisé.

Spécificité	Hôtes	Fournisseurs	Dilutions utilisées
IgG-HRP anti-souris	chèvre	Dako cytomation	1/1000
IgG-HRP anti-lapin	chèvre	Dako cytomation	1/1000
IgG-HRP anti-chèvre	âne	Santacruz biotechnology	1/5000

Tableau M5 : Anticorps secondaires utilisés en western blot.

Les protéines de la membrane sont détectées par chimioluminescence (Millipore) : dilution des deux réactifs vol/vol : la peroxydase en présence d'H₂O₂ permet l'oxydation du diacylhydrazide en un composé lumineux. Les signaux émis sont détectés grâce à un imageur Syngene, modèle Gbox-Chemi-XT (Genesnap Syngene, Cambridge, UK). Afin de quantifier les protéines contenues dans chaque lysat cellulaire protéique, les membranes sont réhybridées avec un anticorps dirigé contre l'actine (Sigma-Aldrich). Une quantification des expressions protéiques de chaque échantillon cellulaire est réalisée en comparant l'intensité d'expression de la protéine d'intérêt à l'intensité de l'actine (Genetool, Syngene).

IV. Extinction de gènes par shRNA

Au cours de ma thèse j'ai eu l'opportunité d'effectuer un stage de deux mois dans un laboratoire espagnol. Ce stage effectué au sein de l'équipe du Dr. Ricardo Sanchez Prieto (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, CRIB, faculté de Médecine, Université de Castilla La Mancha, Albacete) m'a permis d'apprendre la technique d'extinction de gènes (shRNA) par l'utilisation de vecteurs lentiviraux. Cette technique utilise des plasmides contenant une séquence permettant l'extinction du gène d'intérêt.

A. Amplification du plasmide porteur de la séquence d'intérêt

Les plasmides utilisés sont des vecteurs circulaires pLKO.1 commerciaux (Réf. SHC001) (Sigma-Aldrich). La carte de ce plasmide est présentée ci-dessous (Figure M1).

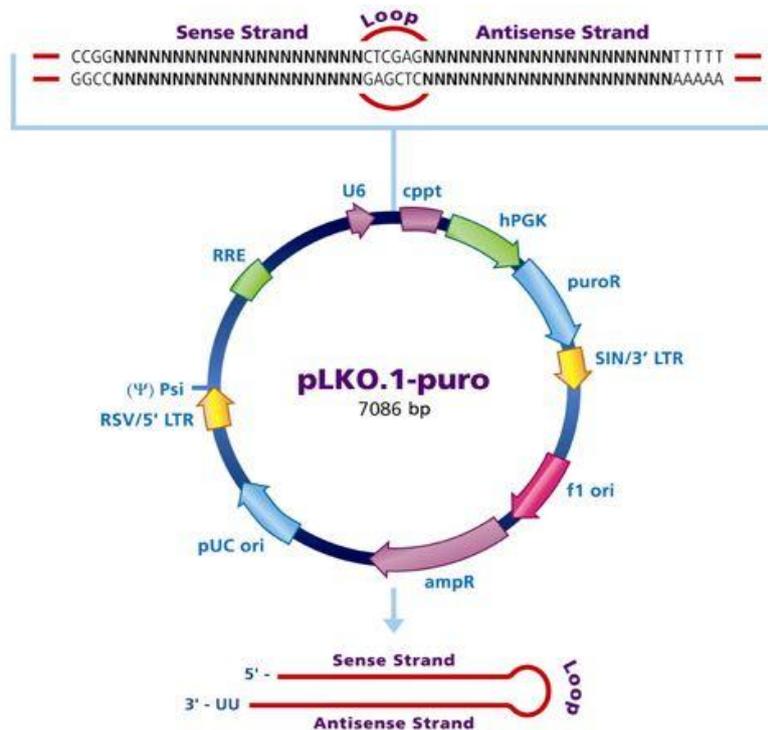


Figure M1 : Carte du vecteur pLKO.1 utilisé pour l'extinction de gènes par shRNA. *Cppt*: Central polypurine tract, *hPGK*: Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter, *puroR*: Puromycin resistance gene for mammalian selection, *SIN/LTR*: 3' self inactivating long terminal repeat, *f1 ori*: f1 origin of replication, *ampR*: Ampicillin resistance gene for bacterial selection, *pUC ori*: pUC origin of replication, *5' LTR*: 5' long terminal repeat, *Psi*: RNA packaging signal, *RRE*: Rev response element.

Pour chaque gène d'intérêt, plusieurs clones sont testés afin de choisir celui dont l'efficacité d'extinction est optimale. Chaque clone correspond au vecteur pLKO.1 comprenant la séquence spécifique du gène qu'il éteindra.

Les plasmides sont donc dans un premier temps amplifiés par transformation bactérienne. 20ng de plasmide (soit 1µL) sont ajoutés à 50µL de bactéries DH5α compétentes (Invitrogen) préalablement mises sur glace. Le mélange est incubé sur glace pendant 30 min. L'insertion du plasmide dans les bactéries se fait par choc thermique à 42°C

pendant 45s, les tubes contenant les bactéries sont ensuite replacés sur glace pendant 2min. Pour chaque transformation bactérienne, 950µL de milieu Luria Broth sans antibiotique (LB, sigma aldrich) est ajouté et les tubes sont incubés 1h à 37°C sous agitation (225rpm). Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur boîtes de LB gélosé (200µL de bactéries par boîte) contenant un antibiotique de sélection : l'ampicilline (100µg/mL, Invitrogen) (le plasmide pLKO contient un gène de résistance à l'ampicilline, Figure M1). Les boîtesensemencées sont incubées à l'envers à 37°C sur la nuit. Le lendemain, une colonie est repiquée etensemencée dans 5mL de LB liquide contenant de l'ampicilline et incubée à 37°C sous agitation pendant environ 6h. 200µL de suspension bactérienne (bactéries amplifiées) sont ensuite déposés dans 100mL de LB contenant de l'ampicilline et incubée à 37°C sous agitation toute la nuit.

Après amplification des bactéries transformées, celles-ci sont récupérées et une Midi prep est effectuée avec le kit NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel, France) afin d'extraire le plasmide amplifié. Brièvement, les bactéries sont centrifugées 5000 x g pendant 10min à 4°C, les culots sont ensuite lysés. Les lysats sont lavés, l'ADN est élué puis précipité dans de l'isopropanol. Après centrifugation (6000 x g, 45min, 4°C) le culot d'ADN est lavé à l'éthanol et centrifugé à nouveau (6000 x g, 10min, température ambiante). Après élimination et évaporation de l'éthanol, l'ADN est reconstitué dans 200µL d'eau ultrapure. La concentration des en ADN plasmidique déterminée par lecture de la densité optique à 260nm avec un Nanodrop (ND1000 Spectrophotometer, Labtech, France).

B. Transfection des cellules HEK293T

Afin de produire les lentivirus contenant le plasmide d'intérêt pour chaque gène, il est indispensable de passer par une étape de transfection de cellules HEK293T (Human Embryonic Kidney). Ces cellules 293T sont modifiées et possèdent un insert contenant l'antigène SV40 T. Ces cellules permettent donc la production de virions à partir de la transfection des plasmides d'intérêt ainsi que deux autres types de plasmides : un plasmide d'enveloppe ainsi qu'un plasmide de « packaging ».

Les cellules sontensemencées au jour 1 (J1) à une densité d'environ 2 à 2,5.10⁶ cellules par flasque de 75cm² (falcon) pour chaque transfection contenant 10mL de milieu de culture. A J2, la transfection est effectuée : cette étape est réalisée avec du milieu de culture

ne contenant ni SVF, ni antibiotiques. Pour chaque transfection, 25µL de lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) sont dilués dans 800µL de milieu de culture et incubés 5min à température ambiante. Parallèlement, 4,5µg de vecteur de transfert contenant la séquence permettant l'extinction du gène d'intérêt (Invitrogen), 3µg de packaging plasmide ainsi que 1,5µg de plasmide d'enveloppe sont déposés dans 800µL de milieu de culture. Le milieu contenant la lipofectamine est ensuite ajouté au milieu contenant l'ADN plasmidique (volume final : 1,6mL) et incubés 20min à température ambiante. Pour chaque transfection, 1,6 mL de milieu est ajouté dans les tubes contenant les complexes d'ADN dilués. Le surnageant des cellules HEK293T est éliminé puis 3,2mL de milieu de culture sans SVF est ajouté dans chaque flasque ainsi que les 3,2mL de milieu contenant les complexes dilués. Les cellules sont placées à l'incubateur pendant 7h. Le milieu de culture est ensuite remplacé par du milieu de culture frais complet (avec SVF et antibiotiques) et les cellules HEK293T sont replacées à l'incubateur. Durant cette incubation, les cellules HEK293T vont produire les virions contenant les séquences permettant l'extinction de gènes spécifique.

C. Infection lentivirale des cellules U87-MG

L'extinction des gènes d'intérêt s'effectue par infection des cellules U87-MG avec les vecteurs lentiviraux produits par les cellules HEK293T. Pour cela, les cellules U87-MG sontensemencées à J3 à une densité d'environ 1.10^6 cellules par flasque de culture de 75cm².

Le protocole d'infection débute à J4 : le milieu de culture des cellules HEK293T transfectées est récupéré et remplacé par du milieu frais, les cellules sont ensuite replacées à l'incubateur. Le surnageant des cellules HEK293T est ensuite centrifugé pendant 5min à 3000rpm à température ambiante afin de culotter les cellules ou les débris et de garder les virions dans le surnageant. Parallèlement, 2mL de milieu frais sont déposés dans des tubes auxquels sont ajoutés 8µg par mL (pour les 10mL finaux de chaque flasque) de polybrène (Sigma-Aldrich) qui permettra une augmentation de l'efficacité d'infection. Après centrifugation, 8mL de surnageant sont récupérés et ajoutés au 2mL de milieu contenant le polybrène. Enfin, le milieu de culture des cellules U87-MG est éliminé et remplacé par le surnageant des cellules HEK293T additionné de milieu de culture frais et de polybrène. Les cellules sont ensuite replacées à l'incubateur.

Après 7h d'incubation, la même manipulation est effectuée en ajoutant deux fois moins de polybrène car il peut être toxique à long terme. Replacer les cellules à l'incubateur sur la nuit.

A J5, les mêmes étapes effectuées à J4 sont répétées et les cellules HEK293T peuvent être jetées. Après l'incubation de 7h des cellules U87-MG avec le milieu de culture des cellules HEK293T, celui-ci est remplacé par du milieu de culture frais complet.

Le sixième jour de ce protocole (J6) correspond à la sélection des cellules ayant intégré le plasmide et donc ayant une extinction du gène d'intérêt. Pour cela, le milieu de culture des cellules U87-MG infectées est éliminé et remplacé par du milieu de culture frais contenant 1µg/mL de puromycine. Cet antibiotique permet de tuer les cellules ne possédant pas de gène de résistance à la puromycine. Au contraire, les cellules ayant intégré les virus et donc le plasmide d'intérêt possèdent un gène de résistance à la puromycine présent dans la séquence du plasmide (cf carte du plasmide Figure M1). Les cellules sont alors incubées 72h avec ce milieu de culture de sélection. A J9, les cellules U87-MG sont passées, et le milieu de culture changé et remplacé par du milieu de culture contenant 0,5µg/mL de puromycine afin de toujours maintenir une pression de sélection. Les cellules peuvent alors être utilisées pour différentes expérimentations telles que l'immunodétection de protéines par western blot afin d'étudier l'absence des protéines d'intérêt suite à l'extinction des gènes leurs correspondant par shRNA.

V. Etude du caractère « souche » des cellules

A. Capacité des cellules à former des sphères : test de clonogénicité en Agar/agarose

Les cellules souches ont parmi leurs différentes caractéristiques la capacité de former des sphères à partir d'une cellule unique. Afin de tester le potentiel d'autorenouvellement de nos cellules, un test de clonogénicité a été effectué sur nos différentes lignées modifiées.

a. Préparation du gel d'agar

Le test de clonogénicité est effectué en plaques de culture 6 puits où sont coulés deux gels différents. Le gel de base est un gel d'agar à 1% en eau stérile dissout au micro-onde. Après obtention d'une solution d'agar, celle-ci est placée dans un bain marie à 40°C. Parallèlement, du milieu de culture défini 2X est aussi placé à 40°C. L'agar est liquide à 40°C mais se solidifie à température ambiante. Une fois que les différentes solutions sont à 40°C, l'agar est dilué de moitié avec le milieu défini 2X afin d'obtenir une solution finale d'agar 0,5% en milieu 1X dans un bain marie, sous hotte stérile. 1 à 1,5mL de solution agar 0,5%-milieu 1X sont déposés dans le puits de la plaque 6 puits afin de recouvrir totalement le fond de celui-ci. Les plaques coulées sont ensuite laissées à température ambiante afin de laisser la base d'agar se solidifier.

b. Préparation du gel d'agarose

Une solution d'agarose à 0,7% en eau stérile est préparée et chauffée au micro-onde afin de dissoudre l'agarose. De la même manière que pour le gel d'agar, la solution d'agarose est placée au bain marie à 40°C ainsi que du milieu de culture défini 2X. En parallèle, les cellules sont préparées. Les neurosphères secondaires sont donc récupérées, centrifugées, dissociées et comptées. Les cellules sont ensuite préparées à raison de 500 à 2500 cellules par puits de la plaque 6 puits. Une fois que les solutions placées au bain marie sont à température, l'agarose est dilué de moitié avec le milieu défini 2X afin d'obtenir une solution finale d'agarose 0,35% en milieu 1X dans un bain marie, sous hotte stérile. Le mélange Agarose-milieu est ajouté aux cellules à raison de 1,5mL de solution pour 2500 cellules. Après homogénéisation, le mélange agarose-milieu-cellules est déposé dans les puits de la plaque 6 puits contenant la base en agar à raison de 1,5mL par puits. Les plaques coulées sont ensuite laissées à température ambiante afin de laisser le gel d'agarose contenant les cellules se solidifier. Avant de placer les plaques à l'incubateur, 500µL à 1mL de milieu de culture défini 1X sont déposés dans chaque puits contenant les cellules. Les plaques sont laissées à l'incubateur 20 à 30 jours en fonction de l'apparition des neurosphères avec changement du milieu de culture 1X 1 à 2 fois par semaine.

B. Capacité des cellules à former des tumeurs : greffes de cellules sur la membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet (CAM)

a. Principe

Une approche *in ovo* a été utilisée afin de déterminer le potentiel de génération de tumeur des cellules utilisées. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de la membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet (ou CAM pour Chorio Allantoic Membrane) qui est développé au sein de notre équipe. Cette technique a été précédemment utilisée pour étudier le potentiel métastatique et angiogénique de certaines tumeurs ainsi que le potentiel anti-angiogénique de certaines molécules.

Afin de réaliser nos expériences, nous utilisons l'embryon de poulet (*Gallus gallus*). Les œufs fécondés proviennent d'un élevage commercial (Ferme avicole Haas, Strasbourg, France).

b. Préparation des œufs

Les œufs fécondés sont stockés après réception 24h à température constante de 16°C. Pour les expériences, ils sont ensuite incubés à 38°C dans une couveuse (Maino, Italie) en atmosphère humide (45% environ) afin d'assurer le meilleur développement possible des embryons.

Les stades embryonnaires sont déterminés à partir des tables de Hamburger et Hamilton (H&H) (1952). Au stade embryonnaire 2,5 jours (Embryonic Day ou ED 2,5) correspondant au stade 17 de H&H, 4mL d'albumine sont retirés à l'aide d'une seringue puis le contenu de chaque œuf est extrait délicatement de sa coquille et placé dans des nacelles de pesée hexagonales (VWR, Strasbourg, France). Ces dernières sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri (VWR) préalablement remplies à moitié d'eau distillée afin d'assurer le maintien d'une hygrométrie convenable et de limiter les risques de contaminations. Les œufs ainsi préparés sont remis à incuber (Figure M2). A ce stade de développement, la membrane chorio-allantoïde commence à être légèrement vascularisée.



Figure M2 : Représentation schématique du dispositif employé pour le développement des œufs fécondés. L'œuf fécondé après ouverture est placé dans une nacelle de pesée elle-même placée dans une boîte de Pétri contenant de l'eau distillée. Le couvercle de la boîte de Pétri permet de conserver un degré d'hygrométrie adéquat pour le développement de l'embryon et protéger l'œuf des contaminations possibles.

c. Préparation des cellules et greffes

Les cellules sont cultivées en milieu de culture basal et amplifiées. Au stade ED9 (stade 35 de H&H) les cellules sont décollées et comptées. Pour chaque greffe sur la CAM, un tube eppendorf (VWR) est préparé contenant 2 millions de cellules. Après centrifugation des tubes contenant les cellules (1500 rpm, 5 min), le surnageant est éliminé par renversement et le culot cellulaire est resuspendu dans le milieu restant (environ 10 μ L). Un anneau de silicone d'environ 1cm de diamètre et 1mm d'épaisseur est ensuite placé sur la CAM de manière à encadrer plusieurs vaisseaux sanguins et permettra de localiser le dépôt des cellules ainsi que limiter l'étalement des cellules déposées. Les cellules sont donc déposées au centre de l'anneau placé sur la CAM et les œufs sont replacés après greffe à l'incubateur.

d. Suivi des greffes

A ED11, 12 et 13 les tumeurs sont observées et photographiées à l'aide d'une binoculaire MZFL3 (Leica, Paris, France). Ce suivi permet d'étudier la prise des greffes en fonction des conditions testées, la croissance tumorale ainsi que la vascularisation en surface des tumeurs. A ED13 les tumeurs sont prélevées et fixées de différentes manières. Les tumeurs sont fixées en formol pour analyses immunohistochimiques de coupes en paraffine ou en PBS-PFA 4% (sur la nuit à 4°C puis rincées et conservées en PBS) pour être ensuite incluses en milieu d'enrobage OCT TissueTek (Sakura, Japon) et effectuer des

coupes immunohistochimiques au cryostat (Leica CM3050) et enfin les tumeurs sont aussi congelées au -80°C en culot sec.

e. Analyse immunohistochimique des tumeurs obtenues après greffe sur la CAM

Avant le sacrifice des animaux, les tumeurs sont récupérées et fixées de différentes manières. Certaines d'entre elles sont donc fixées en formol et envoyées au laboratoire d'Anatomie pathologique du CHU de Limoges (Service du Professeur François Labrousse) qui effectuera différents marquages (prolifération par le Ki67, β -Tubuline III, Nestine...) à partir de coupes en paraffine.

VI. Instrumentation

A. Analyse cellulaire par l'utilisation de biocapteurs

a. Principe

La collaboration mise en place avec une équipe de physiciens (équipe MINACOM : Micro et Nanotechnologies pour Composants Optoélectroniques et Microondes, UMR CNRS 6172, située à XLIM) a permis de développer des capteurs innovants, mesurant les propriétés diélectriques des cellules à des fréquences micro-ondes. Les capteurs sont donc préparés en parallèle de la culture cellulaire. L'élaboration des biocapteurs a été faite par les physiciens avec l'utilisation de matériaux biocompatibles pour la culture et l'analyse de cellules. Ainsi différentes étapes sont indispensables telles que la métallisation du substrat, la définition des lignes d'or ou encore le dépôt de la résine (résine SU8). Cela permettant d'obtenir un capteur modélisé et adapté à l'analyse cellulaire, représenté figure M3.

Les capteurs sont produits dans une salle blanche exempte de particules extérieures et sont stérilisés au poupinel à 180°C durant 2h avant toute utilisation avec les cellules. De plus, les capteurs sont systématiquement mesurés avant utilisation afin de connaître la résonance interne de chaque capteur utilisé.

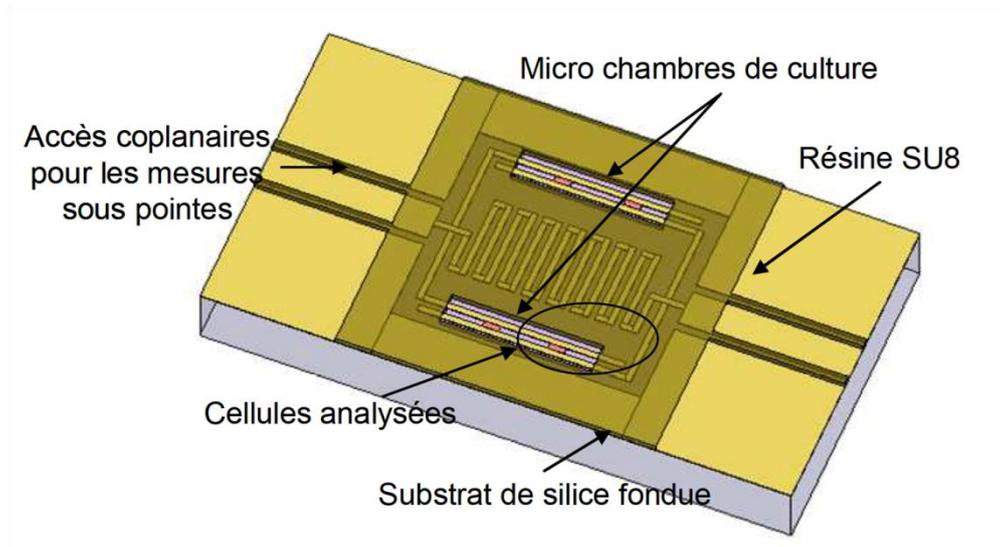


Figure M3 : Représentation schématique des biocapteurs utilisés pour l'analyse des propriétés diélectriques des cellules. Issu de la thèse de Claire Dalmay, « Conception et réalisation de biocapteurs électromagnétiques pour l'analyse cellulaire aux fréquences micro-ondes », 2009.

b. Préparation des cellules

Deux types de mesures ont été effectués. Une première étape du travail a consisté en l'analyse des cellules U87-MG à l'état basal. Pour cela, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits, contenant les biocapteurs à raison de 300000 cellules par puits et incubées environ 48h. Ainsi, durant l'incubation, les cellules vont adhérer au support et pouvoir se placer dans les micro-chambres de culture permettant leur analyse. Les cellules sont ensuite fixées en PFA 4% dans de l'eau distillée stérile pour être mesurées. De manière à ne prendre en compte que les cellules, les mesures sont réalisées à l'air libre après rinçage à l'eau et séchage des biocapteurs juste avant la mesure.

Le deuxième type de mesure a été effectué sur les cellules U87-MG cultivées en milieu défini et donc flottantes. Le protocole de dépôt des cellules a donc été adapté à ces conditions de culture. Les cellules flottantes sont donc récupérées, centrifugées, dissociées et comptées. Une étape de fixation est effectuée en PFA 4% dans de l'eau distillée stérile. En parallèle, les circuits sont placés dans de l'eau distillée afin de remplir les micro-chambres de culture avec de l'eau, afin de permettre l'entrée des cellules plus facile dans ces gaps très fins. Les biocapteurs sont ensuite sortis de l'eau et 10 μ L de suspension

cellulaire (20000 cellules environ) sont déposés directement sur les circuits. Les capteurs sont alors placés à une température de 50°C afin de permettre l'évaporation du liquide et l'entrée des cellules dans les micro-chambres du capteur.

Dans les deux types d'analyse, la position des cellules dans les micro-chambres des biocapteurs est notée grâce à l'utilisation d'un microscope afin de connaître le nombre exact de cellules mesurées par capteur.

B. Tri cellulaire par la technique de couplage flux/force de sédimentation (SdFFF)

a. Principe

La SdFFF a été utilisée dans notre étude afin de trier des cellules ainsi que d'analyser des profils de tri de cellulaires en fonction des modifications apportées aux cellules par extinction de gènes. La SdFFF est donc composée de différentes parties (représentées figure M4) menant à un appareillage permettant de trier des cellules en fonction de leur taille et de leur densité :

- Une pompe permettant de régler un flux constant de la phase mobile (PBS).
- Un injecteur relié par une tubulure au canal de séparation et permettant d'injecter la suspension cellulaire.
- Un joint tournant (Les Ateliers Modernes, Limoges) reliant une tubulure fixe à un axe en rotation.
- Un canal de séparation situé dans un bol de centrifugation.
- Un moteur permettant la rotation du canal.
- Un détecteur mesurant la densité optique des particules à une longueur d'onde de 254nm.

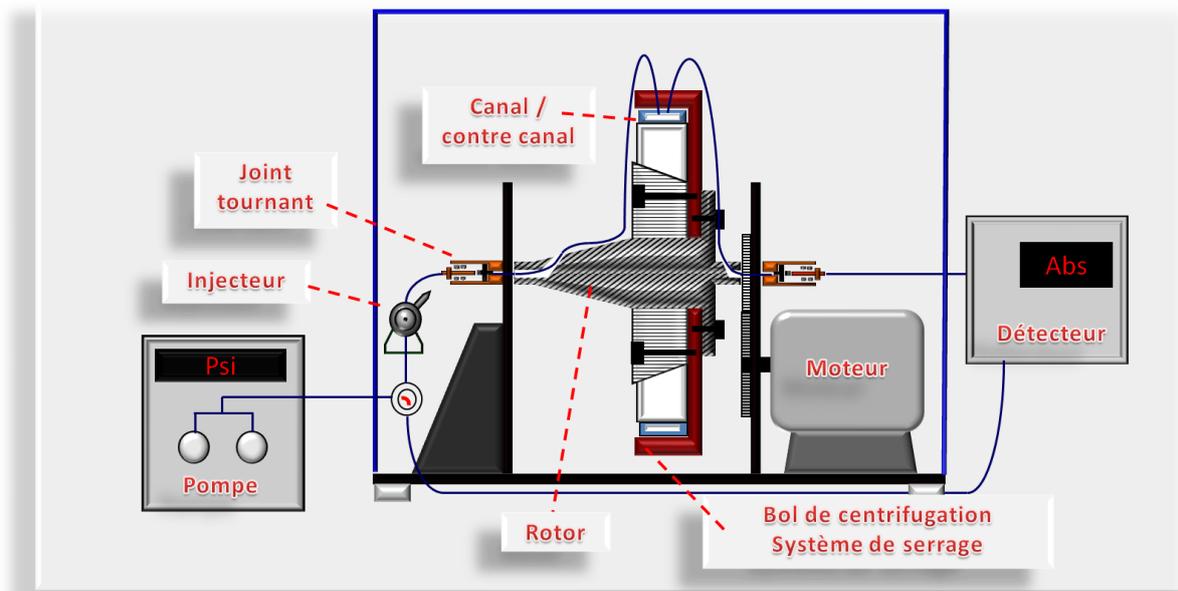


Figure M4 : Représentation de l'appareillage composant la machine de SdFFF.

Avant un tri cellulaire, la machine est nettoyée suivant différentes étapes permettant une stérilisation des tubulures. Ainsi, différents rinçages sont effectués en eau distillée, en Clenz (Beckman Coulter) et en eau de javel pour finir par de l'eau distillée.

b. Préparation des cellules et tri cellulaire

Les cellules sontensemencées 72h avant le tri à une densité de 700000 à 1.10^6 cellules par flasques. Les cellules sont décollées en versène, centrifugées, comptées et resuspendues en PBS à une densité de 3.10^6 à $3,5.10^6$ cellules par mL. Parallèlement, la machine de SdFFF est mise en PBS sous un flux d'1mL par min pendant environ 20 min avant le tri.

Les cellules U87-MG sont donc triées selon des conditions particulières à cette lignée cellulaire. Le flux est donc réglé à 1mL par minute et la vitesse de rotation d'environ 400 rpm (soit un champ externe d'environ 25g).

Résultats

I. Analyse de l'expression de gènes de la glycosylation selon le statut de différenciation de cellules de GBMs

A. Résumé de l'article 1 :

Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells

Mathilde Cheray, Daniel Petit, Lionel Forestier, Lucie Karayan-Tapon, Abderrahman Maftah, Marie-Odile Jauberteau, Serge Battu, François P. Gallet et Fabrice Lalloué.

Cancer Letters (2011)

(vol 312, p.24-32)

Les modifications post-traductionnelles jouent un rôle important dans l'apparition des cancers. Des altérations des gènes ou protéines impliqués au niveau de ces modifications post-traductionnelles peuvent déréguler le fonctionnement normal de l'organisme et induire le développement de différents cancers, en particulier des glioblastomes. La glycosylation est la modification post-traductionnelle majoritairement représentée dans tous les types de cancers. De nombreux travaux attestent de son rôle potentiel dans la carcinogenèse et plus spécifiquement dans les gliomes (227; 228).

Depuis près d'une décennie, l'hypothèse des cellules souches cancéreuses (CSCs) dans les GBMs tend à expliquer le phénomène d'échappement thérapeutique de ces tumeurs ainsi que les mécanismes de récurrence tumorale. Le caractère indifférencié et l'état quiescent sont les caractéristiques majeures des CSCs. Ces deux caractéristiques majeures conditionnent notamment l'agressivité cellulaire. Les facteurs permettant de contrôler les changements d'état de ces cellules, passage de l'état quiescent indifférencié à un état prolifératif différencié pourraient donc représenter de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de les éradiquer

L'état de différenciation des cellules pourrait être étroitement lié à l'expression des gènes impliqués dans la glycosylation dans le système nerveux central (274). Etant donné que l'agressivité des cellules tumorales dépend de leur caractère indifférencié, il apparaissait intéressant d'étudier les modifications d'expression des gènes de la glycosylation selon l'état de différenciation des cellules au cours de la transition CSC/cellules tumorales différenciées. Les gènes impliqués dans le mécanisme de N-glycosylation sont responsables de la synthèse des chaînes glycaniques. Les variations des niveaux d'expression de ces gènes au cours de la différenciation sont susceptibles de refléter les modifications de structure des glycanes. Une analyse transcriptomique différentielle de l'expression de plus de 600 gènes a été effectuée à l'aide de la technique TLDA (Taqman Low Density Array) qui allie une analyse de type micro-array à une analyse en qPCR du niveau d'expression de chaque gène. Notre étude s'est focalisée sur le niveau d'expression des gènes de la glycosylation dans 2 lignées de GBMs (U87-MG et U251) qui ont été placées respectivement dans 2 conditions de culture distinctes permettant un enrichissement en cellules indifférenciées ou en cellules différenciées.

L'analyse différentielle des niveaux d'expression de ces gènes dans ces 2 états cellulaires, permet d'établir une "glyco-signature" moléculaire spécifique des CSCs (cellules à un stade indifférencié). Cette signature basée sur l'expression des gènes de la glycosylation a nécessité plusieurs niveaux d'analyse afin de parvenir à une signature spécifique des CSCs.

B. Conclusion de l'article 1 :

L'altération des modifications post-traductionnelles est impliquée dans la tumorigenèse. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la N-glycosylation dans le cas des glioblastomes à l'aide d'une analyse transcriptomique différentielle du niveau d'expression des gènes de la N-glycosylation selon deux états de différenciation cellulaires, état indifférencié apparenté aux CSCs et état différencié correspondant aux cellules tumorales différenciées.

Le screening effectué à l'aide d'une technique de Taqman Low Density Array (TLDA) a permis d'étudier l'expression d'environ 600 gènes sur les 1000 que compte le glycogénome humain. Le TLDA a été effectué sur deux lignées cellulaires issues de glioblastomes (U251 et U87-MG) cultivées dans deux milieux de culture différents. Le premier est un milieu de culture basal contenant du SVF et menant à l'obtention de grandes cellules adhérentes différenciées. Le second est un milieu de culture spécifique, ne contenant pas de SVF et supplémenté en facteurs de croissance (bFGF et EGF) permettant l'obtention de petites cellules flottantes indifférenciées. La technique de TLDA a donc dans un premier temps permis d'obtenir une quantification du niveau d'expression des 600 gènes étudiés pour chaque lignée et dans les deux conditions de culture pour chacune d'entre elles. Une étape de tri des résultats et de classement des gènes en fonction de leur niveau d'expression dans les cellules indifférenciées comparé aux cellules différenciées a été indispensable pour l'obtention de plusieurs clusters de gènes selon un modèle hiérarchique. Seul une dizaine de gènes sont surexprimés dans les cellules indifférenciées des deux lignées cellulaires étudiées. Huit de ces gènes ont été sélectionnés. L'expression protéique de 5 de ces 8 gènes reflète les variations obtenues lors de l'analyse transcriptomique suggérant que la protéine, comme le gène, voit son niveau d'expression augmenté dans les cellules différenciées : *ATHL1*, *CHI3L1*, *KLRC3*, *PRUNE2* et *ST3GAL5*. Enfin, l'expression transcriptomique de ces 8 gènes a été étudiée à partir des ARNs totaux provenant de tumeurs de patients remises en culture dans les deux conditions de culture initiales. Des résultats comparables à ceux obtenus dans les lignées cellulaires sont observés pour 7 des 8 gènes.

Cette première étude a permis de mettre en évidence que le niveau d'expression des gènes de la glycosylation est différent selon le statut de différenciation des cellules de glioblastome étudiées. Notre étude s'est portée plus particulièrement sur les gènes surexprimés dans les cellules les plus indifférenciées de GBMs. Nos résultats mettent en évidence le fait que ces gènes, ainsi que les protéines pour lesquelles ils codent, sont surexprimés dans les cellules les plus indifférenciées. Ces premières données suggèrent que les gènes de la glycosylation isolés au cours de cette étude ainsi que leurs protéines correspondantes pourraient servir de nouveaux marqueurs des cellules souches cancéreuses de GBMs. Cette nouvelle glyco-signature pourrait refléter le stade d'agressivité de la tumeur.

II. Etude de l'implication de gènes de la glycosylation dans le caractère indifférencié des cellules de la lignée humaine U87-MG

Notre première étude a montré que 5 gènes impliqués dans les mécanismes de glycosylation étaient surexprimés dans les cellules les plus indifférenciées au caractère agressif. Notre second objectif était donc d'évaluer leur degré d'implication dans le maintien du phénotype indifférencié et de déterminer si l'inactivation de ces gènes était susceptible d'inhiber ou de ralentir la progression de la tumeur.

A. Extinction de gènes par la mise en place de shRNA via l'utilisation de vecteurs lentiviraux

a. Mise en place de lignées inactivées et vérification de l'efficacité d'extinction

La technique de transfection lentivirale stable qui m'a permis d'inactiver les gènes cibles résulte d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Ricardo Sanchez Prieto (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, CRIB, faculté de Médecine, Université de Castilla La Mancha, Albacete). L'apprentissage de la technique de transfection de shRNA à l'aide de vecteurs lentiviraux est l'aboutissement d'un stage de 2 mois au sein du laboratoire.

Nous avons donc effectué l'extinction de trois gènes de la glycosylation. Les trois gènes sélectionnés, afin d'effectuer cette seconde étude, ont été choisis car le niveau d'expression de leurs transcrits et des protéines correspondantes était particulièrement élevé dans les cellules indifférenciées. Nous avons transfecté la lignée U87-MG par des plasmides exprimant des shRNA permettant d'inactiver les gènes *CHI3L1*, *KLRC3* et *PRUNE2*. Pour valider le degré d'efficacité de transfection et par conséquent le niveau d'extinction des gènes cibles, l'expression des protéines correspondant aux gènes éteints a été analysée par western blotting et une quantification relative du niveau d'expression protéique a été évaluée par rapport à une protéine de référence (actine) (figure R1).

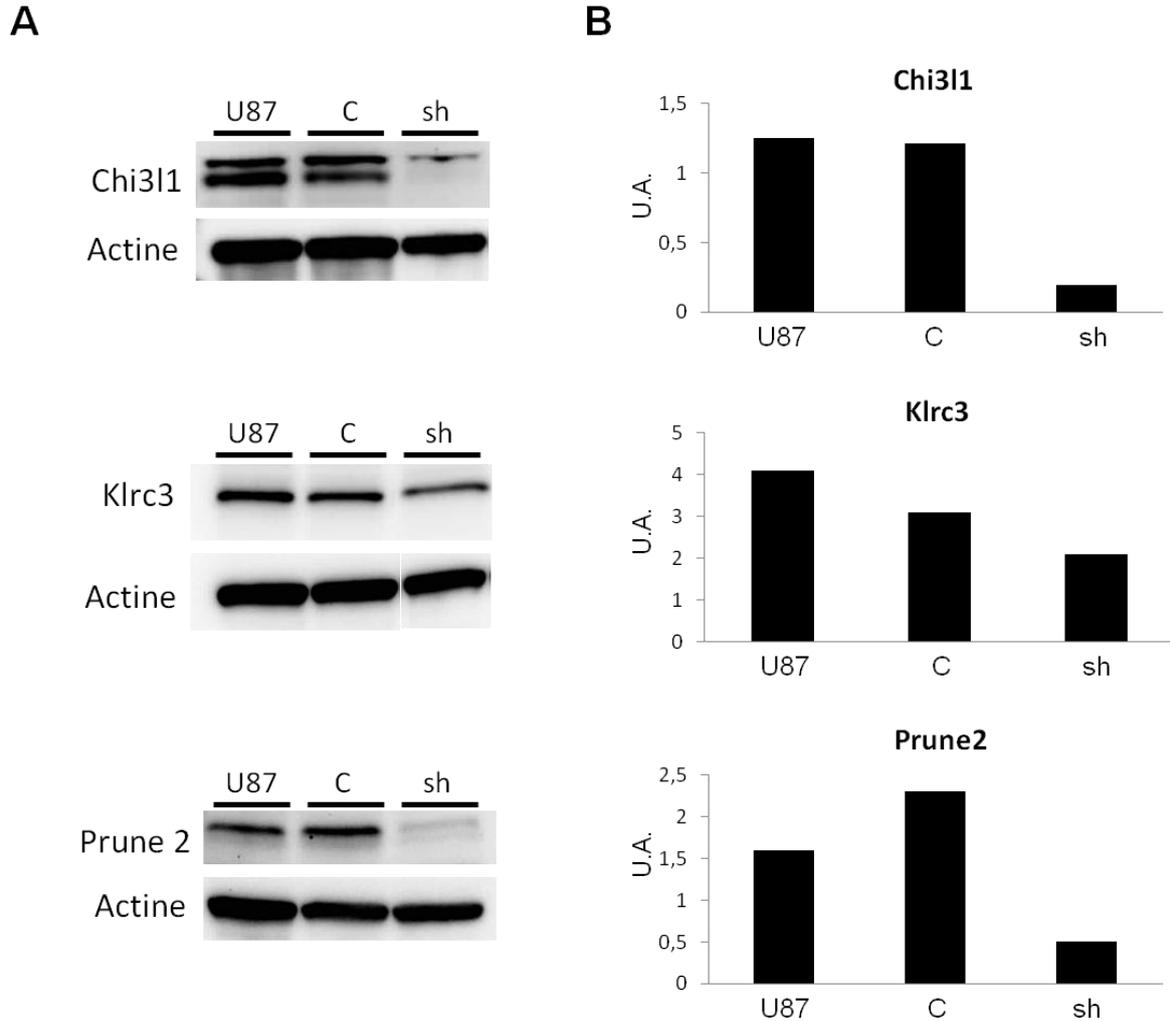


Figure R1 : Etude du niveau d'expression des protéines correspondant aux gènes inactivés par shRNA. **A** : Western blot permettant d'étudier le niveau des protéines correspondant aux gènes sélectionnés et éteints. Un contrôle de la quantité de protéine déposée est effectué par la détection de l'actine. **B** : Les ratios entre le niveau d'expression des protéines et le niveau d'actine est calculé pour comparer les niveaux d'expression des protéines dans chaque condition. U87 : cellules U87-MG en conditions basales ; C : cellules U87-MG ayant intégré le vecteur vide ; sh : lignée U87-MG éteinte pour le gène d'intérêt. U.A. : Unités Arbitraires.

L'efficacité de la transfection des shRNA est validée par l'analyse protéique (Fig.R1) pour les gènes *CHI3L1* et *PRUNE2* étant donné que ces gènes présentent des coefficients d'extinction respectifs d'environ 84% et 74% reflétés par une diminution significative du niveau d'expression des protéines correspondantes (Fig.R1B). En ce qui concerne l'extinction du gène *KLRC3*, l'efficacité d'extinction est beaucoup plus faible avec un coefficient d'extinction d'environ 55%. Une seconde transfection a été réalisée afin d'essayer d'obtenir un coefficient d'extinction meilleur mais les résultats obtenus se sont révélés identiques. Cependant, nous avons choisi d'étudier tout de même cette lignée modifiée,

inactivée partiellement pour le gène *KLRC3* dont l'expression protéique correspondante est faiblement inhibée.

b. Changements phénotypiques survenant dans les lignées modifiées

A partir de l'obtention de ces différentes lignées, nous avons cherché à étudier si l'extinction spécifique de gènes de la glycosylation pouvait entraîner des modifications du phénotype de ces cellules. La morphologie cellulaire des lignées modifiées a donc été analysée.

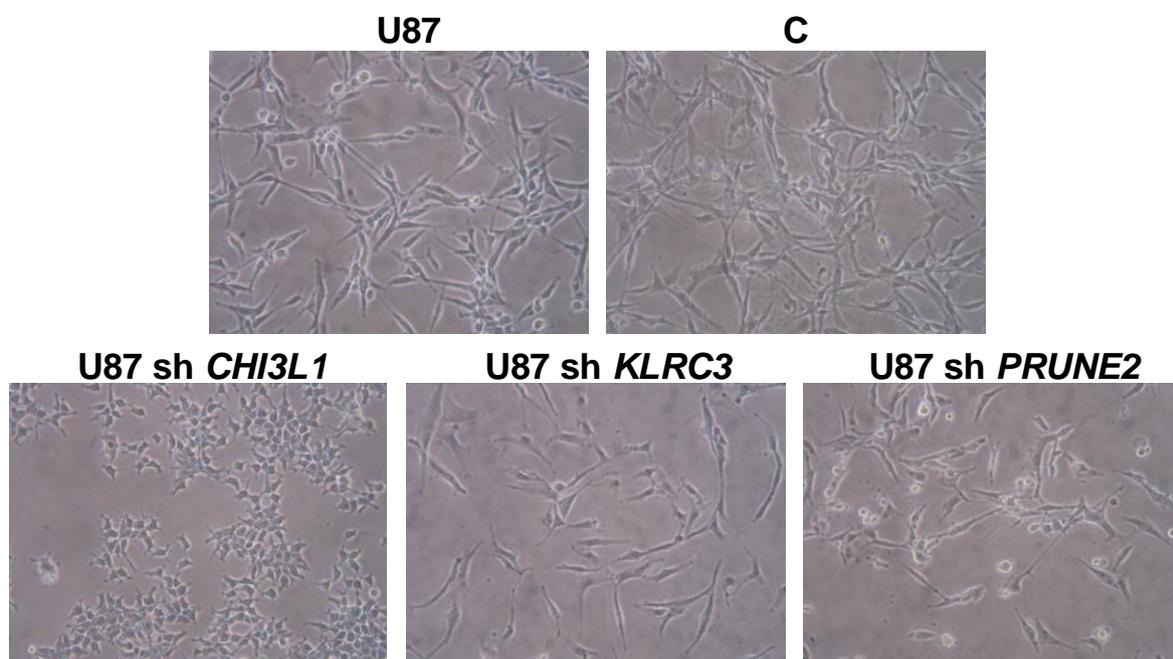


Figure R2 : Aspect morphologique de la lignée U87-MG modifiée ou non par shRNA. Les cellules cultivées en conditions basales sont photographiées après 48h de remise en culture. Grossissement x200. U87 : lignée basale U87-MG ; C : lignée U87-MG contrôle, possédant le vecteur vide pLKO ; U87 sh *CHI3L1* : lignée U87-MG éteinte pour le gène *CHI3L1* ; U87 sh *KLRC3* : lignée U87-MG éteinte pour le gène *KLRC3* ; U87 sh *PRUNE2* : lignée U87-MG éteinte pour le gène *PRUNE2*.

L'étude de l'aspect morphologique des différentes lignées obtenues après extinction de gènes permet de mettre en évidence dans un premier temps que la lignée U87 contrôle (C) transféctée avec le vecteur vide pLKO.1 n'est pas modifiée par rapport aux cellules U87-MG basales (Figure R2). Inversement, la lignée U87 sh *CHI3L1* semble totalement modifiée d'un point de vue morphologique à la suite de l'inactivation du gène *CHI3L1*. En effet, cette

lignée modifiée présente des petites cellules en étoile dépourvues de prolongements par comparaison avec la lignée U87-MG basale suggérant une implication de la protéine Chi3L1 dans la migration cellulaire.

Concernant l'inactivation du gène *KLRC3*, celle-ci semble entraîner la disparition des petites cellules rondes présentes dans la lignée U87-MG et à partir desquelles est générée l'hétérogénéité cellulaire de la lignée. Les autres cellules de cette lignée modifiée présentent toujours de longs prolongements similaires à ceux des cellules différenciées de la lignée U87-MG (Figure R2, cellules U87).

Enfin, l'aspect morphologique des cellules U87 sh *PRUNE2* ne semble pas modifié par comparaison avec les cellules basales.

On observe néanmoins que la quantité de cellules dans les lignées inactivées semble inférieure à celle de la lignée contrôle.

Les observations morphologiques effectuées sur les différentes lignées inactivées ont été complétées par des observations phénotypiques reposant sur l'expression de marqueurs spécifiques de la lignée U87MG. Une quantification relative des niveaux d'expression de chaque protéine dans les différentes lignées a été déterminée par rapport au niveau d'expression dans la lignée contrôle.

B. L'extinction des gènes induit des modifications du phénotype cellulaire

a. **Analyse de l'expression des principaux marqueurs spécifiques de la lignée U87MG dans les lignées modifiées**

Afin de caractériser plus en détails les lignées modifiées par shRNA, nous avons étudié l'expression de différents marqueurs dans le but de déterminer si l'extinction des gènes de la glycosylation modifiait le niveau d'expression de ces marqueurs. L'expression de deux marqueurs de différenciation, la β -tubuline III et le S100 β , et un marqueur des cellules immatures, la vimentine, ont été étudiés par immunocytochimie par immunofluorescence indirecte (IFI) (Figures R3, R4 et R5).

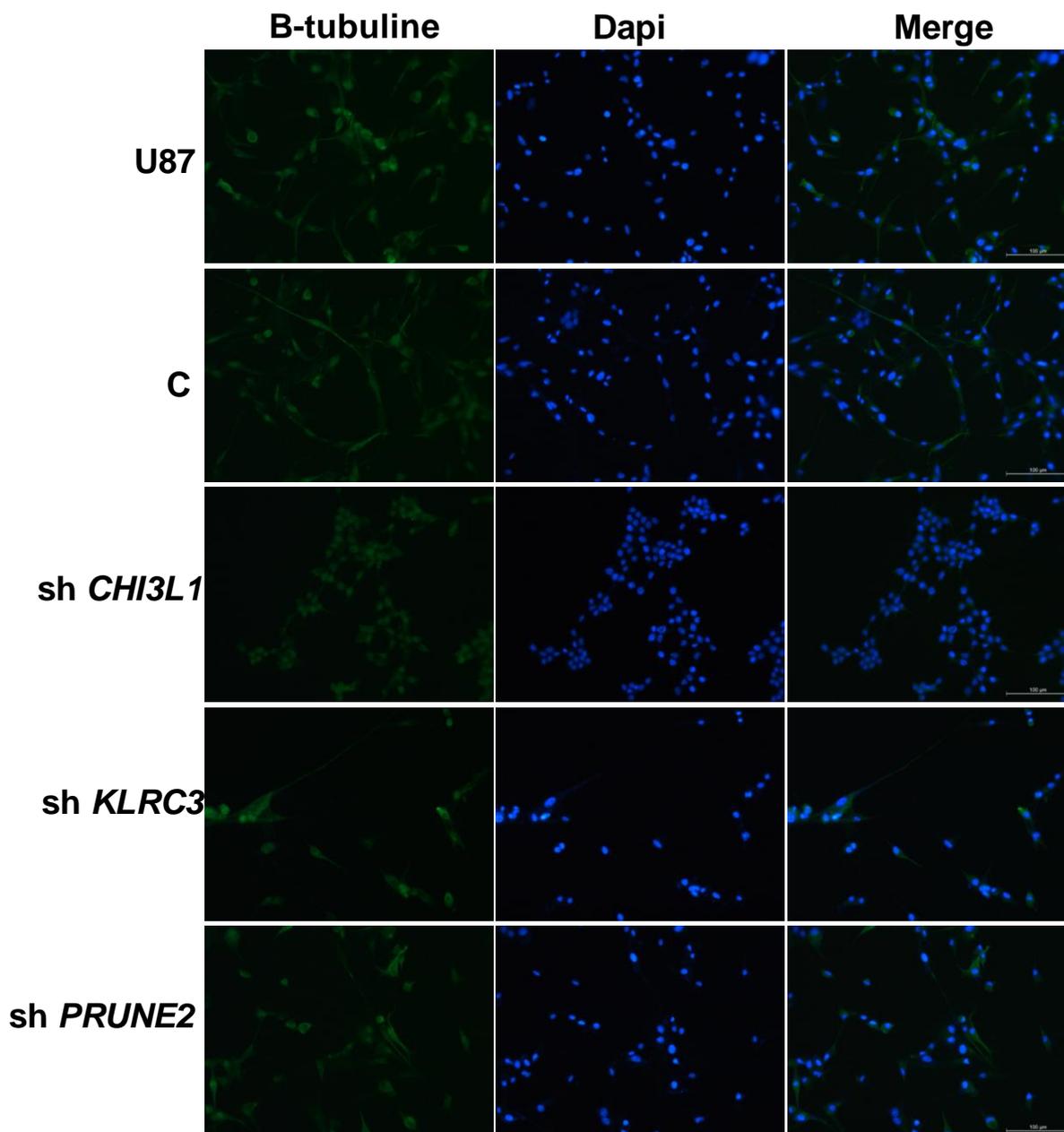


Figure R3 : Etude de l'expression de la β -Tubuline III dans les différentes lignées U87. L'expression de la β -Tubuline III est suivie par le marquage vert (Alexa fluor 488) et les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le DAPI. Merge : superposition des deux marquages. Grossissement x200.

L'expression de la β -tubuline III semble être identique dans les lignées U87 sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* en comparaison avec la lignée U87-MG basale. En revanche, la lignée U87 sh *CHI3L1* présente une diminution ou une perte d'expression de la β -tubuline III.

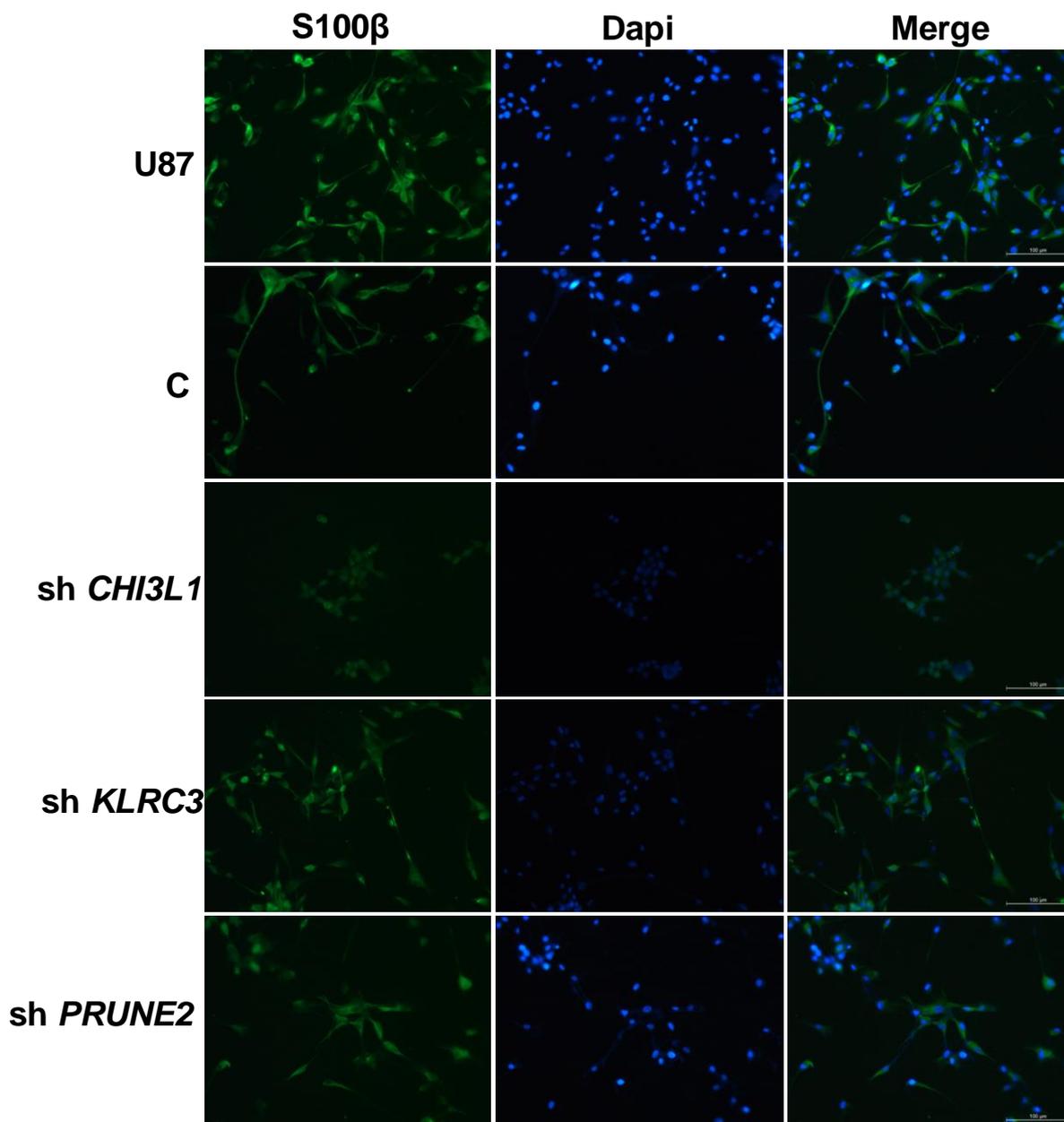


Figure R4 : Etude de l'expression de S100 β dans les différentes lignées U87. L'expression de S100 β est suivie par le marquage vert (Alexa fluor 488) et les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le DAPI. Merge : superposition des deux marquages. Grossissement x200.

Concernant le marqueur des astrocytes S100 β , de la même manière que la β -tubuline III, l'expression est visualisée dans les lignées U87 sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* à un niveau équivalent à celui de la lignée U87-MG basale. En présence du shRNA inactivant *CHI3L1*, l'expression de S100 β diminue fortement par rapport à la lignée contrôle.

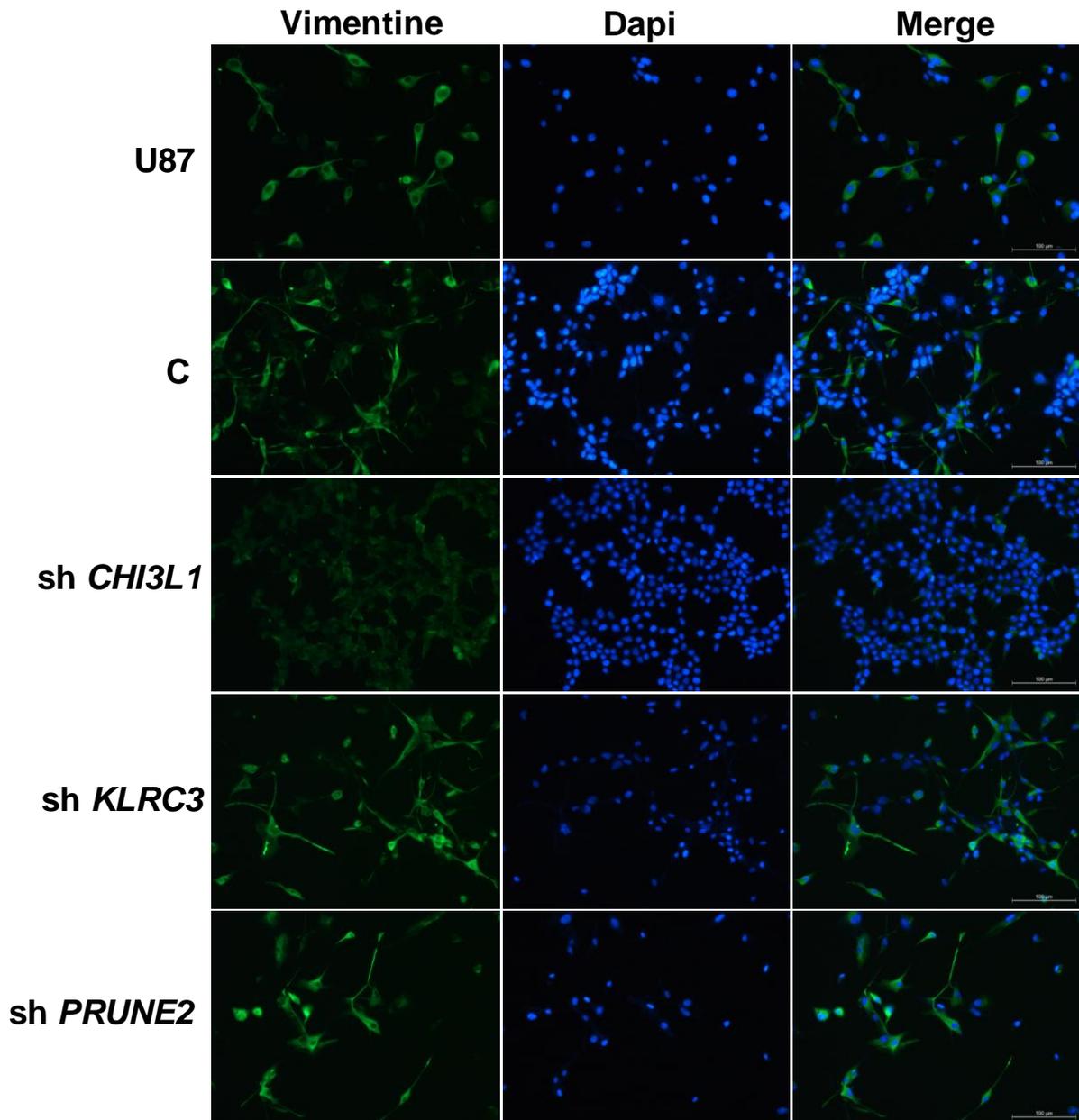


Figure R5 : Etude de l'expression de la vimentine dans les différentes lignées U87. L'expression de la vimentine est suivie par le marquage vert (Alexa fluor 488) et les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le DAPI. Merge : superposition des deux marquages. Grossissement x200.

L'expression de la vimentine ne semble pas être modifiée dans les lignées U87 sh *KLRC3* et *PRUNE2* par comparaison avec les lignées contrôle tandis que cette expression semble avoir disparu à la suite de l'inactivation du gène *CHI3L1* dans la lignée U87 sh *CHI3L1*.

En conclusion, cette première étape de caractérisation des lignées modifiées par shRNA a pu mettre en évidence que l'extinction du gène *CHI3L1* entraîne la diminution ou la perte d'expression des trois marqueurs analysés que sont la β -Tubuline III, le S100 β et la vimentine. Dans les 2 autres lignées étudiées, l'inactivation des gènes *KLRC3* et *PRUNE2* n'induit pas de modification dans le niveau d'expression de ces marqueurs. L'extinction du gène *CHI3L1* semble entraîner des changements morphologiques et phénotypiques des cellules U87-MG.

b. Etude du profil d'élution des lignées modifiées triées par SdFFF

Le tri par SdFFF permet d'isoler des sous-populations cellulaires issues d'une même lignée cellulaire ou d'une tumeur. Le fractogramme obtenu lors de l'élution des cellules triées permet d'isoler les sous-populations en fonction de leur ordre d'élution. En effet, le tri par SdFFF permet d'éluer en premier lieu les cellules les plus grosses ou denses pour finir par les cellules les plus petites. Ainsi, la première fraction de cellules triées appelée, fraction 1 ou F1 sera composée de grosses cellules correspondant à des cellules différenciées (plus grandes puisqu'elles émettent des prolongements), et la dernière fraction de cellules, la fraction 3 ou F3, sera composée d'une population de petites cellules correspondant à des cellules immatures ou peu différenciées. Ces données concernant l'élution des sous-populations issues de la lignée U87-MG ont fait l'objet de travaux antérieurs au sein de l'équipe qui ont permis de montrer que les cellules U87-MG de la fraction F1 présentent une forte expression de la N-CAM tandis que les cellules de la fraction F3 ne l'expriment pas. De la même manière, il a été montré que les cellules de la fraction F3 expriment la vimentine de façon beaucoup plus importante que les cellules de la fraction F1. Enfin, l'expression du marqueur des CSCs CD133 n'a été retrouvée que dans les cellules de la fraction F3 (275). Ces données confirmant donc dans un premier temps l'efficacité du tri, mettent aussi en évidence les caractéristiques des cellules triées : la sous-population composant la fraction F1, correspond aux cellules différenciées de la lignée cellulaire U87-MG, et la sous-population composant la fraction F3 est principalement enrichie en cellules immatures ou indifférenciées.

A partir de ces observations, nous avons utilisé le tri par SdFFF pour tenter de caractériser plus précisément les lignées modifiées par shRNA.

La lignée U87-MG triée par SdFFF a été analysée afin de mettre en évidence ses caractéristiques hétérogènes. Ainsi, après tri par SdFFF, l'expression de différents marqueurs de différenciation (GFAP, β -Tubuline III) et d'immaturité cellulaires (Vimentine, Nanog) a été recherchée par IFI (Figure R6).

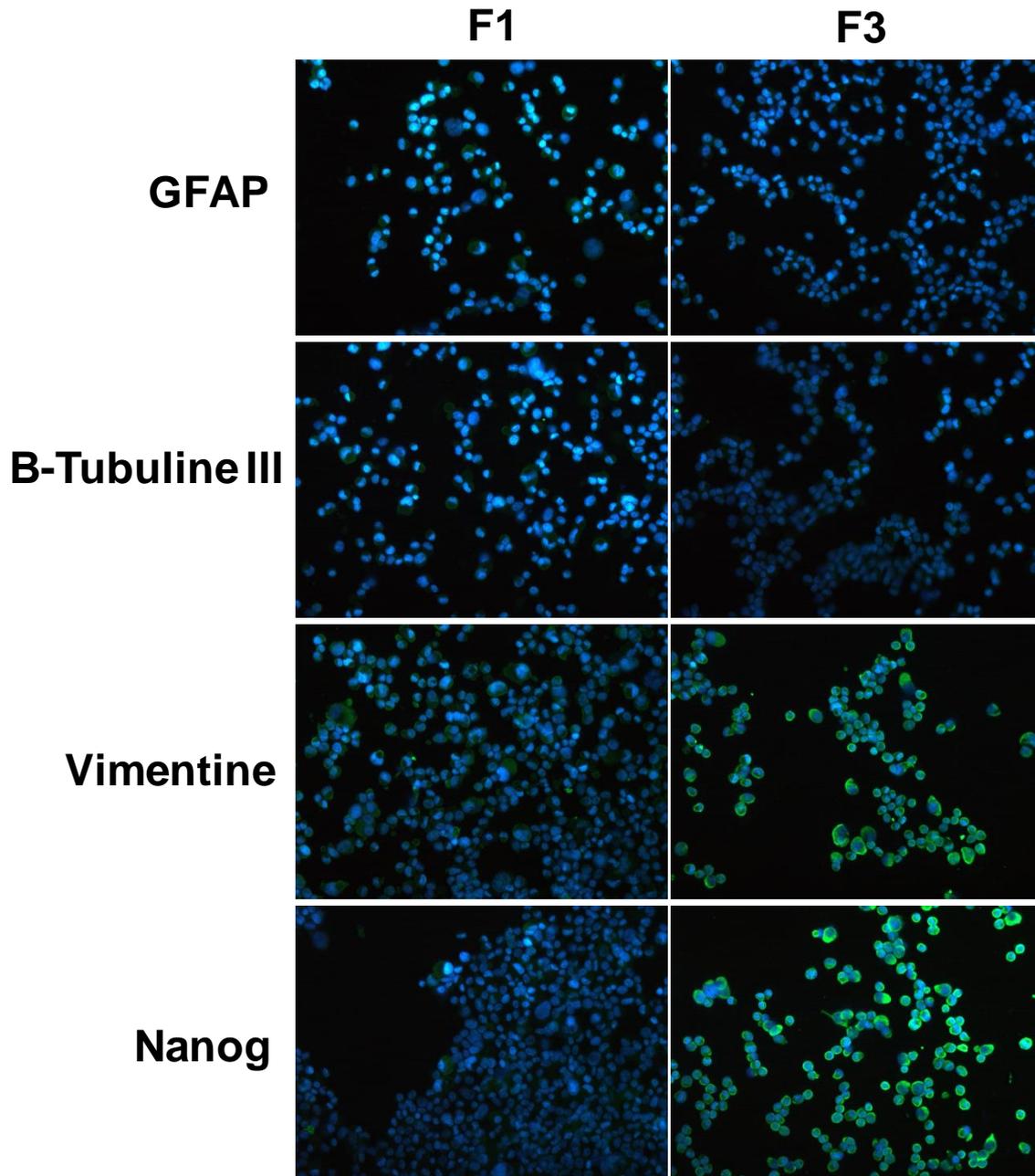


Figure R6 : Etude immunocytochimique de la lignée U87-MG triée par SdFFF. Les cellules U87-MG triées par SdFFF récoltées après tri ont été marquées par IFI avec la GFAP, la β -Tubuline III, la

vimentine et Nanog. Pour chaque marquage, la protéine d'intérêt est révélée par l'alexa fluor 488 (marquage vert) et les noyaux sont marqués par le DAPI (marquage bleu).

Le marquage par immunofluorescence des différentes fractions de la lignée U87-MG permet de mettre en évidence un niveau d'expression des marqueurs étudiés différent en fonction des deux fractions. Ainsi, la fraction 1 ou F1 présente une intensité de fluorescence plus importante pour les marqueurs de différenciation GFAP et β -Tubuline III en comparaison avec les cellules de la fraction 3 ou F3. De façon similaire, la F3 présente une expression des marqueurs d'immaturité vimentine et nanog plus importante que la F1. Ces résultats confirment donc les données préliminaires obtenues par l'équipe et permettent de souligner le caractère hétérogène de la lignée U87-MG composée de cellules à différents stades de différenciation. Le tri par SdFFF permet donc d'isoler les cellules les plus différenciées dans la fraction F1 et les cellules les plus immatures dans la fraction F3.

Dans le but d'étudier les cellules modifiées par shRNA, nous avons trié ces cellules par SdFFF et analysé les profils d'éluion obtenus (Figure R7).

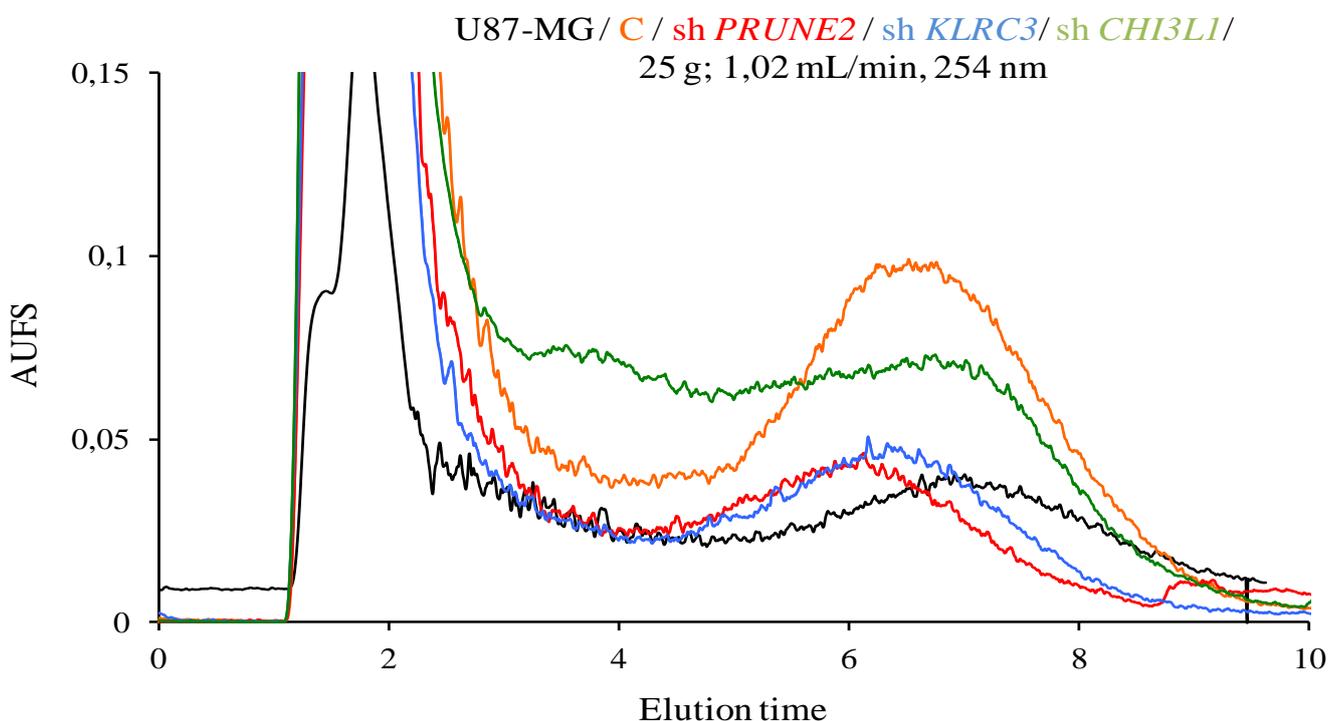


Figure R7 : Fractogrammes de SdFFF présentant les différents profils obtenus avec les lignées modifiées. Les lignées ont été triées indépendamment et les fractogrammes obtenus ont été superposés afin de pouvoir comparer les caractères de tri de chaque lignée. Toutes les lignées ont été

triées à 25G et sous un flux de 1mL/min. Chaque fractogramme représente une lignée définie par une couleur spécifique. U87-MG : noir ; U87-MG contrôle : C : orange ; U87 sh PRUNE2 : rouge ; U87 sh KLRC3 : bleu ; U87 sh CHI3L1 : vert.

Le tri par SdFFF permet, dans un premier temps, de mettre en évidence le fait que chaque lignée présente un profil d'élution propre, qui reflète sa composition cellulaire originale. Ainsi, la superposition des fractogrammes permet de visualiser les variations des profils d'élution des cellules qui dépendent des modifications morphologiques qu'elles subissent selon les différentes conditions.

L'analyse des fractogrammes superposés met en évidence deux types de profils d'élution. Dans un premier cas, les lignées modifiées sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* présentent un décalage de pic vers la gauche en comparaison avec la lignée basale. Comme nous l'avons démontré auparavant, les cellules éluées en premier après tri par SdFFF correspondent aux cellules les plus différenciées. Ainsi, le décalage de pic vers la gauche met en évidence un probable enrichissement en cellules différenciées au détriment des cellules les plus immatures.

Le second type de profil d'élution est obtenu avec la lignée modifiée sh *CHI3L1*. Avec cette lignée, le profil d'élution fait apparaître deux pics de cellules dans le même profil d'élution. Le premier pic (pic de droite) est similaire aux cellules basales bien que légèrement décalé à gauche. Le second pic apparaissant plus à gauche n'est pas retrouvé dans les autres lignées cellulaires et est donc spécifique de la lignée éteinte pour le gène *CHI3L1*. Ce type de profil permet de mettre en évidence deux sous-populations bien distinctes au sein de la même lignée modifiée. Ce second pic ajouté au léger décalage à gauche du premier pic suggère que cette lignée modifiée est enrichie en cellules au caractère différencié.

L'effet de l'inactivation des gènes de la glycosylation peut induire des changements fonctionnels des cellules indifférenciées présentes dans les lignées, c'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'effet de l'extinction de ces gènes sur les caractéristiques d'immaturité des lignées modifiées.

C. Etude de l'effet de l'extinction des gènes de la glycosylation sur le caractère indifférencié ou sur les caractéristiques « souches » des cellules U87-MG

Après avoir étudié les caractéristiques des lignées modifiées par shRNA, nous nous sommes intéressés au caractère indifférencié des cellules modifiées. En effet, nous avons montré dans la première partie de ce travail que le niveau d'expression des gènes sélectionnés est étroitement lié au statut indifférencié des cellules. Si ces gènes sont impliqués dans le maintien de l'état indifférencié, il est probable que la baisse significative de leur niveau d'expression serait susceptible d'inhiber le maintien de l'état d'immatunité. La capacité à générer des neurosphères est propre aux cellules les plus indifférenciées. Afin d'analyser l'effet de la perte de fonction des gènes de la glycosylation sur l'établissement et le maintien du caractère indifférencié au sein des lignées modifiées, nous avons étudié leur clonogénicité ainsi que leur capacité à former des tumeurs.

a. Etude de la clonogénicité des cellules U87-MG

La clonogénicité est l'une des caractéristiques des cellules souches normales et par conséquent des cellules souches cancéreuses. Ce test fonctionnel permet de mettre en évidence les propriétés d'auto-renouvellement des CSCs en démontrant la capacité d'une cellule unique à former une neurosphère. La clonogénicité des cellules U87-MG et des cellules U87-MG modifiées par shRNA a été étudié après culture en milieu défini afin d'amplifier préalablement les cellules indifférenciées (Figure R8).

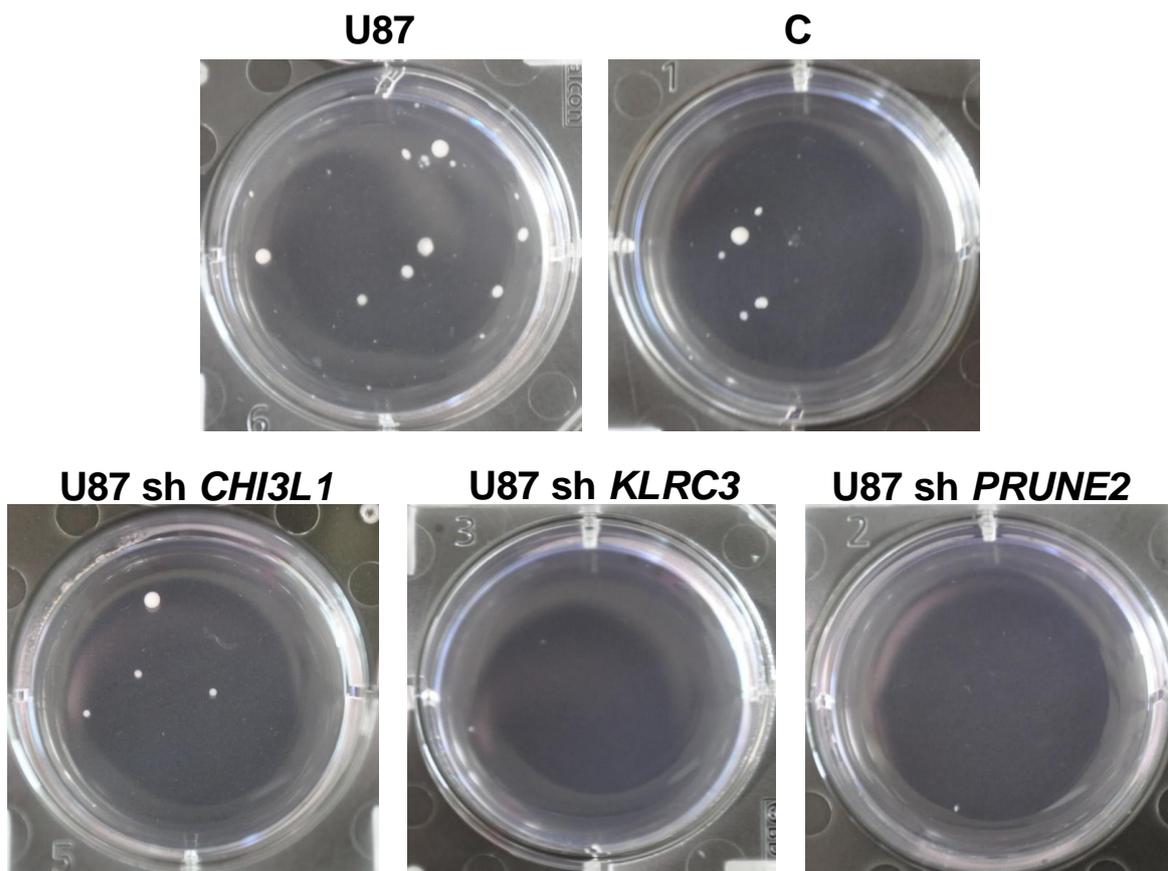


Figure R8 : Clonogénicité des cellules U87-MG contrôle et modifiées par shRNA. Les cellules cultivées en milieu défini ont été ensemencées en gel d'agar/agarose cela permettant le développement de sphères à partir d'une cellule unique. U87 : cellules U87-MG basales ; C : Cellules U87-MG transfectées avec le vecteur vide pLKO ; U87 sh CHI3L1/KLRC3/PRUNE2 : cellules U87-MG dont l'expression du gène correspondant est éteinte par shRNA.

Les résultats au test de clonogénicité sont divergents selon la nature des gènes inactivés au sein de la lignée U87-MG comme le prouvent les observations macroscopiques (Figure R8) et les comptages du nombre de sphères (Figure R9). Si on considère les trois lignées modifiées, on constate que le nombre de sphères formées a diminué par rapport au contrôle U87-MG + PLKO vide. Il existe cependant des différences entre les lignées modifiées. Pour la lignée U87 inactivée pour *CHI3L1*, le nombre de sphères formées (10 neurosphères) est inférieur à celui de la lignée native U87-MG (20 neurosphères) mais est sensiblement équivalent à celui de la lignée U87-MG + PLKO vide (9 sphères). Pour les lignées U87 sh *KLRC3* (2 neurosphères) et U87 sh *PRUNE2* (3 neurosphères), le nombre de sphères produit est significativement inférieur à celui des contrôles.

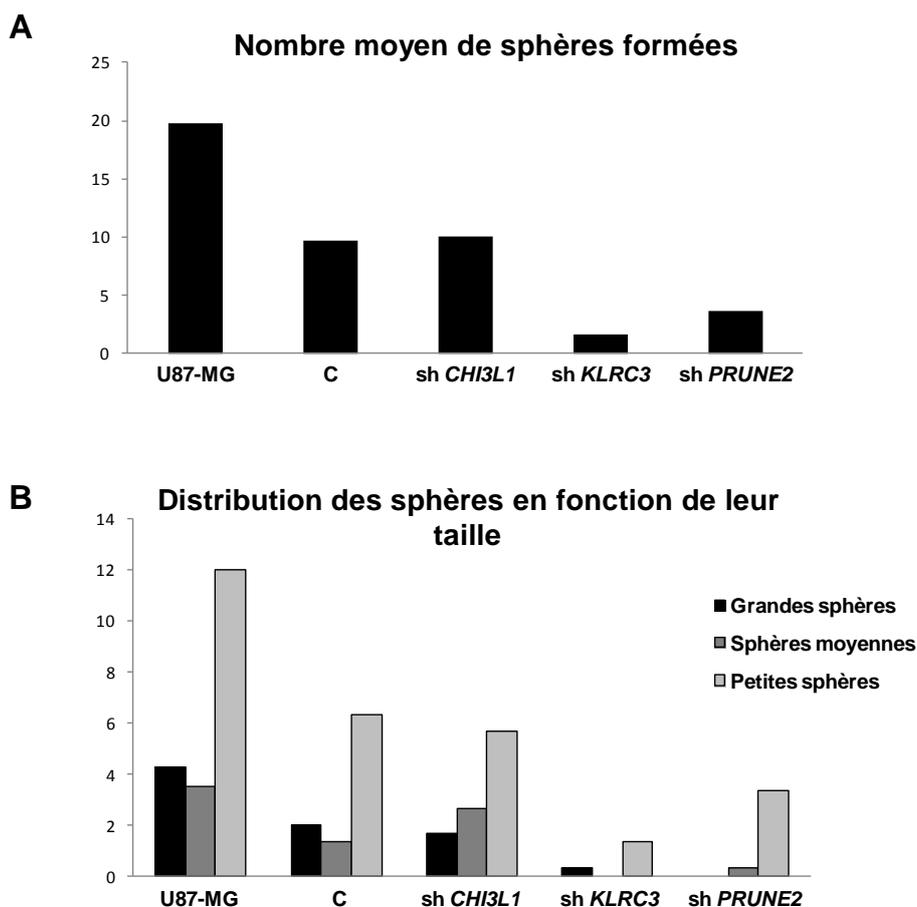


Figure R9 : Etude du nombre moyen de sphères formées et de la distribution du nombre de sphères en fonction de leur taille obtenues par test de clonogénicité. **A** : Nombre moyen de sphères formées après 1 mois de culture en test de clonogénicité en fonction des lignées étudiées. **B** : Distribution du nombre de sphères formées en fonction de leur taille pour chaque lignée étudiée. Pour chaque lignée, le test de clonogénicité a été effectué sur trois puits indépendants. Le nombre de sphères et leur taille a été calculé avec le logiciel Image J.

Le test de clonogénicité permet de mettre en évidence la diminution de formation de sphères en présence des shRNA *KLRC3* et *PRUNE2*. Par comparaison avec la lignée U87-MG basale, la lignée éteinte pour le gène *PRUNE2* présente 4 fois moins de sphères formées et la lignée inactivée pour *KLRC3* environ 10 fois moins de sphères formées (Figure R9, A). En ce qui concerne la lignée sh *CHI3L1*, le nombre de sphères formées est inférieur à la lignée basale U87-MG mais reste supérieur aux deux autres lignées modifiées. La distribution du nombre de sphères en fonction de leur taille a également été étudiée. Ainsi, les lignées sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* ne forment peu ou pas de grosses sphères (Figure R9, B).

Dans les deux lignées modifiées, le nombre de sphères formées et leurs tailles sont significativement diminués par rapport aux lignées contrôles suggérant une diminution du nombre des cellules présentant un caractère souche ou encore une altération de la fonction d'auto-renouvellement à la suite de l'inactivation de ces deux gènes. La diminution est nettement moins importante avec la lignée sh *CHI3L1* qui forme cependant des sphères de taille inférieure à la lignée U87-MG basale.

Ces résultats semblent corrélés ceux obtenus à la suite du tri par SdFFF. L'hypothèse émise concernerait plutôt une perte ou d'une diminution du pool des cellules souches qu'une perte de leur fonction d'auto-renouvellement puisque les résultats de SdFFF montrent clairement un enrichissement en cellules différenciées dans les lignées sh *KLRC3* et sh *PRUNE2*.

b. Etude du caractère tumorigène des cellules U87-MG

Les glioblastomes sont des tumeurs très agressives ayant la capacité de former de nouvelles tumeurs même après exérèse de la tumeur primitive. Ce caractère tumorigène est spécifique des CSCs qui sont considérées comme les cellules les plus agressives des GBMs. La lignée U87-MG est une lignée cellulaire issue de glioblastome et connue comme ayant un fort potentiel tumorigène (276; 277). Nous avons donc cherché à déterminer si l'extinction des gènes de la glycosylation pouvait modifier les propriétés de tumorigénicité de cette lignée. Le modèle d'étude de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet (CAM) est un modèle simple permettant de produire des tumeurs expérimentales à partir d'un embryon d'oiseau et d'étudier leur développement. Les tumeurs formées sont semblables aux tumeurs humaines d'un point de vue histo-pathologique et morphologique. La proportion des marqueurs classiques est similaire. Un développement de lobes tumoraux caractéristiques, très souvent absents dans les modèles murins de xéno greffes est observé. Une néo-angiogenèse tumorale très précoce permet la vascularisation tumorale et la formation de zones nécrotiques au sein de la tumeur. Ce modèle est relativement courant pour l'étude de l'angiogenèse tumorale dans les GBMs comme l'attestent les travaux suivants (278-280). Nos tests fonctionnels de tumorigénicité ont donc été réalisés sur ce modèle de tumeurs expérimentales.

Des greffes de cellules sur la CAM ont été réalisées afin d'étudier le potentiel tumorigène des cellules modifiées. Le modèle de la CAM permet d'effectuer des

observations macroscopiques des tumeurs et ainsi de les comparer d'un point de vue morphologique (Figure R10).

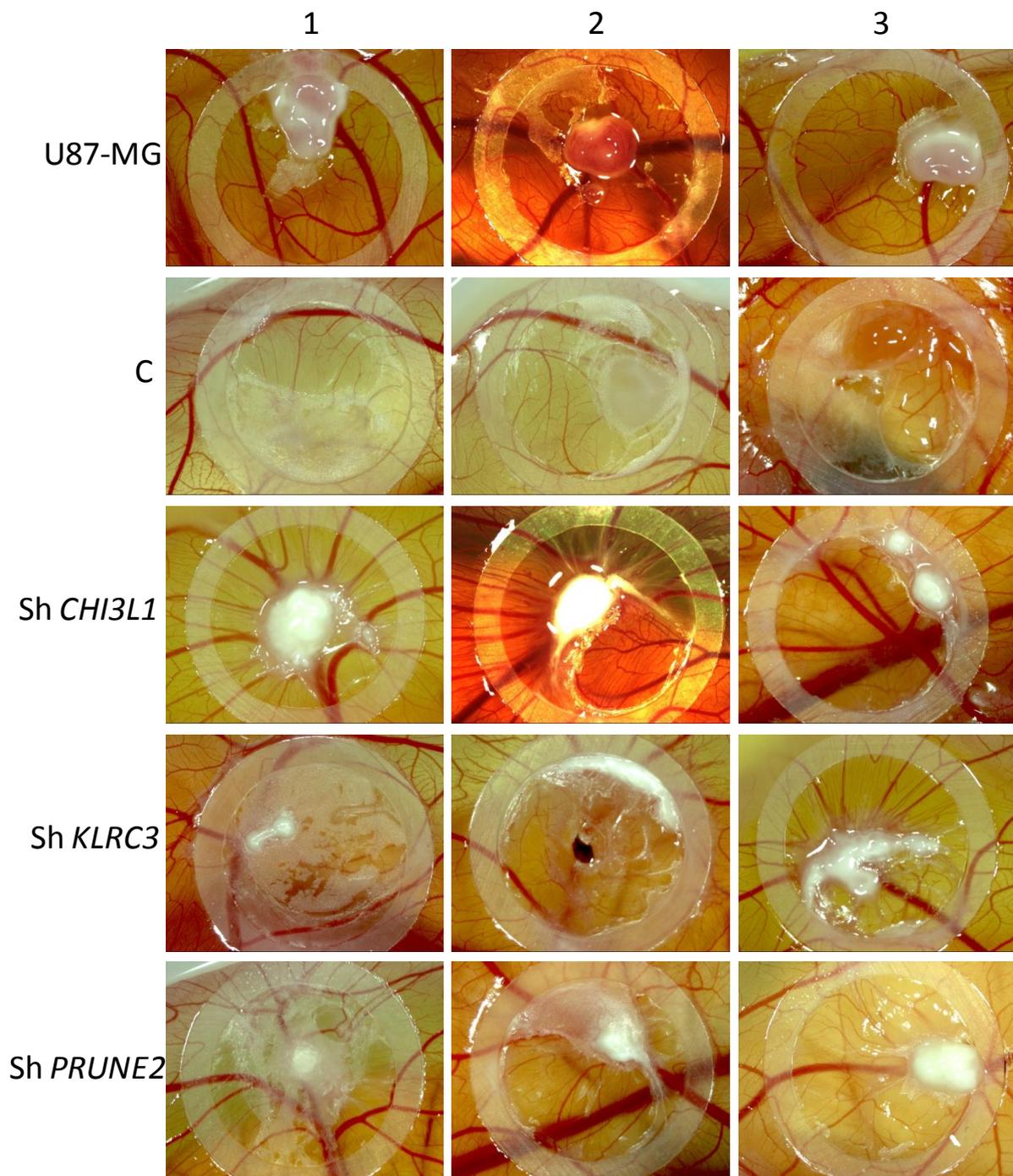


Figure R10 : Greffes des cellules U87-MG (modifiées ou non) sur la CAM. Les différentes lignées sont greffées avec 3.10^6 cellules pour chaque lignée. Après 4 jours, les tumeurs sont récupérées et analysées. U87 : cellules U87-MG basales ; C : Cellules U87-MG transfectées avec le vecteur vide pLKO ; U87 sh *CHI3L1*/*KLRC3*/*PRUNE2* : cellules U87-MG dont l'expression du gène correspondant est éteinte par shRNA.

Les cellules U87-MG greffées sur la CAM entraînent la formation de tumeurs volumineuses, d'aspect dense et de couleur rose en raison de la présence d'une importante micro-vascularisation. Les cellules modifiées par shRNA forment également des tumeurs mais celles-ci sont généralement de taille inférieure, d'aspect plus étalé et de couleur blanche. Concernant les cellules contrôles (C) transfectées par le vecteur vide, aucune masse tumorale n'est visible. L'infection des cellules avec le vecteur vide n'est pas censée modifier celles-ci mais uniquement servir de contrôle interne aux cellules modifiées. Dans notre cas, il semble que le vecteur vide modifie les cellules ce qui n'est pas logique au regard des résultats obtenus avec les lignées sh qui ont été transfectées avec la même construction contenant en plus le shRNA spécifique du gène d'intérêt. Ces dernières conservent en effet leur capacité à générer des tumeurs dont les caractéristiques morphologiques sont différentes de celles de la lignée basale.

Ces observations concernant la lignée contrôle suggèrent que la lignée contenant le vecteur vide aurait été modifiée et pourrait remettre en question l'utilisation de ce vecteur. L'effet observé dans les lignées modifiées par shRNA pourrait être dû à l'inactivation spécifique du gène et non à la construction plasmidique. Ces lignées modifiées par sh *CHI3L1*, sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* sont totalement blanches en surface suggérant la formation de zones de nécrose comme cela a pu être préalablement observé sur la CAM (278). De plus, les lignées sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* semblent former des tumeurs beaucoup moins structurées et compactes que la lignée U87-MG.

Ces résultats préliminaires mettent en évidence une modification de la lignée contrôle à la suite de l'intégration du vecteur vide pLKO. Ce vecteur, semble à lui seul modifier les caractéristiques tumorigènes de la lignée U87-MG alors que son insertion est censé être sans effet sur le comportement cellulaire (281). Dans les lignées modifiées par shRNA, la formation de tumeurs indique au contraire que le vecteur pLKO ne serait pas en cause dans l'inhibition de la progression tumorale. Le vecteur vide ayant été gracieusement prêté par l'équipe du Dr Sanchez-Prieto, nous réalisons actuellement de nouvelles transfections de la lignée U87-MG avec un pLKO d'origine commerciale afin de lever le doute sur ce problème.

c. Effet des inactivations de gènes sur l'angiogenèse tumorale

Le modèle de la CAM est relativement intéressant pour étudier la vascularisation de l'embryon de poulet détournée par la tumeur formée (282-284). Les glioblastomes sont

capables de détourner la vascularisation de leur hôte afin de permettre un apport en oxygène au cœur de la tumeur permettant son développement au détriment de la formation de zones hypoxiques (285; 286). La présence de zones nécrotiques assimilables à des zones hypoxiques visibles à la surface des tumeurs issues des cellules modifiées par les différents shRNA suggère un défaut de vascularisation des tumeurs formées sur la CAM. Des travaux antérieurs ont démontré que YKL-40 (CHI3L1) jouait un rôle clé dans la promotion de l'angiogenèse tumorale (287). Une analyse plus approfondie de l'angiogenèse tumorale a donc été effectuée. Après avoir récupéré la tumeur avec la CAM qui l'entoure, la vascularisation de la région basale de la tumeur en contact avec la CAM est observée (figure R11). Ces observations macroscopiques permettent de visualiser la néo-vascularisation tumorale ainsi que les vaisseaux détournés par les tumeurs qui pénètrent dans la masse tumorale.

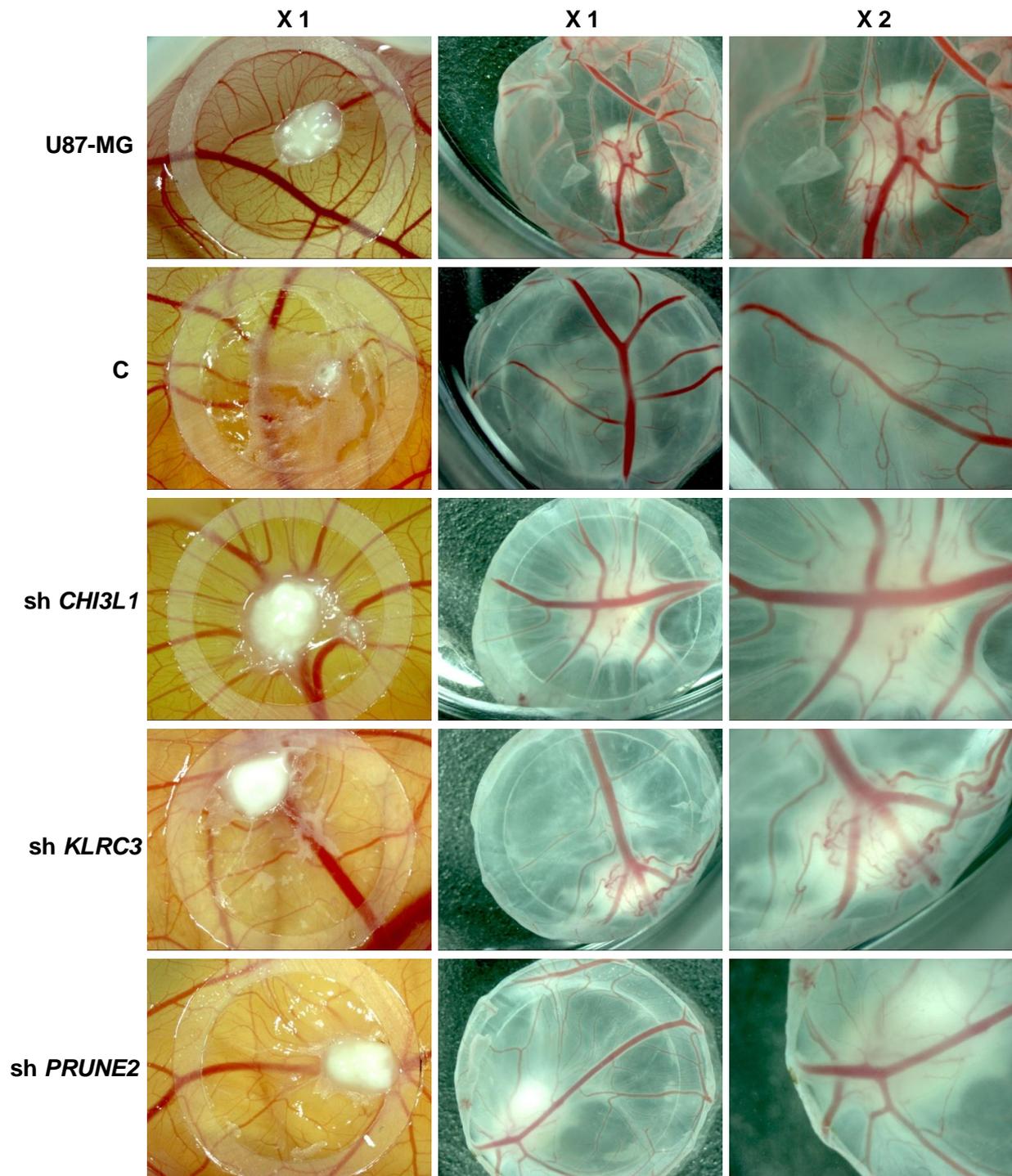


Figure R11 : Etude de la vascularisation des tumeurs obtenues par greffe sur la CAM. Les tumeurs formées par les cellules greffées sur la membrane chorioallantoïdienne de poulet sont photographiées dans un premier temps encore présentes sur la CAM de l'embryon de poulet vivant. L'animal est sacrifié et la membrane sur laquelle la tumeur a poussé est récupérée, retournée et photographiée.

Afin d'effectuer une comparaison précise, nous avons délibérément sélectionné la tumeur la plus blanche obtenue avec les cellules U87-MG afin de pouvoir comparer la

vascularisation de cette masse tumorale avec les autres tumeurs obtenues avec les lignées modifiées. Cette tumeur présente néanmoins une petite partie rosée visible (extrémité droite de la tumeur) à l'inverse des autres tumeurs. Nos observations ont porté également sur l'unique tumeur obtenue avec la lignée contrôle (C), dont la taille est très réduite. Pour les raisons invoquées précédemment, cette unique tumeur ne peut être considérée comme un bon témoin afin d'effectuer des comparaisons avec les lignées modifiées.

La tumeur obtenue avec les cellules basales U87-MG semble présenter un réseau vasculaire très dense et montre de nombreux vaisseaux de taille variable pénétrant dans la tumeur ainsi qu'une prolifération abondante de petits capillaires à partir du vaisseau principal qui correspond au site sur lequel les cellules ont été déposées au moment de la greffe. Ces capillaires se dirigeant directement au cœur de la masse tumorale mettent en évidence le détournement de la vascularisation de l'embryon de poulet par cette tumeur. Ces observations macroscopiques suggèrent que l'organisation du réseau vasculaire à partir de la CAM vers la masse tumorale reflète le mécanisme d'angiogenèse tumorale classique adopté par les glioblastomes *in situ* (288).

Comme nous l'avons précisé précédemment, les résultats de la lignée U87-MG + pLKO vide ne seront pas pris en compte puisque la seule tumeur formée est de taille inférieure à toutes les autres lignées confondues (modifiées ou non) et laisse plus penser à un amas de cellules séchées qu'à la formation d'une masse tumorale. C'est la raison pour laquelle l'ensemble des analyses de la vascularisation des tumeurs obtenues avec les lignées modifiées par shRNA a été comparé par la suite avec les données issues de la lignée U87MG basale.

Ainsi, la lignée sh *KLRC3* montre une vascularisation détournée de l'embryon de poulet qui est proche de celle de la lignée basale. Néanmoins, les vaisseaux détournés présentent une désorganisation qui n'est pas constatée dans la tumeur basale. Le nombre de vaisseaux pénétrant dans la tumeur est également inférieur et ces derniers semblent beaucoup plus petits en calibre. Par ailleurs, les gros vaisseaux proches de la tumeur issue des cellules sh *KLRC3* apparaissent déformés. Ces résultats prouvent que les cellules sh *KLRC3* ont la capacité de former une masse tumorale, mais celle-ci n'est que faiblement vascularisée et le réseau vasculaire proche semble présenter des anomalies structurales gênant l'entrée des vaisseaux au sein de la masse tumorale.

A l'inverse, la tumeur formée par les cellules greffées sh *PRUNE2* ne montre pas de néo-vascularisation. En effet, bien que les cellules aient été greffées à proximité d'un gros

vaisseau, aucune vascularisation détournée n'est visible contrairement aux observations faites avec les lignées sh *KLRC3* et basale. Aucun capillaire ou vaisseau de petite taille ne s'est formé à partir de la vascularisation existante. La tumeur semble donc avoir une vascularisation très réduite et n'utilise pas les mécanismes de l'angiogenèse tumorale qui permettent de détourner la vascularisation de l'embryon de poulet dans le cas contrôle.

La tumeur générée par la lignée sh *CHI3L1* est très volumineuse, néanmoins, elle est d'apparence très blanche et ne semble pas vascularisée. Cette observation est confirmée par l'étude de la région basale de la tumeur. Les gros vaisseaux à proximité de cette tumeur ne présentent pas de ramifications à l'inverse de la lignée basale (et de la lignée sh *KLRC3* en plus faible quantité). De plus, les vaisseaux semblent repoussés ou se détourner de la tumeur (flèches, figure R12).

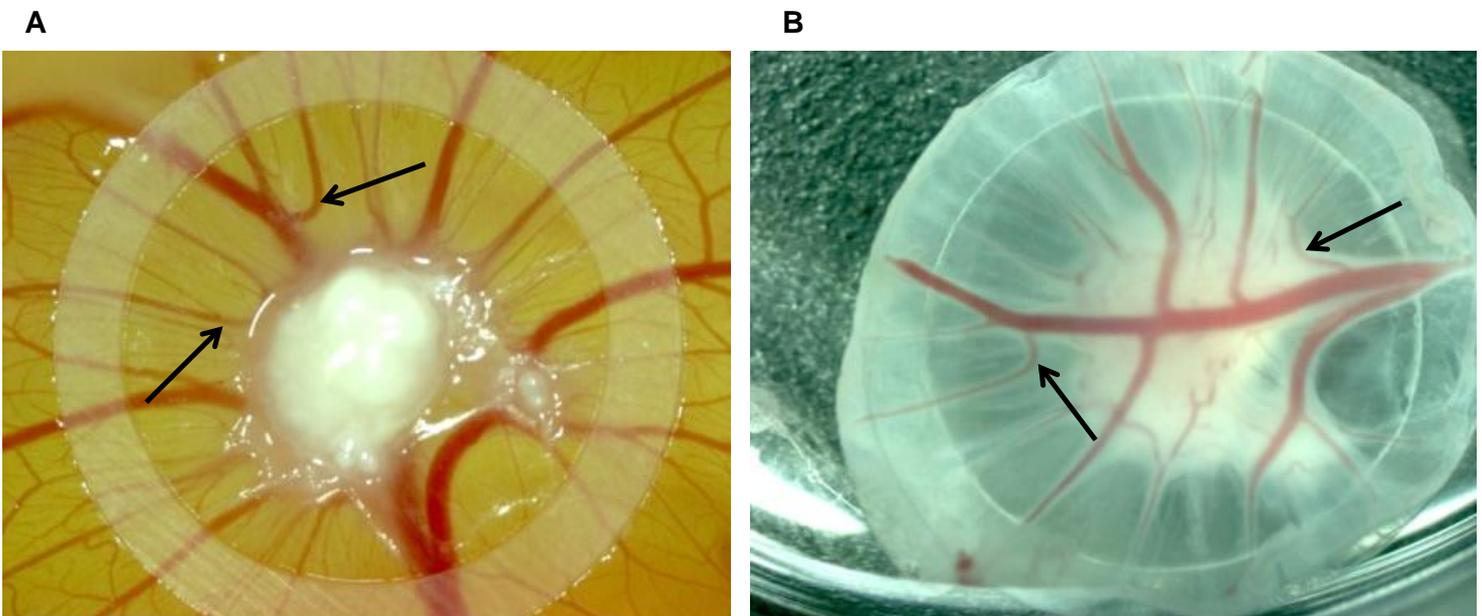


Figure R12 : Etude de la vascularisation au pourtour de la tumeur formée par greffe de cellules U87 sh *CHI3L1*. **A** : Vue de dessus d'une tumeur formée à partir de cellules sh *CHI3L1*. **B** : Vue de dessous de la même tumeur. Les flèches mettent en évidence des vaisseaux qui semblent se détourner de la masse tumorale.

Sur la figure R12, on constate que les vaisseaux sanguins semblent repoussés à l'approche de la tumeur (flèches). Les vaisseaux de l'embryon de poulet présents autour de la tumeur évitent cette dernière comme si un mécanisme de répulsion les détournait de leur cible. Le système vasculaire de l'embryon de poulet présente une organisation originale dans cette condition, où les vaisseaux fuient et s'éloignent de la tumeur. Ces observations

sont concordantes avec les différentes études effectuées sur la protéine CHI3L1 et son rôle activateur de l'angiogenèse tumorale (287; 289; 290).

Une étude plus approfondie et quantitative de la néo-vascularisation tumorale pourra être réalisée en utilisant une approche immuno-histochimique qui permettra de caractériser les cellules constituant l'endothélium vasculaire du poulet à l'aide d'une agglutinine spécifique, SNA-1 (Sambucus nigra Agglutinin – 1). Un marquage spécifique des cellules de poulet permettra de mettre en évidence la présence de vaisseaux issus de la vascularisation de l'embryon de poulet détournée par la tumeur elle-même. L'absence de vascularisation sur les tumeurs issues de cellules modifiées par les shRNA doit avoir des conséquences directes sur les principaux mécanismes dont dépend la progression tumorale, notamment la prolifération tumorale.

d. Etude de la prolifération cellulaire des tumeurs issues des différentes lignées greffées sur la CAM

Afin de comprendre si l'inactivation des gènes de la glycosylation ciblés dans notre étude agit sur la progression tumorale, nous avons analysé le caractère prolifératif des différentes tumeurs obtenues après greffes sur le modèle de la CAM. Le taux de prolifération cellulaire a été évalué en analysant le niveau d'expression de l'antigène Ki67 qui est un marqueur de prolifération reconnu en oncologie. Après prélèvement des tumeurs et en collaboration avec les membres de l'équipe appartenant au service d'anatomo-pathologie, des coupes en paraffine ont été effectuées et une immunohistochimie avec l'anticorps anti-Ki67 a permis d'obtenir une quantification précise du taux de prolifération des cellules tumorales composant les tumeurs (Figure R13).

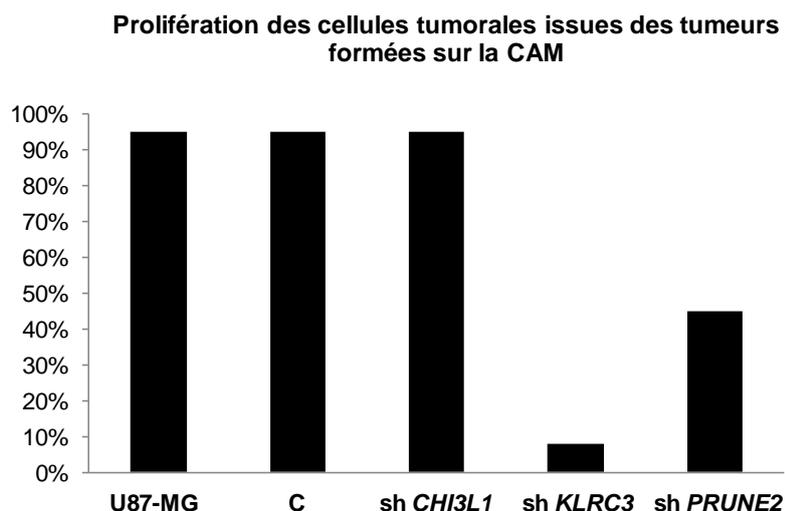


Figure R13 : Variation du taux de prolifération des cellules au sein des tumeurs en fonction de la nature des cellules greffées sur la CAM. Pour chaque lignée greffée, le taux de prolifération des cellules tumorales les composant a été mesuré par marquage au Ki67. U87-MG : cellules U87-MG basales ; C : Cellules U87-MG transfectées avec le vecteur vide pLKO ; U87 sh *CHI3L1*/*KLRC3*/*PRUNE2* : cellules U87-MG dont l'expression du gène correspondant est éteinte par shRNA.

L'étude de la prolifération cellulaire des tumeurs obtenues sur la CAM met en évidence un taux de prolifération basale (lignée U87-MG) autour de 95%. Ce niveau de prolifération est comparable à celui des tumeurs contrôles (bien qu'une seule tumeur ait pu être analysée) mais également à celui des tumeurs sh *CHI3L1*. Les tumeurs obtenues par greffe des cellules sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* présentent une diminution significative de leur taux de prolifération. Seules 45% des cellules issues de la tumeur sh *PRUNE2* sont en prolifération. La proportion des cellules en prolifération est encore plus faible avec *KLRC3* puisque 8% des cellules composant la tumeur sh *KLRC3* sont marquées au Ki67. Ces résultats montrent que l'inactivation des gènes *KLRC3* et *PRUNE2* exerce une répression sur le caractère prolifératif des cellules U87-MG.

L'analyse anatomo-pathologique des tumeurs a également mis en évidence le caractère nécrotique des tumeurs sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* ce qui peut être corrélé à la diminution de prolifération des cellules composant ces tumeurs. Enfin, comme observé dans la figure R11, la tumeur sh *KLRC3* montre une néo-vascularisation importante retrouvée lors de l'analyse histo-pathologique.

D. Conclusion

Cette seconde partie de mon travail de thèse repose sur une étude du rôle potentiel de 3 gènes de la glycosylation dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ainsi que sur l'analyse des conséquences de l'inactivation de ces gènes sur les propriétés fonctionnelles de ces cellules (auto-renouvellement, expression de marqueurs d'immatunité, capacité à régénérer la tumeur).

Cette démarche expérimentale s'appuyait sur une perte de fonction de chacun des 3 gènes au sein de la lignée de GBM humain U87-MG. La transfection lentivirale de shRNA, a conduit à l'obtention de trois lignées dans lesquelles l'expression des gènes *CHI3L1*, *KLRC3* et *PRUNE2* a été respectivement inactivée.

L'efficacité d'extinction a pu être vérifiée en quantifiant le niveau d'expression des protéines correspondantes par western blot dans deux lignées modifiées sur trois. En effet, l'expression de la protéine KLRC3 semble diminuée mais faiblement par rapport au contrôle. La poursuite du travail a consisté à analyser dans chaque lignée les caractéristiques d'immatunité des cellules U87-MG et plus spécifiquement le niveau d'expression des marqueurs d'indifférenciation.

Ces résultats préliminaires, permettent de mettre en évidence des changements réels du statut des cellules au sein des lignées inactivées. L'analyse de l'expression des marqueurs par immunofluorescence révèle une diminution d'expression des marqueurs β -Tubuline III, S100 β et Vimentine pour la lignée sh *CHI3L1*.

L'analyse des profils d'élution obtenus par SdFFF des lignées modifiées permet de compléter les données précédentes et révèlent que les lignées sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* présentent des fractogrammes d'élution différents des lignées sh contrôles, suggérant que ces lignées pourraient avoir perdu leur caractère immature au profit d'un statut cellulaire différencié. Le profil d'élution obtenu de la lignée sh *CHI3L1* est caractéristique puisqu'il semble qu'une population de cellules différenciées soit présente parallèlement à une seconde population de cellules au caractère immature. Ces données obtenues par SdFFF permettent de mettre en évidence une réelle modification du phénotype cellulaire des lignées.

Néanmoins une analyse spécifique des caractères définissant les cellules souches cancéreuses s'imposait. La propriété d'auto-renouvellement de ces cellules est certainement l'un des critères majeurs. La clonogénicité des cellules modifiées c'est-à-dire à leur capacité à former des neurosphères à partir d'une cellule unique a été analysée. Ce test a permis de montrer que la lignée sh *CHI3L1* possède la capacité de former des sphères mais en moins grande quantité que la lignée basale, tandis que les lignées sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* ne forment que peu ou pas de neurosphères. Ces résultats sont concordants avec les profils d'éluion obtenus par SdFFF dans lesquels on constate que ces deux lignées semblent perdre les cellules les plus indifférenciées composant la lignée U87-MG basale et où la lignée sh *CHI3L1* semble composée de deux sous-populations distinctes dont l'une d'elle est composée de cellules indifférenciées. L'inactivation des gènes *KLRC3* et *PRUNE2* agirait donc négativement sur les propriétés d'auto-renouvellement des cellules indifférenciées par le biais d'une altération du mode de division symétrique ou bien d'une augmentation du mode de division asymétrique expliquant ainsi l'augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation dans ces lignées.

La modification des propriétés d'auto-renouvellement de certaines lignées modifiées permettait de penser que le potentiel tumorigène de ces dernières pourrait être altéré. Le modèle de choix pour étudier la capacité de régénération tumorale des lignées fût le modèle de la CAM. Les données remettent en cause la lignée contrôle (U87 + pLKO vide) et l'intégration du vecteur vide au sein de cette lignée puisqu'aucune tumeur ne se développe en présence de cette construction. Paradoxalement, les lignées transfectées avec ce même vecteur, contenant en plus un shRNA, permettant l'extinction du gène d'intérêt, forment toutes des tumeurs. Ces résultats sur les lignées modifiées semblent indiquer que les problèmes rencontrés avec la lignée contrôle ne proviennent pas de la construction plasmidique mais probablement d'un défaut dans la préparation du pLKO vide. L'ensemble des résultats obtenus a donc été comparé uniquement avec la lignée basale afin d'éviter des biais. Quel que soit la lignée modifiée étudiée, les tumeurs générées sont toujours d'apparence blanchâtre par opposition avec les tumeurs basales qui présentent visuellement une couleur rosée révélant la néo-vascularisation tumorale. De plus, les observations macroscopiques de la néo-vascularisation des tumeurs mettent en évidence trois résultats principaux :

- La tumeur issue des cellules sh *KLRC3* semble vascularisée puisque les vaisseaux de l'embryon de poulet présentent des ramifications se dirigeant vers la tumeur. Néanmoins, ces vaisseaux semblent moins nombreux que dans le cas de la tumeur basale. La néo-

angiogénèse tumorale aurait donc encore lieu dans cette tumeur mais serait diminuée par rapport à la condition basale.

- La tumeur issue des cellules sh *PRUNE2* quant à elle ne semble pas présenter de vascularisation, en effet, les gros vaisseaux aux alentours de la tumeur ne présentent peu ou pas de ramifications se dirigeant vers la masse tumorale. *PRUNE2* pourrait donc promouvoir la néo-vascularisation tumorale au même titre que *CHI3L1* (287).

- Un mécanisme répulsif semble mis en jeu au niveau de la tumeur issue des cellules sh *CHI3L1*. Les vaisseaux proches de la tumeur semblent se détourner de la masse tumorale et chercher à l'éviter. Le phénomène de répulsion observé n'est pas sans rappeler celui engendré par les sémaphorines dans le guidage vasculaire (291). Il permet de confirmer l'importance de *CHI3L1* en tant que promoteur de l'angiogénèse tumorale (287).

Les observations morphologiques des tumeurs obtenues montrent clairement que l'extinction des gènes induit des changements significatifs de la tumorigénicité des cellules. Les gènes *KLRC3* et *PRUNE2* pourraient donc être déterminants au cours de l'initiation tumorale mais également au cours de la progression tumorale. En effet, l'inactivation de ces gènes induit une diminution de la prolifération tumorale par rapport aux cellules basales qui s'accompagne d'un développement de zones nécrotiques.

Les résultats préliminaires apportés par l'extinction spécifique de gènes de la glycosylation nous incitent à poursuivre le travail sur l'implication de ces gènes dans le maintien de l'état indifférencié des cellules de glioblastome et la caractérisation de nouvelles cibles des CSCs. Afin de poursuivre nos investigations, d'autres approches sont envisagées. Dans un premier temps, la lignée contrôle sera refaite à partir du vecteur commercial (pLKO vide) afin de pouvoir valider les résultats obtenus et de pouvoir envisager la suite des expérimentations. Dans un second temps, une étude plus approfondie sera menée sur les tumeurs obtenues (étude des cellules composant ces tumeurs par une approche immunohistochimique supplémentaire ainsi qu'une étude transcriptomique). La dernière étude portera sur la radiorésistance qui est l'une des caractéristiques des CSCs. Nous chercherons à déterminer si le caractère radio-résistant des CSCs dépend de l'expression de l'un des gènes impliqués dans la glycosylation.

III. Etude des propriétés diélectriques des cellules de glioblastomes par le développement de biocapteurs

Cette dernière partie de notre travail a consisté en l'étude des propriétés diélectriques des cellules grâce au développement de biocapteurs. Dans cette étude, toute la partie développement instrumentale a été effectuée par l'équipe d'XLIM. Notre implication a porté sur la partie biologique du projet en particulier sur les tests de biocompatibilité des résines ainsi que sur l'application des cellules cultivées selon différentes conditions sur le biocapteur. Ce travail a été effectué parallèlement à mon travail de thèse principal c'est pourquoi cette partie sera moins développée. Cette étude a abouti à la publication de deux articles scientifiques.

A. Résumé de l'article 2 :

Ultra sensitive biosensor based on impedance spectroscopy at microwave frequencies for cell scale analysis

Claire Dalmay, Mathilde Cheray, Arnaud Pothier, Fabrice Lalloué, Marie-Odile Jauberteau et Pierre Blondy.

Procedia Chemistry (2009)

(Vol 1, p.742-745)

Le développement de biocapteurs a pour but de mesurer des caractéristiques de permittivité et de conductivité des cellules afin de pouvoir différencier des sous-populations cellulaires. L'intérêt principal de cet outil est de pouvoir s'affranchir de tout marquage préalable pouvant altérer ou modifier l'intégrité cellulaire et, par ailleurs, pouvoir effectuer un diagnostic différentiel. Cette brève étude permet de présenter les bases du développement ainsi que le fonctionnement de ces biocapteurs. Ainsi, après différents tests et différentes adaptations, les capteurs sont biocompatibles, permettant la culture des cellules, et adaptés

à la taille de celles-ci. L'optimisation des fréquences de résonances de l'ordre de 15GHz rendent le capteur extrêmement sensible à de petite perturbation, ainsi, les mesures peuvent être effectuées sur une cellule unique. L' extraction de la bio-impédance de chaque cellule doit permettre à terme de constituer une banque constituée des signatures électromagnétiques de chaque type cellulaire. Dans ce travail, nous avons cherché à détecter la présence de cellules sur le capteur et à montrer que cet outil était capable de part sa sensibilité de distinguer deux types cellulaires distincts présentant un contenu cytoplasmique différent.

B. Résumé de l'article 3 :

Ultra sensitive biosensor based on impedance spectroscopy at microwave frequencies for cell scale analysis

Claire Dalmay, Mathilde Cheray, Arnaud Pothier, Fabrice Lalloué, Marie-Odile Jauberteau et Pierre Blondy.

Sensors and Actuators A (2010)

(Vol 162, p.189-197)

Au cours de cette étude sur les propriétés diélectriques des cellules, nous avons pu voir dans un premier temps qu'il est possible de mesurer la permittivité et la conductivité des cellules dans leur état physiologique tout en s'affranchissant de marquage spécifique. Nous avons apporté la preuve de la faisabilité du concept des biocapteurs qui doivent posséder d'une part une grande sensibilité et d'autre part une capacité de discrimination fine. La deuxième étape de ce projet a donc été d'étudier des sous-populations cellulaires et de chercher à obtenir une signature électromagnétique propre à chaque sous-population.

L'évolution des biocapteurs a donc permis dans un premier temps d'obtenir des mesures à l'échelle d'une cellule unique. Cela valide donc la sensibilité des biocapteurs et ainsi l'obtention de données spécifiques à une seule cellule analysée. Ensuite, nous avons cherché à étudier les signatures électromagnétiques obtenues pour des cellules issues de la même lignée cellulaire (U87-MG) mais cultivées dans deux conditions différentes. Nous retrouvons donc ici les deux conditions de culture utilisées pour notre étude précédente permettant d'obtenir des cellules à des stades de différenciation opposés. Les mesures effectuées dans cette partie sont donc réalisées sur des cellules adhérentes ayant un caractère différencié, et sur des cellules flottantes immatures ou indifférenciées. Les résultats obtenus par les biocapteurs permettent de différencier ces deux sous-populations cellulaires qui possèdent des signatures électromagnétiques distinctes.

C. Conclusion des articles 2 et 3 :

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des cellules indifférenciées ou cellules souches issues de glioblastomes. Ainsi, il nous paraissait très intéressant de pouvoir étudier et développer une méthode d'étude des cellules innovante et permettant de s'affranchir de toutes les méthodes utilisées actuellement. En effet, l'utilisation de marqueurs spécifiques de sous-populations cellulaires est actuellement controversée comme cela a été décrit pour le cas du CD133 (271).

Les premiers travaux effectués sur les biocapteurs ont permis de mettre au point les conditions idéales pour les mesures des cellules. En effet, des travaux antérieurs ont été effectués sur différents milieux de culture et différents protocoles de mesure ont été testés. Ces travaux préliminaires ont permis dans un premier temps de pouvoir différencier deux types cellulaires (cellules neuronales SHSY5Y et cellules gliales U87-MG) de par leurs caractéristiques diélectriques (292). Nos travaux étant axés plus particulièrement sur l'étude des glioblastomes et des cellules les plus agressives les composant, nous avons choisi de poursuivre ces travaux sur les cellules issues de la lignée U87-MG.

La première étape du développement des biocapteurs a donc été d'adapter ces capteurs aux cellules étudiées, afin de permettre la culture directe des cellules sur ces capteurs. Ainsi, une résine spécifique (la SU8) a été choisie et les capteurs ont été adaptés au niveau de la taille des chambres de culture et des gaps de mesure. Ces adaptations ainsi que des tests au niveau des fréquences de mesure utilisées ont permis d'obtenir une signature électromagnétique spécifique des cellules U87-MG. De plus, des densités différentes de cellules ont pu être analysées menant à l'obtention de mesures à l'échelle d'une cellule unique. Enfin, les protocoles de dépôt des cellules ont été adaptés par la suite à l'analyse de cellules flottantes. En effet, le but ultime de ce travail a été de pouvoir différencier deux sous-populations de cellules U87-MG cultivées dans deux conditions différentes. Ce dernier travail nous a permis de mettre en évidence les propriétés diélectriques différentes de cellules présentant des stades de différenciation opposés. Les biocapteurs ainsi développés permettent d'obtenir une signature électromagnétique spécifique des cellules les plus indifférenciées apparentées aux cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes, et donc d'envisager une nouvelle méthode d'isolement de ces cellules permettant leur étude dans leur état physiologique normal.

Discussion générale

Les glioblastomes sont des tumeurs très agressives et incurables présentant un taux de survie qui ne dépasse pas 15 mois en raison du risque de récurrence de ces tumeurs. Ces cancers sont donc très agressifs et les traitements actuels par chimio ou radiothérapie ne permettent pas de les éradiquer (44).

Cette agressivité tumorale est liée à la présence de cellules initiant la tumeur et capables de reformer une nouvelle masse tumorale même après résection totale de la tumeur initiale. Ces cellules initiatrices de la tumeur sont assimilées aux cellules souches cancéreuses. Elles sont très étudiées actuellement mais demeurent difficiles à isoler et à caractériser. CD133 reste actuellement le principal marqueur pour la caractérisation et l'isolement des CSCs. En effet, les premiers travaux réalisés à partir de greffes de cellules CD133⁺ isolées de GBMs ont montré que ces cellules permettent la formation de la tumeur tandis que les greffes de cellules CD133⁻ échouent dans ce sens (92; 94). Néanmoins, ces premières observations ont récemment été controversées et remettent en cause le caractère de CD133 en tant que marqueur générique des CSCs (110). La controverse s'appuie sur le fait que l'épitope reconnu par l'anticorps anti-CD133 couramment utilisé subirait une modification post-traductionnelle. C'est une N-glycosylation qui serait responsable d'un changement de conformation et d'accessibilité de ses épitopes (271). Ainsi, la remise en cause de l'utilisation du CD133 comme marqueur des CSCs dépendrait uniquement d'un manque de spécificité des anticorps actuels (271; 273).

La glycosylation est une modification post-traductionnelle majeure intervenant sur la majorité des protéines et correspondant à l'ajout d'oligosaccharides sur une séquence spécifique. Elle intervient dans les conditions physiologiques et les processus de tumorigenèse. L'implication de cette modification post-traductionnelle a pu être observée dans le cas du cancer du sein (293-295), dans le cancer du poumon (223; 296) et dans le cancer colorectal (297; 298) entre autres. De nombreuses aberrations de la glycosylation ont également été retrouvées dans le cas des glioblastomes (225; 299-301).

De nombreux récepteurs utilisés comme marqueurs d'agressivité dans les GBMs présentent des sites de N-glycosylation tels que les récepteurs à tyrosine kinase (RTKs), et notamment l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ou encore le récepteur pentamérique CD133 (271; 302). La N-glycosylation de ces protéines réceptrices constitue une étape critique qui est contrôlée activement au cours du processus de maturation. Son intérêt biologique est clairement illustré par l'exemple des RTKs en particulier l'EGFR qui voit son activité régulée par des modifications de la glycosylation sur des sites spécifiques. L'inhibition de la N-glycosylation entraîne une diminution de la signalisation via les RTKs et

leur cible principale Akt, conduisant à une plus grande sensibilité des cellules tumorales aux traitements radio-thérapeutiques (303). Des travaux récents apportent la preuve que la N-glycosylation est requise pour l'expression de CD133 à la membrane cellulaire et dépendrait d'une enzyme apparentée aux glycosyltransférases, la MGAT4C (mannosyl (alpha-1,3)-glycoprotein beta-1,4-Nacetylglucosaminyltransferase (isozyme C) (304). Bien que le rôle physiologique de CD133 reste encore inconnu, on sait que ce marqueur est associé à l'agressivité cellulaire et, par conséquent, il est probable que sa localisation membranaire soit déterminante dans l'activation ou la transactivation de voies de signalisation capables d'activer les mécanismes tumorigéniques. Cette dernière étude suggère donc que l'analyse des variations des profils d'expression des glycanes entre cellules immatures (CSCs) et cellules différenciées pourrait aider à la compréhension du comportement cellulaire selon ces différents états. L'étude de l'expression des gènes de la glycosylation selon l'état de différenciation pourrait donc être d'un grand intérêt afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou pour améliorer la caractérisation des CSCs.

Ce dernier point reste actuellement l'un des problèmes majeurs posés dans l'étude des GBMs puisque l'absence de marqueurs fiables rend la caractérisation des CSCs et leur isolement difficiles à réaliser. Ces deux étapes semblent incontournables pour permettre l'étude des mécanismes de régulation mis en jeu dans les CSCs. Leurs descriptions permettront de mettre à jour de nouvelles cibles destinées à éliminer directement les CSCs ou à les éradiquer indirectement *via* des thérapies d'induction de la différenciation.

Dans ce travail, nous avons choisi de développer deux approches différentes permettant d'améliorer la caractérisation et l'isolement des cellules souches cancéreuses de glioblastomes. La première consiste à établir une signature moléculaire spécifique des cellules indifférenciées basée sur les gènes impliqués dans la glycosylation. L'établissement d'une glyco-signature s'appuie sur la comparaison du niveau d'expression des gènes de la N-glycosylation selon l'état de différenciation des cellules. La seconde approche vise à développer un outil d'analyse cellulaire s'affranchissant des marquages immunologiques classiques pour obtenir une nouvelle signature reposant sur les propriétés diélectriques des cellules.

I. Le niveau d'expression de gènes de la glycosylation est lié au caractère indifférencié des cellules de glioblastome

Comme nous avons pu le voir, des glycosylations aberrantes sont retrouvées dans de nombreux cancers suggérant que cette modification post-traductionnelle, lorsqu'elle est perturbée, est une caractéristique (ou « hallmark ») des tumeurs telles que les glioblastomes (225; 299-301). Notre étude portait sur l'analyse du niveau d'expression d'un large panel de gènes de glycosylation (559 gènes). La seule étude antérieure connue s'appuyait sur une analyse microarray afin d'étudier les changements d'expression de 359 gènes du glycogénome issus de cerveaux sains et de différents sous-types de gliomes (305).

L'originalité de notre approche se base sur la comparaison de deux statuts de différenciation des cellules ayant pour origine la même lignée cellulaire afin de se placer dans des conditions mimant le contexte pathologique. Seules des études protéomiques ont été effectuées à ce jour, cette approche utilisant la protéomique quantitative ainsi que la chromatographie d'affinité a permis d'identifier 18 glycoprotéines plus spécifiques des CSCs et démontre l'implication du lysosome dans le processus de différenciation à partir des CSCs (306; 307). Au cours de ce travail, aucune analyse des changements des niveaux d'expression des transcrits n'a été menée.

La technique de Taqman Low Density Array (TLDA) présente l'avantage de combiner l'étude du niveau d'expression d'un grand nombre de gènes avec une analyse de type microarray (308; 309). Cette technique a été appliquée à l'analyse transcriptomique différentielle des gènes de la N-glycosylation suivant l'état de différenciation cellulaire. 559 gènes ont été étudiés dans des lignées U87-MG et U251. Cette étude permet de comparer le niveau d'expression relatif des gènes dans les cellules cultivées en conditions différenciantes (présence de SVF) comparativement à celles cultivées en milieu défini favorisant l'obtention de cellules indifférenciées (cellules souches cancéreuses). Parmi ces gènes, nous avons identifié et caractérisé plusieurs sous-groupes (clusters) dont la classification dépend du niveau et de la variation d'expression dans les lignées U87-MG et U251. Le cluster d'intérêt dans notre étude a été celui dans lequel les gènes étaient spécifiquement surexprimés dans les cellules indifférenciées au sein des deux lignées

étudiées. Cette hiérarchisation en cluster a permis d'identifier 8 gènes surexprimés dans les CSCs issues des lignées cellulaires U87-MG et U251 : *ATHL1*, *CHI3L1*, *KLRC3*, *GAA*, *GLT25D2*, *PRUNE2*, *ST3GAL5*, *ST8SIA1*.

Nous avons mis en évidence une corrélation entre l'augmentation du niveau d'expression de ces gènes et celui des protéines correspondantes. Les protéines *ATHL1*, *CHI3L1*, *KLRC3*, *PRUNE2* et *ST3GAL5* sont retrouvées surexprimées dans les CSCs d'une ou des deux lignées à la fois. Enfin, afin d'étendre ces résultats à un contexte physiopathologique, nous avons étudié le niveau d'expression de ces 8 gènes dans des ARNs issus de tumeurs de patients. Ces tumeurs ayant été au préalable dissociées et cultivées dans les deux conditions de culture préalablement citées, nous avons pu établir le niveau d'expression relatif de ces gènes dans les CSCs dont elles sont issues. Nos résultats, bien que préliminaires (étude réalisée sur 3 patients), permettent de confirmer, pour 7 gènes, une surexpression dans les CSCs de 1 à 2 patients.

Les gènes ainsi sélectionnés sont décrits à divers niveaux pour leur implication dans les processus tumoraux. Ainsi, *PRUNE2* a été décrit comme étant surexprimé dans une lignée issue de GBM (310), bien que nous ne retrouvions pas cette surexpression lors de l'analyse des ARNs issus de patients. Le rôle de *PRUNE2* n'est pas clairement défini, en effet, il est surexprimé dans les CSCs issues des lignées, mais cela n'est pas retrouvé dans les tumeurs. Cette même ambiguïté est retrouvée dans la littérature. Surexprimé dans un cas de GBM (310), il est aussi considéré comme facteur de bon pronostic en fonction de sa localisation cellulaire dans certains neuroblastomes (311). Inversement, *PRUNE2* est surexprimé dans les métastases de cancer de la prostate, où il est considéré comme marqueur d'agressivité (312). L'expression de *PRUNE2* est donc associée à différentes réponses selon le type tumoral et peut être associé à un phénotype tumoral agressif et résistant.

Le gène *ST8SIA1* code pour la protéine GD3 synthase et sont tous les deux surexprimés dans les CSCs issues des lignées cellulaires ou les tumeurs de patients. Le rôle de la GD3 synthase dans la prolifération et l'invasion tumorales a été mis en évidence dans les neuroblastomes et les gliomes. Dans un modèle murin, l'inhibition de son expression dans des cellules de neuroblastomes a été associée à une réduction de la migration cellulaire *in vitro* et à une diminution du pouvoir métastatique des cellules *in vivo* (313; 314). De plus, la surexpression de la GD3 synthase augmente le pouvoir tumorigène et invasif des cellules de gliomes de rat et, par ailleurs, des anticorps dirigés contre la GD3 synthase entraînent une inhibition de la prolifération tumorale (315; 316).

En ce qui concerne le gène *ST3GAL5* (qui code pour la GM3 synthase), la littérature lui confère des rôles opposés. En effet, un niveau d'expression élevé de *ST3GAL5* est corrélé dans un cas à l'activation de l'apoptose dans des cellules cancéreuses de la vessie dans un modèle murin (317). Dans un autre cas, l'augmentation de l'expression du gène *ST3GAL5* a été décrite comme liée à l'expression de l'oncogène *RUNX*, menant à une augmentation de la survie associée à la résistance à l'apoptose (318). Enfin, plus récemment son expression a été associée à la tumorigenèse rectale puisque ce gène est retrouvé surexprimé dans les carcinomes rectaux en comparaison avec des tissus normaux (319). Ces données suggèrent que *ST3GAL5* joue probablement un rôle dans le maintien des propriétés malignes des cellules cancéreuses ce qui est en accord avec le fait qu'il soit surexprimé dans les cellules indifférenciées dans notre étude.

Le gène *GLT25D2* est peu étudié et son expression dans les cancers n'a jamais été recherchée. Ce gène est retrouvé dans le muscle squelettique et à un niveau plus faible dans le cerveau (320). Notre étude est donc la seule actuellement à présenter l'expression de ce gène dans les tumeurs cérébrales. En revanche, la surexpression de la protéine *GLT25D1* a été décrite dans différents cancers (321). Il est probable que l'expression de *GLT25D2* qui appartient à la même famille de protéines soit similaire. Les données obtenues pour le gène *GLT25D2* montrent qu'il est surexprimé à la fois dans les lignées et les tumeurs. Ces données suggèrent que ce gène peut être considéré comme un marqueur d'agressivité potentiel dans les GBMs ce qui fait de lui un biomarqueur d'intérêt dans la caractérisation des CSCs de glioblastomes.

Le gène *CHI3L1* (YKL-40) code pour une glycoprotéine dont l'expression est augmentée dans différents types de cancers. *CHI3L1* est considéré comme un marqueur d'agressivité dans le cancer du sein (322; 323), de l'ovaire (324), dans le cancer colorectal (325) où dans le cancer du poumon à petites cellules (326). La surexpression de *CHI3L1* est associée à la résistance des cellules aux traitements radio ou chimio-thérapeutiques ainsi qu'à la diminution du taux de survie des patientes atteintes de cancer de l'ovaire (327). Cette protéine est donc largement associée à l'agressivité des cellules cancéreuses ce qui est en accord avec sa surexpression (gène et protéine) dans les CSCs de nos lignées cellulaires ou celles des tumeurs issues de patients. Cependant, la fonction réelle de *CHI3L1* n'est pas encore déterminée. La protéine *CHI3L1* peut-être induite par des stress environnementaux tels que l'hypoxie et peut induire l'angiogenèse tumorale *in vivo* (287; 328). Dans le cas des glioblastomes, les taux élevés d'ARNm de *CHI3L1* sont associés à la diminution du taux de survie des patients et à la diminution de la réponse aux traitements

(261; 262; 329; 330). Ces données, associées aux connaissances sur les CSCs et aux résultats de notre analyse TLDA, suggèrent que *CHI3L1* pourrait être un bon marqueur des CSCs de glioblastomes.

Les derniers gènes: *ATHL1*, *GAA* et *KLRC3* ont été sélectionnés pour leur niveau d'expression élevé dans les CSCs de lignées cellulaires et des tumeurs. Leur expression protéique est corrélée au niveau d'expression des transcrits. Ce type d'étude n'a jamais été réalisé pour *ATHL1*, *GAA* et *KLRC3* et peu d'informations les concernant existent. Ces gènes sont impliqués dans différents mécanismes tels que la dégradation des carbohydrates (pour *ATHL1*), le métabolisme du glycogène (pour *GAA*) et l'immunité (pour *KLRC3*). Notre étude permet de relier ces gènes à un nouveau rôle dans l'agressivité tumorale, cependant des études supplémentaires sont requises pour valider et explorer plus spécifiquement leurs implications dans les glioblastomes.

Cette étude a permis de sélectionner des gènes spécifiquement surexprimés dans les CSCs à partir de lignées cellulaires ou de cultures primaires issues de tumeurs de patients. Certains de ces gènes étaient déjà considérés comme des marqueurs d'agressivité dans les tumeurs, notre étude vient compléter ces observations en particulier pour *CHI3L1* puisqu'elle permet de fournir la preuve que *CHI3L1* peut être un marqueur spécifique des CSCs ou des changements d'état de ces cellules au cours du temps. De plus, notre travail a permis la caractérisation de nouveaux gènes encore peu étudiés qui, du fait de leur expression dans les cellules les plus indifférenciées, pourraient potentiellement participer à l'agressivité des glioblastomes. Cet ensemble de gènes constituent donc la base d'une glyco-signature qui pourrait à terme être utilisée dans le tri ou le diagnostic clinique.

A partir de ces premiers résultats, nous avons voulu explorer plus précisément le rôle de certains de ces gènes dans la fonction et le caractère indifférencié des cellules de glioblastome.

II. L'inactivation des gènes *CHI3L1*, *KLRC3* et *PRUNE2* modifie les caractéristiques « souches » des cellules de la lignée cellulaire U87-MG

La première étape de notre travail a permis d'isoler des gènes de la glycosylation surexprimés dans les CSCs. Il est à présent nécessaire de déterminer si cette augmentation

d'expression joue un rôle dans les caractéristiques d'indifférenciation des cellules étudiées. Ainsi, nous avons créé des lignées stables issues de la lignée U87-MG, dont l'expression de certains gènes de la glycosylation a été éteinte par shRNA. Nous avons réalisé une inactivation des gènes *CHI3L1*, *KLRC3* et *PRUNE2*. L'objet de l'étude a porté sur l'implication de ces gènes dans le maintien du caractère indifférencié, les propriétés clonogéniques ainsi que la capacité à régénérer la tumeur.

La discussion des principaux résultats repose sur une comparaison avec la lignée basale U87-MG, et non avec la lignée contrôle (U87-MG + pLKO vide) pour les raisons exposées précédemment dans les résultats. Comme nous avons pu l'aborder, la lignée contrôle avec la construction vide sera refaite pour infirmer toute influence du pLKO seul sur le comportement cellulaire.

L'étude de l'expression de β -Tubuline III, de S100 β et de la vimentine a mis en évidence la perte d'expression de ces trois protéines par la lignée sh *CHI3L1*. De plus, cette lignée présente un profil d'élution spécifique par SdFFF. En effet, l'extinction du gène *CHI3L1* semble entraîner l'apparition de deux sous-populations distinctes : un pic décalé à gauche correspondant à une sous-population de cellules différenciées et un pic similaire à celui des cellules U87-MG correspondant à une sous-population de cellules plutôt immatures. L'inactivation de ce gène entraîne l'augmentation de cellules à caractère différencié tout en conservant une sous-population de cellules indifférenciées. Les mêmes observations ont pu être faites en étudiant l'action synergique de la tunicamycine avec l'acide rétinoïque. Cette combinaison permet d'inhiber la prolifération cellulaire d'une lignée de cancer du sein MCF-7 et d'améliorer le processus de différenciation (331). Ces données suggèrent que l'inhibition totale (tunicamycine) ou partielle (gènes cibles inactivés) de la N-glycosylation pourraient faciliter le processus de différenciation cellulaire et expliqueraient ainsi les résultats obtenus. Les résultats du test de clonogénicité viennent étayer les résultats précédents en ce qui concerne la lignée sh *CHI3L1*. En effet, même si cette lignée conserve une capacité d'auto-renouvellement, cette fonctionnalité est sérieusement réduite en comparaison des contrôles. Ces neurosphères sont probablement issues du faible pool restant de cellules indifférenciées identifiable par SdFFF.

Les deux autres lignées inactivées semblent moins sensibles au mécanisme de différenciation mais présentent de fortes altérations de leur capacité d'auto-renouvellement. Dans les cellules neurales normales, il a été clairement montré que la formation des neurosphères pouvait être augmentée par des cellules exprimant des glycannes portant la séquence 3-fucosyl N-acetyllactosamine (Lewis X) (332). Par conséquent, il est probable

que la perte de fonction des gènes *PRUNE2* et *KLRC3* conduise à une inhibition de la glycosylation de motifs spécifiques et à la disparition de certains épitopes glycosylés tels que SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) qui joue un rôle clé dans le maintien des propriétés d'auto-renouvellement et du caractère souche (« stemness ») des cellules (333).

La capacité des cellules modifiées à former des tumeurs est également altérée par l'inactivation des 3 principaux gènes. Ce caractère fait partie des critères fonctionnels majeurs permettant de reconnaître des CSCs. Le modèle de la CAM permet un suivi aisé de l'évolution des greffes effectuées avec les différentes lignées. Une analyse de la vascularisation tumorale est réalisée avec chaque tumeur. La lignée U87 sh *CHI3L1* permet d'obtenir des tumeurs après greffes qui restent blanches et au sein desquelles la vascularisation est faible par comparaison avec les tumeurs vascularisées (rosées) obtenues par greffes de cellules U87-MG. L'apparence des tumeurs suggère que celles-ci ne sont pas vascularisées. Cette hypothèse est confirmée par l'observation des vaisseaux pénétrant dans la tumeur qui sont quasiment inexistantes. De plus, les vaisseaux issus de l'embryon ne sont pas attirés vers la tumeur et semblent au contraire l'éviter. La perte de fonction de nos 3 gènes semblent indiquer que ceux-ci pourraient agir comme des agents anti-angiogéniques soit en bloquant les mécanismes qui induisent la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par la tumeur tels que le VEGF-A, soit en inhibant les récepteurs en charge de la réception de ces signaux tels que le VEGF-R2. Cette seconde hypothèse semble séduisante étant donné qu'il a pu être montré que le mode d'action de certaines molécules possédant des propriétés anti-angiogéniques comme l'itraconazole passait par l'inhibition de la glycosylation du VEGF-R2 à la surface des cellules endothéliales (334).

Concernant plus spécifiquement *CHI3L1*, des données récentes ont mis en évidence son rôle clé (287; 289; 290). Nos résultats sont concordants avec les données de la littérature puisque la perte de fonction du gène induit une réduction de la densité vasculaire. Le caractère prolifératif des cellules composant ces tumeurs semble lui aussi altéré comme le prouve les études histochimiques avec l'anticorps anti-Ki67 à l'exception de la lignée inactivée pour *CHI3L1*. Dans cette dernière, les tumeurs montrent un taux de prolifération élevé des cellules au sein de la tumeur associé à un centre nécrotique. Ces données indiqueraient que même si la néo-vascularisation est réduite, la tumeur conserve son caractère tumorigène peut-être en raison de la présence d'une zone nécrotique centrale. A partir de ces observations, il est possible d'envisager qu'à moyen terme ces tumeurs auraient probablement régressé à l'inverse des tumeurs basales. L'extinction du gène *CHI3L1* semble modifier la lignée cellulaire U87-MG et entraîner la perte de propriétés indispensables à

l'agressivité tumorale. Cependant, des études complémentaires seront nécessaires pour corrélérer cette extinction à la perte du phénotype souche. Dans cette optique, nous envisageons d'étudier la résistance des cellules modifiées à un traitement radiothérapeutique ainsi que de caractériser plus spécifiquement cette lignée à l'aide de marqueurs de différenciation et d'immaturité. Enfin, il paraît intéressant d'étudier et de caractériser plus finement les deux sous-populations mises en évidence par SdFFF.

Les résultats obtenus pour les lignées modifiées U87 sh *KLRC3* et U87 sh *PRUNE2* sont semblables et seront développés en parallèle. En effet, l'étude de l'expression des protéines β -Tubuline III, S100 β et vimentine ne mettent pas en évidence de réelle différence entre ces lignées et la lignée basale. Cependant, le tri par SdFFF montre une modification des profils d'élution. En effet, le pic cellulaire présente, pour les deux lignées, un décalage vers la gauche correspondant à un enrichissement en cellules différenciées au détriment des cellules immatures (275; 335). Cette observation est confirmée par le test de clonogénicité. En effet, les lignées U87 sh *KLRC3* et sh *PRUNE2* ne forment peu ou pas de neurosphères suite à leur culture en milieu spécifique. Par la suite, les greffes sur le modèle de la CAM mènent à des résultats similaires visuellement. En effet, les tumeurs obtenues pour ces deux lignées sont blanches, de taille variable, et mal organisées par comparaison avec celles issues des cellules U87-MG. Lors de l'analyse de la vascularisation de ces tumeurs, deux types de résultats ont été observés : pour la lignée sh *KLRC3*, la vascularisation semble être amplifiée autour de la tumeur et les vaisseaux principaux présentent des ramifications caractéristiques d'une néo-angiogenèse tumorale. En revanche, celles obtenues après greffe des cellules sh *PRUNE2*, ne présentent pas de vascularisation et les vaisseaux périphériques ne forment pas de vascularisation supplémentaire. Le rôle de *PRUNE2/BMCC1* qui a été étudié dans plusieurs lignées de cancer de la prostate indique que cette protéine pourrait interagir avec RhoA et RhoC, qui sont des acteurs déterminants de la transformation cellulaire et de l'apparition des métastases (312). *PRUNE2* pourrait donc activer le processus métastatique. Ce dernier nécessite la présence d'un important réseau vasculaire afin de faciliter l'envahissement et la diffusion rapide des cellules tumorales. L'inactivation de *PRUNE2* pourrait donc prévenir le processus métastatique en altérant également la néo-vascularisation tumorale qui permet ainsi « d'asphyxier » la tumeur. L'effet de répulsion sur les vaisseaux, d'évitement de la tumeur, n'est pas constaté dans ce cas comme nous avons pu l'observer dans les tumeurs issues de sh *CHI3L1*. L'analyse immuno-histochimique permet de confirmer que les tumeurs sh *KLRC3* sont vascularisées au contraire de celles issues de sh *PRUNE2*. Malgré cette vascularisation, les deux masses tumorales présentent des zones nécrotiques. Le taux de prolifération des

cellules composant les tumeurs est fortement réduit : 8% de prolifération pour U87 sh *KLRC3* et 45% pour U87 sh *PRUNE2*; en comparaison des données concernant la lignée U87-MG (95% de prolifération). Cette baisse de la prolifération cellulaire au sein des tumeurs pourrait dépendre de l'extinction des gènes impliqués dans la glycosylation. En effet, on constate que dans des cellules indifférenciées de cancer colorectal HCT-116, l'inhibition de la glycosylation par la tunicamycine bloque la prolifération cellulaire ainsi que la progression tumorale (336). La diminution significative de la prolifération constatée pourrait donc être la conséquence de l'inactivation des lignées par sh *KLRC3* et sh *PRUNE2*.

Les résultats obtenus pour ces deux lignées sont très encourageants puisqu'ils semblent confirmer le rôle prépondérant de ces gènes dans le caractère agressif et tumorigène de la lignée U87-MG. L'extinction de ces gènes mène à la diminution ou la perte des cellules indifférenciées au profit de cellules moins agressives. Les cellules indifférenciées ou CSCs étant impliquées dans la résistance aux traitements (95; 136), afin de confirmer les résultats et les hypothèses avancées, la résistance aux rayonnements ionisants de ces deux lignées sera évaluée.

Ces résultats préliminaires restent à confirmer. Néanmoins, ceux-ci semblent être en accord avec l'hypothèse posée selon laquelle les gènes de la glycosylation sélectionnés par TLDA joueraient un rôle dans le maintien du caractère « souche » (« stemness »), indifférencié des cellules de GBMs. Les données obtenues confirmant les données actuelles sur le rôle de *CHI3L1* amènent des informations importantes sur les gènes *KLRC3* et *PRUNE2* dans le cas des glioblastomes. Les études sont à poursuivre dans cette voie et il paraît important à l'avenir d'étudier plus précisément le rôle de ces gènes au sein de tumeurs issues de patients.

III. Les biocapteurs permettent d'obtenir une signature électromagnétique propre à chaque cellule analysée

Les différentes données concernant les CSCs issues de glioblastomes convergent toutes vers une problématique essentielle : leur isolement et leur caractérisation (337-340). Nous avons donc choisi de compléter notre étude sur l'implication des gènes de la glycosylation dans l'agressivité tumorale par une autre approche qui s'appuie uniquement sur les propriétés physiques des cellules. Le développement de cette méthodologie

innovante permettant un nouveau type de caractérisation et de signature a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'XLIM qui a développé des biocapteurs nécessaires à l'analyse.

Ces biocapteurs sont basés sur l'interaction entre un ou plusieurs objets biologiques et une onde électromagnétique se situant dans la gamme de longueurs d'onde des micro-ondes (fréquences dans la gamme 10-30 GigaHertz). Une première génération de biocapteurs a été élaborée utilisant un phénomène de résonance : ils présentent à une certaine fréquence, fréquence de résonance, un pic d'absorption du signal électromagnétique. En présence de cellules sur le capteur, le résonateur est perturbé entraînant une modification de la fréquence de résonance. La mesure de cette modification par la mesure du décalage observé peut-être relié au nombre de cellules, à leur position sur le capteur, à la taille des cellules et surtout à leur contenu. L'idée étant dans un premier temps de relier la mesure au type cellulaire observé. Ainsi, les premières données obtenues ont permis de mettre en évidence la sensibilité du capteur puisque les mesures réalisées permettaient de différencier deux types cellulaires : neuronal et glial (292).

Dans le contexte de notre étude, nous avons cherché à développer le biocapteur dans le but de pouvoir différencier des sous-populations cellulaires. En effet, nous envisageons d'utiliser cette technique pour isoler les CSCs de glioblastomes sans modification de l'intégrité cellulaire. Cette méthodologie devrait permettre à terme de caractériser ces cellules indifférenciées. Ainsi, les biocapteurs ont été adaptés au type et à la morphologie cellulaires ce qui a permis d'acquérir une signature électromagnétique spécifique des cellules de la lignée U87-MG en conditions de culture avec SVF. Ces données ont pu être corrélées à un ensemble de cellules mais aussi à la mesure d'une cellule unique permettant de valider la sensibilité du capteur (341).

Afin d'étudier les CSCs plus précisément, nous avons testé les cellules U87-MG cultivées dans un milieu permettant l'enrichissement en cellules indifférenciées ou CSCs. Les mesures ont permis de mettre en évidence une réelle différence des propriétés diélectriques entre les cellules différenciées et les CSCs issues de la lignée U87-MG (156). Ainsi, il a clairement été établi que les CSCs possèdent une signature électromagnétique spécifique. Ces données très encourageantes sont les prémices de l'étude des CSCs et permettent désormais de pouvoir étudier des cellules issues directement de tumeurs de patients.

Conclusions/Perspectives

En plus des différentes idées de tests supplémentaires mentionnés au cours de l'exposé de nos résultats et de leur discussion, et certaines expérimentations en cours de réalisation, nous envisageons d'effectuer des expériences supplémentaires dans la continuité des résultats obtenus.

I. Les gènes de la glycosylation : vers une étude à l'échelle du patient

Les premiers travaux effectués ont porté principalement sur la caractérisation d'une signature moléculaire spécifique de l'état de différenciation des cellules tumorales de glioblastome humain (342). Les gènes ciblés dans cette étude préliminaire étaient des gènes impliqués dans les mécanismes de la glycosylation. Les changements de l'état de glycosylation des cellules ont été décrits dans de nombreux types de cancers dans lesquels ils sont généralement associés à de nombreux processus tumorigènes et sont considérés comme étant de mauvais pronostic (224; 227; 343).

Ainsi, à partir des résultats obtenus, nous envisageons d'effectuer une nouvelle analyse de l'expression des gènes de la glycosylation par TLDA sur des différents types de gliomes issus de patients et actuellement stockés dans la tumorotheque. L'étape préliminaire sera donc la constitution d'une large cohorte de tumeurs de patients classées en fonction du grade tumoral. L'intérêt de cette étude sera donc d'établir une corrélation de nos résultats préliminaires avec une analyse à grande échelle sur un maximum de tumeurs afin d'en extraire quelques gènes spécifiques qui viendront enrichir une signature moléculaire.

La N-glycosylation est de plus une étape critique activement contrôlée au cours de la maturation de différentes protéines transmembranaires telles que les récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) ou encore dans les récepteurs aux neurotrophines qui sont souvent exprimés dans les tumeurs (299; 344). Par ailleurs, notre équipe étudie activement l'implication des neurotrophines et de leurs récepteurs dans différents types tumoraux (345-347). Ainsi, l'étude que nous envisageons aura pour but de caractériser et d'évaluer la corrélation, dans différents sous-types histologiques de gliomes (astrocytomes, oligoastrocytomes et oligodendrogliomes de grade II ou III, et glioblastomes), de l'expression des gènes impliqués dans la glycosylation et des gènes codant pour plusieurs récepteurs potentiellement clés dans la survie tumorale tels que les récepteurs aux neurotrophines et l'EGFR. Cette

approche transcriptomique dans un premier temps et protéomique ensuite, permettra de définir de nouveaux marqueurs d'agressivité et de déterminer leur valeur en tant que marqueurs des différents types histologiques, avec pour objectif d'améliorer la classification histomoléculaire des gliomes, indispensable dans le cadre de la prise en charge des patients.

Ces travaux permettront de confirmer l'implication de ces gènes dans les processus tumorigéniques. La glycosylation pourrait intervenir de manière dynamique dans le contrôle de l'activation de différents types de récepteurs. Les récepteurs aux neurotrophines (TrkA, TrkB, TrkC, p75^{NTR}) et les récepteurs à tyrosine Kinase (RTKs) tels que l'EGFR ou le VEGFR semblent être des cibles privilégiées dans les cellules cancéreuses de ces mécanismes (299; 303). Etant donné que les gènes impliqués dans la glycosylation semblent associés à l'agressivité de la tumeur, nous chercherons à établir une corrélation des niveaux d'expression de ces gènes avec ceux des gènes codants pour les différents récepteurs dans des tissus tumoraux. Cette approche devrait permettre d'identifier de nouveaux marqueurs d'agressivité tumorale.

Aucune étude n'a porté actuellement sur la co-expression de ces différents gènes dans des tumeurs de patients. En nous appuyant sur les liens existant entre l'expression des gènes impliqués dans la glycosylation et l'expression de ces différents récepteurs au sein de sous-types de gliomes, nous chercherons à établir des corrélations entre agressivité des tumeurs et l'expression spécifique de certains gènes ce qui permettra de définir des profils moléculaires pouvant être utiles à la classification des gliomes et au développement de nouvelles thérapies plus ciblées.

II. SdFFF et biocapteurs, couplage de deux techniques pour le développement d'un outil de tri cellulaire en microfluidique

Les biocapteurs développés et utilisés lors de ce travail ont permis d'étudier les propriétés diélectriques des cellules à des fréquences micro-ondes. Ces fréquences permettent de sonder le contenu intra cellulaire et donc d'obtenir une mesure de résonance propre à chaque cellule. En effet, les différentes expérimentations effectuées ont permis dans un premier temps de pouvoir différencier deux types cellulaires, puis, grâce à

l'adaptation de ces biocapteurs, de différencier des sous populations cellulaires différentes de part leur stade de différenciation. En effet, les expérimentations effectuées sur les CSCs issues de la lignée U87-MG tendent à montrer que le stade de différenciation des cellules est étroitement lié à leurs propriétés diélectriques. Ces résultats restent à confirmer mais ouvrent une voie importante concernant la caractérisation des CSCs et leur isolement. Ces capteurs permettraient donc dans un premier temps de trier les cellules sans marquage préalable permettant de ne pas modifier l'intégrité cellulaire.

En parallèle, l'équipe a développé depuis plusieurs années la méthode de tri par SdFFF. Adaptée désormais au tri cellulaire, cette méthode permet elle aussi de s'affranchir de tout marquage préalable pour trier des sous-populations cellulaires. Ainsi, à plus long terme, l'association de ces deux techniques sous la forme d'un système intégré micro-fluidique pourrait apporter une plus-value significative. En effet, un pré-tri par SdFFF permettra d'enrichir significativement une sous-population cellulaire en cellules souches cancéreuses. Cette sous-population pourra, à l'aide de conditions micro-fluidiques, passer dans un canal dans lequel aura été préalablement inséré le biocapteur. Ce dernier effectuera une mesure des propriétés diélectriques des cellules et fournira une signature électromagnétique propre aux cellules souches. Ce système de tri très précis reposant sur les caractéristiques physiques des cellules permettra de ne pas modifier leur intégrité afin de les remettre en culture, de les greffer ou de les étudier. Ce développement technologique serait idéal dans l'étude de biopsies ou de tumeurs de patients. En effet, ce système de tri ultra rapide pourrait permettre de caractériser le type de tumeur en fonction d'une base de données comprenant les signatures diélectriques des différentes cellules qui la constituent. Cette lecture analytique de la tumeur de chaque patient renforcerait la qualité du diagnostic et du pronostic et permettrait d'adapter la prise en charge du patient afin de parvenir à une prise en charge thérapeutique personnalisée.

Bibliographie

1. Hanahan, D., Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, (2000), 57-70.
2. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114, (2007), 97-109.
3. Hardell, L., Carlberg, M., Hansson Mild, K., Mobile phone use and the risk for malignant brain tumors: a case-control study on deceased cases and controls. *Neuroepidemiology*, 35, (2010), 109-114.
4. Hardell, L., Carlberg, M., Hansson Mild, K., Pooled analysis of case-control studies on malignant brain tumours and the use of mobile and cordless phones including living and deceased subjects. *Int J Oncol*, 38, (2011), 1465-1474.
5. Louis, D.N., Holland, E.C., Cairncross, J.G., Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol*, 159, (2001), 779-786.
6. Mischel, P.S., Cloughesy, T.F., Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol*, 13, (2003), 52-61.
7. Zülch, (Ed.) Histological typing of tumours of the central nervous system, Geneva, (1979).
8. Kleihues, P., (Ed.) Histological typing of tumours of the central nervous system., *Springer*, Heidelberg, (1993).
9. Kleihues, P., Cavenee W.K., (Ed.) World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system, Lyon, (2000).
10. Kleihues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*, 3, (1993), 255-268.
11. Kleihues, P., Sobin, L.H., World Health Organization classification of tumors. *Cancer*, 88, (2000), 2887.
12. Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., Delattre, J.Y., Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 361, (2003), 323-331.
13. Schneider, T., Mawrin, C., Scherlach, C., Skalej, M., Firsching, R., Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int*, 107, (2010), 799-807; quiz 808.
14. Dumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., Fallet-Bianco, C., [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol*, 20, (2000), 413-428.
15. Dumas-Duport, C., Tucker, M.L., Kolles, H., Cervera, P., Beuvon, F., Varlet, P., Udo, N., Koziak, M., Chodkiewicz, J.P., Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J Neurooncol*, 34, (1997), 61-78.

16. Daumas-Duport, C., Koziak, M., Miquel, C., Nataf, F., Jouvret, A., Varlet, P., [Reappraisal of the Sainte-Anne Hospital classification of oligodendrogliomas in view of retrospective studies]. *Neurochirurgie*, 51, (2005), 247-253.
17. Rasheed, B.K., Wiltshire, R.N., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol*, 11, (1999), 162-167.
18. Wen, P.Y., Kesari, S., Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359, (2008), 492-507.
19. Brandes, A.A., Tosoni, A., Cavallo, G., Reni, M., Franceschi, E., Bonaldi, L., Bertorelle, R., Gardiman, M., Ghimenton, C., Iuzzolino, P., Pession, A., Blatt, V., Ermani, M., Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study. *J Clin Oncol*, 24, (2006), 4746-4753.
20. Kouwenhoven, M.C., Kros, J.M., French, P.J., Biemond-ter Stege, E.M., Graveland, W.J., Taphoorn, M.J., Brandes, A.A., van den Bent, M.J., 1p/19q loss within oligodendroglioma is predictive for response to first line temozolomide but not to salvage treatment. *Eur J Cancer*, 42, (2006), 2499-2503.
21. Bauman, G.S., Ino, Y., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Fisher, B.J., Macdonald, D.R., Stitt, L., Louis, D.N., Cairncross, J.G., Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48, (2000), 825-830.
22. Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., Ino, Y., Ramsay, D.A., Louis, D.N., Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*, 90, (1998), 1473-1479.
23. Cairncross, G., Jenkins, R., Gliomas with 1p/19q codeletion: a.k.a. oligodendroglioma. *Cancer J*, 14, (2008), 352-357.
24. Reifenberger, G., Louis, D.N., Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62, (2003), 111-126.
25. Smith, J.S., Tachibana, I., Pohl, U., Lee, H.K., Thanarajasingam, U., Portier, B.P., Ueki, K., Ramaswamy, S., Billings, S.J., Mohrenweiser, H.W., Louis, D.N., Jenkins, R.B., A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics*, 64, (2000), 44-50.
26. Chakravarti, A., Dicker, A., 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. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58, (2004), 927-931.
27. Heldin, C.H., Protein tyrosine kinase receptors. *Cancer Surv*, 27, (1996), 7-24.

- 28.Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R., PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275, (1997), 1943-1947.
- 29.Lang, F.F., Miller, D.C., Koslow, M., Newcomb, E.W., Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg*, 81, (1994), 427-436.
- 30.Vousden, K.H., Lu, X., Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2, (2002), 594-604.
- 31.Louis, D.N., The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, 53, (1994), 11-21.
- 32.Sherr, C.J., McCormick, F., The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2, (2002), 103-112.
- 33.Schmidt, E.E., Ichimura, K., Reifenberger, G., Collins, V.P., CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res*, 54, (1994), 6321-6324.
- 34.Ueki, K., Ono, Y., Henson, J.W., Efird, J.T., von Deimling, A., Louis, D.N., CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res*, 56, (1996), 150-153.
- 35.Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Meltzer, P.S., Collins, V.P., Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res*, 54, (1994), 4299-4303.
- 36.Costello, J.F., Plass, C., Arap, W., Chapman, V.M., Held, W.A., Berger, M.S., Su Huang, H.J., Cavenee, W.K., Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res*, 57, (1997), 1250-1254.
- 37.Wolffe, A.P., Matzke, M.A., Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 286, (1999), 481-486.
- 38.Robertson, K.D., DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, 20, (2001), 3139-3155.
- 39.Costello, J.F., DNA methylation in brain development and gliomagenesis. *Front Biosci*, 8, (2003), s175-184.
- 40.Hegi, M.E., Liu, L., Herman, J.G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., Mehta, M.P., Gilbert, M.R., Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter

- methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*, 26, (2008), 4189-4199.
41. Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., Herman, J.G., Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, 343, (2000), 1350-1354.
 42. Silber, J.R., Bobola, M.S., Ghatan, S., Blank, A., Kolstoe, D.D., Berger, M.S., O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. *Cancer Res*, 58, (1998), 1068-1073.
 43. Gerstner, E.R., Yip, S., Wang, D.L., Louis, D.N., Iafrate, A.J., Batchelor, T.T., Mgmt methylation is a prognostic biomarker in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neurology*, 73, (2009), 1509-1510.
 44. Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Di, C., Lin, N., Mattox, A.K., Bigner, D.D., Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs*, 18, (2009), 1061-1083.
 45. Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, (2005), 987-996.
 46. Ohgaki, H., Kleihues, P., Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109, (2005), 93-108.
 47. McKinley, B.P., Michalek, A.M., Fenstermaker, R.A., Plunkett, R.J., The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J Neurosurg*, 93, (2000), 932-939.
 48. Ohgaki, H., Kleihues, P., Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 170, (2007), 1445-1453.
 49. Gorlia, T., van den Bent, M.J., Hegi, M.E., Mirimanoff, R.O., Weller, M., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Belanger, K., Brandes, A.A., Allgeier, A., Lacombe, D., Stupp, R., Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol*, 9, (2008), 29-38.
 50. Simon, J.M., Toubiana, T., Lang, P., Taillibert, S., Mazon, J.J., [Radiotherapy for glioblastomas: from radiobiology to concomitant chemotherapy]. *Cancer Radiother*, 9, (2005), 322-331.
 51. Walker, M.D., Alexander, E., Jr., Hunt, W.E., MacCarty, C.S., Mahaley, M.S., Jr., Mealey, J., Jr., Norrell, H.A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C.B., Gehan, E.A., Strike, T.A.,

- Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*, 49, (1978), 333-343.
52. Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial. *J Clin Oncol*, 19, (2001), 509-518.
53. Westphal, M., Hilt, D.C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P.C., Whittle, I.R., Jaaskelainen, J., Ram, Z., A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol*, 5, (2003), 79-88.
54. Rich, J.N., Reardon, D.A., Peery, T., Dowell, J.M., Quinn, J.A., Penne, K.L., Wikstrand, C.J., Van Duyn, L.B., Dancey, J.E., McLendon, R.E., Kao, J.C., Stenzel, T.T., Ahmed Rasheed, B.K., Tourt-Uhlig, S.E., Herndon, J.E., 2nd, Vredenburgh, J.J., Sampson, J.H., Friedman, A.H., Bigner, D.D., Friedman, H.S., Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*, 22, (2004), 133-142.
55. Wen, P.Y., Yung, W.K., Lamborn, K.R., Dahia, P.L., Wang, Y., Peng, B., Abrey, L.E., Raizer, J., Cloughesy, T.F., Fink, K., Gilbert, M., Chang, S., Junck, L., Schiff, D., Lieberman, F., Fine, H.A., Mehta, M., Robins, H.I., DeAngelis, L.M., Groves, M.D., Puduvalli, V.K., Levin, V., Conrad, C., Maher, E.A., Aldape, K., Hayes, M., Letvak, L., Egorin, M.J., Capdeville, R., Kaplan, R., Murgo, A.J., Stiles, C., Prados, M.D., Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08. *Clin Cancer Res*, 12, (2006), 4899-4907.
56. Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.J., Zhu, M., Ancukiewicz, M., Mrugala, M.M., Plotkin, S., Drappatz, J., Louis, D.N., Ivy, P., Scadden, D.T., Benner, T., Loeffler, J.S., Wen, P.Y., Jain, R.K., AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*, 11, (2007), 83-95.
57. Stommel, J.M., Kimmelman, A.C., Ying, H., Nabioullin, R., Ponugoti, A.H., Wiedemeyer, R., Stegh, A.H., Bradner, J.E., Ligon, K.L., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R.A., Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*, 318, (2007), 287-290.
58. Yung, W.K., Albright, R.E., Olson, J., Fredericks, R., Fink, K., Prados, M.D., Brada, M., Spence, A., Hohl, R.J., Shapiro, W., Glantz, M., Greenberg, H., Selker, R.G., Vick, N.A., Rampling, R., Friedman, H., Phillips, P., Bruner, J., Yue, N., Osoba, D., Zaknoen, S., Levin, V.A., A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer*, 83, (2000), 588-593.
59. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, (2001), 105-111.

60. Bruce, W.R., Van Der Gaag, H., A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature*, 199, (1963), 79-80.
61. Bonnet, D., Dick, J.E., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3, (1997), 730-737.
62. Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, (2003), 3983-3988.
63. Esposito, I., Kleeff, J., Bischoff, S.C., Fischer, L., Collecchi, P., Iorio, M., Bevilacqua, G., Buchler, M.W., Friess, H., The stem cell factor-c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. *Lab Invest*, 82, (2002), 1481-1492.
64. Dahlstrand, J., Collins, V.P., Lendahl, U., Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res*, 52, (1992), 5334-5341.
65. Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., Ailles, L.E., Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, (2007), 973-978.
66. Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., De Maria, R., Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445, (2007), 111-115.
67. Hamburger, A.W., Salmon, S.E., Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197, (1977), 461-463.
68. Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., Steindler, D.A., Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*, 39, (2002), 193-206.
69. Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., Vescovi, A., Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 64, (2004), 7011-7021.
70. Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.K., Wen, P.Y., Olson, J.J., Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*, 60, (2010), 166-193.
71. Reynolds, B.A., Weiss, S., Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, (1992), 1707-1710.
72. Palmer, T.D., Takahashi, J., Gage, F.H., The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, 8, (1997), 389-404.

- 73.Roy, N.S., Wang, S., Harrison-Restelli, C., Benraiss, A., Fraser, R.A., Gravel, M., Braun, P.E., Goldman, S.A., Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci*, 19, (1999), 9986-9995.
- 74.Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4, (1998), 1313-1317.
- 75.Johansson, C.B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A.M., Frisen, J., Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res*, 253, (1999), 733-736.
- 76.Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., Weissman, I.L., Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, (2000), 14720-14725.
- 77.Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S., A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 12, (1992), 4565-4574.
- 78.Craig, C.G., Tropepe, V., Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Weiss, S., van der Kooy, D., In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci*, 16, (1996), 2649-2658.
- 79.Fricker-Gates, R.A., Winkler, C., Kirik, D., Rosenblad, C., Carpenter, M.K., Bjorklund, A., EGF infusion stimulates the proliferation and migration of embryonic progenitor cells transplanted in the adult rat striatum. *Exp Neurol*, 165, (2000), 237-247.
- 80.Li, F., Tiede, B., Massague, J., Kang, Y., Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*, 17, (2007), 3-14.
- 81.Shoshan, Y., Nishiyama, A., Chang, A., Mork, S., Barnett, G.H., Cowell, J.K., Trapp, B.D., Staugaitis, S.M., Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, (1999), 10361-10366.
- 82.Bouvier, C., Bartoli, C., Aguirre-Cruz, L., Virard, I., Colin, C., Fernandez, C., Gouvernet, J., Figarella-Branger, D., Shared oligodendrocyte lineage gene expression in gliomas and oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosurg*, 99, (2003), 344-350.
- 83.Dufour, C., Cadusseau, J., Varlet, P., Surena, A.L., de Faria, G.P., Dias-Morais, A., Auger, N., Leonard, N., Daudigeos, E., Dantas-Barbosa, C., Grill, J., Lazar, V., Dessen, P., Vassal, G., Prevot, V., Sharif, A., Chneiweiss, H., Junier, M.P., Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation. *Stem Cells*, 27, (2009), 2373-2382.
- 84.Voigt, T., Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol*, 289, (1989), 74-88.

85. Hunter, K.E., Hatten, M.E., Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, (1995), 2061-2065.
86. Soriano, E., Alvarado-Mallart, R.M., Dumesnil, N., Del Rio, J.A., Sotelo, C., Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron*, 18, (1997), 563-577.
87. Leavitt, B.R., Hernit-Grant, C.S., Macklis, J.D., Mature astrocytes transform into transitional radial glia within adult mouse neocortex that supports directed migration of transplanted immature neurons. *Exp Neurol*, 157, (1999), 43-57.
88. Magavi, S.S., Leavitt, B.R., Macklis, J.D., Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405, (2000), 951-955.
89. Sulman, E., Aldape, K., Colman, H., Brain tumor stem cells. *Curr Probl Cancer*, 32, (2008), 124-142.
90. Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., Yu, J.S., Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23, (2004), 9392-9400.
91. Singec, I., Knoth, R., Meyer, R.P., Maciaczyk, J., Volk, B., Nikkhah, G., Frotscher, M., Snyder, E.Y., Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods*, 3, (2006), 801-806.
92. Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B., Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63, (2003), 5821-5828.
93. Huang, Z., Cheng, L., Guryanova, O.A., Wu, Q., Bao, S., Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell*, 1, (2010), 638-655.
94. Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432, (2004), 396-401.
95. Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444, (2006), 756-760.
96. Chong, Y.K., Toh, T.B., Zaiden, N., Poonepalli, A., Leong, S.H., Ong, C.E., Yu, Y., Tan, P.B., See, S.J., Ng, W.H., Ng, I., Hande, M.P., Kon, O.L., Ang, B.T., Tang, C., Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme. *Stem Cells*, 27, (2009), 29-39.

- 97.Suslov, O.N., Kukekov, V.G., Ignatova, T.N., Steindler, D.A., Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, (2002), 14506-14511.
- 98.Gursel, D.B., Shin, B.J., Burkhardt, J.K., Kesavabhotla, K., Schlaff, C.D., Boockvar, J.A., Glioblastoma Stem-Like Cells-Biology and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel)*, 3, (2011), 2655-2666.
- 99.Guan, Y., Gerhard, B., Hogge, D.E., Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 101, (2003), 3142-3149.
- 100.Mellor, H.R., Ferguson, D.J., Callaghan, R., A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *Br J Cancer*, 93, (2005), 302-309.
- 101.Scopelliti, A., Cammareri, P., Catalano, V., Saladino, V., Todaro, M., Stassi, G., Therapeutic implications of Cancer Initiating Cells. *Expert Opin Biol Ther*, 9, (2009), 1005-1016.
- 102.Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., Buck, D.W., A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90, (1997), 5013-5021.
- 103.Ribatti, D., The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 8, (2004), 294-300.
- 104.Yu, Y., Flint, A., Dvorin, E.L., Bischoff, J., AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem*, 277, (2002), 20711-20716.
- 105.Horn, P.A., Tesch, H., Staib, P., Kube, D., Diehl, V., Voliotis, D., Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 93, (1999), 1435-1437.
- 106.Buhring, H.J., Seiffert, M., Marxer, A., Weiss, B., Faul, C., Kanz, L., Brugger, W., AC133 antigen expression is not restricted to acute myeloid leukemia blasts but is also found on acute lymphoid leukemia blasts and on a subset of CD34+ B-cell precursors. *Blood*, 94, (1999), 832-833.
- 107.Lee, S.T., Jang, J.H., Min, Y.H., Hahn, J.S., Ko, Y.W., AC133 antigen as a prognostic factor in acute leukemia. *Leuk Res*, 25, (2001), 757-767.
- 108.Corbeil, D., Roper, K., Weigmann, A., Huttner, W.B., AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood*, 91, (1998), 2625-2626.
- 109.Tamaki, S., Eckert, K., He, D., Sutton, R., Doshe, M., Jain, G., Tushinski, R., Reitsma, M., Harris, B., Tsukamoto, A., Gage, F., Weissman, I., Uchida, N., Engraftment of

- sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res*, 69, (2002), 976-986.
110. Wang, J., Sakariassen, P.O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R., Enger, P.O., CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, 122, (2008), 761-768.
111. Zheng, X., Shen, G., Yang, X., Liu, W., Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res*, 67, (2007), 3691-3697.
112. Rich, J.N., Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res*, 67, (2007), 8980-8984.
113. Chen, M.S., Woodward, W.A., Behbod, F., Peddibhotla, S., Alfaro, M.P., Buchholz, T.A., Rosen, J.M., Wnt/beta-catenin mediates radiation resistance of Sca1+ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *J Cell Sci*, 120, (2007), 468-477.
114. Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., Alfaro, M.P., Buchholz, T.A., Rosen, J.M., WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, (2007), 618-623.
115. Reya, T., Clevers, H., Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434, (2005), 843-850.
116. Phillips, T.M., McBride, W.H., Pajonk, F., The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 98, (2006), 1777-1785.
117. Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., Ruiz i Altaba, A., HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*, 17, (2007), 165-172.
118. Puc, J., Keniry, M., Li, H.S., Pandita, T.K., Choudhury, A.D., Memeo, L., Mansukhani, M., Murty, V.V., Gaciong, Z., Meek, S.E., Piwnica-Worms, H., Hibshoosh, H., Parsons, R., Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell*, 7, (2005), 193-204.
119. Jiang, Z., Pore, N., Cerniglia, G.J., Mick, R., Georgescu, M.M., Bernhard, E.J., Hahn, S.M., Gupta, A.K., Maity, A., Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir. *Cancer Res*, 67, (2007), 4467-4473.
120. Chakravarti, A., Chakladar, A., Delaney, M.A., Latham, D.E., Loeffler, J.S., The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res*, 62, (2002), 4307-4315.
121. Debenham, P.G., Kartner, N., Siminovitch, L., Riordan, J.R., Ling, V., DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Mol Cell Biol*, 2, (1982), 881-889.

122. Kartner, N., Riordan, J.R., Ling, V., Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 221, (1983), 1285-1288.
123. Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., Sorrentino, B.P., The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 7, (2001), 1028-1034.
124. Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., Mulligan, R.C., Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 183, (1996), 1797-1806.
125. Fukaya, R., Ohta, S., Yamaguchi, M., Fujii, H., Kawakami, Y., Kawase, T., Toda, M., Isolation of cancer stem-like cells from a side population of a human glioblastoma cell line, SK-MG-1. *Cancer Lett*, 291, (2010), 150-157.
126. Summer, R., Kotton, D.N., Sun, X., Ma, B., Fitzsimmons, K., Fine, A., Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285, (2003), L97-104.
127. Alvi, A.J., Clayton, H., Joshi, C., Enver, T., Ashworth, A., Vivanco, M.M., Dale, T.C., Smalley, M.J., Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*, 5, (2003), R1-8.
128. Lassalle, B., Bastos, H., Louis, J.P., Riou, L., Testart, J., Dutrillaux, B., Fouchet, P., Allemand, I., 'Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development*, 131, (2004), 479-487.
129. Asakura, A., Rudnicki, M.A., Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol*, 30, (2002), 1339-1345.
130. Martin, C.M., Meeson, A.P., Robertson, S.M., Hawke, T.J., Richardson, J.A., Bates, S., Goetsch, S.C., Gallardo, T.D., Garry, D.J., Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol*, 265, (2004), 262-275.
131. Lechner, A., Leech, C.A., Abraham, E.J., Nolan, A.L., Habener, J.F., Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 293, (2002), 670-674.
132. Terunuma, A., Jackson, K.L., Kapoor, V., Telford, W.G., Vogel, J.C., Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *J Invest Dermatol*, 121, (2003), 1095-1103.
133. Wulf, G.G., Wang, R.Y., Kuehnle, I., Weidner, D., Marini, F., Brenner, M.K., Andreeff, M., Goodell, M.A., A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*, 98, (2001), 1166-1173.

134. Jin, F., Zhao, L., Zhao, H.Y., Guo, S.G., Feng, J., Jiang, X.B., Zhang, S.L., Wei, Y.J., Fu, R., Zhao, J.S., Comparison between cells and cancer stem-like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes. *Neuroscience*, 154, (2008), 541-550.
135. Shervington, A., Lu, C., Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells. *Cancer Invest*, 26, (2008), 535-542.
136. Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., Yu, J.S., Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, (2006), 67.
137. Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R., MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, (2005), 997-1003.
138. Magni, M., Shammah, S., Schiro, R., Mellado, W., Dalla-Favera, R., Gianni, A.M., Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. *Blood*, 87, (1996), 1097-1103.
139. Pearce, D.J., Taussig, D., Simpson, C., Allen, K., Rohatiner, A.Z., Lister, T.A., Bonnet, D., Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*, 23, (2005), 752-760.
140. Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M.S., Dontu, G., ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1, (2007), 555-567.
141. Rasper, M., Schafer, A., Piontek, G., Teufel, J., Brockhoff, G., Ringel, F., Heindl, S., Zimmer, C., Schlegel, J., Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol*, 12, (2010), 1024-1033.
142. Gollmer, J.C., Ladoux, A., Gioanni, J., Paquis, P., Dubreuil, A., Chatel, M., Frelin, C., Expression of vascular endothelial growth factor-b in human astrocytoma. *Neuro Oncol*, 2, (2000), 80-86.
143. Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., McLendon, R.E., Bigner, D.D., Rich, J.N., Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, 66, (2006), 7843-7848.
144. Wurmser, A.E., Nakashima, K., Summers, R.G., Toni, N., D'Amour, K.A., Lie, D.C., Gage, F.H., Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*, 430, (2004), 350-356.

145. Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., De Maria, R., Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468, (2010), 824-828.
146. Alvero, A.B., Chen, R., Fu, H.H., Montagna, M., Schwartz, P.E., Rutherford, T., Silasi, D.A., Steffensen, K.D., Waldstrom, M., Visintin, I., Mor, G., Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle*, 8, (2009), 158-166.
147. Gilbertson, R.J., Rich, J.N., Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer*, 7, (2007), 733-736.
148. Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I.T., Zakharenko, S.S., Gajjar, A., Davidoff, A., Gilbertson, R.J., A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 11, (2007), 69-82.
149. Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S., Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, 304, (2004), 1338-1340.
150. Gabriel, C., Gabriel, S., Corthout, E., The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Phys Med Biol*, 41, (1996), 2231-2249.
151. Gabriel, S., Lau, R.W., Gabriel, C., The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. *Phys Med Biol*, 41, (1996), 2251-2269.
152. Gabriel, S., Lau, R.W., Gabriel, C., The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues. *Phys Med Biol*, 41, (1996), 2271-2293.
153. Schwan, H.P., Electrical properties of blood and its constituents: alternating current spectroscopy. *Blut*, 46, (1983), 185-197.
154. Fricke, H., The theory of electrolytic polarization. *Philosophical Magazine*, 14, (1932), 310-318.
155. Sallinen, S.L., Sallinen, P.K., Haapasalo, H.K., Helin, H.J., Helen, P.T., Schraml, P., Kallioniemi, O.P., Kononen, J., Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res*, 60, (2000), 6617-6622.
156. Dalmay, C., Cheray, M., Pothier, A., Lalloué, F., Jauberteau, M.O., Blondy, P., Ultra sensitive biosensor based on impedance spectroscopy at microwave frequencies for cell scale analysis. *Sensors and Actuators A*, 162, (2010), 189-197.

157. Cardot, P.J.P., Denizot, Y., Battu, S., Cell sorting using Sedimentation Field-Flow Fractionation: methodologies, problems, and solutions - A "Cellulomics" Concept., in: J. Cazes, (Ed.), *Encyclopedia of Chromatography*, M. Dekker Inc., New York, (2005), pp. 282-291.
158. Kowalkowski, T., Buszewski, B., Cantado, C., Dondi, F., Field-flow fractionation: theory, techniques, applications and the challenges. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36, (2006), 129-135.
159. Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Michelini, E., Roda, A., Field-flow fractionation and biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23, (2005), 475-483.
160. Williams, S.K.R., Lee, D., Field-flow fractionation of proteins, polysaccharides, synthetic polymers, and supramolecular assemblies. *Journal of Separation Science*, 29, (2006), 1720-1732.
161. Caldwell, K.D., Cheng, Z.Q., Hradecky, P., Giddings, J.C., Separation of human and animal cells by steric field-flow fractionation. *Cell Biophysics*, 6, (1984), 233-251.
162. Merino-Dugay, A., Cardot, P.J.P., Czok, M., Guernet, M., Andreux, J.P., Monitoring of an experimental red blood cell pathology with gravitational field-flow fractionation. *J. Chromatogr.*, 579, (1992), 73-83.
163. Parsons, R., Yue, V., Tong, X., Cardot, P., Bernard, A., Andreux, J.P., Caldwell, K., Comparative study of human red blood cell analysis with three different field-flow fractionation systems. *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, 686, (1996), 177-187.
164. Urbankova, E., Vacek, A., Chmelik, J., Micropreparation of hemopoietic stem cells from the mouse bone marrow suspension by gravitational field-flow fractionation. *J. Chromatogr. B*, 687, (1996), 449-452.
165. Metreau, J.M., Gallet, S., Cardot, P.J., Le Maire, V., Dumas, F., Hervann, A., Loric, S., Sedimentation field-flow fractionation of cellular species. *Analytical Biochemistry*, 251, (1997), 178-186.
166. Cardot, P.J.P., Launay, J.-M., Martin, M., Age-dependent elution of human red blood cells in gravitational field-flow fractionation. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20, (1997), 2543-2553.
167. Tong, X., Caldwell, K.D., Differential swelling kinetics in particle separation by steric FFF: Simulation and experiment. *Book of Abstracts, 214th ACS National Meeting, Las Vegas, NV, September 7-11, (1997)*, ANYL-125.
168. Battu, S., Elyaman, W., Hugon, J., Cardot, P.J.P., Cortical cell elution by sedimentation field-flow fractionation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1528, (2001), 89-96.

169. Battu, S., Cook-Moreau, J., Cardot, P.J.P., Sedimentation field-flow fractionation: methodological basis and applications for cell sorting. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 25, (2002), 2193-2210.
170. Guglielmi, L., Battu, S., Le Bert, M., Faucher, J.L., Cardot, P.J.P., Denizot, Y., Mouse embryonic stem cell sorting for the generation of transgenic mice by sedimentation field-flow fractionation. *Anal. Chem.*, 76, (2004), 1580-1585.
171. Leger, D.Y., Liagre, B., Cardot, P.J.P., Beneytout, J.L., Battu, S., Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in HEL cell line and SdFFF monitoring. *Anal. Biochem.*, 335, (2004), 267-278.
172. Weers, J.G., Arlauskas, R.A., Particle size analysis of perfluorocarbon emulsions in a complex whole blood matrix by sedimentation field-flow fractionation. *Colloid Surface B*, 33, (2004), 265-269.
173. Arifin, D.R., Palmer, A.F., Stability of liposome encapsulated hemoglobin dispersions. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 33, (2005), 113-136.
174. Lautrette, C., Cardot, P.J.P., Vermot-desroche, C., Wijdenes, J., Jauberteau, M.O., Battu, S., SdFFF Purification of Immature Neural Cells from a Human Tumor Neuroblastoma Cell Line. *J. Chromatogr. B.*, 791, (2003), 149-160.
175. Comte, I., Battu, S., Mathonnet, M., Bessette, B., Lalloue, F., Cardot, P., Ayer-Le Lievre, C., Neural stem cell separation from the embryonic avian olfactory epithelium by sedimentation field-flow fractionation. *J. Chromatogr. B*, 843, (2006), 175-182.
176. Liu, J., Andya, J.D., Shire, S.J., A critical review of analytical ultracentrifugation and field flow fractionation methods for measuring protein aggregation. *AAPS J.*, 8, (2006), E580-E589.
177. Farmakis, L., Koliadima, A., Kinetic Study of Cell Proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Sedimentation/Steric Field Flow Fractionation in Situ. *Biotechnol. Prog.*, 21, (2005), 971-977.
178. Sanz, R., Cardot, P., Battu, S., Galceran, M.T., Steric-Hyperlayer Sedimentation Field Flow Fractionation and Flow Cytometry Analysis Applied to the Study of *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Chemistry*, 74, (2002), 4496-4504.
179. Saenton, S., Lee, H., Gao, Y.-S., Ranville, J.F., Williams, S.K.R., Evaluation of different field-flow fractionation techniques for separating bacteria. *Sep. Sci. Technol.*, 35, (2000), 1761-1775.
180. Khoshmanesh, A., Sharma, R., Beckett, R., Biomass of sediment bacteria by sedimentation field-flow fractionation. *J. Environ. Eng.*, 127, (2001), 19-25.

181. Begaud-Grimaud, G., Battu, S., Lazcoz, P., Castresana, J.S., Jauberteau, M.O., Cardot, P.J., Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by sedimentation field flow fractionation. *Int J Oncol*, 31, (2007), 883-892.
182. Levene, P.A., Alsberg, C.L., The cleavage products of vitellin. *J Biol Chem*, 2, (1906), 127-133.
183. Lipmann, F.A., Levene, P.A., Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *J Biol Chem*, 98, (1932), 109-114.
184. Burnett, G., Kennedy, E.P., The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem*, 211, (1954), 969-980.
185. de Graauw, M., Hensbergen, P., van de Water, B., Phospho-proteomic analysis of cellular signaling. *Electrophoresis*, 27, (2006), 2676-2686.
186. Shchemelinin, I., Sefc, L., Necas, E., Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol (Praha)*, 52, (2006), 81-100.
187. Delom, F., Chevet, E., Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Sci*, 4, (2006), 15.
188. Bloom, J., Cross, F.R., Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, (2007), 149-160.
189. Davis, R.J., The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 268, (1993), 14553-14556.
190. Tanoue, T., Nishida, E., Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*, 15, (2003), 455-462.
191. Johnson, G.L., Lapadat, R., Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298, (2002), 1911-1912.
192. Wu, C.J., Cai, T., Rikova, K., Merberg, D., Kasif, S., Steffen, M., A predictive phosphorylation signature of lung cancer. *PLoS One*, 4, (2009), e7994.
193. Takayama, T., Shiozaki, H., Doki, Y., Oka, H., Inoue, M., Yamamoto, M., Tamura, S., Shibamoto, S., Ito, F., Monden, M., Aberrant expression and phosphorylation of beta-catenin in human colorectal cancer. *Br J Cancer*, 77, (1998), 605-613.
194. Birner, P., Toumangelova-Uzeir, K., Natchev, S., Guentchev, M., STAT3 tyrosine phosphorylation influences survival in glioblastoma. *J Neurooncol*, 100, (2010), 339-343.
195. Lorimer, I.A., Lavictoire, S.J., Activation of extracellular-regulated kinases by normal and mutant EGF receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1538, (2001), 1-9.

196. Gayther, S.A., Batley, S.J., Linger, L., Bannister, A., Thorpe, K., Chin, S.F., Daigo, Y., Russell, P., Wilson, A., Sowter, H.M., Delhanty, J.D., Ponder, B.A., Kouzarides, T., Caldas, C., Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet*, 24, (2000), 300-303.
197. Huang, B.H., Laban, M., Leung, C.H., Lee, L., Lee, C.K., Salto-Tellez, M., Raju, G.C., Hooi, S.C., Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ*, 12, (2005), 395-404.
198. Song, J., Noh, J.H., Lee, J.H., Eun, J.W., Ahn, Y.M., Kim, S.Y., Lee, S.H., Park, W.S., Yoo, N.J., Lee, J.Y., Nam, S.W., Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*, 113, (2005), 264-268.
199. Hrzanjak, A., Moinfar, F., Kremser, M.L., Strohmeier, B., Staber, P.B., Zatloukal, K., Denk, H., Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther*, 5, (2006), 2203-2210.
200. Weichert, W., Roske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Stephan, C., Jung, K., Fritzsche, F.R., Niesporek, S., Denkert, C., Dietel, M., Kristiansen, G., Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer*, 98, (2008), 604-610.
201. Kim, M.S., Blake, M., Baek, J.H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., Carrier, F., Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res*, 63, (2003), 7291-7300.
202. Lucio-Eterovic, A.K., Cortez, M.A., Valera, E.T., Motta, F.J., Queiroz, R.G., Machado, H.R., Carlotti, C.G., Jr., Neder, L., Scrideli, C.A., Tone, L.G., Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer*, 8, (2008), 243.
203. Kvasha, S., Gordiyuk, V., Kondratov, A., Ugryn, D., Zgonnyk, Y.M., Rynditch, A.V., Vozianov, A.F., Hypermethylation of the 5'CpG island of the FHIT gene in clear cell renal carcinomas. *Cancer Lett*, 265, (2008), 250-257.
204. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., Reed, J.C., bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 82, (1993), 1820-1828.
205. Barton, C.A., Hacker, N.F., Clark, S.J., O'Brien, P.M., DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol Oncol*, 109, (2008), 129-139.
206. Kim, T.Y., Zhong, S., Fields, C.R., Kim, J.H., Robertson, K.D., Epigenomic profiling reveals novel and frequent targets of aberrant DNA methylation-mediated silencing in malignant glioma. *Cancer Res*, 66, (2006), 7490-7501.

207. Yu, J., Zhang, H., Gu, J., Lin, S., Li, J., Lu, W., Wang, Y., Zhu, J., Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. *BMC Cancer*, 4, (2004), 65.
208. Jacinto, F.V., Esteller, M., MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)*, 6, (2007), 1155-1160.
209. Cartron, P.F., Oliver, L., Martin, S., Moreau, C., LeCabelle, M.T., Jezequel, P., Meflah, K., Vallette, F.M., The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet*, 11, (2002), 675-687.
210. Dall'olio, F., Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *Clin Mol Pathol*, 49, (1996), M126-135.
211. Yarema, K.J., Bertozzi, C.R., Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biol*, 2, (2001), REVIEWS0004.
212. Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., Essentials of Glycobiology, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2009).
213. Rademacher, T.W., Parekh, R.B., Dwek, R.A., Glycobiology. *Annu Rev Biochem*, 57, (1988), 785-838.
214. Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K.M., Lehoux, S., Slomianny, C., Kim, C.H., Le Bourhis, X., Delannoy, P., GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Chem*, 390, (2009), 601-609.
215. Senn, H.J., Orth, M., Fitzke, E., Wieland, H., Gerok, W., Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. *Eur J Biochem*, 181, (1989), 657-662.
216. Degroote, S., Wolthoorn, J., van Meer, G., The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol*, 15, (2004), 375-387.
217. Svennerholm, L., Ganglioside designation. *Adv Exp Med Biol*, 125, (1980), 11.
218. Plomp, J.J., Willison, H.J., Pathophysiological actions of neuropathy-related anti-ganglioside antibodies at the neuromuscular junction. *J Physiol*, 587, (2009), 3979-3999.
219. Kaida, K., Ariga, T., Yu, R.K., Antiganglioside antibodies and their pathophysiological effects on Guillain-Barre syndrome and related disorders--a review. *Glycobiology*, 19, (2009), 676-692.
220. Portoukalian, J., Zwingelstein, G., Dore, J.F., Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur J Biochem*, 94, (1979), 19-23.

- 221.Thampoe, I.J., Furukawa, K., Vellve, E., Lloyd, K.O., Sialyltransferase levels and ganglioside expression in melanoma and other cultured human cancer cells. *Cancer Res*, 49, (1989), 6258-6264.
- 222.Ravindranath, M.H., Tsuchida, T., Morton, D.L., Irie, R.F., Ganglioside GM3:GD3 ratio as an index for the management of melanoma. *Cancer*, 67, (1991), 3029-3035.
- 223.Yoshida, S., Fukumoto, S., Kawaguchi, H., Sato, S., Ueda, R., Furukawa, K., Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res*, 61, (2001), 4244-4252.
- 224.Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., Bobowski, M., Grigoriadis, A., Tutt, A., Tulasne, D., Le Bourhis, X., Delannoy, P., GD synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Mol Cancer Res*, 8, (2010), 1526-1535.
- 225.Oblinger, J.L., Pearl, D.K., Boardman, C.L., Saqr, H., Prior, T.W., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B., Burger, P.C., Yates, A.J., Diagnostic and prognostic value of glycosyltransferase mRNA in glioblastoma multiforme patients. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 32, (2006), 410-418.
- 226.Abeijon, C., Hirschberg, C.B., Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 17, (1992), 32-36.
- 227.Hakomori, S., Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, (2002), 10231-10233.
- 228.Dawson, G., Moskal, J.R., Dawson, S.A., Transfection of 2,6 and 2,3-sialyltransferase genes and GlcNAc-transferase genes into human glioma cell line U-373 MG affects glycoconjugate expression and enhances cell death. *J Neurochem*, 89, (2004), 1436-1444.
- 229.Fuster, M.M., Esko, J.D., The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 5, (2005), 526-542.
- 230.Hakomori, S., Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*, 52, (1989), 257-331.
- 231.Feizi, T., Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*, 314, (1985), 53-57.
- 232.Dwek, M.V., Ross, H.A., Leatham, A.J., Proteome and glycosylation mapping identifies post-translational modifications associated with aggressive breast cancer. *Proteomics*, 1, (2001), 756-762.

- 233.Konska, G., Guillot, J., De Latour, M., Fonck, Y., Expression of Tn antigen and N-acetyllactosamine residues in malignant and benign human breast tumors detected by lectins and monoclonal antibody 83D4. *Int J Oncol*, 12, (1998), 361-367.
- 234.Konska, G., Favy, D., Guillot, J., Bernard-Gallon, D., de Latour, M., Fonck, Y., [Expression of T and Tn antigens in breast cancers]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 192, (1998), 733-747.
- 235.Burchell, J.M., Mungul, A., Taylor-Papadimitriou, J., O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6, (2001), 355-364.
- 236.Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G.F., Karsten, U., Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol*, 106, (1996), 197-207.
- 237.Springer, G.F., Desai, P.R., Banatwala, I., Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue. *J Natl Cancer Inst*, 54, (1975), 335-339.
- 238.Ikeda, Y., Kuwano, H., Baba, K., Ikebe, M., Matushima, T., Adachi, Y., Mori, M., Sugimachi, K., Expression of Sialyl-Tn antigens in normal squamous epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma in the esophagus. *Cancer Res*, 53, (1993), 1706-1708.
- 239.Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Montgomery, C.K., Kjeldsen, T., Takahashi, H.K., Bigbee, W.L., Kim, Y.S., Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res*, 49, (1989), 197-204.
- 240.Schuessler, M.H., Pintado, S., Welt, S., Real, F.X., Xu, M., Melamed, M.R., Lloyd, K.O., Oettgen, H.F., Blood group and blood-group-related antigens in normal pancreas and pancreas cancer: enhanced expression of precursor type 1, Tn and sialyl-Tn in pancreas cancer. *Int J Cancer*, 47, (1991), 180-187.
- 241.Springer, G.F., Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine alpha-O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma: a functional predictor of aggressiveness. *Mol Immunol*, 26, (1989), 1-5.
- 242.Itzkowitz, S.H., Bloom, E.J., Kokal, W.A., Modin, G., Hakomori, S., Kim, Y.S., Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer*, 66, (1990), 1960-1966.
- 243.Ma, X.C., Terata, N., Kodama, M., Jancic, S., Hosokawa, Y., Hattori, T., Expression of sialyl-Tn antigen is correlated with survival time of patients with gastric carcinomas. *Eur J Cancer*, 29A, (1993), 1820-1823.
- 244.Yin, B.W., Lloyd, K.O., Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*, 276, (2001), 27371-27375.

245. Nustad, K., Bast, R.C., Jr., Brien, T.J., Nilsson, O., Seguin, P., Suresh, M.R., Saga, T., Nozawa, S., Borner, O.P., de Bruijn, H.W., Nap, M., Vitali, A., Gadnell, M., Clark, J., Shigemasa, K., Karlsson, B., Kreutz, F.T., Jette, D., Sakahara, H., Endo, K., Paus, E., Warren, D., Hammarstrom, S., Kenemans, P., Hilgers, J., Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. *International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tumour Biol*, 17, (1996), 196-219.
246. O'Brien, T.J., Beard, J.B., Underwood, L.J., Dennis, R.A., Santin, A.D., York, L., The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol*, 22, (2001), 348-366.
247. Yin, B.W., Dnistrian, A., Lloyd, K.O., Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer*, 98, (2002), 737-740.
248. Reis, C.A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., David, L., Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol*, 63, (2010), 322-329.
249. Hakomori, S., Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res*, 45, (1985), 2405-2414.
250. Hakomori, S., Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res*, 56, (1996), 5309-5318.
251. Zhao, Y.Y., Takahashi, M., Gu, J.G., Miyoshi, E., Matsumoto, A., Kitazume, S., Taniguchi, N., Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci*, 99, (2008), 1304-1310.
252. Traylor, T.D., Hogan, E.L., Gangliosides of human cerebral astrocytomas. *J Neurochem*, 34, (1980), 126-131.
253. Fredman, P., von Holst, H., Collins, V.P., Ammar, A., Dellheden, B., Wahren, B., Granholm, L., Svennerholm, L., Potential ganglioside antigens associated with human gliomas. *Neurol Res*, 8, (1986), 123-126.
254. Jennemann, R., Rodden, A., Bauer, B.L., Mennel, H.D., Wiegandt, H., Glycosphingolipids of human gliomas. *Cancer Res*, 50, (1990), 7444-7449.
255. Jennemann, R., Mennel, H.D., Bauer, B.L., Wiegandt, H., Glycosphingolipid component profiles of human gliomas correlate with histological tumour types: analysis of inter-individual and tumour-regional distribution. *Acta Neurochir (Wien)*, 126, (1994), 170-178.
256. Chang, F., Li, R., Noon, K., Gage, D., Ladisch, S., Human medulloblastoma gangliosides. *Glycobiology*, 7, (1997), 523-530.

257. Markowska-Woyciechowska, A., Bronowicz, A., Ugorski, M., Gamian, E., Jablonski, P., Study on ganglioside composition in brain tumours supra- and infratentorial. *Neurol Neurochir Pol*, 34, (2000), 124-130.
258. Comas, T.C., Tai, T., Kimmel, D., Scheithauer, B.W., Burger, P.C., Pearl, D.K., Jewell, S.D., Yates, A.J., Immunohistochemical staining for ganglioside GD1b as a diagnostic and prognostic marker for primary human brain tumors. *Neuro Oncol*, 1, (1999), 261-267.
259. Popko, B., Pearl, D.K., Walker, D.M., Comas, T.C., Baerwald, K.D., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., Yates, A.J., Molecular markers that identify human astrocytomas and oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, (2002), 329-338.
260. Hamasaki, H., Aoyagi, M., Kasama, T., Handa, S., Hirakawa, K., Taki, T., GT1b in human metastatic brain tumors: GT1b as a brain metastasis-associated ganglioside. *Biochim Biophys Acta*, 1437, (1999), 93-99.
261. Tanwar, M.K., Gilbert, M.R., Holland, E.C., Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res*, 62, (2002), 4364-4368.
262. Pelloski, C.E., Mahajan, A., Maor, M., Chang, E.L., Woo, S., Gilbert, M., Colman, H., Yang, H., Ledoux, A., Blair, H., Passe, S., Jenkins, R.B., Aldape, K.D., YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 11, (2005), 3326-3334.
263. Yamamoto, H., Oviedo, A., Sweeley, C., Saito, T., Moskal, J.R., Alpha2,6-sialylation of cell-surface N-glycans inhibits glioma formation in vivo. *Cancer Res*, 61, (2001), 6822-6829.
264. Wiranowska, M., Ladd, S., Smith, S.R., Gottschall, P.E., CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of glioma. *Brain Cell Biol*, 35, (2006), 159-172.
265. Prag, S., Lepekhin, E.A., Kolkova, K., Hartmann-Petersen, R., Kawa, A., Walmod, P.S., Belman, V., Gallagher, H.C., Berezin, V., Bock, E., Pedersen, N., NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci*, 115, (2002), 283-292.
266. Sasaki, H., Yoshida, K., Ikeda, E., Asou, H., Inaba, M., Otani, M., Kawase, T., Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer*, 82, (1998), 1921-1931.
267. Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Raimondi, A., Pola, S., Cattaneo, M.G., Francolini, M., Vicentini, L.M., Pietrini, G., Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J Cell Sci*, 115, (2002), 3331-3340.
268. Asano, K., Duntsch, C.D., Zhou, Q., Weimar, J.D., Bordelon, D., Robertson, J.H., Pourmotabbed, T., Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol*, 70, (2004), 3-15.

269. Utsuki, S., Sato, Y., Oka, H., Tsuchiya, B., Suzuki, S., Fujii, K., Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *J Neurooncol*, 57, (2002), 187-192.
270. Green, C.L., Loken, M., Buck, D., Deeg, H.J., Discordant expression of AC133 and AC141 in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia*, 14, (2000), 770-772.
271. Bidlingmaier, S., Zhu, X., Liu, B., The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*, 86, (2008), 1025-1032.
272. Kemper, K., Sprick, M.R., de Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., Zeilstra, J., Pals, S.T., Mehmet, H., Stassi, G., Medema, J.P., The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res*, 70, (2010), 719-729.
273. Campos, B., Herold-Mende, C.C., Insight into the complex regulation of CD133 in glioma. *Int J Cancer*, 128, (2011), 501-510.
274. Ermonval, M., Petit, D., Le Duc, A., Kellermann, O., Gallet, P.F., Glycosylation-related genes are variably expressed depending on the differentiation state of a bioaminergic neuronal cell line: implication for the cellular prion protein. *Glycoconj J*, 26, (2009), 477-493.
275. Bertrand, J., Begaud-Grimaud, G., Bessette, B., Verdier, M., Battu, S., Jauberteau, M.O., Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas-induced apoptosis. *Int J Oncol*, 34, (2009), 717-727.
276. Wu, F.Y., Wang, S.E., Sanders, M.E., Shin, I., Rojo, F., Baselga, J., Arteaga, C.L., Reduction of cytosolic p27(Kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity. *Cancer Res*, 66, (2006), 2162-2172.
277. Dos Santos, C., Karaky, R., Renoir, D., Hamma-Kourbali, Y., Albanese, P., Gobbo, E., Griscelli, F., Opolon, P., Dalle, S., Perricaudet, M., Courty, J., Delbe, J., Antitumorogenic effects of a mutant of the heparin affini regulatory peptide on the U87 MG glioblastoma cell line. *Int J Cancer*, 127, (2010), 1038-1051.
278. Hagedorn, M., Javerzat, S., Gilges, D., Meyre, A., de Lafarge, B., Eichmann, A., Bikfalvi, A., Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, (2005), 1643-1648.
279. Lamour, V., Le Mercier, M., Lefranc, F., Hagedorn, M., Javerzat, S., Bikfalvi, A., Kiss, R., Castronovo, V., Bellahcene, A., Selective osteopontin knockdown exerts anti-tumoral activity in a human glioblastoma model. *Int J Cancer*, 126, (2010), 1797-1805.
280. Pen, A., Durocher, Y., Slinn, J., Rukhlova, M., Charlebois, C., Stanimirovic, D.B., Moreno, M.J., Insulin-like growth factor binding protein 7 exhibits tumor suppressive and vessel stabilization properties in U87MG and T98G glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther*, 12, (2011), 634-646.

281. Merk, B.C., Owens, J.L., Lopes, M.B., Silva, C.M., Hussaini, I.M., STAT6 expression in glioblastoma promotes invasive growth. *BMC Cancer*, 11, (2011), 184.
282. Liang, G., Butterfield, C., Liang, J., Birsner, A., Folkman, J., Shing, Y., Beta-35 is a transferrin-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 409, (2011), 562-566.
283. Huang, C., Jiang, T., Zhu, L., Liu, J., Cao, J., Huang, K.J., Qiu, Z.J., STAT3-targeting RNA interference inhibits pancreatic cancer angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 38, (2011), 1637-1644.
284. Sihn, G., Walter, T., Klein, J.C., Queguiner, I., Iwao, H., Nicolau, C., Lehn, J.M., Corvol, P., Gasc, J.M., Anti-angiogenic properties of myo-inositol trispyrophosphate in ovo and growth reduction of implanted glioma. *FEBS Lett*, 581, (2007), 962-966.
285. Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., Date, I., Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol*, 28, (2011), 13-24.
286. Oliver, L., Olivier, C., Marhuenda, F.B., Campone, M., Vallette, F.M., Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy. *Curr Mol Pharmacol*, 2, (2009), 263-284.
287. Shao, R., Hamel, K., Petersen, L., Cao, Q.J., Arenas, R.B., Bigelow, C., Bentley, B., Yan, W., YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene*, 28, (2009), 4456-4468.
288. Wong, M.L., Prawira, A., Kaye, A.H., Hovens, C.M., Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *J Clin Neurosci*, 16, (2009), 1119-1130.
289. Francescone, R.A., Scully, S., Faibish, M., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., Yan, W., Bentley, B., Shao, R., Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma. *J Biol Chem*, 286, (2011), 15332-15343.
290. Faibish, M., Francescone, R., Bentley, B., Yan, W., Shao, R., A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Mol Cancer Ther*, 10, (2011), 742-751.
291. Torres-Vazquez, J., Gitler, A.D., Fraser, S.D., Berk, J.D., Van, N.P., Fishman, M.C., Childs, S., Epstein, J.A., Weinstein, B.M., Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. *Dev Cell*, 7, (2004), 117-123.
292. Dalmay, C., Pothier, A., Blondy, P., Lalloué, F., Jauberteau, M.O., Label free bio sensing method using radio frequencies spectroscopy for cell detection and discrimination. *Biodevices 2009*, (2009), 3-6.

293. Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S., Delannoy, P., Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydr Res*, 345, (2010), 1377-1383.
294. Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., Delannoy, P., Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12, (2010), 204.
295. Fry, S.A., Afrough, B., Lomax-Browne, H.J., Timms, J.F., Velentzis, L.S., Leathem, A.J., Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers. *Glycobiology*, 21, (2011), 1060-1070.
296. Tsai, H.Y., Boonyapranai, K., Sriyam, S., Yu, C.J., Wu, S.W., Khoo, K.H., Phutrakul, S., Chen, S.T., Glycoproteomics analysis to identify a glycoform on haptoglobin associated with lung cancer. *Proteomics Clin Appl*, 5, (2011), 560.
297. Saeland, E., Belo, A.I., Mongera, S., van Die, I., Meijer, G.A., van Kooyk, Y., Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients. *Int J Cancer*, (2011).
298. Pedersen, J.W., Blixt, O., Bennett, E.P., Tarp, M.A., Dar, I., Mandel, U., Poulsen, S.S., Pedersen, A.E., Rasmussen, S., Jess, P., Clausen, H., Wandall, H.H., Seromic profiling of colorectal cancer patients with novel glycopeptide microarray. *Int J Cancer*, 128, (2011), 1860-1871.
299. Fernandes, H., Cohen, S., Bishayee, S., Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem*, 276, (2001), 5375-5383.
300. Schraen-Maschke, S., Zanetta, J.P., Role of oligomannosidic N-glycans in the proliferation, adhesion and signalling of C6 glioblastoma cells. *Biochimie*, 85, (2003), 219-229.
301. Kroes, R.A., He, H., Emmett, M.R., Nilsson, C.L., Leach, F.E., 3rd, Amster, I.J., Marshall, A.G., Moskal, J.R., Overexpression of ST6GalNAcV, a ganglioside-specific alpha2,6-sialyltransferase, inhibits glioma growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, (2010), 12646-12651.
302. Haniu, M., Talvenheimo, J., Le, J., Katta, V., Welcher, A., Rohde, M.F., Extracellular domain of neurotrophin receptor trkB: disulfide structure, N-glycosylation sites, and ligand binding. *Arch Biochem Biophys*, 322, (1995), 256-264.
303. Contessa, J.N., Bhojani, M.S., Freeze, H.H., Rehemtulla, A., Lawrence, T.S., Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. *Cancer Res*, 68, (2008), 3803-3809.

304. Mak, A.B., Blakely, K.M., Williams, R.A., Penttila, P.A., Shukalyuk, A.I., Osman, K.T., Kasimer, D., Ketela, T., Moffat, J., CD133 N-glycosylation processing contributes to cell-surface recognition of the primitive cell marker AC133. *J Biol Chem*, (2011).
305. Kroes, R.A., Dawson, G., Moskal, J.R., Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas. *J Neurochem*, 103 Suppl 1, (2007), 14-24.
306. Alvarez-Manilla, G., Warren, N.L., Atwood, J., 3rd, Orlando, R., Dalton, S., Pierce, M., Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells: identification of potential glyco-biomarkers using lectin affinity chromatography of glycopeptides. *J Proteome Res*, 9, (2010), 2062-2075.
307. He, J., Liu, Y., Zhu, T.S., Xie, X., Costello, M.A., Talsma, C.E., Flack, C.G., Crowley, J.G., Dimeco, F., Vescovi, A.L., Fan, X., Lubman, D.M., Glycoproteomic analysis of glioblastoma stem cell differentiation. *J Proteome Res*, 10, (2011), 330-338.
308. Steg, A., Wang, W., Blanquicett, C., Grunda, J.M., Eltoum, I.A., Wang, K., Buchsbaum, D.J., Vickers, S.M., Russo, S., Diasio, R.B., Frost, A.R., LoBuglio, A.F., Grizzle, W.E., Johnson, M.R., Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by TaqMan low-density array: Application to hedgehog and Wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *J Mol Diagn*, 8, (2006), 76-83.
309. Jiang, Z., Hu, J., Li, X., Jiang, Y., Zhou, W., Lu, D., Expression analyses of 27 DNA repair genes in astrocytoma by TaqMan low-density array. *Neurosci Lett*, 409, (2006), 112-117.
310. Iwama, E., Tsuchimoto, D., Iyama, T., Sakumi, K., Nakagawara, A., Takayama, K., Nakanishi, Y., Nakabeppu, Y., Cancer-related PRUNE2 protein is associated with nucleotides and is highly expressed in mature nerve tissues. *J Mol Neurosci*, 44, (2011), 103-114.
311. Machida, T., Fujita, T., Ooo, M.L., Ohira, M., Isogai, E., Mihara, M., Hirato, J., Tomotsune, D., Hirata, T., Fujimori, M., Adachi, W., Nakagawara, A., Increased expression of proapoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene*, 25, (2006), 1931-1942.
312. Clarke, R.A., Zhao, Z., Guo, A.Y., Roper, K., Teng, L., Fang, Z.M., Samaratunga, H., Lavin, M.F., Gardiner, R.A., New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One*, 4, (2009), e4995.
313. Zeng, G., Li, D.D., Gao, L., Birkle, S., Bieberich, E., Tokuda, A., Yu, R.K., Alteration of ganglioside composition by stable transfection with antisense vectors against GD3-synthase gene expression. *Biochemistry*, 38, (1999), 8762-8769.
314. Zeng, G., Gao, L., Birkle, S., Yu, R.K., Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res*, 60, (2000), 6670-6676.

315. Sottocornola, E., Colombo, I., Vergani, V., Taraboletti, G., Berra, B., Increased tumorigenicity and invasiveness of C6 rat glioma cells transfected with the human alpha-2,8 sialyltransferase cDNA. *Invasion Metastasis*, 18, (1998), 142-154.
316. Hedberg, K.M., Dellheden, B., Wikstrand, C.J., Fredman, P., Monoclonal anti-GD3 antibodies selectively inhibit the proliferation of human malignant glioma cells in vitro. *Glycoconj J*, 17, (2000), 717-726.
317. Watanabe, R., Ohyama, C., Aoki, H., Takahashi, T., Satoh, M., Saito, S., Hoshi, S., Ishii, A., Saito, M., Arai, Y., Ganglioside G(M3) overexpression induces apoptosis and reduces malignant potential in murine bladder cancer. *Cancer Res*, 62, (2002), 3850-3854.
318. Kilbey, A., Terry, A., Jenkins, A., Borland, G., Zhang, Q., Wakelam, M.J., Cameron, E.R., Neil, J.C., Runx regulation of sphingolipid metabolism and survival signaling. *Cancer Res*, 70, (2010), 5860-5869.
319. Choi, S.Y., Jang, J.H., Kim, K.R., Analysis of differentially expressed genes in human rectal carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Clin Exp Med*, (2011).
320. Schegg, B., Hulsmeier, A.J., Rutschmann, C., Maag, C., Hennet, T., Core glycosylation of collagen is initiated by two beta(1-O)galactosyltransferases. *Mol Cell Biol*, 29, (2009), 943-952.
321. Lu, Y., Yi, Y., Liu, P., Wen, W., James, M., Wang, D., You, M., Common human cancer genes discovered by integrated gene-expression analysis. *PLoS One*, 2, (2007), e1149.
322. Jensen, B.V., Johansen, J.S., Price, P.A., High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 9, (2003), 4423-4434.
323. Shao, R., Cao, Q.J., Arenas, R.B., Bigelow, C., Bentley, B., Yan, W., Breast cancer expression of YKL-40 correlates with tumour grade, poor differentiation, and other cancer markers. *Br J Cancer*, 105, (2011), 1203-1209.
324. Hogdall, E.V., Johansen, J.S., Kjaer, S.K., Price, P.A., Christensen, L., Blaakaer, J., Bock, J.E., Glud, E., Hogdall, C.K., High plasma YKL-40 level in patients with ovarian cancer stage III is related to shorter survival. *Oncol Rep*, 10, (2003), 1535-1538.
325. Cintin, C., Johansen, J.S., Christensen, I.J., Price, P.A., Sorensen, S., Nielsen, H.J., High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer*, 95, (2002), 267-274.
326. Johansen, J.S., Drivsholm, L., Price, P.A., Christensen, I.J., High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung Cancer*, 46, (2004), 333-340.
327. Gronlund, B., Hogdall, E.V., Christensen, I.J., Johansen, J.S., Norgaard-Pedersen, B., Engelholm, S.A., Hogdall, C., Pre-treatment prediction of chemoresistance in second-line

- chemotherapy of ovarian carcinoma: value of serological tumor marker determination (tetranectin, YKL-40, CASA, CA 125). *Int J Biol Markers*, 21, (2006), 141-148.
328. Junker, N., Johansen, J.S., Hansen, L.T., Lund, E.L., Kristjansen, P.E., Regulation of YKL-40 expression during genotoxic or microenvironmental stress in human glioblastoma cells. *Cancer Sci*, 96, (2005), 183-190.
329. Ku, B.M., Lee, Y.K., Ryu, J., Jeong, J.Y., Choi, J., Eun, K.M., Shin, H.Y., Kim, D.G., Hwang, E.M., Yoo, J.C., Park, J.Y., Roh, G.S., Kim, H.J., Cho, G.J., Choi, W.S., Paek, S.H., Kang, S.S., CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells. *Int J Cancer*, 128, (2011), 1316-1326.
330. Iwamoto, F.M., Hottinger, A.F., Karimi, S., Riedel, E., Dantis, J., Jahdi, M., Panageas, K.S., Lassman, A.B., Abrey, L.E., Fleisher, M., Deangelis, L.M., Holland, E.C., Hormigo, A., Serum YKL-40 is a marker of prognosis and disease status in high-grade gliomas. *Neuro Oncol*, (2011).
331. Takahashi, N., Iwahori, A., Breitman, T.R., Fukui, T., Tunicamycin in combination with retinoic acid synergistically inhibits cell growth while decreasing palmitoylation and enhancing retinoylation of proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Oncol Res*, 9, (1997), 527-533.
332. Hennen, E., Czopka, T., Faissner, A., Structurally distinct LewisX glycans distinguish subpopulations of neural stem/progenitor cells. *J Biol Chem*, 286, (2011), 16321-16331.
333. Hashemi, S.M., Soudi, S., Shabani, I., Naderi, M., Soleimani, M., The promotion of stemness and pluripotency following feeder-free culture of embryonic stem cells on collagen-grafted 3-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials*, 32, (2011), 7363-7374.
334. Nacev, B.A., Grassi, P., Dell, A., Haslam, S.M., Liu, J.O., The antifungal drug itraconazole inhibits vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, trafficking and signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*, (2011).
335. Leger, D.Y., Liagre, B., Cardot, P.J., Beneytout, J.L., Battu, S., Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring. *Anal Biochem*, 335, (2004), 267-278.
336. de Freitas Junior, J.C., Silva Bdu, R., de Souza, W.F., de Araujo, W.M., Abdelhay, E.S., Morgado-Diaz, J.A., Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68, (2011), 227-238.
337. Yu, S.C., Ping, Y.F., Yi, L., Zhou, Z.H., Chen, J.H., Yao, X.H., Gao, L., Wang, J.M., Bian, X.W., Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett*, 265, (2008), 124-134.

338. Qiang, L., Yang, Y., Ma, Y.J., Chen, F.H., Zhang, L.B., Liu, W., Qi, Q., Lu, N., Tao, L., Wang, X.T., You, Q.D., Guo, Q.L., Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett*, 279, (2009), 13-21.
339. Osmond, T.L., Broadley, K.W., McConnell, M.J., Glioblastoma cells negative for the anti-CD133 antibody AC133 express a truncated variant of the CD133 protein. *Int J Mol Med*, 25, (2010), 883-888.
340. Broadley, K.W., Hunn, M.K., Farrand, K.J., Price, K.M., Grasso, C., Miller, R.J., Hermans, I.F., McConnell, M.J., Side population is not necessary or sufficient for a cancer stem cell phenotype in glioblastoma multiforme. *Stem Cells*, 29, (2011), 452-461.
341. Dalmay, C., Cheray, M., Pothier, A., Lalloué, F., Jauberteau, M.O., Blondy, P., Ultra sensitive biosensor based on impedance spectroscopy at microwave frequencies for cell scale analysis. *Procedia Chemistry*, 1, (2009), 742-745.
342. Cheray, M., Petit, D., Forestier, L., Karayan-Tapon, L., Maftah, A., Jauberteau, M.O., Battu, S., Gallet, F.P., Lalloué, F., Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells. *Cancer Lett*, 312, (2011), 24-32.
343. Fukuda, M., Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res*, 56, (1996), 2237-2244.
344. Woronowicz, A., Amith, S.R., De Vusser, K., Laroy, W., Contreras, R., Basta, S., Szewczuk, M.R., Dependence of neurotrophic factor activation of Trk tyrosine kinase receptors on cellular sialidase. *Glycobiology*, 17, (2007), 10-24.
345. Akil, H., Perraud, A., Melin, C., Jauberteau, M.O., Mathonnet, M., Fine-Tuning Roles of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB and Sortilin in Colorectal Cancer Cell Survival. *PLoS One*, 6, (2011), e25097.
346. Lise, M.C., Sparsa, A., Marie, I., Lalloué, F., Ly, K., Martel, C., Bezanahary, H., Gondran, G., Loustaud-Ratti, V., Bonnetblanc, J.M., Vidal, E., Jauberteau, M.O., Fauchais, A.L., Serum neurotrophin profile in systemic sclerosis. *PLoS One*, 5, (2010), e13918.
347. Fauchais, A.L., Lalloué, F., Lise, M.C., Boumediene, A., Preud'homme, J.L., Vidal, E., Jauberteau, M.O., Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol*, 181, (2008), 3027-3038.

Résumé :

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale la plus agressive due à sa radio-résistance et sa capacité à récidiver, cela suggérant la présence de cellules souches cancéreuses (CSCs) au sein de la tumeur. Ces cellules sont considérées comme cible majeure pour éradiquer la tumeur mais restent mal connues. La principale difficulté reste leur isolement et leur caractérisation afin de développer des thérapies ciblées et découvrir de nouveaux marqueurs. Dans ce sens, nous avons utilisé deux approches de caractérisation et/ou d'isolement des CSCs dans le GBM. La première repose sur l'obtention d'une signature moléculaire (glyco-signature). Une analyse transcriptomique différentielle du niveau d'expression des gènes de la glycosylation selon l'état de différenciation des cellules issues de 2 lignées de GBMs a été effectuée. Cette méthodologie a permis d'identifier des gènes spécifiquement surexprimés dans les cellules indifférenciées apparentées aux CSCs par Taqman Low Density Array (TLDA). Ces résultats ont pu être confirmés par l'étude de l'expression protéique de ces gènes dans les lignées ainsi que dans des transcrits de tumeurs de patients. L'implication des gènes isolés pour le maintien du caractère indifférencié des cellules a été évaluée à l'aide de lignées cellulaires inactivées pour chaque gène sélectionné. La seconde approche repose sur le développement d'un biocapteur permettant d'obtenir une signature électromagnétique des cellules les plus indifférenciées. Celui-ci permet de s'affranchir des marquages immunologiques afin de caractériser et trier ces cellules. Cette solution de tri pourra être couplée à une technologie de tri existant dans le laboratoire, la SdFFF.

Mots clés : Glioblastomes, cellules souches cancéreuses, TLDA, glycosylation, gènes, caractérisation cellulaire.

Title: Characterization of glioblastoma tumor stem cells : definition of a specific glyco-signature and development of tools for characterizing stem cells

Abstract:

Glioblastomas (GBMs) are the most common and aggressive type of brain tumor. The understanding of the cellular and molecular mechanisms of tumor initiation and acquired resistance to conventional radio- and chemotherapy should lead to novel therapeutic approaches. In this regard, the identification and characterization of cancer stem cells (CSCs) has gained attention. In the present report, we used two approaches for the characterization and/or isolation of CSCs in GBM. The first approach consisted on defining a molecular signature (glyco-signature). Glycosylation-related gene expression of 2 GBMs cell lines was assessed by differential transcriptomic analysis to compare differentiation states. Overexpressed genes in undifferentiated cells in comparison with differentiated ones were identified by Taqman Low Density Array (TLDA). Similar results were found in patient's tumors transcripts and protein expression was also confirmed in the 2 cell lines. In order to correlate gene expression with undifferentiated characteristics maintenance, 3 selected genes thought to be involved in maintenance of the undifferentiated status were inactivated. The second approach was based on developing cell sorting tools. Electromagnetic characteristics of undifferentiated cells were studied by the development of a biosensor which allows sorting cells avoiding immunologic labeling. Finally, biosensors could be coupled with SdFFF, another cell sorting technique used in the laboratory.

Keywords: Glioblastoma, cancer stem cells, TLDA, glycosylation, genes, cellular characterization