



**HAL**  
open science

# Cellules souches cancéreuses et glioblastome : Etude du mode d'action d'un composé actif

Laëtitia Chezeau

► **To cite this version:**

Laëtitia Chezeau. Cellules souches cancéreuses et glioblastome : Etude du mode d'action d'un composé actif. Sciences pharmaceutiques. 2015. hal-01734235

**HAL Id: hal-01734235**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734235>**

Submitted on 14 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

**UNIVERSITE DE LORRAINE**  
**2015**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

***THESE***

Présentée et soutenue publiquement

Le 30 septembre 2015, sur un sujet dédié à :

***Cellules souches cancéreuses et glioblastome :  
Etude du mode d'action d'un composé actif***

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Laëtitia CHEZEAU**

née le 2 juin 1987 à Mont-Saint-Martin (54)

**Membres du Jury**

**Président :** Pr. **Bertrand RIHN**, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie - Nancy

**Juges :** Dr. **Olivier JOUBERT**, Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie - Nancy, Directeur de thèse  
Dr. **Maria ZENIOU**, Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie – Strasbourg  
Dr. **Marie CESARONI**, Responsable adjoint des opérations pharmaceutiques, Nancyclotep  
Dr. **Lionel DOMENJOUR**, Maître de Conférences, Faculté des Sciences et Technologies - Nancy  
Dr. **Stéphane BINET**, Directeur de laboratoire, INRS - Vandoeuvre  
Dr. **Laurent GATE**, Responsable d'études, INRS - Vandoeuvre

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2014-2015**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Béatrice FAIVRE

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Conseil de la Pédagogie**

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Président, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Président, Raphaël DUVAL

**Responsable de la filière Officine**

**Responsables de la filière Industrie**

**Responsable de la filière Hôpital**

**Responsable Pharma Plus ENSIC**

**Responsable Pharma Plus ENSAIA**

**Responsable de la Communication**

**Responsable de la Cellule de Formation Continue  
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément  
des maîtres de stage**

**Responsables des échanges internationaux**

**Responsable ERASMUS**

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Pierre LECTARD  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
Maurice PIERFITTE  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

Françoise HINZELIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Jean-Louis MONAL  
Blandine MOREAU  
Dominique NOTTER  
Christine PERDICAKIS  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ENSEIGNANTS**

Section  
CNU\*

Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

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

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé

Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

#### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

#### **PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

#### \*Disciplines du Conseil National des Universités :

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

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

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

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

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

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

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

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

# SERMENT DES APOTHICAIRES



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

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

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

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

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

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



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

# Remerciements

---

**A Monsieur Bertrand RIHN, Professeur des Universités,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse,  
Veuillez accepter ici toute ma considération ainsi que mon profond respect.

**A Monsieur Olivier JOUBERT, Maître de Conférences,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de ce travail,  
Pour vos conseils, votre disponibilité et votre soutien,  
Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus profond respect et de ma plus vive reconnaissance.

**A Madame Maria ZENIOU, Maître de Conférences,**

Pour m'avoir accueillie pendant mon stage de master 2, dans votre équipe au sein du laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200, Faculté de Pharmacie, Strasbourg),  
Pour m'avoir permis d'approfondir mes connaissances et ma technique dans le domaine scientifique,  
Pour votre aide, votre disponibilité et votre gentillesse à mon égard,  
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.  
Sans vous, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

**A Monsieur Laurent GATE, Responsable d'études,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,  
Pour votre gentillesse, votre disponibilité et vos précieux conseils,  
Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus profonde estime et ma sincère gratitude.

**A Monsieur Lionel DOMENJOUR, Maître de Conférences,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,  
Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

**A Monsieur Stéphane BINET, Directeur de laboratoire,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,  
Veuillez trouver ici l'expression de ma plus respectueuse gratitude.

**A Madame Marie CESARONI, Responsable adjoint des opérations pharmaceutiques,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,  
Pour m'avoir accompagnée avec joie et bonne humeur tout au long de mes études,  
Un grand merci.

**A Madame Marie-Claude KILHOFFER, Professeur des Universités, aux doctorants Jihu DONG et Wanyin CHEN,**

Je vous remercie pour votre gentillesse et votre disponibilité à mon égard.

**A mes parents et à mon frère,**

Je vous remercie de m'avoir toujours soutenue dans les bons comme dans les mauvais moments, de m'avoir donné la force de continuer quand moi-même je n'y croyais plus. Merci pour tout ce que vous avez fait, faites et ferez pour moi.

**A tous les membres de ma famille,**

Je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements.

**Aux membres du groupe des « 4 fantastiques »,**

Je vous remercie d'avoir rendu magiques ces années à la faculté. Merci pour tous nos moments, nos karaokés mythiques, nos folles soirées ! Et ce n'est que le début d'une longue aventure : « ça fout les j'tons » !

Merci plus particulièrement à Marie, ma « blonde préférée », pour ton aide précieuse lors de la relecture de cette thèse.

**A mon binôme Carine,**

Je te remercie pour ta patience et ton soutien pendant les heures interminables passées à rédiger nos rapports... Merci pour les bons moments passés ensemble à la faculté.

**Aux « indémodables », à mes amis longoviciens, à mes amis d'enfance,**

Je vous remercie d'avoir été toujours présents. Je n'oublie pas d'où je viens : « Longwy, c'est la vie » ! Mention spéciale à Ophélie et nos plans « foireux ».

**A Crapule,**

Je te remercie d'avoir pris soin d'une « expatriée » lorraine pendant mes 2 années à Strasbourg. Une pensée pour nos soirées mythiques au Nelson, au Wawa, notre périple à Prague et tant d'autres...

**Aux Pharmacies Saltel, Roméro et Brayer,**

Je vous remercie pour vos conseils et la transmission de votre savoir lors de mes stages et remplacements.

Enfin, merci à toutes les personnes que j'aurais oublié par mégarde mais qui se reconnaîtront.

**A mes grand-mères Yvonne CHEZEAU et Julia KRISTOF,**  
J'aurais tant aimé vous avoir à mes côtés en ce jour si particulier,  
Je vous dédie cette thèse.

# Table des matières

---

<b>Liste des figures</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>7</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>9</b>
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Glioblastomes</b> .....	<b>12</b>
1.1. Définition et classification .....	12
1.2. Epidémiologie .....	13
1.3. Clinique .....	14
1.4. Principales altérations génétiques et épigénétiques.....	14
1.4.1. Délétion 1p, codélétion chromosomique 1p/19q .....	14
1.4.2. Mutations des gènes <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> .....	15
1.4.3. Altération de la voie du rétinoblastome P16 INK4a/CDK4/RB.....	16
1.4.4. Voie P53/MDM2/P14 ARF .....	17
1.4.5. Voie PTEN/RAS/PI3K/AKT .....	18
1.4.6. Amplification du récepteur EGFR.....	19
1.4.7. Inactivation du gène O6-méthylguanine ADN méthyltransférase.....	19
1.5. Origine des glioblastomes .....	20
1.6. Diagnostic et traitements .....	21
1.6.1. Diagnostic .....	21
1.6.2. Traitements .....	21
1.6.2.1. Traitement antitumoral.....	21
1.6.2.1.1. <i>Glioblastomes nouvellement détectés</i> .....	21
a) Chirurgie .....	21
b) Radiothérapie.....	22
c) Chimiothérapie.....	24
d) Thérapie ciblée.....	26
e) Dispositif NovoTTF™-100A.....	29

1.6.2.1.2. Récidives .....	30
1.6.2.1.3. Particularité des patients âgés (> 70ans).....	31
1.6.2.2. Traitement symptomatique.....	31
1.7. Pronostic.....	32
1.8. Hétérogénéité tumorale .....	32
<b>2. Cellules souches cancéreuses.....</b>	<b>34</b>
2.1. Généralités.....	34
2.1.1. Introduction et définition .....	34
2.1.1.1. Cellules souches normales .....	34
2.1.1.2. Cellules souches cancéreuses ou cellules initiatrices de tumeurs .....	34
2.1.2. Origine .....	35
2.1.3. Propriétés et isolement.....	36
2.1.4. Cellules souches cancéreuses et microenvironnement tumoral .....	37
2.2. Cellules souches retrouvées au sein du système nerveux central.....	39
2.2.1. Cellules souches neurales normales.....	39
2.2.2. Cellules souches de tumeurs cérébrales .....	39
2.2.2.1. Origine .....	39
2.2.2.2. Propriétés et isolement .....	40
2.2.2.3. Voies moléculaires contrôlant l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches neurales adultes, implication dans le développement des tumeurs cérébrales .....	41
2.2.2.4. Cellules souches de tumeurs cérébrales et microenvironnement tumoral ....	42
2.3. Un concept controversé .....	42
2.4. Résistance des cellules souches cancéreuses aux traitements conventionnels.....	44
2.5. Nouvelles thérapies ciblant les cellules souches cancéreuses .....	45
<b>Chapitre II : Travail expérimental .....</b>	<b>48</b>
<b>1. Travail préliminaire au sein de l'UMR 7200.....</b>	<b>49</b>
1.1. Contexte et thématique du laboratoire .....	49
1.2. Développement et caractérisation d'un modèle d'étude <i>in vitro</i> de glioblastome .....	49
1.3. Chimiothèque et criblage moléculaire.....	52
1.4. Etude des voies de signalisation perturbées par le DDPM.....	53
<b>2. Travail personnel réalisé au sein de l'UMR 7200 .....</b>	<b>57</b>

2.1. Objectifs .....	57
2.2. Matériels et méthodes.....	58
2.2.1. Culture cellulaire.....	58
2.2.2. Extraction et quantification protéiques .....	59
2.2.3. Immunoblot.....	60
2.2.4. Effet du composé S0859, un inhibiteur de cotransporteurs NBC, sur les cellules souches TG1 quiescentes .....	61
2.3. Résultats .....	62
2.3.1. Etude du niveau d'expression et de phosphorylation de la thréonine 60 de WNK1 dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome, après traitement par le DDPM (immunoblot) .....	62
2.3.2. Etude du niveau d'expression et de phosphorylation de partenaires connus de WNK1 après traitement par le DDPM.....	63
2.3.3. Etude de modifications éventuelles de l'activité kinase de WNK1 après traitement par le DDPM.....	65
2.3.4. Etude de l'implication éventuelle de canaux/cotransporteurs substrats de WNK1, dans l'activité cytotoxique du DDPM.....	67
2.4. Discussion .....	69
2.5. Analyse critique.....	73
2.5.1. Outils méthodologiques .....	73
2.5.2. Modèle d'étude .....	74
<b>3. Conclusion et perspectives du travail expérimental .....</b>	<b>76</b>
3.1. Conclusion : Modèle proposé pour l'action du DDPM.....	76
3.2. Perspectives.....	77
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>81</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>82</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>89</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : Répartition des différents types de gliomes en pourcentage.....	13
Figure 2 : Implication des isoformes IDH1 et IDH2 dans les mécanismes de résistance à l'apoptose, aux traitements de radio et/ou chimiothérapies ainsi qu'au stress oxydant.....	15
Figure 3 : Les différents acteurs intervenant dans la régulation de la protéine de la voie du rétinoblastome.....	16
Figure 4 : Rôles transcriptionnels et régulation du gène suppresseur de tumeur <i>P53</i> .....	17
Figure 5 : Implication du récepteur EGFR dans les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT.....	18
Figure 6 : Mécanisme d'action de la méthylguanine méthyltransférase (MGMT).....	20
Figure 7 : Mode d'action du témozolomide.....	24
Figure 8 : Structure schématique d'une nanoparticule PLGA sur laquelle sont greffées la lactoferrine et l'acide folique, encapsulant l'étoposide.....	28
Figure 9 : Modèles stochastique et hiérarchique permettant d'expliquer l'hétérogénéité tumorale.....	33
Figure 10 : Propriétés des cellules souches cancéreuses.....	37
Figure 11 : Altérations caryotypiques observée dans des cellules de glioblastome.....	40
Figure 12 : Nouveaux paradigmes pour le traitement du cancer.....	45
Figure 13 : Modèle cellulaire d'étude.....	50
Figure 14 : Evaluation du pouvoir tumorigène <i>in vivo</i> de cellules souches cancéreuses de glioblastome après greffe dans le cerveau de souris immunodéprimées.....	51
Figure 15 : Le bisacodyl et son métabolite actif, le DDPM, ciblent les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes.....	53
Figure 16 : Etude de la phosphorylation de plusieurs protéines après traitement des cellules souches de glioblastome quiescentes par le bisacodyl, utilisation des <i>Human Phospho-Kinase Arrays</i> de <i>R&amp;D Systems</i> <sup>®</sup> .....	54
Figure 17 : Vue d'ensemble des principaux processus cellulaires régulés par la voie de signalisation WNK et impliqués dans la biologie des cellules cancéreuses.....	55
Figure 18 : Représentation schématique des différents domaines de WNK1.....	56
Figure 19 : Niveau d'expression et de phosphorylation de la kinase WNK1 dans les cellules souches TG1 de glioblastome traitées avec le DDPM ou le dérivé inactif LPI 2450.....	63

Figure 20 : Niveau d'expression et de phosphorylation de la kinase AKT dans les cellules souches TG1 de glioblastome traitées avec le DDPM ou le dérivé inactif LPI 2450. ....	64
Figure 21 : Niveau d'expression et de phosphorylation des kinases SPAK et OSR1 dans les cellules souches TG1 de glioblastome traitées avec le DDPM ou le dérivé inactif LPI 2450. 66	66
Figure 22 : Effet du prétraitement des cellules souches de glioblastome quiescentes avec le composé S0859, un inhibiteur de cotransporteurs NBC dont NBCe1, sur l'activité cytotoxique du DDPM. ....	68
Figure 23 : Modèle proposé pour l'action du DDPM. ....	76
Figure 24 : Validation du rôle de WNK1 et de ses activités impliquées dans l'effet cytotoxique du DDPM. ....	78
Figure 25 : Etude du rôle de WNK1 dans la physiopathologie des cellules souches cancéreuses de glioblastome. ....	79

# Liste des tableaux

---

Tableau I : Classification internationale des astrocytomes selon l'OMS en 2007. ....	12
Tableau II : Taux de survie relatif à 1, 2, 5 et 10 ans en fonction de l'âge des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives.....	32

# Liste des abréviations

---

1p	Bras court du chromosome 1
19q	Bras long du chromosome 19
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
5-ALA	Acide 5-aminolévulinique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ATRA	Acide tout-trans-rétinoïque
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BMI-1	<i>B-cell specific Moloney murine leukaemia virus integration site 1</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CTLA-4	Antigène-4 des lymphocytes T cytotoxiques
DDPM	Dihydroxydiphenyl-pyridyl Methane ou Désacetylbisacodyl
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EdU	5-Ethynyl-2'-Déoxyuridine
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUBP1	<i>Far Upstream Element [FUSE] Binding Protein 1</i>
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
Gy	Gray
HAS	Haute Autorité de Santé
HDAC	Histones déacétylases
HER	<i>Human Epithelial Receptor</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
IDH	Isocitrate Déshydrogénase
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor I</i>
INCa	Institut National du Cancer
iPS	Cellules Souches Pluripotentes induites
IRCU	<i>International Commission on Radiation Units and Measurements</i>
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal Kinase</i>
KCC	Cotransporteur K-Cl
LAM	Leucémie Aigüe Myeloïde
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>

MCM2	<i>Minichromosome maintenance 2</i>
MDM2	<i>Mouse Double minute 2</i>
MGMT	O6-Méthylguanine ADN méthyltransférase
MTIC	Monométhyl Triazéno-Imidazole Carboxamide
NBC	Cotransporteur sodium bicarbonate
NCC	Cotransporteur Na-Cl
NCIC	<i>National Cancer Institute of Canada</i>
NF1	<i>Neurofibromine 1</i>
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NKCC	Cotransporteur Na-K-Cl
NOD/SCID	<i>Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
OLIG2	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OSR1	<i>Oxidative Stress Response kinase 1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death-1</i>
PD-L1(2)	<i>Programmed death-ligand 1(2)</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-Dependent Kinase 1</i>
PLGA	Acide poly(lactique-co-glycolique)
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PKB	Protéine Kinase B
PMSF	Fluorure de Phénylméthylsulfonyle
Pp	Protoporphyrine
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog on chromosome 10</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RB	Rétinoblastome
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor 1</i>
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SGK1	<i>Serum-and Glucocorticoid-induced Kinase 1</i>
Shc	<i>Src homology 2-containing protein</i>
SPAK	<i>STE20 and SPS1-related Proline Alanine rich Kinase</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>
WNK	<i>With No lysine (K) Kinase</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

# Introduction

---

Les tumeurs cérébrales sont des tumeurs pouvant se développer dans n'importe quelle région du cerveau (tronc cérébral, hémisphères, cervelet, hypophyse...). Elles se différencient en fonction de leur localisation ; de leur grade (témoignant de l'agressivité de la tumeur) ; et enfin de leur type défini par les cellules initiatrices (cellules gliales, méninges...). Les hommes sont plus fréquemment atteints que les femmes. Les tumeurs primitives touchent 10 à 15 personnes pour 100 000 habitants par an, et représentent 2 à 3% de la totalité des cancers humains. Elles se distinguent des métastases cérébrales, les plus fréquentes, provenant d'un cancer extra-cérébral [Institut National Du Cancer (INCa), 2010].

Actuellement, la classification majeure des tumeurs cérébrales repose sur les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2007. Elle distingue les tumeurs d'origine neuroépithéliales comprenant essentiellement les gliomes, les tumeurs des nerfs crâniens et paraspinaux, les tumeurs méningées, les tumeurs germinales et de la région sellaire, les lymphomes ainsi que les tumeurs métastatiques [Louis, Ohgaki, Wiestler *et al.*, 2007].

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales impliquant les cellules gliales. Ces cellules forment l'environnement des neurones (astrocytes, oligodendrocytes, épendymocytes et microglie).

Il existe actuellement plusieurs classifications pour les gliomes.

La classification anatomo-pathologique de référence est fondée sur les critères de l'OMS de 2007. Elle distingue les gliomes en fonction de leur phénotype cellulaire (astrocytaire, oligodendrocytaire ou mixte) ainsi que de différents critères (densité cellulaire, atypies cytonucléaires, mitose, prolifération endothéliocapillaire, nécrose), définissant le grade de malignité (de I, bénin à IV, malin). Les glioblastomes sont des astrocytomes de grade IV. Une des limites de la classification de l'OMS est son manque de reproductibilité.

Ainsi en France, la classification de l'Hôpital Sainte-Anne est fréquemment utilisée. Elle repose sur un examen anatomo-pathologique et sur l'analyse de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettant de distinguer les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A, les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B et enfin les glioblastomes. Elle permet d'établir le diagnostic simplement.

Une autre classification des gliomes, basée sur des critères moléculaires se développe actuellement, notamment à la suite de l'initiative du *National Institutes of Health* (NIH). Elle permet de définir des sous-groupes en fonction des altérations génétiques présentes au sein de ces tumeurs. L'objectif est de mettre au point de nouvelles thérapies plus spécifiques à chaque sous-groupe [Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010].

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes de l'adulte (40%). Cependant leur incidence reste faible avec 5 à 8 cas pour 100 000 habitants par an en France et aux Etats-Unis. Ils représentent la 4<sup>ème</sup> cause de mortalité chez l'adulte et la 2<sup>ème</sup>

cause de mortalité chez l'enfant [Haberer, Assouline and Mazon, 2010]. L'âge moyen de diagnostic dépend du type de gliomes. Les gliomes de bas grade sont plus fréquemment retrouvés chez de jeunes adultes, tandis que les gliomes de haut grade se développent préférentiellement à l'âge de 50 ans.

Les symptômes sont en corrélation avec la compression cérébrale et l'hypertension intracrânienne. Ils dépendent de la localisation ainsi que du grade de la tumeur. Les plus fréquents sont des céphalées s'accompagnant parfois de nausées, des crises d'épilepsie partielles ou généralisées, un ralentissement physique et psychique, une faiblesse musculaire, des troubles de la parole ainsi qu'un déficit moteur ou visuel [Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC)].

Le diagnostic des gliomes repose sur l'examen clinique et l'imagerie (scanner ou IRM). Une biopsie permet de confirmer leur présence.

Le traitement est complexe. Il dépend du type de tumeur, de sa localisation, de son apparente gravité ainsi que de l'âge et de l'état général du patient. On distingue le traitement antitumoral, comprenant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie conventionnelle ou la thérapie ciblée ; du traitement symptomatique visant à soulager le patient à court terme.

Le pronostic des gliomes dépend de l'histologie de la tumeur, de la qualité de l'exérèse, ainsi que de l'âge et de l'état général du patient.

Selon la classification de l'OMS, les tumeurs de grade I sont curables par chirurgie. Les patients atteints de tumeurs de grade II survivent généralement plus de 5 ans et ceux avec une tumeur de grade III environ 2 à 3 ans. Le pronostic des patients possédant un gliome de grade IV dépend de l'efficacité des traitements disponibles mais est souvent sombre. En ce qui concerne les glioblastomes, la forme la plus sévère de gliomes, la médiane de survie des patients est de 3 mois seulement sans traitement et d'environ 14 mois avec traitement [Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010].

Le premier chapitre de ce manuscrit s'intéressera à l'état des connaissances actuelles concernant les glioblastomes, un sous-type particulier de gliomes. Au sein des glioblastomes, sont retrouvées une majorité de cellules de la masse tumorale possédant une capacité proliférative limitée, mais également une petite proportion de cellules dotées de propriétés particulières : les cellules souches cancéreuses. Ces dernières sont en partie responsables du mauvais pronostic de ce type de tumeur. Ainsi la seconde partie de ce chapitre sera consacrée à la description des caractéristiques de ces cellules particulières.

Dans un deuxième temps, une synthèse du travail expérimental réalisé lors de mon stage de master 2, au sein du laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200, Faculté de Pharmacie de Strasbourg), sera présentée. Ce chapitre portera sur l'étude du mode d'action d'un composé actif sur les cellules souches cancéreuses quiescentes de glioblastome.

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

# 1. Glioblastomes

---

## 1.1. Définition et classification

Selon la classification de l'OMS de 2007, les glioblastomes sont des astrocytomes de grade IV, la forme la plus sévère de gliomes (Tableau I) [Carrondo Cottin, 2008].

**Tableau I : Classification internationale des astrocytomes selon l'OMS en 2007.**

Tableau adapté de Carrondo Cottin, (2008).

<i>Tumeur</i>	<i>Grade histologique</i>	<i>Critères histologiques</i>	<i>Taux de survie relatif à 10 ans (%)</i>
<i>Astrocytome pilocyttaire</i>	I	Prolifération cellulaire anarchique	89,3
<i>Astrocytome diffus</i>	II	Atypies nucléaires discrètes	38,7
<i>Astrocytome anaplasique</i>	III	Atypies importantes avec mitoses	22,2
<i>Glioblastome</i>	IV	Atypies importantes avec mitoses, nécrose et/ou prolifération endothéliale	2,3

Ils se divisent en deux sous-types : primaire et secondaire.

Le glioblastome primaire ou *de novo* représente plus de 90% des glioblastomes. Il survient surtout à partir de 60 ans et possède une histoire clinique courte. Les anomalies génétiques rencontrées sont une amplification de l'*Epidermal growth factor receptor (EGFR)* (40% des cas), une mutation du gène *P53* (28% des cas) et une mutation du gène *Phosphatase and TENsin homolog on chromosome 10 (PTEN)* (25% des cas).

Le glioblastome secondaire moins fréquent, se développe à partir d'un gliome de stade inférieur, chez des patients plus jeunes. Son histoire clinique est donc plus longue. Il se caractérise surtout par des mutations du gène *P53* (65% des cas) [Figarella-Branger, Colin, Tchoghandjian *et al.*, 2010].

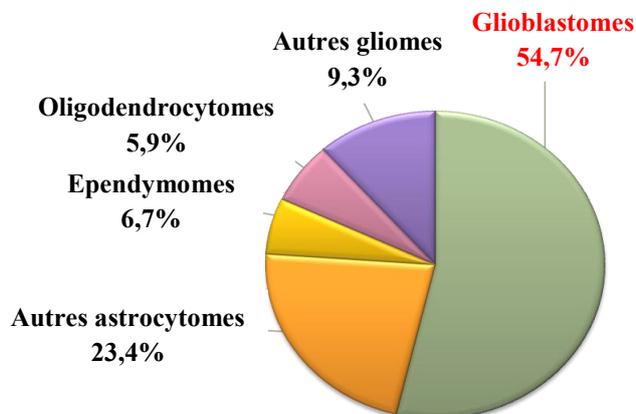
Le NIH a établi plus récemment une classification moléculaire répertoriant les glioblastomes primaires en 4 sous-groupes :

- le sous-type 1 ou classique : le profil est typique de cellules hautement prolifératives. Il se caractérise par une amplification du gène *EGFR*, une perte des gènes suppresseurs de tumeur *PTEN* et *CDKN2A*. Il répond aux radiothérapies et aux chimiothérapies classiques.

- le sous-type 2 ou méenchymateux : les gènes suppresseurs de tumeur *Neurofibromine 1 (NF1)* (37%), *P53* (32%) et *PTEN* (32%) sont fréquemment inactivés dans ce groupe. Il répond aux radiothérapies et chimiothérapies agressives.
- le sous-type 3 ou proneural : il se caractérise par une surexpression de gènes intervenant dans le développement oligodendrocytique (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR- $\alpha$ )*, *Oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2)*), et proneural (*SOX*, *DCX*) ; mais également par des mutations du gène *Isocitrate Déshydrogénase 1 (IDH1)*. Les patients atteints sont plus jeunes. Le taux de réponse aux thérapies classiques est plus faible mais la survie est légèrement supérieure aux trois autres sous-groupes.
- le sous-type 4 ou neural : ce groupe est moins bien défini. Excepté la surexpression du gène *EGFR*, il possède la signature d'expression génique de cellules constituant un cerveau normal, se traduisant notamment par l'expression des marqueurs neuronaux *NEFL*, *GABRA1*, *SYTI*, *SLC12A5*. Le degré d'infiltration des tumeurs de ce groupe est faible [Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010].

## 1.2. Epidémiologie

Les glioblastomes représentent la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive (20%) (Figure 1) [Ostrom, Gittleman, Liao *et al.*, 2014]. Il s'agit néanmoins de tumeurs rares, concernant 2 à 3 cas pour 100 000 habitants par an en France.



**Figure 1 : Répartition des différents types de gliomes en pourcentage.**

Les glioblastomes représentent plus de la moitié des cas de gliomes. Figure adaptée du *Central Brain Tumor Registry of the United States*, (2007-2011) [Ostrom, Gittleman, Liao *et al.*, 2014].

Les glioblastomes peuvent se développer à n'importe quelle période de la vie mais leur fréquence augmente avec l'âge. On observe ainsi un pic entre 55 et 74 ans (âge médian : 64 ans) [Ostrom, Gittleman, Liao *et al.*, 2014]. Cependant il existe une disparité en fonction des sexes. En effet, ces tumeurs sont deux fois plus fréquentes chez les hommes, indépendamment de l'âge. Une équipe de chercheurs de l'Université de Washington, a

récemment publié une étude qui expliquerait cette différence par une moindre activité de la protéine du rétinoblastome (RB), dans le cerveau des hommes. Leurs observations ont été réalisées sur des glioblastomes mésoenchymateux [Sun, Warrington, Luo *et al.*, 2014].

### **1.3. Clinique**

Les glioblastomes se caractérisent par de petites zones de tissu nécrosé et hypoxiques (contrairement aux astrocytomes de grade III) entourées de cellules hautement anaplasiques. Ils peuvent se former dans la matière grise ou blanche (permettant de les différencier des oligodendrogliomes) et infiltrer rapidement le cerveau pouvant atteindre, dans certains cas, la paroi meningée ou ventriculaire provoquant une hyperprotéinorachie. Malgré leur rapide dissémination dans le cerveau résultant d'une importante angiogenèse, les glioblastomes sont rarement responsables de métastases extra-cérébrales.

Les symptômes dépendent de l'emplacement de la tumeur. Les plus fréquents sont une altération de la personnalité, une perte progressive de la mémoire ou des troubles neurologiques lorsque les lobes frontal et temporal sont touchés. Des signes communs à l'ensemble des gliomes peuvent également se manifester comme la présence de céphalées s'accompagnant parfois de nausées et/ou vomissements, de crises d'épilepsie, pouvant évoluer vers une hémiparésie. Dans certains cas, la tumeur peut s'avérer asymptomatique.

### **1.4. Principales altérations génétiques et épigénétiques**

Les principales altérations retrouvées dans les glioblastomes sont des pertes chromosomiques, des surexpressions de facteurs de croissance, des gains de fonction de récepteurs à activité tyrosine kinase ou encore des pertes de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs [Figarella-Branger, Colin, Tchoghandjian *et al.*, 2010].

#### **1.4.1. Délétion 1p, codélétion chromosomique 1p/19q**

La délétion du bras court du chromosome 1, 1p36 ; s'observe dans différents types de tumeurs cérébrales, notamment les astrocytomes et les glioblastomes. Dans cette région se trouve le gène suppresseur *Mig-6* dont la perte fréquente, dans les glioblastomes, entraînerait une activation aberrante de la voie de signalisation EGFR. En effet, ce gène serait responsable de la dégradation du couple EGF/EGFR par les endosomes. Les patients porteurs de cette délétion ont une durée de vie plus courte que ceux porteurs de la codélétion 1p/19q.

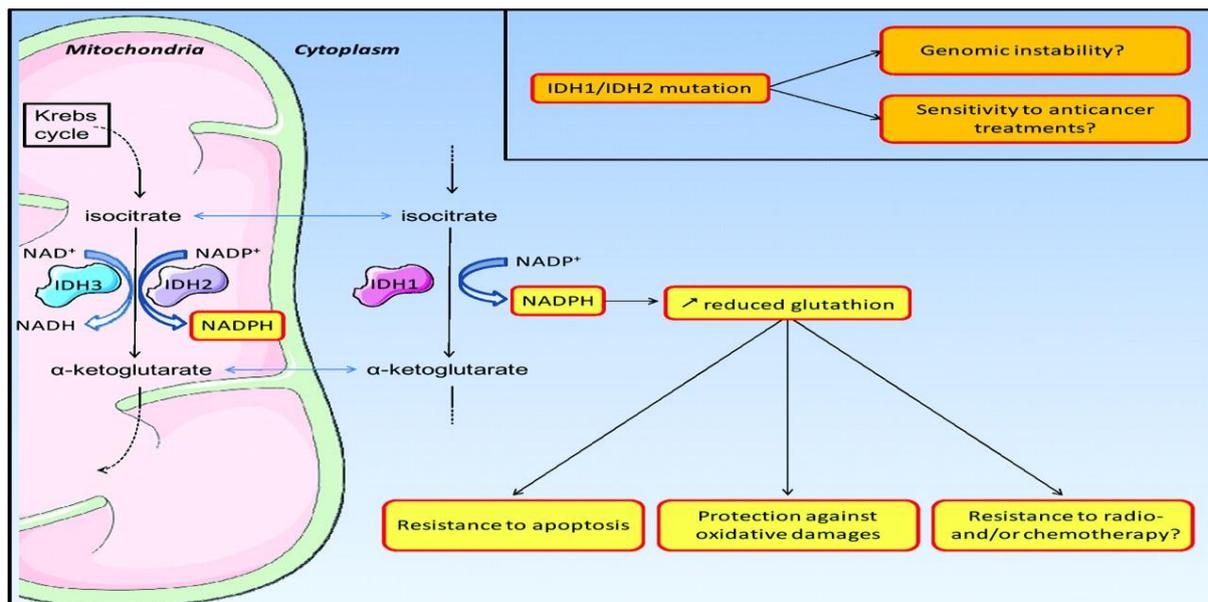
Les délétions totales et combinées des bras 1p et 19q sont retrouvées dans les oligodendrogliomes présentant une meilleure réponse à la chimiothérapie, et dont les patients porteurs possèdent une survie sans rechute augmentée. Cependant ce type

d'oligodendrogliomes évolue secondairement en glioblastomes. Cette mutation provient d'une translocation t(1;19) (q10;p10) déséquilibrée de 19q sur 1p provoquant une perte de matériel génétique [Larsen, 2010]. Les gènes *CIC* (homologue du gène *capicua* de la drosophile) et *FUBP1* (*Far Upstream Element [FUSE] Binding Protein 1*) situés sur les chromosomes 19q et 1p respectivement, ont été associés à cette codélétion. *CIC* est impliqué dans la régulation de la voie RAS/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), et *FUBP1* dans la régulation de l'expression du proto-oncogène c-Myc [Sahm, Koelsche, Meyer *et al.*, 2012; Chan, Pang, Chung *et al.*, 2014]. La codélétion 1p/19q et la mutation du gène *P53*, ou la mutation EGFR, s'excluraient mutuellement [Huse and Holland, 2010].

#### 1.4.2. Mutations des gènes *IDH1* et *IDH2*

L'enzyme IDH1 est retrouvée dans le cytosol et les peroxysomes. Elle est codée par le gène *IDH1* localisé sur le chromosome 2. Un second isoforme, présent dans les mitochondries, est codé par le gène *IDH2*, situé sur le bras long du chromosome 15. Ces deux isoformes interviennent dans le cycle de Krebs en catalysant la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate, permettant la réduction du  $\text{NADP}^+$  en NADPH. Ce cofacteur, essentiel à la glutathion réductase, lui permet de régénérer le glutathion réduit (GSH), molécule protégeant les cellules contre les dommages oxydatifs provoqués notamment par les traitements de radio- et/ou chimiothérapies. Le glutathion réduit entraîne également une résistance à l'apoptose (Figure 2).

La mutation du gène *IDH1* se caractérise par la substitution de l'arginine 132 par une histidine, appelée R132H. Elle est localisée dans le site actif de l'enzyme, la rendant inactive. La mutation du gène *IDH2* moins fréquente, se situe sur l'arginine 172 [Labussiere, Sanson, Idbaih *et al.*, 2010].



**Figure 2 : Implication des isoformes IDH1 et IDH2 dans les mécanismes de résistance à l'apoptose, aux traitements de radio et/ou chimiothérapies ainsi qu'au stress oxydant.**

D'après Labussiere, Sanson, Idbaih *et al.*, (2010).

Quatre-vingt-dix pour cent des glioblastomes de type 2 présentent une mutation du gène *IDH1* alors que cette mutation reste exceptionnelle dans le type 1. Une hypothèse est que les glioblastomes secondaires proviendraient de l'évolution anaplasique de gliomes astrocytaires, oligodendrocytaires ou mixtes, pour lesquels les gènes *IDH1* et *IDH2* sont fréquemment mutés [Watanabe, Nobusawa, Kleihues *et al.*, 2009; Figarella-Branger, Colin, Tchoghandjian *et al.*, 2010; Larsen, 2010].

Ces anomalies seraient capables d'augmenter la vulnérabilité de la cellule, notamment au stress oxydant, ainsi qu'à la radio- et/ou chimiothérapies, par des mécanismes actuellement inconnus. Elles présentent un intérêt pronostique favorable [Zhu, Zuo, Xu *et al.*, 2011].

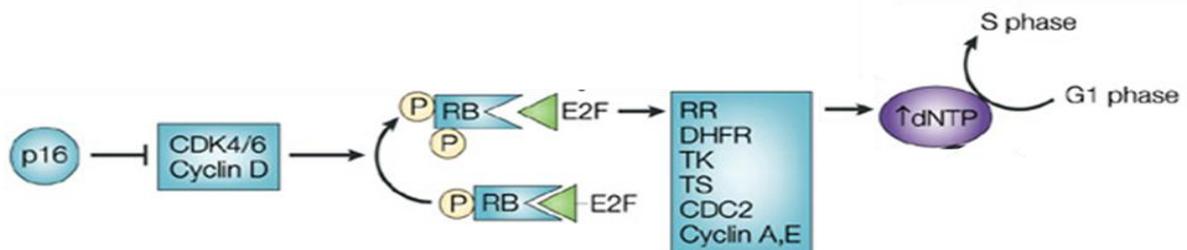
Dans les glioblastomes primaires et secondaires, les mutations *IDH1* et *EGFR* sont mutuellement exclusives [Huse and Holland, 2010].

### 1.4.3. Altération de la voie du rétinoblastome P16 INK4a/CDK4/RB

Le gène suppresseur de tumeur *RB* intervient dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la transition de la phase G1 vers la phase S. Des anomalies dans cette voie sont observées dans 78% des glioblastomes et impliquent la protéine P16 INK4a, le complexe CDK4-6/cycline D ou la protéine RB [Cancer Genome Atlas Research Network, 2008].

Le gène suppresseur de tumeurs *CDKN2A* localisée sur le chromosome 9 code la protéine P16 INK4a. Cette protéine est capable d'inhiber le complexe CDK4-6/cycline D, le rendant incapable de phosphoryler la protéine RB. Le facteur de transcription E2F reste alors associé à cette protéine empêchant la transcription d'autres gènes impliqués dans la transition G1/S. Le cycle cellulaire est ainsi bloqué en phase G1 (Figure 3) [Chiocca, 2002].

Dans les glioblastomes, les altérations observées sont une délétion homozygote ou des mutations de *CDKN2A /P16 INK4a* dans 52% des cas, de fréquentes méthylations du promoteur de *CDKN2A/P16 INK4a*, ou une surexpression de *CDK4* dans 18% des cas. Des délétions homozygotes ou mutations de *RB* se produisent dans 11% des cas, et une inactivation de cette protéine à la suite de la méthylation de son promoteur est présente dans 11% des glioblastomes primaires et 43% des glioblastomes secondaires [Figarella-Branger, Colin, Tchoghandjian *et al.*, 2010].



**Figure 3 : Les différents acteurs intervenant dans la régulation de la protéine de la voie du rétinoblastome.** La protéine P16 INK4a inhibe le complexe CDK4/6-Cycline D. Ce complexe est normalement responsable de la phosphorylation de la protéine RB entraînant la libération du facteur E2F. Ce dernier permet la transcription de gènes cibles contrôlant l'entrée en phase S, notamment le gène de la ribonucléotide réductase (*RR*), de la dihydrofolate réductase (*DHFR*), de la thymidilate synthase (*TS*), de CDC2, des cycline-A et -E. En bloquant la transition G1/S du cycle cellulaire, la protéine P16 INK4a exerce un rôle de suppresseur de tumeur. Figure adaptée de Chiocca, (2002). (dNTP : désoxyribonucléotides tri-phosphates).

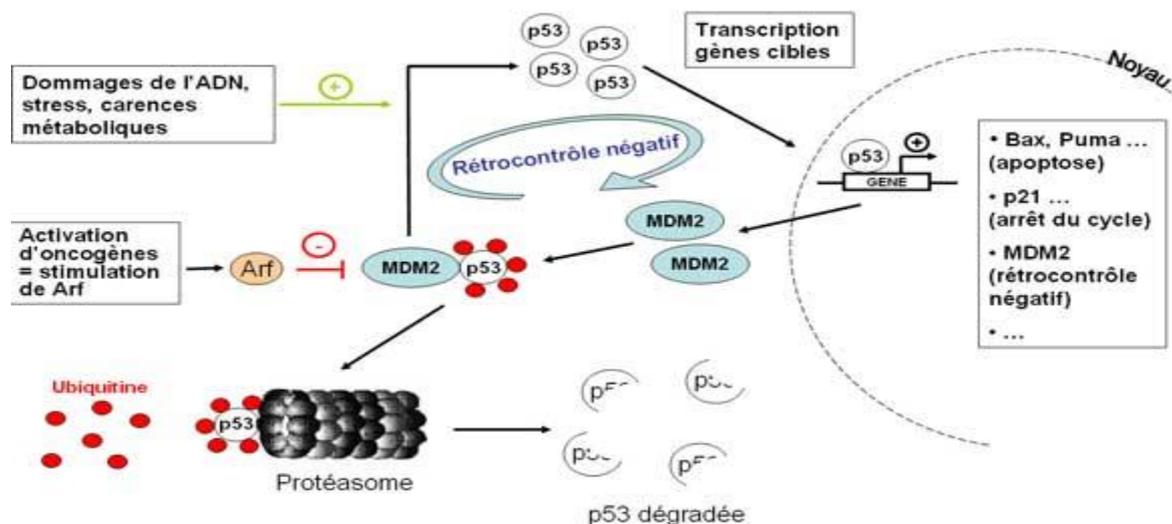
#### 1.4.4. Voie P53/MDM2/P14 ARF

Le gène *P53* localisé sur le chromosome 17, est activé à la suite d'un stress, de carences métaboliques ou de dommages à l'ADN. Il code une protéine suppresseur de tumeur essentielle au contrôle du cycle cellulaire. En effet, elle induit la transcription du gène *P21* inhibant ainsi la transition G1/S. Ce blocage à la phase G1 doit permettre à la cellule de réparer de possibles dommages. Cependant lorsque ces dommages sont trop importants et que les mécanismes de réparation de l'ADN sont dépassés (notamment dans le cas des cellules cancéreuses), P53 provoque l'apoptose des cellules concernées.

D'autre part, la protéine P53 induit la transcription du gène *Mouse Double minute 2* (*MDM2*) qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie P53. En effet, quand la protéine P53 dépasse un certain niveau cellulaire, MDM2 provoque son ubiquitination, responsable de sa dégradation par le protéasome. Cette dégradation peut être inhibée à la suite de l'activation, par des oncogènes, de la protéine P14 ARF, un produit du locus *CDKN2A*.

Des altérations de la voie P53 sont observées dans 87% des glioblastomes, à la suite de différents mécanismes. Les anomalies principales sont des délétions homozygotes ou mutations du gène *P53* (35%) ou *CDKN2A* (49%). Les mutations de *P53* sont présentes dans 65% des glioblastomes secondaires (codons 248 et 273) alors qu'elles ne sont que rarement observées dans les glioblastomes primaires (28%). Une fréquente méthylation du promoteur du gène *CDKN2A* empêche l'expression de la protéine P14 ARF. Enfin dans 14% des cas, une amplification de *MDM2* est présente (Figure 4) [Figarella-Branger, Colin, Tchoghandjian *et al.*, 2010].

La mutation de *P53* et l'amplification d'*EGFR* sont mutuellement exclusives [Watanabe, Tachibana, Sata *et al.*, 1996].



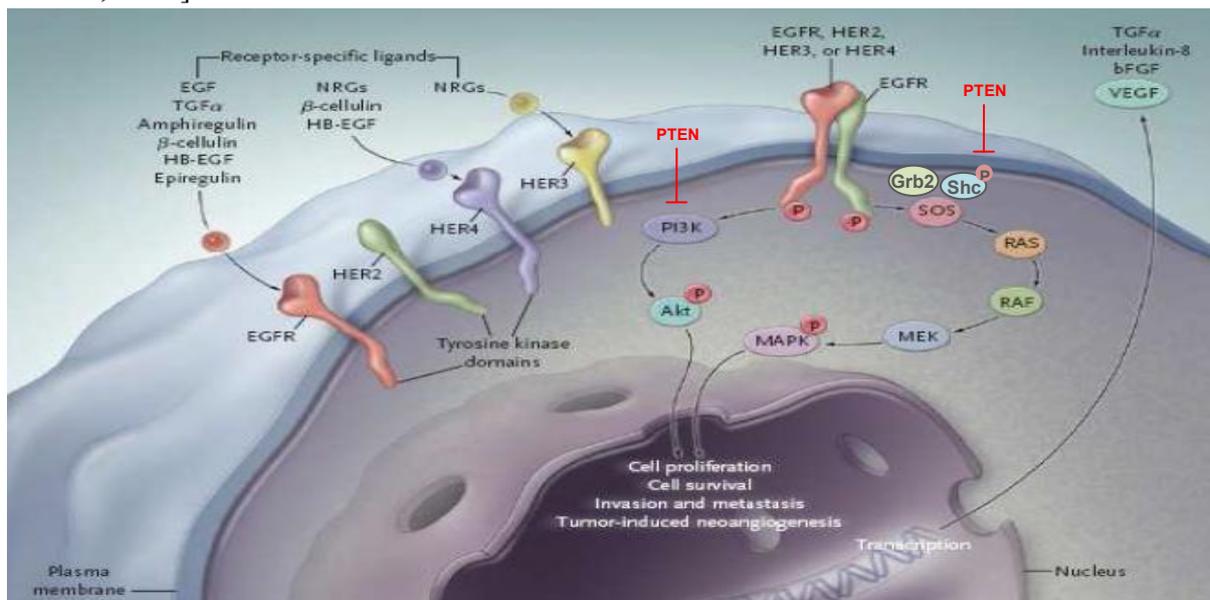
**Figure 4 : Rôles transcriptionnels et régulation du gène suppresseur de tumeur *P53*.**

A la suite de dommages à l'ADN, en cas de stress ou de carences métaboliques, le gène suppresseur de tumeur *P53* est activé, entraînant la transcription de gènes cibles impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ou l'apoptose (*P21*, *Bax*). D'autre part, P53 activée permet la transcription du gène *MDM2* qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie P53, en provoquant la dégradation de cette protéine lorsque son niveau cellulaire est trop important. Enfin, la protéine P14 ARF activée par des oncogènes, exerce un deuxième niveau de régulation en inhibant MDM2 et donc la dégradation de P53 par le protéasome.

#### 1.4.5. Voie PTEN/RAS/PI3K/AKT

La fixation du ligand *Epidermal Growth Factor* (EGF) sur son récepteur EGFR permet de recruter la *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K) au niveau de la membrane cellulaire. Cette dernière permet la phosphorylation de PIP2 en PIP3 servant alors de cofacteur à *Phosphoinositide-Dependent Kinase 1* (PDK1). PDK1 phosphoryle ainsi la protéine kinase AKT au niveau de sa thréonine en position 308. En parallèle, l'enzyme *mammalian target of rapamycin* (mTOR) phosphoryle la sérine 473 dans la partie C-terminale d'AKT. La phosphorylation de ces 2 résidus est nécessaire à l'activation de cette kinase, et lui permet ainsi de réguler différentes cibles. La cascade de signalisation conduit à la prolifération et à la survie cellulaires en inhibant l'apoptose, et en favorisant la transition G1/S dans le cycle cellulaire [Alessi, Andjelkovic, Caudwell *et al.*, 1996; Sarbassov, Guertin, Ali *et al.*, 2005; Jacinto, Facchinetti, Liu *et al.*, 2006].

Le gène suppresseur de tumeur *PTEN* situé sur le chromosome 10, code une protéine capable, grâce à son activité lipide phosphatase, d'inhiber la voie de signalisation PI3K/AKT. Elle diminue ainsi la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose. D'autre part, PTEN grâce à son activité protéine phosphatase, peut bloquer la voie RAS/MAPK, également impliquée dans la prolifération cellulaire (Figure 5) [Tamura, Gu, Tran *et al.*, 1999; Ciardiello and Tortora, 2008].



**Figure 5 : Implication du récepteur EGFR dans les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT.**

Le récepteur EGFR est activé à la suite de la fixation d'un ligand spécifique (EGF notamment) sur son domaine extracellulaire, provoquant sa dimérisation. Les tyrosines du domaine intracellulaire du récepteur sont ainsi phosphorylées, permettant de recruter la kinase PI3K au niveau de la membrane cytoplasmique. Il en résulte la phosphorylation d'AKT au niveau de sa thréonine 308, essentielle à l'activation de la voie PI3K/AKT. La voie RAS/MAPK est également activée. Ces deux voies jouent un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaires, de la migration, de l'invasion avec la formation de métastases et de l'angiogenèse. PTEN est le principal inhibiteur de la voie PI3K/AKT. Il est également capable de bloquer la voie RAS/MAPK, en inhibant la phosphorylation de la protéine *Src homology 2-containing protein* (Shc). Il en résulte une diminution de la prolifération cellulaire. Figure adaptée de Ciardiello and Tortora, (2008). (*bFGF*: *basic fibroblast growth factor*, *HB-EGF*: *heparin-binding EGF*, *MAPK*: *mitogen-activated protein kinase*, *PI3K*: *phosphatidyl inositol kinase*, *TGF $\alpha$* : *transforming growth factor  $\alpha$* , *VEGF*: *vascular endothelial growth factor*).

La voie PI3K/AKT est altérée dans 88% des glioblastomes par divers mécanismes. Une mutation ou des délétions homozygotes de *PTEN* ou du gène *PI3KRI* (gène codant pour la sous-unité régulatrice de la PI3K) sont observées dans 36% et 15% des glioblastomes respectivement. De plus, une mutation activatrice du gène *PI3KCA*, codant pour la sous-unité catalytique de PI3K, ou une amplification de la protéine AKT se produisent dans 2% des glioblastomes [Figarella-Branger, Colin, Tchoghandjian *et al.*, 2010].

#### 1.4.6. Amplification du récepteur EGFR

Le proto-oncogène *c-erbB1* code le récepteur EGFR, localisé sur le chromosome 7. EGFR est le premier membre de la famille des récepteurs transmembranaires *Human Epithelial Receptor* (HER), d'où son autre nom HER1. Cette famille comprend également HER2, HER3 et HER4.

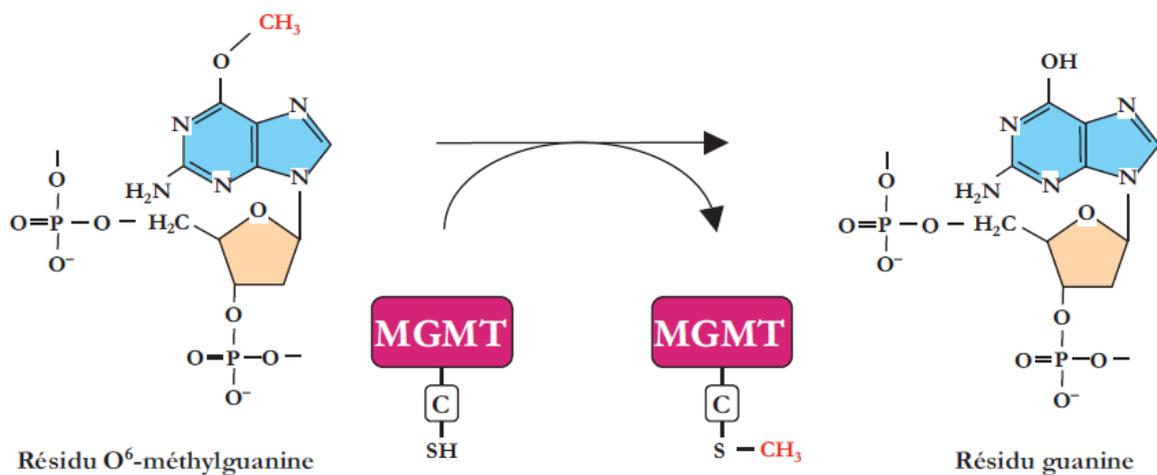
HER1 est constitué d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire. Il est activé à la suite de la fixation d'un de ses ligands (EGF, TGF $\alpha$  (*Transforming Growth Factor  $\alpha$* )...) au niveau de son domaine extracellulaire, provoquant sa dimérisation. Il peut former un homodimère en se liant avec un autre EGFR, ou un hétérodimère en se liant avec HER2, HER3 ou HER4. Cette dimérisation permet la phosphorylation ATP-dépendante de résidus tyrosines du domaine intracellulaire du récepteur, induisant son activité kinase. Deux voies de signalisation intracellulaire sont alors activées : la voie PI3K/AKT et la voie RAS/MAPK. Ces voies sont impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires en inhibant l'apoptose, dans l'invasion, la migration tumorale avec la formation de métastases ainsi que la néo-angiogenèse (Figure 5) [Ciardiello and Tortora, 2008].

L'amplification du gène *EGFR* est l'anomalie la plus fréquemment retrouvée dans les glioblastomes primaires (40%) alors qu'elle est présente dans seulement 8% des glioblastomes secondaires [Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010]. Dans les glioblastomes, l'amplification d'*EGFR* est souvent liée à des délétions sur le chromosome 10 sur lequel se trouve le gène *PTEN* notamment. La surexpression d'*EGFR* est un facteur de mauvais pronostic et s'observe dans les tumeurs résistantes au témozolomide (Temodal<sup>®</sup>), le médicament de référence utilisé dans le traitement des glioblastomes [Addeo, Zappavigna, Parlato *et al.*, 2014; Danhier, Messaoudi, Lemaire *et al.*, 2015].

#### 1.4.7. Inactivation du gène O6-méthylguanine ADN méthyltransférase

Le gène *O6-méthylguanine ADN méthyltransférase* (*MGMT*) localisé sur le chromosome 10, code une protéine intervenant dans la réparation des dommages à l'ADN, en supprimant les groupements alkyls ajoutés en position O6 des guanines (Figure 6) [Pourquier and Robert, 2011]. Ainsi elle protège les cellules normales des facteurs cancérigènes de l'environnement, et les cellules cancéreuses des agents alkylants comme le témozolomide. Dans environ 50% de ces tumeurs, une méthylation des îlots CpG du promoteur du gène

*MGMT* est observée, inhibant son expression. Il en résulte une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à l'action du témozolomide. Elle est de ce fait, un marqueur prédictif de la réponse de la tumeur aux agents alkylants. De plus, plusieurs études ont montré une corrélation entre la méthylation du promoteur et une meilleure survie des patients traités par radiothérapie et chimiothérapie. Elle posséderait ainsi un intérêt pronostique favorable. D'autre part, la méthylation de *MGMT* et la codélétion 1p/19q qui prolonge la durée de vie des patients porteurs, sont fortement corrélées [Figarella-Branger, Colin, Tchoghandjian *et al.*, 2010; Larsen, 2010].



**Figure 6 : Mécanisme d'action de la méthylguanine méthyltransférase (MGMT).**

Cette enzyme de réparation de l'ADN, supprime les groupements alkyl ( $\text{CH}_3$ ) en position  $\text{O}^6$  des guanines en les transférant sur le groupement thiol de la cystéine de son site actif. Figure adaptée de Pourquier and Robert, (2011).

### 1.5. Origine des glioblastomes

Actuellement, l'origine des glioblastomes demeure inconnue. Néanmoins, deux hypothèses sont proposées : les glioblastomes seraient formés à partir de cellules souches de tumeurs cérébrales provenant soit de la transformation de cellules souches neurales ou progéniteurs localisés dans le cerveau, soit de la dédifférenciation de cellules matures (oligodendrocytes, astrocytes) ou progéniteurs [Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010]. Ces hypothèses seront développées dans la partie suivante traitant en détail des cellules souches.

## 1.6. Diagnostic et traitements

### 1.6.1. Diagnostic

Lorsqu'un médecin suspecte un glioblastome à la suite d'un scanner ou une IRM, seule une biopsie permet de confirmer le diagnostic.

### 1.6.2. Traitements

On distingue le traitement antitumoral du traitement symptomatique.

#### 1.6.2.1. Traitement antitumoral

##### *1.6.2.1.1. Glioblastomes nouvellement détectés*

Actuellement, le traitement standard de première intention des glioblastomes, chez les patients de moins de 70 ans en bon état général, repose principalement sur l'exérèse chirurgicale la plus complète possible suivie du **protocole de Stupp** [Stupp, Mason, van den Bent *et al.*, 2005]. Ce protocole consiste en une radiothérapie conformationnelle en 3D (60 Gy) combinée à une chimiothérapie quotidienne par le témozolomide. Quatre semaines après la fin de la radiochimiothérapie, le témozolomide est administré en traitement d'entretien, en monothérapie pendant 6 mois.

Les tumeurs jugées inopérables sont traitées avec un protocole associant radiothérapie et chimiothérapie.

#### a) Chirurgie

La chirurgie totale ou maximale doit toujours être réalisée en priorité sauf en cas de contre-indication (anesthésie, âge du patient, état général, tumeur inopérable due à sa localisation, pathologie...). En effet, elle reste, actuellement, le traitement le plus efficace. Cependant, à cause de la nature infiltrante et des bords diffus des glioblastomes, cette technique utilisée seule, s'avère souvent insuffisante.

Ces 20 dernières années, de nouvelles techniques ont été développées afin d'essayer d'améliorer l'exérèse, tout en préservant au maximum le tissu sain avoisinant. Actuellement, la technique de référence est la neuronavigation ou chirurgie assistée par ordinateur permettant de visualiser en 3D le cerveau. Cette technique consiste pendant l'opération, à fusionner les images de l'IRM pré-opératoire du patient avec son cerveau. Elle permet ainsi une localisation précise de la tumeur et guide l'exérèse. Une autre technique utilisée est l'échographie per-opératoire isolée ou couplée à la neuronavigation. Enfin, l'IRM per-opératoire est également proposée mais sa lourdeur et son coût limitent son utilisation. Ces

outils apportent une aide précieuse aux neurochirurgiens. Néanmoins, aucune étude n'a démontré clairement une amélioration significative de l'exérèse suite à leur utilisation.

Dans ce contexte, une nouvelle technique se développe : la chirurgie guidée par fluorescence utilisant l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA). Elle présente de nombreux bénéfices dans l'exérèse du glioblastome. Le 5-ALA, présent naturellement dans nos cellules, est un précurseur biochimique naturel de l'hème, un constituant de l'hémoglobine des globules rouges. Cette voie métabolique est perturbée dans les cellules cancéreuses, entraînant une surcharge en Protoporphyrine (PpIX), un composé intermédiaire fluorescent et photosensible. Dans le cas du glioblastome, l'administration par voie orale au patient de 5-ALA, 3 heures avant l'opération, est responsable d'une accumulation de PpIX dans les cellules cancéreuses. En excitant la PpIX avec une lumière bleue émise par un microscope neurochirurgical, elle émet une forte fluorescence rouge guidant l'exérèse. La qualité de la chirurgie repose sur la disparition de la fluorescence. Cette technique permet d'augmenter le pourcentage d'exérèse tumorale totale ainsi que d'améliorer la survie sans récurrence et la survie globale des patients. En Europe, le 5-ALA a reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) le 7 septembre 2007 sous la dénomination de Gliolan<sup>®</sup>. Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), « Gliolan<sup>®</sup> est indiqué chez le patient adulte dans la visualisation des tissus malins au cours du traitement chirurgical du gliome malin (grade III et IV de l'OMS) ». Toutefois, elle précise qu'il s'agit d'un progrès thérapeutique mineur. En effet, d'après l'avis de la Commission de transparence du 19 mai 2010 (CT-7583), « les résultats des études cliniques ne montrent pas d'impact de GLIOLAN sur la survie globale des patients atteints de gliomes malins. Par ailleurs, il n'y a pas de données sur l'impact de GLIOLAN sur la qualité de vie » [Stummer, Pichlmeier, Meinel *et al.*, 2006].

Enfin, la chirurgie guidée par microscopie confocale se développe, notamment dans le cas des glioblastomes. Cette technique consiste à injecter une molécule fluorescente ensuite excitée par un faisceau laser d'un endoscope dirigé sur le tissu cancéreux. Elle permet d'observer en temps réel sur écran, des coupes histologiques *in vivo* renseignant sur l'architecture tissulaire [Guyotat, 2013].

Dans les 48 heures suivant l'exérèse, une IRM avec et sans injection doit être réalisée afin d'estimer le volume résiduel tumoral.

## b) Radiothérapie

La radiothérapie est l'utilisation d'un faisceau de rayonnements ionisants d'origine externe (rayons X de faible énergie ou photons  $\gamma$  de haute énergie, dans un but diagnostique ou thérapeutique) entraînant la formation de radicaux libres responsables de lésions au niveau des glucides, lipides, protéines et surtout de l'ADN (modifications de bases, cassures simple ou double brin). Lorsque ces dommages à l'ADN sont conséquents, ou lorsque les mécanismes de réparation de la cellule sont dépassés ou altérés (cellules tumorales), la cellule provoque son auto-destruction par apoptose. En fonction de la dose, de la radiosensibilité de chaque type de cellules, les lésions sur l'ADN sont plus ou moins réversibles. En

radiothérapie, la dose de rayons s'exprime en grays (Gy) : 1 Gy est une unité de dose absorbée qui correspond à un transfert d'énergie de 1 joule à 1 kg de matière.

Un des inconvénients de cette technique est qu'elle affecte également les tissus sains. Toutefois, son efficacité provient de la plus grande capacité de réparation des lésions des tissus sains [Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), 2014].

Les tumeurs cérébrales sont traitées par des rayons  $\gamma$  qui pénètrent en profondeur. Concernant les glioblastomes, la radiothérapie est pratiquée 4 à 6 semaines suivant l'exérèse chez les patients possédant un bon état général. Son but est de prévenir toute rechute survenant en moyenne après 9 mois. Avant la radiothérapie, une IRM est effectuée afin de détecter d'éventuelles récidives post-opératoires précoces.

Le traitement standard associe la radiothérapie focalisée de 60 Gy en 30 fractions de 2 Gy par jour, 5 jours par semaines, pendant 6 semaines, et la chimiothérapie utilisant le témozolomide (75 mg/m<sup>2</sup>/jour). En effet, cette association a démontré une amélioration de la survie à 2 et à 5 ans, dans une étude réalisée par l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) et le *National Cancer Institute of Canada* (NCIC) en 2005 [Stupp, Mason, van den Bent *et al.*, 2005; Stupp, Hegi, Mason *et al.*, 2009].

En pratique, une séance dure 15 minutes. Pendant l'irradiation la tête du patient est maintenue par un masque thermoformé composé de 3 attaches [Glioblastome Association Michèle Esnault (GFME), 2013]. Différents volumes cibles à irradier sont pris en compte par l'opérateur selon les normes de l'*International Commission on Radiation Units and Measurements* (ICRU). Il faut également respecter la notion de volume maximal irradiable par organe limitant la dose appliquée sur un tiers du système nerveux central à 60 Gy, sur deux tiers à 50 Gy et sur la totalité du cerveau à 45 Gy. Enfin une même région ne peut être irradiée qu'une seule fois.

Des effets indésirables fonction de la dose peuvent apparaître chez certains patients. A court terme, on peut observer une asthénie pouvant s'accompagner d'une dépression, des céphalées, nausées ou vomissement, une alopecie dose-dépendante survenant autour de la 3<sup>ème</sup> semaine et localisée à l'endroit des rayons. Une irritation du cuir chevelu, un œdème pouvant être traité par corticothérapie et dans certains cas une aggravation temporaire des symptômes de la tumeur peuvent se manifester. A long terme, une nécrose, une cécité, une surdité ou un hypopituitarisme sont des complications possibles. Des déficits neuro-cognitifs apparaissant après 4 à 6 mois de traitement, sont fréquemment observés et se manifestent par des troubles de la concentration et de la mémoire, un ralentissement dans l'exécution des mouvements. Des avancées en radiothérapie permettent de limiter ces effets indésirables en diminuant au maximum les doses (notamment au niveau des tissus sains avoisinants) et les volumes traités.

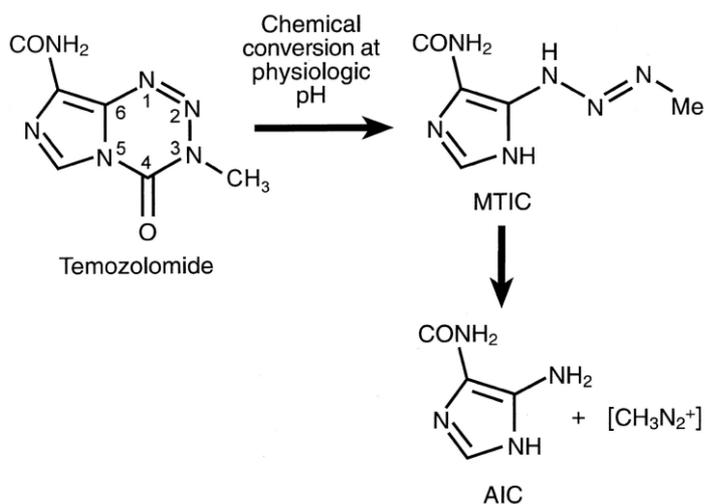
Malgré les progrès réalisés, un obstacle majeur demeure la radiorésistance des glioblastomes. Afin de pallier ce phénomène, les chercheurs développent des molécules d'intérêt thérapeutique, capables de sensibiliser les cellules tumorales aux effets cytotoxiques de la radiothérapie, notamment le témozolomide, des inhibiteurs de la PI3K ainsi que de l'EGFR [Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010].

### c) Chimiothérapie

La chimiothérapie est l'utilisation de médicaments provoquant la destruction de cellules tumorales, mais également de cellules à renouvellement rapide. Elle est principalement administrée par voie orale ou intraveineuse et sa durée est variable. Généralement une association d'anticancéreux est préférée. Dans le cas des tumeurs cérébrales, ces substances doivent traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Actuellement, le traitement de 1<sup>ère</sup> intention des glioblastomes nouvellement diagnostiqués est basé sur le **protocole de Stupp (2005)**, détaillé précédemment [Stupp, Mason, van den Bent *et al.*, 2005; Van den Bent, Hegi and Stupp, 2006]. Ce schéma a été validé pour les glioblastomes par la *Food and Drug Administration* (FDA) et l'Agence Européenne des Médicaments en 2005.

Le témozolomide est un agent alkylant de l'ADN, plus précisément un dérivé triazène qui est spontanément hydrolysé à pH physiologique en monométhyl triazéno-imidazole carboxamide actif (MTIC). La cytotoxicité du MTIC proviendrait principalement d'une méthylation de l'ADN en position O6 et N7 de la guanine, et en position N3 de l'adénine provoquant un mésappariement de bases (méthyl-guanine avec thymidine), suivi d'un arrêt de la transcription. Si le système de réparation de la cellule est altéré ou dépassé, une réparation aberrante de l'ADN méthylé provoquera ainsi sa mort par apoptose (Figure 7) [Friedman, Kerby and Calvert, 2000].



**Figure 7 : Mode d'action du témozolomide.**

Le témozolomide est un dérivé triazène qui subit une conversion chimique rapide à pH physiologique en MTIC, son métabolite actif. Le MTIC est ensuite catabolisé en 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) à la suite de la libération du cation méthyldiazonium. Le composé AIC, produit final de dégradation du témozolomide est ensuite excrété par les reins. D'après Friedman, Kerby and Calvert (2000).

Dans le cas de la chimiothérapie concomitante, le témozolomide est administré au patient par voie orale quotidiennement, à la dose de 75 mg/m<sup>2</sup>. Il doit être pris à jeun ou à distance des repas (respecter un délai minimum de 2 heures), une heure avant la séance de radiothérapie, pendant toute la durée de la radiothérapie (6 semaines en général).

Divers effets indésirables ont été rapportés et sont communs aux différents types d'anticancéreux. Le témozolomide entraîne fréquemment des nausées (43%) et vomissements (36%) de 3 types ; anticipés, aigus (immédiatement après l'administration) ou retardés (12 à 24 heures après). Il est possible de les prévenir en administrant simultanément des antiémétiques, comme les antagonistes des récepteurs 5-HT3 ou sétrons (ZOPHREN®), ainsi que des corticoïdes.

Une toxicité hématologique retardée se manifeste par une anémie, une thrombopénie et une neutropénie, rapidement réversibles (une à deux semaines). Le nadir, défini comme le taux de leucocytes le plus bas, est compris entre 21 et 28 jours. Une lymphopénie en cas de radiothérapie concomitante, survient fréquemment mais ne justifie pas l'arrêt du traitement. Une aplasie grave et prolongée peut se manifester dans de rares cas, nécessitant une surveillance hebdomadaire de la fonction hématologique pendant la radiochimiothérapie. Cette surveillance doit permettre une adaptation de la dose si nécessaire. Un bilan préalable puis après 21 jours des fonctions hématologique, hépatique et rénale est également réalisé.

La survenue d'une pneumopathie à *Pneumocystis jirovecii*, favorisée par l'administration de corticoïdes et la présence d'une lymphopénie, nécessite une antibioprophylaxie orale avec le cotrimoxazole (BACTRIM® : 1 cp/jour 7j/7 ou BACTRIM FORTE® : 3 cp/semaine), ou un aérosol de pentamidine (PENTACARINAT 300® ; 1 aérosol par mois) [Stupp, Hegi, Mason *et al.*, 2009].

Une asthénie, des céphalées, anorexie ou rashes cutanés, fièvre et somnolence apparaissent fréquemment (5 à 20%). Selon l'importance du rash, un arrêt définitif ou transitoire du traitement peut être nécessaire.

Une alopecie, des douleurs abdominales, pertes de poids, prurit, dyspnée, paresthésies et malaises peuvent également se manifester avec une fréquence de 2 à 5%. L'alopecie peut être totale, partielle, et est toujours réversible. Elle s'observe en général 10 jours après le début du traitement et atteint son apogée 1 ou 2 mois plus tard. Son impact psychologique doit être pris en compte car il risque d'influencer l'observance du traitement.

Enfin, cet agent alkylant peut affecter la fertilité, provoquant une aménorrhée chez la femme et une augmentation du risque de ménopause. Chez l'homme une stérilité par azoospermie est possible. Ainsi, avant le traitement, il est conseillé aux patients d'effectuer un don d'ovules ou de sperme. De plus, la génotoxicité et tératogénicité de cette molécule nécessite l'utilisation de préservatifs chez l'homme traité, et une contraception efficace chez la femme.

Quatre semaines après l'arrêt de la radiochimiothérapie, le témozolomide est administré en monothérapie, en traitement d'entretien pendant 6 mois. La posologie est de 150 mg/m<sup>2</sup>/j en une prise à jeun (ou à distance des repas), les 5 premiers jours du premier mois. Cette dose est ensuite augmentée à 200 mg/m<sup>2</sup> les 5 premiers jours des mois 2 à 6, en fonction de la tolérance hématologique du patient [Stupp, Mason, van den Bent *et al.*, 2005; Stupp, Hegi, Mason *et al.*, 2009].

Avant le traitement, il est nécessaire de déterminer le statut *MGMT* du patient qui est un marqueur prédictif de la réponse de la tumeur aux agents alkylants, comme détaillé

précédemment. Il permet ainsi de choisir entre une radiothérapie seule ou combinée au témozolomide [Figarella-Branger, Colin, Tchoghandjian *et al.*, 2010; Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010].

Une variante de la chimiothérapie consiste à utiliser des implants imprégnés de 7,7 mg de carmustine (nitroso-urée) ou Gliadel<sup>®</sup>, uniquement après confirmation du diagnostic de glioblastome. 1 à 8 implants sont déposés par le neurochirurgien à l'emplacement de la tumeur, après chirurgie complète ou quasi-complète. Une AMM existe pour le traitement de première ligne et en cas de récurrence. Ces implants peuvent être associés au protocole standard de Stupp. Des effets indésirables comme des œdèmes, une cicatrisation retardée, des abcès, des convulsions, une méningite, une détérioration neurologique ainsi qu'une fuite de LCR, ont été rapportés [Oncologie, 2011].

#### d) Thérapie ciblée

Ces dernières années, grâce aux progrès réalisés notamment dans la caractérisation moléculaire des glioblastomes (NIH), les médecins et chercheurs se tournent d'avantage vers le développement d'une médecine personnalisée.

Une première approche s'intéresse aux inhibiteurs de récepteurs de facteurs de croissance. Cette classe comprend notamment les inhibiteurs de l'EGFR, des composés agissant en bloquant de manière sélective la tyrosine kinase du récepteur EGFR, fréquemment amplifié dans les glioblastomes. Le gefitinib (Iressa<sup>®</sup>) et l'erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>), administrés par voie orale, présentent l'avantage de traverser la BHE grâce à leur petite taille et sont bien tolérés. Cependant, les essais cliniques réalisés chez des patients atteints de gliomes malins, n'ont pas permis d'observer une augmentation de la survie sans progression, ni de la survie globale [Rich, Reardon, Peery *et al.*, 2004; Raizer, Abrey, Lassman *et al.*, 2010; Hottinger, Stupp and Homicsko, 2014]. Les anticorps monoclonaux anti-EGFR appartiennent également à cette famille. Ils inhibent par compétition irréversible, la fixation des ligands sur leur récepteur. Un des composés, le cetuximab utilisé seul ou combiné à d'autres anticancéreux, est bien toléré mais n'a pas montré de réelle efficacité chez des patients atteints de glioblastomes [Neyns, Sadones, Joosens *et al.*, 2009; Hasselbalch, Lassen, Hansen *et al.*, 2010; Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010]. D'autre part, cette classe comprend les inhibiteurs du *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR), récepteur fréquemment surexprimé dans le sous-type 3 (proneural) des glioblastomes. Un de ces inhibiteurs, l'imatinib mesylate, a présenté initialement une activité antitumorale dans des modèles de gliomes orthotopiques. Cependant, ce composé, utilisé seul ou combiné à l'hydroxyurée, s'est montré inactif dans plusieurs essais cliniques, et aucune amélioration de la survie n'a été observée [Wen, Yung, Lamborn *et al.*, 2006; Razis, Selviaridis, Labropoulos *et al.*, 2009; Reardon, Desjardins, Vredenburgh *et al.*, 2012; Hottinger, Stupp and Homicsko, 2014].

Une approche prometteuse est le développement de molécules inhibant l'angiogenèse, et donc la croissance des tumeurs. Une des stratégies consiste à cibler différents facteurs impliqués dans cette voie, notamment le *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF), le *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) et le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF). Le

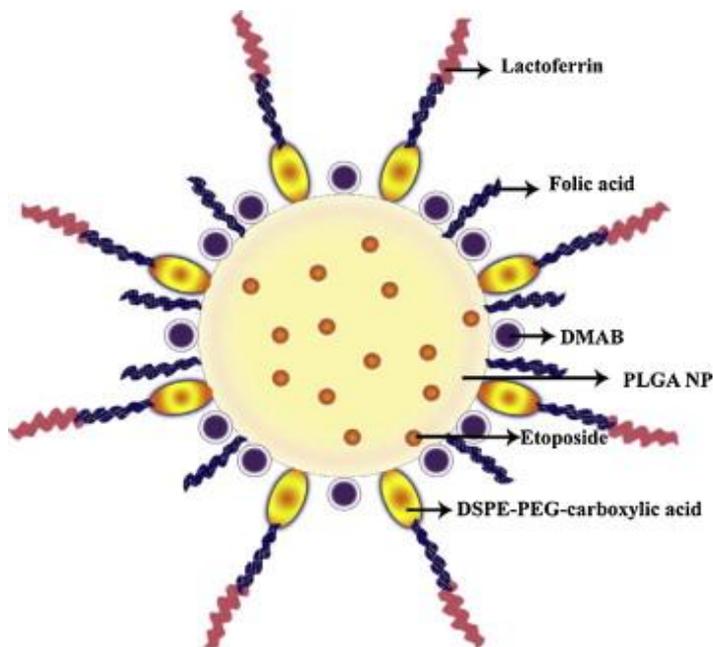
bevacizumab ou Avastin<sup>®</sup>, un anticorps monoclonal humanisé, est dirigé contre le VEGF, facteur avec un rôle majeur dans l'initiation de l'angiogenèse. Il bloque la croissance des petits vaisseaux sanguins à l'intérieur de la tumeur, la privant ainsi de l'oxygène et des nutriments nécessaires à son développement. Cet anticorps est fréquemment utilisé en raison d'un taux élevé de réponse (50%) chez des patients atteints de glioblastome récidivant après radiochimiothérapie, et en raison d'une bonne tolérance observés dans plusieurs études [Vredenburgh, Desjardins, Herndon *et al.*, 2007 (a); Vredenburgh, Desjardins, Herndon *et al.*, 2007 (b); Friedman, Prados, Wen *et al.*, 2009].

Une autre stratégie consiste à cibler des voies de signalisation dérégulées dans les glioblastomes, notamment la voie PI3K/AKT/mTOR impliquée dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaires (Figure 5). Plusieurs inhibiteurs sélectifs de mTOR ont ainsi été développés, notamment le sirolimus, le temsirolimus et l'everolimus. L'association sirolimus (Rapamune<sup>®</sup>)/erlotinib ainsi que la combinaison temsirolimus/bevacizumab, n'ont pas démontré de réelle efficacité dans le traitement de glioblastomes récidivants [Reardon, Desjardins, Vredenburgh *et al.*, 2010; Lassen, Sorensen, Gaziel *et al.*, 2013]. Récemment, l'activité de l'everolimus combiné à la radiochimiothérapie classique a été évaluée chez des patients atteints de glioblastomes nouvellement diagnostiqués. Les conclusions sont similaires : cette association présente une faible toxicité mais son bénéfice en terme de survie est insuffisant [Ma, Galanis, Anderson *et al.*, 2015].

D'autre part, une piste s'intéresse aux histones déacétylases (HDAC), protéines majeures impliquées dans la régulation épigénétique. Dans les glioblastomes, une hyperméthylation et une hypoacétylation des histones provoquent la répression de gènes suppresseurs de tumeurs (*RB*, *MGMT*) ainsi que de gènes contrôlant le cycle cellulaire (*P15*, *INK4*). Le vorinostat, un acide hydroxamique, est l'inhibiteur des HDAC le plus avancé en développement clinique dans les glioblastomes récidivants. Une étude de phase II a montré que ce composé était bien toléré mais possédait une activité antitumorale modérée [Galanis, Jaeckle, Maurer *et al.*, 2009; Pecuchet, Cluzeau, Thibault *et al.*, 2010]. Actuellement, des essais de phase II évaluant son association avec d'autres agents de thérapie ciblée, le témozolomide et la radiothérapie, sont en cours. Les études précliniques ont mis en évidence des effets bénéfiques, mais les premiers essais cliniques sont moins encourageants. Des essais à plus grande échelle sont nécessaires [Bezecny, 2014]. D'autres inhibiteurs des HDAC sont développés, notamment l'acide valproïque. Plusieurs études suggèrent une prolongation de la survie des patients recevant ce composé (seul ou combiné à la radiochimiothérapie), alors qu'un autre essai clinique n'a pas mis en évidence de réel bénéfice [Berendsen, Broekman, Seute *et al.*, 2012; Tsai, Wei, Tsai *et al.*, 2012; Barker, Bishop, Chang *et al.*, 2013; Yuan, Xiang, Qing *et al.*, 2014; Krauze, Myrehaug, Chang *et al.*, 2015]. Enfin une récente étude de phase II sur l'association du panobinostat (LBH589) avec le bevacizumab dans les glioblastomes récidivants, n'a pas montré d'augmentation significative de la survie à 6 mois par rapport au bevacizumab seul [Lee, Reardon, Schiff *et al.*, 2015].

Les agents de thérapie ciblés, de plus en plus développés dans le traitement du glioblastome, sont souvent responsables de mécanismes de résistance provoquant le décès rapide des patients. Pour y remédier, les études actuelles se portent majoritairement sur diverses combinaisons permettant de cibler simultanément plusieurs voies.

D'autre part, la nanomédecine apparaît comme une nouvelle voie de traitement des glioblastomes, avec l'utilisation de nanoparticules à l'intérieur desquelles différents anticancéreux sont encapsulés. Dans ce contexte, les nanoparticules formulées à base d'acide poly(lactique-co-glycolique) ou PLGA, présentent des propriétés intéressantes. Elles sont biodégradables, biocompatibles, protègent le médicament de la dégradation, et permettent sa libération prolongée. Elles peuvent également être utilisées avec différents types de médicaments (hydrophiles ou hydrophobes). De plus, il est possible de modifier les propriétés de surface des nanoparticules afin de cibler des organes ou cellules spécifiquement. La FDA et l'Agence européenne des médicaments ont approuvé ces nanoparticules PLGA dans les systèmes de délivrance pour l'administration parentérale, diminuant les délais nécessaires pour leurs applications en clinique humaine [Danhier, Ansorena, Silva *et al.*, 2012]. Ces nanoparticules ont été récemment modifiées par un glycopeptide (g7). Elles sont ainsi capables de traverser efficacement la BHE afin de libérer le médicament encapsulé [Danhier, Ansorena, Silva *et al.*, 2012; Tosi, Bortot, Ruozi *et al.*, 2013]. Dernièrement, une équipe s'est intéressée à l'utilisation de nanoparticules PLGA sur lesquelles sont greffés de la lactoferrine et de l'acide folique. A l'intérieur de ces nanoparticules est encapsulé l'étoposide, un inhibiteur de topoisomérase II candidat dans le traitement des glioblastomes. Ces nanoparticules permettent une traversée plus efficace de la BHE et une meilleure inhibition de la croissance de la lignée cellulaire humaine de glioblastome U87 (Figure 8) [Kuo and Chen, 2015].



**Figure 8 : Structure schématique d'une nanoparticule PLGA sur laquelle sont greffées la lactoferrine et l'acide folique, encapsulant l'étoposide.**

D'après Kuo and Chen, (2015).

Les microARN constituent une nouvelle option thérapeutique dans la prise en charge des glioblastomes. Ces petits ARN non codants sont impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes au niveau post-traductionnelle. Des dérégulations de l'expression de ces miARN ont été mises en évidence dans plusieurs types de cancers. Dans ce contexte, une

étude a montré que *MIR-491*, un gène codant pour 2 miARN, fréquemment sous-exprimé et délété dans les glioblastomes, était un suppresseur de tumeur, contrôlant la prolifération et l'invasion tumorale, notamment en ciblant EGFR [Li, Liu, Granberg *et al.*, 2015].

Enfin, l'immunothérapie semble une approche prometteuse dans le traitement des glioblastomes. Elle consiste à inhiber les voies de signalisation impliquées dans l'échappement de la tumeur au système immunitaire. Dans ce contexte, l'anticorps monoclonal humain Nivolumab, stimule les lymphocytes T en bloquant la liaison entre le récepteur *Programmed cell death-1* (PD-1) et les ligands PD-L1 et PD-L2 (*Programmed death-ligand 1, 2*). L'anticorps monoclonal humain Ipilimumab, est capable d'activer les lymphocytes T en bloquant spécifiquement le signal inhibiteur de CTLA-4, l'antigène-4 des lymphocytes T cytotoxiques (point de contrôle immunitaire) (vidal). Ces 2 composés sont en cours d'évaluation dans de nombreuses études cliniques. Un autre composé, le Rindopepimut (CDX-110) est actuellement le plus avancé en terme de développement clinique. Il cible le variant III du récepteur EGFR (EGFRvIII), muté dans environ 30 % des glioblastomes primaires et associé à un mauvais pronostic. Des études de phase II ont montré que ce vaccin était bien toléré et entraînait une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale. Une étude de phase III est actuellement en cours (NCT01480479) [Sampson, Heimberger, Archer *et al.*, 2010; Hottinger, Stupp and Homicsko, 2014; Reardon, Freeman, Wu *et al.*, 2014; Schuster, Lai, Recht *et al.*, 2015].

#### e) Dispositif NovoTTF™-100A

Le dispositif NovoTTF™-100A développé par la société Novocure, est un nouveau traitement qui semble très prometteur. Il consiste à délivrer un courant électrique dans le cerveau de patients atteints de glioblastomes nouvellement diagnostiqués. Pratiquement, ce dispositif comprend 24 électrodes à appliquer sur le crâne rasé des malades. Ces électrodes portées en permanence, sont reliées à un générateur portatif de 3 kg, qui diffuse des courants électriques alternatifs de faible intensité, dénommés *Tumor Treating Fields* ou *TTFields*. Ces courants vont interférer avec les divisions cellulaires, freinant ainsi la croissance tumorale. Une étude clinique de phase III EF-14, initiée en 2010 sur 700 patients atteints de glioblastomes nouvellement diagnostiqués, a été évaluée à mi-parcours, sur demande de la FDA. Les résultats obtenus fin 2014, chez les 315 premiers patients sont très encourageants. En effet, la combinaison de ce dispositif avec le témozolomide augmenterait le taux de survie globale à 2 ans de 29% à 43% par rapport à l'utilisation du témozolomide seul. Toutefois, ce traitement se limite aux patients ne possédant aucun trouble moteur ni cognitif [American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2015].

Malgré le développement de nouvelles thérapies, les glioblastomes présentent un mauvais pronostic. Une des raisons est la présence de cellules souches cancéreuses résistantes à ces thérapies, et responsables d'une rechute des patients. Ainsi, les chercheurs se tournent de plus en plus vers des traitements ciblant ces cellules particulières. Ce point sera développé dans la seconde partie.

### 1.6.2.1.2. Récidives

Une réunion de concertation pluridisciplinaire doit permettre de décider de la stratégie thérapeutique à adopter en cas de récurrence. Une nouvelle chirurgie est envisageable en fonction de l'emplacement de la tumeur. Une autre option concerne les implants de carmustine, qui possèdent une AMM en seconde ligne de traitement des glioblastomes, bien qu'aucune preuve de leur bénéfice n'ait été démontrée actuellement. Il est également possible de reprendre une radiothérapie en adaptant les doses.

La chimiothérapie peut être proposée au patient, mais aucun standard n'existe pour les traitements de 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne. Il est conseillé dès que possible d'inclure les patients dans des essais cliniques. Les molécules administrées sont diverses.

Le bevacizumab ou Avastin<sup>®</sup> est fréquemment utilisé en raison d'un taux élevé de réponse (50%) chez des patients atteints de glioblastome récidivant après radiochimiothérapie, et en raison d'une bonne tolérance observés dans plusieurs études, comme détaillé précédemment. La posologie est de 10 mg/kg en IV pendant 90 minutes, tous les 15 jours [Vredenburgh, Desjardins, Herndon *et al.*, 2007 (a); Vredenburgh, Desjardins, Herndon *et al.*, 2007 (b); Friedman, Prados, Wen *et al.*, 2009; Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010]. Le bévacizumab est autorisé par la FDA mais pas par l'Agence Européenne des Médicaments, estimant qu'il n'existe pas suffisamment de données témoignant de son efficacité.

Ce composé, malgré une bonne tolérance, n'est pas dénué d'effets secondaires. Il peut entraîner un retard de cicatrisation des plaies et doit être arrêté en cas de chirurgie. Ses effets indésirables les plus fréquents sont une hypertension artérielle dose-dépendante, une asthénie, une anorexie, une stomatite, une fièvre et une constipation. Des effets indésirables plus graves ont également été observés : réactions allergiques, accidents thromboemboliques, hémorragies (rectale, épistaxis). Le risque d'hémorragie intratumorale est le plus redouté même s'il reste faible (3%).

L'association bévacizumab et irinotecan (Campto<sup>®</sup>, inhibiteur de topoisomérase I) est également utilisée dans le traitement des rechutes. Le schéma est le suivant : un cycle tous les 15 jours de bevacizumab à 10 mg/kg et d'irinotecan à 125 mg/m<sup>2</sup> (si pas de prise d'antiépileptiques inducteurs enzymatiques) ou à 340 mg/m<sup>2</sup> (si prise d'antiépileptiques inducteurs enzymatiques comme la carbamazépine), tous deux en perfusion IV de 90 minutes. D'après les conclusions de plusieurs études, cette combinaison s'avère efficace et bien tolérée [Vredenburgh, Desjardins, Herndon *et al.*, 2007 (a); Vredenburgh, Desjardins, Herndon *et al.*, 2007 (b); Friedman, Prados, Wen *et al.*, 2009].

D'autre part, une reprise du témozolomide est envisageable selon différentes modalités : en utilisant la dose standard, augmentée, en traitement semi-continu (75 mg/m<sup>2</sup>/jour, 21 jours sur 28) ou continu (50 mg/m<sup>2</sup>/jour).

L'utilisation des nitroso-urées comme la bélustine, la carmustine IV ou la fotémustine IV (AMM dans les tumeurs cérébrales) dans plusieurs études cliniques, n'a pas montré d'efficacité réelle et est à utiliser avec précaution en raison de l'importante toxicité hématologique de cette famille d'anticancéreux.

Le schéma PCV (procarbazine, CCNU ou belustine, et vincristine) fréquent en neuro-oncologie, est de moins en moins utilisé en cas de rechute, à cause de sa complexité et du manque de preuve de son efficacité.

L'association carboplatine-étoposide n'a pas non plus démontré un réel bénéfice.

En cas d'échec ou lorsqu'aucune de ces techniques n'est envisageable, le patient bénéficiera d'une prise en charge palliative [Oncologie, 2011].

#### 1.6.2.1.3. Particularité des patients âgés (> 70ans)

Une évaluation gériatrique est recommandée.

Chez les patients âgés en bon état général, une exérèse est possible suivie du protocole de Stupp, nécessitant une adaptation des doses de radiothérapie (protocole RSP : 50 Gy en 28 fractions [Keime-Guibert, Chinot, Taillandier *et al.*, 2007] ou protocole ROA : 40 Gy en 15 fractions [Roa, Brasher, Bauman *et al.*, 2004].

Chez les patients en mauvais état général, une biopsie est réalisée afin de déterminer le grade du glioblastome. Elle est suivie soit d'une chimiothérapie avec le témozolomide seul, bien toléré et améliorant la survie des patients, soit d'une radiothérapie (50 Gy en 28 fractions ou 40 Gy en 15 fractions), soit d'une prise en charge palliative.

En cas de récurrences et en fonction de l'état général du patient, les médecins peuvent envisager une reprise de la chirurgie suivie d'une chimiothérapie. L'autre alternative est la prise en charge palliative [Oncologie, 2011].

Un récapitulatif des différentes méthodes de prise en charge des glioblastomes en fonction de l'âge du patient atteint est présenté en Annexe 1.

#### 1.6.2.2. Traitement symptomatique

Le traitement symptomatique peut comprendre l'administration de corticoïdes comme la dexaméthasone (Dectancyl<sup>®</sup> 0,5 mg) par voie orale afin de diminuer l'œdème et la pression intracrânienne, et donc les céphalées ainsi que la somnolence. Des diurétiques sont parfois prescrits afin de permettre l'élimination de l'excès de liquide dans le cerveau. En cas de crises d'épilepsie (25% des patients), des anticonvulsivants sont administrés comme le valproate de sodium (Dépakine<sup>®</sup>) ou la carbamazépine (Tégréto<sup>®</sup>). Il faut être prudent avec l'utilisation de la phénytoïne qui, administrée parallèlement à la radiothérapie, peut provoquer de graves réactions cutanées, comme le syndrome de Stevens-Johnson et l'érythème multiforme. Les céphalées et la douleur sont traitées grâce à des antalgiques. Des anticoagulants permettent d'éviter certaines complications comme la phlébite ou l'embolie pulmonaire [Institut National Du Cancer (INCa), 2010]. Enfin des antidépresseurs sont parfois prescrits.

L'évaluation clinique (échelle OMS de classification de l'état général, tests MMS (Mini-Mental Status)), le statut neurologique et le suivi post thérapeutiques des patients sont essentiels [Oncologie, 2011]. L'INCa recommande au minimum une consultation annuelle avec le radiothérapeute.

## 1.7. Pronostic

Malgré les progrès réalisés dans les thérapies, les glioblastomes possèdent toujours un pronostic très sombre. En effet, sans traitement, la médiane de survie n'excède pas 3 mois. Avec le traitement conventionnel (protocole de Stupp), elle est augmentée mais n'excède pas 14 mois [Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010]. Enfin, la combinaison avec des thérapies ciblées comme le bévacizumab, prolonge la médiane de survie de 6 mois seulement (Tableau II) [Carrondo Cottin, 2008].

**Tableau II : Taux de survie relatif à 1, 2, 5 et 10 ans en fonction de l'âge des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives.**

Tableau adapté de Carrondo Cottin, (2008).

<i>Tranche d'âge</i>	<i>Taux de survie relatif à (%)</i>			
	<i>1 an</i>	<i>2 ans</i>	<i>5 ans</i>	<i>10 ans</i>
<i>0-19 ans</i>	50,9	27,9	19	15,6
<i>20-44 ans</i>	60	29,8	13,3	8,7
<i>45-54 ans</i>	42,2	11,6	3,3	1,6
<i>55-64 ans</i>	31,3	6	1,3	0,5
<i>65-74 ans</i>	16,8	2,7	0,4	0,1
<i>75 ans et plus</i>	8,1	1,4	0,5	0,3

Il faut également tenir compte des facteurs de mauvais pronostic notamment un âge avancé (supérieur à 60 ans), une exérèse incomplète (contours irréguliers des glioblastomes à cause de leur nature infiltrante) et une altération de l'état général du patient. Enfin la nature du microenvironnement tumoral (hypoxie et acidité) augmente l'agressivité de ces tumeurs. Dans la majorité des cas, le décès survient à la suite d'un œdème cérébral.

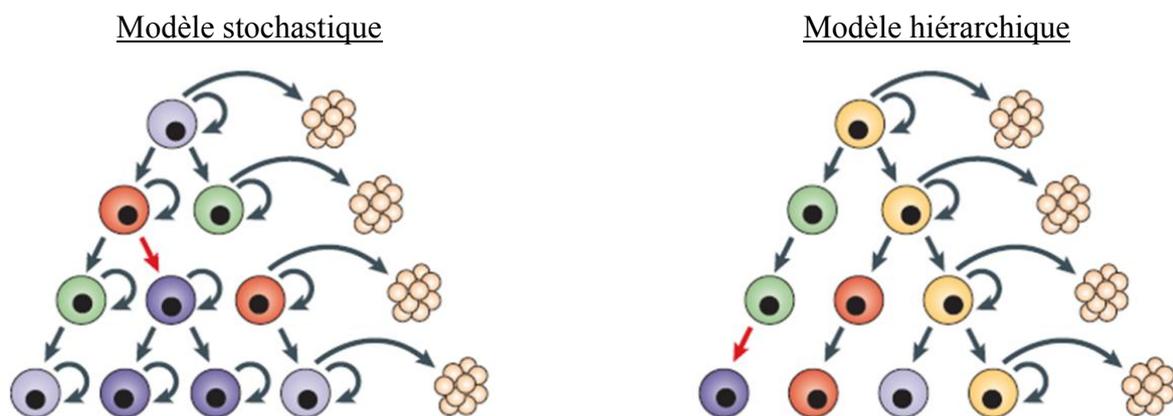
## 1.8. Hétérogénéité tumorale

Une des origines du mauvais pronostic des glioblastomes est l'hétérogénéité de ce type de tumeurs. En effet, les cellules tumorales diffèrent entre elles par leur capacité de prolifération, leur état de différenciation, leur activité métabolique et les mécanismes de résistance aux traitements. Deux modèles ont été développés, permettant d'expliquer cette hétérogénéité : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique. Ces deux modèles peuvent coexister.

Le modèle stochastique ou modèle de l'évolution clonale est **le premier** à avoir été proposé pour expliquer la prolifération cancéreuse. Dans ce modèle classique, il n'existe pas de hiérarchie entre les différentes cellules de la tumeur qui possèdent toutes le même potentiel

tumorigène (y compris les cellules différenciées). Au fur et à mesure de la croissance tumorale, n'importe quelle cellule peut ainsi subir des mutations aléatoires, proliférer indéfiniment et former un clone tumoral indépendant. Le clone le plus agressif et s'adaptant le mieux au microenvironnement tumoral, sera ensuite sélectionné pour former de nouvelles tumeurs. L'hétérogénéité tumorale résulte de la différenciation, de modifications génétiques ou épigénétiques et de l'influence du microenvironnement.

Le second modèle, apparu plus récemment, est fondé sur l'existence d'une organisation hiérarchique au sein de la tumeur. Dans ce modèle, la majorité des cellules de la masse tumorale ont une capacité de prolifération limitée. Seule une petite proportion de cellules possède un potentiel tumorigène. Ce potentiel leur confère une capacité d'autorenouvellement et de prolifération à long terme, permettant la formation et la propagation de nouvelles tumeurs. Ce modèle est à l'origine du **concept des cellules souches cancéreuses** (Figure 9) [Reya, Morrison, Clarke *et al.*, 2001; Vescovi, Galli and Reynolds, 2006].



**Figure 9 : Modèles stochastique et hiérarchique permettant d'expliquer l'hétérogénéité tumorale.**

Dans le modèle stochastique, chaque cellule peut proliférer indéfiniment, former un clone tumoral et évoluer à la suite de l'accumulation de mutations oncogéniques. Dans le modèle hiérarchique, seule une cellule souche ou progénitrice (représentée en jaune) peut être la cible de l'oncogenèse et proliférer indéfiniment. D'après Vescovi, Galli and Reynolds (2006).

## 2. Cellules souches cancéreuses

---

### 2.1. Généralités

#### 2.1.1. Introduction et définition

##### 2.1.1.1. Cellules souches normales

La découverte des cellules souches embryonnaires en 1981 chez la souris par Evans, Kaufman et Martin, puis en 1998 chez l'Homme par les américains James Alexander Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor et l'israélien Benjamin Reubinoff, est l'un des plus grands bouleversements de la biologie de ces dernières décennies.

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules souches pluripotentes provenant d'un embryon au stade blastocyste. Elles sont capables de s'autorenouveler, de proliférer en culture ainsi que de se différencier en n'importe quel tissu de l'organisme. Cette capacité exceptionnelle leur confère un immense potentiel thérapeutique. En effet, elles pourraient permettre la réparation d'organes, de tissus malades ou endommagés. Cependant, leur utilisation soulève des problèmes éthiques (loi n° 2004-800 du 06 août 2004 relative à la bioéthique).

Ces derniers ont conduit les chercheurs à se tourner vers les cellules souches adultes. Ces cellules, multipotentes, sont retrouvées dans la plupart de nos tissus. Cependant elles présentent certaines limites, notamment une faible disponibilité, et une capacité de différenciation limitée.

En 2006 apparaît la notion de cellules souches pluripotentes induites (iPS) à la suite des travaux de Takahashi et Yamanaka. Ces cellules iPS ont été obtenues à la suite de la reprogrammation génétique directe de cellules somatiques adultes de souris en utilisant 4 facteurs de transcription : Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4. En 2007, ces mêmes facteurs ont permis à ces auteurs de générer des cellules iPS à partir de fibroblastes adultes humains [Takahashi and Yamanaka, 2006]. En 2012, leur découverte a été récompensée par le prix Nobel de médecine.

##### 2.1.1.2. Cellules souches cancéreuses ou cellules initiatrices de tumeurs

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, Joseph Claude Anselme Récamier et Robert Remak évoquent pour la première fois la notion de cellules souches cancéreuses, après avoir remarqué que les tissus cancéreux ressemblaient d'avantage aux tissus embryonnaires qu'aux tissus adultes. Cette observation est à l'origine de la « théorie des restes embryonnaires » proposée par Franco Durante et Julius Cohnheim selon laquelle les cancers proviendraient de cellules embryonnaires surnuméraires, demeurant indifférenciées chez l'adulte [Recamier, 1829; Remak, 1854; Ratajczak, Tarnowski, Borkowska *et al.*, 2013].

Récemment, est apparu le concept de cellules souches cancéreuses qui trouve son origine dans le modèle hiérarchique.

En 1994, la première description d'une organisation hiérarchique au sein d'une tumeur est réalisée par l'équipe de John Dick (Toronto). Cette équipe a montré qu'une petite proportion de cellules tumorales (CD34+ CD38-) isolée chez un patient atteint de leucémie aigüe myéloïde (LAM), était capable, à la suite d'une transplantation orthotopique chez des souris immunodéprimées, d'initier une LAM phénotypiquement identique à la tumeur originelle. Pour cela, ils ont utilisé un protocole particulier associant deux techniques : le tri cellulaire par cytométrie en flux et l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Les cellules sont ainsi triées en fonction des antigènes de surface qu'elles expriment, puis transplantées chez des souris immunodéficientes. Ces expériences sont considérées comme les premières preuves de l'existence des cellules souches cancéreuses et du modèle hiérarchique au sein des tumeurs [Lapidot, Sirard, Vormoor *et al.*, 1994].

Quelques années plus tard, une adaptation de ce protocole a permis de mettre en évidence des cellules souches cancéreuses dans de nombreuses tumeurs solides, notamment dans les cancers du sein en 2003 [Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez *et al.*, 2003], les glioblastomes en 2004 [Singh, Hawkins, Clarke *et al.*, 2004], les cancers de la prostate [Collins, Berry, Hyde *et al.*, 2005], les carcinomes de la peau [Fang, Nguyen, Leishear *et al.*, 2005], le cancer du poumon [Eramo, Lotti, Sette *et al.*, 2008], l'adénocarcinome du colon [Ricci-Vitiani, Lombardi, Pilozzi *et al.*, 2007] et le cancer du pancréas en 2007 [Li, Heidt, Dalerba *et al.*, 2007].

Actuellement, la théorie des cellules souches cancéreuses reste controversée au sein de la communauté scientifique (ce point sera détaillé ci-après), et il demeure difficile de caractériser ces cellules. La définition qui fait l'unanimité est basée sur leurs caractéristiques fonctionnelles. Les cellules souches cancéreuses sont des cellules tumorales multipotentes, capables de s'autorenouveler et de reproduire à l'identique l'hétérogénéité de la tumeur d'origine, après implantation orthotopique dans des modèles animaux immunodéprimés. Cette dernière propriété permet de les différencier des cellules souches normales [Clarke, Dick, Dirks *et al.*, 2006;].

### 2.1.2. Origine

Deux hypothèses sont proposées pour tenter d'expliquer l'origine des cellules souches cancéreuses : elles proviendraient soit de la transformation de cellules souches normales ou progéniteurs, soit de la dédifférenciation de cellules matures ou progéniteurs ; à la suite de mutations oncogéniques.

Les cellules souches cancéreuses ne représentent qu'une faible proportion des cellules composant la tumeur, mais sont nécessaires à son maintien [Sutter, Yadirgi and Marino, 2007].

### 2.1.3. Propriétés et isolement

Les cellules souches cancéreuses partagent un certain nombre de propriétés avec les cellules souches somatiques.

Tout d'abord elles possèdent une capacité de **prolifération et d'autorenouvellement** quasiment infinis. En effet, en cultivant ces cellules pendant plusieurs jours dans un milieu dépourvu de sérum mais en présence de facteurs de croissance, elles survivent à long terme et prolifèrent, en formant des sphères (test de clonalité) [Vescovi, Galli and Reynolds, 2006]. Cette propriété s'explique notamment par le maintien, dans ces cellules, de l'activité télomérase protégeant l'extrémité des chromosomes.

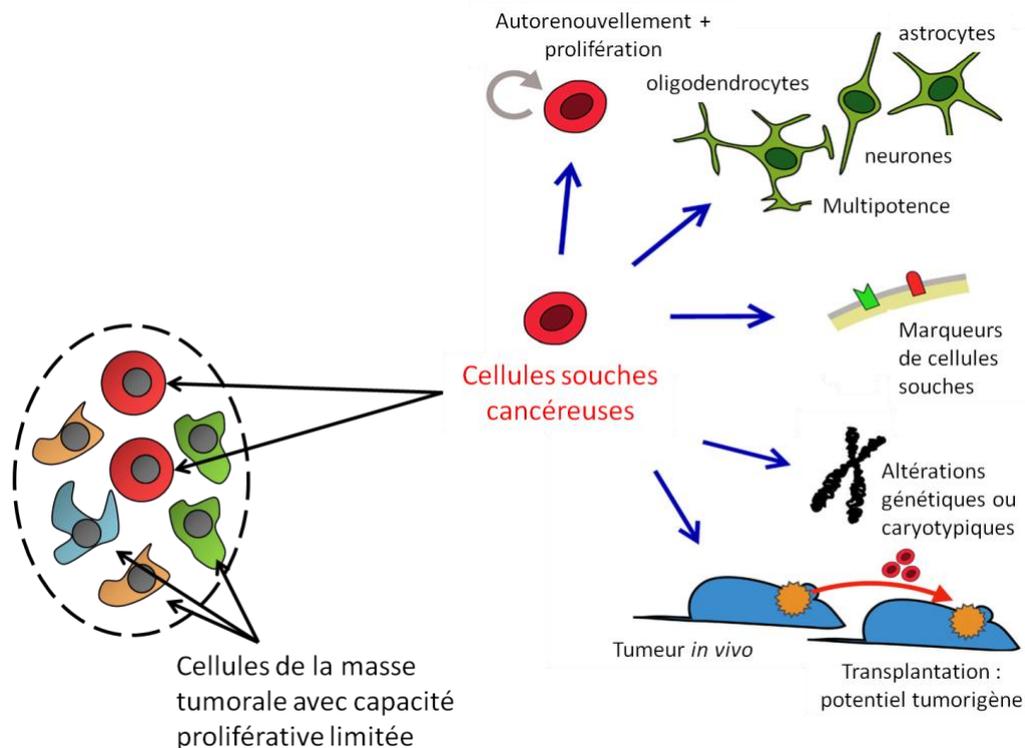
D'autre part les cellules souches cancéreuses sont **multipotentes**. En ajoutant du sérum dans un milieu de culture dépourvu de facteur de croissance, elles sont capables de se différencier en donnant naissance à plusieurs lignées (test de différenciation).

De plus elles expriment à leur surface des molécules considérées comme des **marqueurs de cellules souches**, notamment CD133 (Prominin-1) [Singh, Hawkins, Clarke *et al.*, 2004], CD34 [Lapidot, Sirard, Vormoor *et al.*, 1994], CD44 [Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez *et al.*, 2003]... Les cellules exprimant ces marqueurs peuvent être identifiées par cytométrie en flux. Toutefois, ces marqueurs sont à utiliser avec précaution.

Enfin, les cellules souches cancéreuses sont capables de survivre dans le milieu environnant sans adhérer à un substrat, et possèdent des capacités de migration cellulaire, notamment responsables de la formation de métastases.

Elles possèdent également des propriétés qui leur sont propres avec la présence d'**altérations génétiques ou caryotypiques** (amplification de certains gènes comme *EGFR*, délétion d'autres gènes, aneuploïdie), qui leur confèrent un caractère malin.

Elles sont caractérisées de manière fonctionnelle par leur **pouvoir tumorigène *in vivo***. Une injection d'un petit nombre de cellules souches *in vivo* chez des animaux immunodéprimés, permet de reproduire une tumeur phénotypiquement identique à la tumeur d'origine. Cette propriété est conservée à la suite de plusieurs transplantations en série (Figure 10) [Sutter, Yadirgi and Marino, 2007].



**Figure 10 : Propriétés des cellules souches cancéreuses.**

Les cellules souches cancéreuses partagent un certain nombre de propriétés avec les cellules souches somatiques, notamment, une capacité d'autorenouvellement et de prolifération quasi infinie, une multipotence et expriment à leur surface des marqueurs de cellules souches. D'autre part, elles possèdent un caractère malin avec la présence d'altérations génétiques ou caryotypiques ainsi qu'un pouvoir tumorigène *in vivo*. Figure adaptée de Sutter, Yadirgi and Marino (2007).

Ainsi le test de clonalité, de différenciation et le pouvoir tumorigène sont fréquemment utilisés pour sélectionner les cellules souches au sein d'une population.

#### 2.1.4. Cellules souches cancéreuses et microenvironnement tumoral

Les **cellules souches normales** sont localisées dans des endroits particuliers appelés niches ou microenvironnement. Le concept de niche est apparu en 1978, mentionné dans des travaux réalisés sur les cellules souches hématopoïétiques par Ray Schofield. Ces niches permettent d'accueillir les cellules souches et de les protéger. De plus, elles contrôlent leur devenir ainsi que leur nombre en régulant l'autorenouvellement, l'entrée en différenciation et l'apoptose. Ainsi, les cellules souches peuvent développer leurs pleines potentialités [Larsen, 2007].

Les niches comprennent les cellules souches elles-mêmes, concentrées à proximité d'un réseau microvasculaire composé de cellules endothéliales. Ces dernières permettent le recrutement et la sécrétion de chimiokines ainsi que de facteurs de croissance contrôlant la différenciation (BMP : Bone morphogenic protein) ou l'angiogenèse (VEGF, TGF). Ainsi, les

cellules endothéliales participent directement au maintien de l'autorenouvellement et du phénotype indifférencié des cellules souches. Les niches se composent aussi de cellules stromales. Ces cellules mésenchymateuses synthétisent une partie de la matrice extracellulaire permettant de structurer la niche. Enfin, des fibres nerveuses transmettent des stimuli aux cellules souches.

L'hypothèse de l'existence de niches similaires hébergeant les **cellules souches cancéreuses**, notamment dans le cas des cellules souches de tumeurs cérébrales, a été formulée [Calabrese, Poppleton, Kocak *et al.*, 2007]. Au sein de ces niches, les cellules souches cancéreuses seraient capables de conserver leur état indifférencié et leur capacité d'autorenouvellement, ce qui conditionnerait la progression tumorale. De plus, ce microenvironnement ; par l'intermédiaire des cellules endothéliales, augmenterait la résistance des cellules souches cancéreuses aux traitements de radiothérapie et chimiothérapie [Larsen, 2007].

Les interactions entre cellules souches cancéreuses et le microenvironnement sont complexes et peu développées actuellement, mais plusieurs modèles existent.

Dans le premier modèle, les cellules souches cancéreuses sont capables de survivre et se développer dans la niche des cellules souches normales, excluant ainsi l'existence d'une niche spécifique aux cellules souches cancéreuses.

Un second modèle mentionne une niche spécifique aux cellules souches cancéreuses, capables d'interagir avec ces dernières *via* la transmission de signaux. Ainsi la pré-existence d'une telle niche conditionnerait la survie et le devenir de ces cellules [Calabrese, Poppleton, Kocak *et al.*, 2007].

D'autre part, le microenvironnement serait impliqué dans la plasticité des cellules souches cancéreuses en provoquant leur dédifférenciation ou transdifférenciation vers d'autres types cellulaires. Ainsi une cellule souche transplantée dans un tissu différent de son tissu originel, est capable de se reprogrammer ; preuve qu'elle interagit étroitement avec la niche dans laquelle elle est hébergée [Watt and Hogan, 2000].

De plus, la niche des cellules souches cancéreuses permet de conserver un environnement hypoxique, nécessaire à la progression tumorale [Heddleston, Li, McLendon *et al.*, 2009]. En effet, pour permettre sa croissance, une tumeur a besoin d'un apport suffisant en oxygène, nécessitant une augmentation de la vascularisation grâce à la synthèse accrue de facteurs angiogéniques. Cependant la prolifération rapide du cancer entraîne une vascularisation insuffisante et anormale, responsable d'une hypoxie intra-tumorale. Divers mécanismes ont permis l'adaptation des cellules cancéreuses à cet environnement, notamment une augmentation du transport du glucose et de la glycolyse aérobie au détriment de la phosphorylation oxydative, entraînant une acidification du microenvironnement (effet Warburg 1923). La niche des cellules souches quant à elle, permet de pallier cette diminution de l'oxygénation en sécrétant différents signaux dont VEGF, impliqué dans la croissance et l'augmentation de la perméabilité de nouveaux vaisseaux, essentielles à l'angiogenèse et l'invasion tumorale. La période d'hypoxie est suivie d'une réoxygénation favorisant la progression tumorale.

## 2.2. Cellules souches retrouvées au sein du système nerveux central

### 2.2.1. Cellules souches neurales normales

Le cerveau adulte a longtemps été considéré comme un organe incapable de se régénérer. Ce n'est que récemment, en 1981, grâce aux travaux pionniers de Nottebohm, que la persistance d'une neurogenèse dans le cerveau adulte d'oiseaux chanteurs a été mise en évidence. Ces travaux ont été suivis par ceux de Reynolds et Weiss, au début des années 1990, consistant à isoler des cellules souches neurales multipotentes dans le cerveau de souris adultes [Nottebohm, 1981; Reynolds and Weiss, 1992].

La neurogenèse adulte se déroule principalement dans la zone sous-ventriculaire bordant les ventricules cérébraux, ainsi que dans la zone sous-granulaire du *gyrus* denté de l'hippocampe. Elle est retrouvée chez de nombreuses espèces, notamment chez l'Homme [Eriksson, Perfilieva, Bjork-Eriksson *et al.*, 1998; Sutter, Yadirgi and Marino, 2007; Spalding, Bergmann, Alkass *et al.*, 2013]. La neurogenèse adulte est assurée par une petite proportion de cellules souches neurales qui vont se différencier en neurones ou cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, épendymocytes et microglie).

Les **cellules souches neurales normales** partagent les propriétés des cellules souches en général, mentionnées précédemment, notamment une capacité d'**autorenewement et de prolifération** à long terme. Elles se caractérisent par une prolifération en culture sous forme de neurosphères en suspension. Le **test des neurosphères**, développé par Reynolds et Weiss en 1992, est essentiel pour isoler des cellules souches neurales provenant de biopsie de tumeurs cérébrales de patients. Il s'agit d'un système de culture sélectif, dépourvu de sérum mais contenant les facteurs de croissance EGF et FGF2 (Annexe 2) [Reynolds and Weiss, 1992; Vescovi, Galli and Reynolds, 2006]. D'autre part, ces cellules sont **multipotentes**, ce qui signifie qu'elles peuvent se différencier en neurones, astrocytes, oligodendrocytes. Elles expriment à leur surface CD133, CD15 (considérés comme des marqueurs de cellules souches neurales), ainsi que CXCR4. Toutefois, ces marqueurs sont à utiliser avec précaution [Capela and Temple, 2002; Sutter, Yadirgi and Marino, 2007; Patru, Romao, Varlet *et al.*, 2010].

Elles sont localisées dans des **niches microvasculaires spécifiques** essentielles au maintien de la capacité d'autorenewement et de l'état indifférencié. Ces niches sont constituées de cellules endothéliales, provenant notamment de la différenciation de cellules souches neurales normales [Ricci-Vitiani, Pallini, Biffoni *et al.*, 2010].

### 2.2.2. Cellules souches de tumeurs cérébrales

#### 2.2.2.1. Origine

La première preuve de l'existence de cellules souches dans les tumeurs cérébrales humaines a été fournie par Ignatova *et al.* en 2002, à la suite de l'isolement de précurseurs formant des neurosphères à partir de glioblastomes humains [Ignatova, Kukekov, Laywell *et*

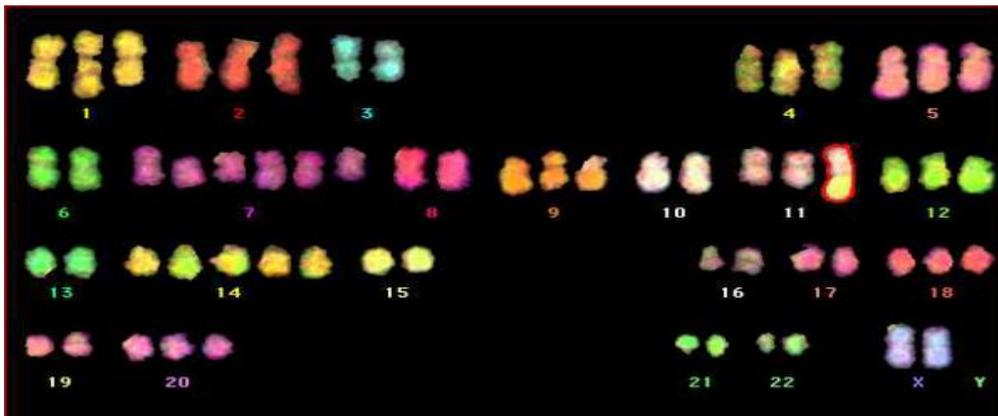
*al.*, 2002]. Les **cellules souches de tumeurs cérébrales** localisées au sein de la tumeur, ne représentent qu'une faible proportion des cellules tumorales.

Actuellement, leur origine n'est pas clairement définie, comme dans le cas des cellules souches cancéreuses en général [Sutter, Yadirgi and Marino, 2007; Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010].

#### 2.2.2.2. Propriétés et isolement

Les **cellules souches de tumeurs cérébrales** partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules souches neurales normales, notamment l'expression de **marqueurs de surface communs** (CD133, CD15 et CXCR4) [Capela and Temple, 2002; Singh, Hawkins, Clarke *et al.*, 2004; Sutter, Yadirgi and Marino, 2007; Patru, Romao, Varlet *et al.*, 2010], une capacité **d'autorenouvellement et de prolifération** à long terme (test des neurosphères), et une **multipotence**.

Ces cellules possèdent également des propriétés spécifiques. Elles sont dotées d'un **pouvoir tumorigène *in vivo***, et sont caractérisées par la présence d'**altérations génétiques et caryotypiques**. Dans ce contexte, un caryotype effectué chez un patient atteint d'un glioblastome, a mis en évidence de nombreuses anomalies, notamment la présence de 62 chromosomes (Figure 11) [Patru, Romao, Varlet *et al.*, 2010].



**Figure 11 : Altérations caryotypiques observée dans des cellules de glioblastome.**

Analyse chromosomique de cellules de glioblastome par hybridation *in situ* en fluorescence, révélant la présence de 62 chromosomes et de nombreuses anomalies, notamment une surexpression des chromosomes 7 et 14. D'après Patru, Romao, Varlet *et al.*, (2010).

Elles possèdent des propriétés de **différenciation aberrantes** (co-expression de marqueurs neuronaux ;  $\beta$ III tubuline et gliaux ; GFAP (protéine acide fibrillaire gliale)), et sont capables de former des cellules non-tumorigènes. De plus elles sont radio- et chimiorésistantes, il est donc essentiel de les cibler.

L'isolement ainsi que l'identification des cellules souches de tumeurs cérébrales demeurent complexes, mais peuvent s'effectuer grâce aux mêmes tests utilisés pour identifier les cellules souches cancéreuses en général [Vescovi, Galli and Reynolds, 2006].

Dans ce contexte, CD90 a été identifié comme un marqueur de cellules souches **cancéreuses**, notamment dans le cas des gliomes [He, Liu, Zhu *et al.*, 2012].

### 2.2.2.3. Voies moléculaires contrôlant l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches neurales adultes, implication dans le développement des tumeurs cérébrales

Il est intéressant de noter que les capacités d'autorenouvellement des cellules souches normales et des cellules souches cancéreuses, sont contrôlées par des voies moléculaires identiques, notamment dans le cas des tumeurs cérébrales. L'accumulation de mutations dans les cellules souches cancéreuses peut provoquer une activation inappropriée de ces voies et conduire au développement d'un cancer :

- La protéine BMI-1 (*B-cell specific Moloney murine leukaemia virus integration site 1*) permet de réguler l'autorenouvellement et la prolifération des cellules souches normales et cancéreuses. Elle agit en inhibant le locus *INK4a/ARF*, un suppresseur de tumeur. BMI-1 est surexprimée dans les médulloblastomes humains (tumeurs embryonnaires du tissu neuro-épithélial et tumeurs solides les plus fréquentes chez l'enfant) [Vescovi, Galli and Reynolds, 2006; Sutter, Yadirgi and Marino, 2007].
- La voie de signalisation Notch permet de maintenir un réservoir de cellules souches normales multipotentes dans le cerveau de souris adulte, en favorisant leur autorenouvellement et en inhibant leur différenciation. Une activation excessive de cette voie est retrouvée dans de nombreuses tumeurs humaines comme les leucémies, le cancer du sein, les gliomes (implication dans la radio-résistance des cellules souches), et enfin les glioblastomes [Fan, Khaki, Zhu *et al.*, 2010; Wang, Wakeman, Lathia *et al.*, 2010].
- La voie de signalisation Sonic hedgehog/Gli1 régule la croissance, la prolifération et la survie des cellules souches, en provoquant la transcription de gènes régulant le cycle cellulaire et de facteurs de croissance (cycline D1/ E, *c-Myc*, *EGF*, *PDGF $\alpha$* ). Des mutations dans cette voie sont responsables de la formation de médulloblastomes.
- La voie Wnt/ $\beta$ -caténine contrôle l'autorenouvellement des cellules souches en permettant la transcription de gènes impliqués dans l'entrée dans le cycle cellulaire et la prolifération (cycline D1, *c-Myc*). Cette voie intervient également dans la régulation de la neurogenèse adulte et dans la formation de gliomes ou de médulloblastomes [Vescovi, Galli and Reynolds, 2006; Sutter, Yadirgi and Marino, 2007].
- La signalisation BMP est impliquée dans la neurogenèse, plus spécifiquement dans l'astrocytogenèse. Les protéines BMP provoqueraient une perte du pouvoir tumorigène *in vivo* de cellules de glioblastomes humains [Piccirillo, Reynolds, Zanetti *et al.*, 2006].
- Le facteur OLIG2 est responsable de la prolifération des progéniteurs neuronaux durant le développement normal du système nerveux central. Il joue également un rôle essentiel dans la prolifération des cellules souches de gliomes en inhibant directement la protéine suppresseur de tumeur P21 WAF1/CIP1.
- Enfin le gène *PTEN* contrôle la prolifération, la croissance, la migration et la mort cellulaires en inhibant les voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/MAPK. Des mutations ou des délétions de ce gène sont fréquemment observées dans des tumeurs cérébrales dont le glioblastome, comme détaillé précédemment [Sutter, Yadirgi and Marino, 2007].

#### 2.2.2.4. Cellules souches de tumeurs cérébrales et microenvironnement tumoral

Les cellules souches de tumeurs cérébrales sont hébergées dans des niches hypoxiques et périvasculaires permettant des interactions étroites entre cellules souches et vaisseaux. Cette connexion entre cellules souches neurales et compartiment endothéliale semble être cruciale dans les glioblastomes. En effet, les cellules souches favorisent le développement de leur propre niche en augmentant l'angiogenèse *via* la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, principalement VEGF, *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) [Ricci-Vitiani, Pallini, Biffoni *et al.*, 2010].

Ce microenvironnement est essentiel au développement des tumeurs cérébrales, notamment il pourrait permettre aux cellules cancéreuses normales d'acquérir des propriétés souches. En effet, des auteurs ont montré qu'en maintenant des cellules non souches dans des conditions hypoxiques, elles pouvaient alors former des neurosphères. Cette reprogrammation de cellules somatiques différenciées en cellules souches, nécessite une augmentation de la régulation de certains facteurs Oct4, Nanog, c-Myc impliqués dans la survie et l'autorenouvellement des cellules souches de tumeurs cérébrales. Dans ces conditions, une thérapie ciblant uniquement les cellules souches cancéreuses serait insuffisante pour éradiquer une tumeur.

Le bevacizumab efficace dans le traitement du glioblastome, agit en ciblant le facteur VEGF induisant l'angiogenèse, et perturbe ainsi la niche périvasculaire des cellules souches cancéreuses. Une nouvelle piste serait de développer des inhibiteurs du facteur de transcription HIF2- $\alpha$  (*Hypoxia Inducible Factor-2 $\alpha$* ), impliqué dans l'adaptation des cellules à l'hypoxie intra-tumorale et dans la régulation de l'expression de VEGF [Heddleston, Li, McLendon *et al.*, 2009].

### 2.3. Un concept controversé

Les cellules souches cancéreuses ont été mises en évidence dans les cancers hématopoïétiques ainsi que dans de nombreuses tumeurs solides. Cependant, ce concept relativement nouveau, reste controversé au sein de la communauté scientifique.

Premièrement, l'isolement des cellules souches cancéreuses est contesté, certains auteurs remettant en cause la spécificité des marqueurs de surface utilisés pour les identifier. Des études sur les tumeurs cérébrales, ont décrit que seule la population de cellules CD133<sup>+</sup> possédait un pouvoir tumorigène, après implantation dans le cerveau de souris *non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency* (NOD/SCID) [Singh, Hawkins, Clarke *et al.*, 2004]. Ainsi, ce marqueur a longtemps été associé aux cellules souches de tumeurs cérébrales. Or il a été ensuite démontré par cytométrie en flux, que certaines de ces cellules n'exprimaient pas CD133, notamment en fonction de leur environnement. La même observation a été réalisée avec CD15 et plus récemment, CD90 [Patru, Romao, Varlet *et al.*, 2010; Woo, Oh, An *et al.*, 2015].

La présence de certains marqueurs de surface n'est donc pas un critère suffisant pour caractériser ces cellules particulières. Des tests complémentaires comme celui des neurosphères, doivent être réalisés.

Deuxièmement, cette théorie est discutée à cause de contraintes expérimentales, dont la principale est la fiabilité des modèles animaux utilisés. En effet, la meilleure manière de s'intéresser au potentiel tumorigène des cellules souches cancéreuses humaines, est de les transplanter dans des souris hautement immunodéprimées, notamment NOD/SCID. Classiquement, les cellules humaines sont transplantées dans ces modèles murins de manière hétérotopique, après inclusion dans du Matrigel en présence de différents facteurs de croissance. Ces conditions expérimentales diffèrent de la croissance des cellules tumorales au sein de leur niche originelle. Dans ce contexte, il existe un risque d'altération du comportement des cellules implantées, laissant planer le doute sur leur réel caractère de cellules souches. De plus, les greffes s'effectuant dans des modèles de plus en plus immunodéprimés, le potentiel tumorigène des cellules souches cancéreuses peut être surestimé. Afin de contourner ces problèmes, certains auteurs ont proposé d'exprimer des facteurs de croissance humains chez la souris, d'optimiser le site de transplantation puis de réévaluer dans ces conditions le potentiel tumorigène de ces cellules [Shackleton, Quintana, Fearon *et al.*, 2009].

Face à ces contraintes expérimentales, une preuve solide de l'existence des cellules souches cancéreuses serait de les observer de manière individuelle et de montrer leur implication dans la croissance tumorale, au sein de leur environnement natif *in vivo* (tumeur intacte). Dans ce contexte, une équipe de chercheurs a développé une nouvelle stratégie de traçage génétique, consistant à marquer aléatoirement des cellules tumorales de papillome, à l'aide de la protéine fluorescente YFP. Cette dernière est activée suite à l'administration de tamoxifène à des souris. La quantité de tamoxifène est déterminée afin de marquer uniquement quelques cellules cancéreuses, disséminées au sein de la tumeur (marquage à densité clonale). Ces cellules sont ensuite suivies individuellement au cours du temps. Si une cellule a proliféré, un îlot fluorescent ou « clone » sera observé à proximité, car il se compose de descendants également marqués. Grâce à cette technique, les chercheurs ont montré que la majorité des cellules tumorales marquées, ont une prolifération limitée et disparaissent après quelques semaines. Au contraire, une petite proportion se comporte comme des cellules souches : elles survivent à long terme, prolifèrent et engendrent des cellules formant des parties entières de la tumeur. De plus, ces cellules sont capables de se différencier en plusieurs types de cellules tumorales [EuroStemCell, 2010; Driessens, Beck, Caauwe *et al.*, 2012; Ligue contre le Cancer, 2015].

Au même moment, une autre équipe a observé, *in vivo*, chez des souris atteintes de glioblastome, la présence en faible proportion, de cellules capables de propager la tumeur après chimiothérapie [Chen, Li, Yu *et al.*, 2012].

D'autre part, l'efficacité des nouvelles thérapies basées sur l'éradication des cellules souches cancéreuses chez l'Homme, serait un argument fort en faveur de ce concept. Ce point sera détaillé ultérieurement.

En conclusion, le modèle des cellules souches cancéreuses demeure de nos jours controversé à cause de certaines limites portant principalement sur les techniques, les protocoles ainsi que les modèles expérimentaux utilisés pour identifier et isoler ces cellules. Toutefois, la recherche sur les cellules souches cancéreuses a été considérable au cours de cette dernière décennie, et cette théorie réunit de plus en plus d'adeptes au sein de la communauté scientifique. Ce concept est attractif car il laisse entrevoir la perspective d'éradiquer un jour définitivement, la prolifération des cellules cancéreuses.

#### **2.4. Résistance des cellules souches cancéreuses aux traitements conventionnels**

Cette perspective se heurte cependant à la capacité des cellules souches cancéreuses à échapper aux traitements conventionnels, par divers mécanismes.

Tout d'abord, ces cellules sont chimiorésistantes.

En effet, elles se divisent lentement et sont capables *in vivo* de se maintenir au sein des tumeurs dans un **état quiescent**, état qui les protège des molécules utilisées en chimiothérapie, agissant sur les cellules en prolifération. Grâce à cette propriété, elles peuvent à nouveau se propager, entraînant ainsi une rechute de la tumeur.

De plus, ces cellules expriment préférentiellement à leur surface des pompes d'efflux, notamment les transporteurs *ATP binding cassette* (ABC), qui vont expulser continuellement les médicaments dans le milieu extracellulaire. Ces cellules deviennent alors imperméables aux molécules utilisées en chimiothérapie [Frank, Margaryan, Huang *et al.*, 2005].

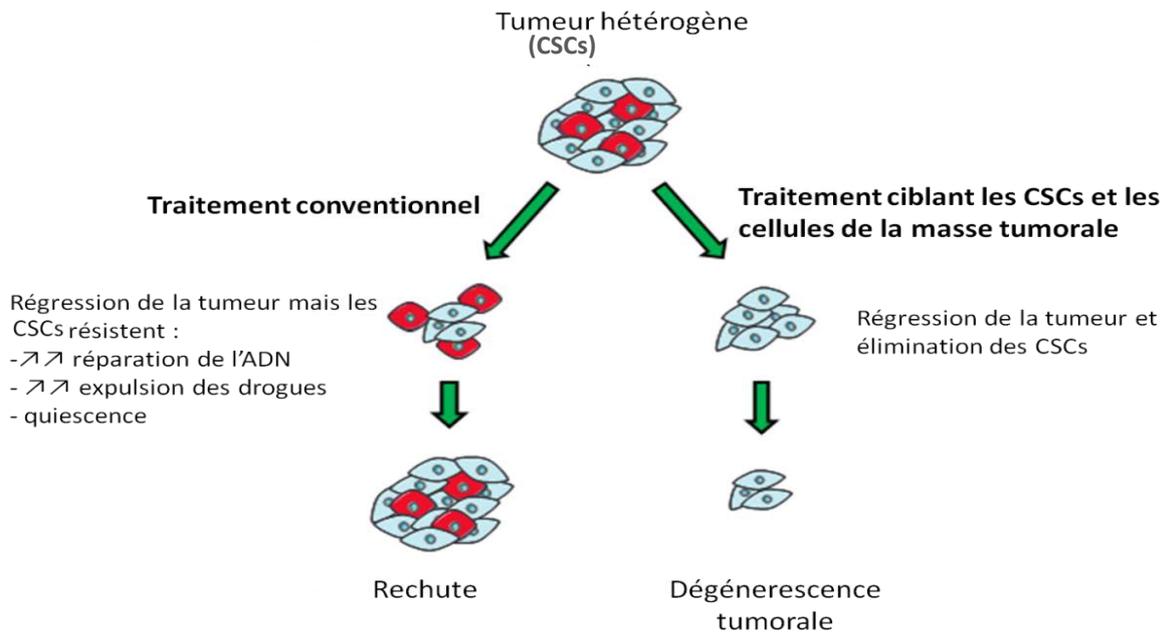
D'autre part, elles sont capables de se protéger des effets pro-apoptotiques engendrés par les chimiothérapies en sécrétant des protéines spécifiques, notamment la cytokine pro-inflammatoire IL-4 dans le cas des cancers du colon. En utilisant des anticorps pour inhiber IL-4, les cellules souches cancéreuses deviennent de nouveau sensibles à la chimiothérapie [Todaro, Alea, Di Stefano *et al.*, 2007].

Par ailleurs, ces cellules sont radiorésistantes.

En effet, elles sont capables de réparer très efficacement les dommages à l'ADN provoqués par la radiothérapie. Cette propriété a été mise en évidence dans les gliomes : à la suite d'une irradiation, les cellules capables de résister et d'être ainsi sélectionnées au cours du temps, sont les cellules exprimant CD133 à leur surface, considéré comme un marqueur de cellules souches neurales. Ce mécanisme de résistance impliquerait des protéines régulatrices des points de contrôle du cycle cellulaire, notamment CHK1 et CHK2 [Bao, Wu, McLendon *et al.*, 2006].

Les propriétés de chimio- et radiorésistances de ces cellules, peuvent également s'expliquer par une activation fréquente de voies de signalisation anti-apoptotiques dans de nombreuses tumeurs. Ainsi une amplification des voies PI3K/AKT, RAS/MAPK, Notch est fréquemment observée dans les glioblastomes, comme mentionné précédemment.

Par conséquent, les traitements conventionnels actuels des cancers, ciblant uniquement les cellules de la masse tumorale, ont une efficacité limitée. Dans ces conditions, il s'avère nécessaire de développer un traitement ciblant à la fois les cellules de la masse tumorale et les cellules souches cancéreuses afin d'éradiquer la tumeur à long terme (Figure 12) [Reya, Morrison, Clarke *et al.*, 2001; De Sousa, Guessous, Vermeulen *et al.*, 2011].



**Figure 12 : Nouveaux paradigmes pour le traitement du cancer.**

Les traitements actuellement disponibles (traitements conventionnels) cibleraient uniquement les cellules de la masse tumorale. Les cellules souches cancéreuses résisteraient, notamment parce qu'elles possèdent des capacités accrues de réparation de leur ADN et d'expulsion des drogues, et peuvent se maintenir au sein des tumeurs dans un état quiescent qui les protège des thérapies antiprolifératives. Grâce à leurs propriétés particulières (prolifération, multipotence), elles peuvent reconduire au développement tumoral, provoquant une rechute. Il est donc actuellement admis que pour être efficaces, les nouveaux traitements doivent cibler à la fois les cellules souches cancéreuses ainsi que les cellules de la masse tumorale (CSCs : Cellules souches cancéreuses).

## 2.5. Nouvelles thérapies ciblant les cellules souches cancéreuses

Actuellement, différentes stratégies thérapeutiques permettant de cibler les cellules souches cancéreuses, se développent.

Une première piste consiste à provoquer leur différenciation. De cette manière, ces cellules deviendraient à nouveau sensibles aux thérapies conventionnelles : il s'agit de la « sensibilisation » de la tumeur. Cette différenciation peut s'effectuer grâce à l'utilisation d'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA). Son efficacité en tant qu'agent anticancéreux, a été mise en évidence pour la première fois, dans le traitement de la leucémie aigüe

promyélocytaire. Cependant, ce dérivé de la vitamine A est responsable de nombreux phénomènes de résistance, limitant son utilisation en clinique [Tallman, Nabhan, Feusner *et al.*, 2002; Parisotto, Brodeur, Bhat *et al.*, 2006]

Il est également intéressant de cibler une protéine d'une voie de signalisation impliquée dans la tumorigénèse des cellules souches cancéreuses, notamment la voie Notch. Des inhibiteurs de  $\gamma$ -sécrétases ont ainsi été développés. Les  $\gamma$ -sécrétases, sont des protéines impliquées dans le clivage du récepteur Notch, permettant la libération du fragment *Notch intracellular domain* (NICD) qui pourra activer les protéines Notch ainsi que d'autres cibles. Des études ont montré que les inhibiteurs des  $\gamma$ -sécrétases diminuent le nombre de cellules souches dans les glioblastomes ainsi que leur pouvoir tumorigène, et inhibe la croissance des neurosphères. D'autre part, ils augmentent l'efficacité de la radiothérapie dans le traitement des gliomes, en sensibilisant les cellules souches aux radiations [Fan, Khaki, Zhu *et al.*, 2010; Wang, Wakeman, Lathia *et al.*, 2010].

Une autre stratégie consiste à cibler un ou plusieurs marqueurs spécifiques des cellules souches cancéreuses, non retrouvés chez les cellules souches normales, par exemple CD20 dans le cas du mélanome. Dans ce contexte, une étude réalisée en 2012 par Schlaak *et al.* a montré que l'utilisation du rituximab ou anticorps anti-CD20 chez un patient porteur d'un mélanome avancé, résistant à la chimiothérapie, a provoqué une régression de la tumeur [Schlaak, Schmidt, Bangard *et al.*, 2012]. Cette stratégie efficace demeure néanmoins complexe, la principale difficulté étant d'identifier et de s'assurer de la spécificité de ces marqueurs, comme décrit précédemment.

D'autre part, les transporteurs d'efflux sont fréquemment impliqués dans la résistance aux anticancéreux, notamment la pompe ABCB1 (ou glycoprotéine P). Actuellement, il existe de nombreux inhibiteurs de cette pompe, notamment la ciclosporine, un puissant immunosuppresseur diminuant le risque de rejet dans les greffes d'organes. Toutefois, un obstacle majeur à l'utilisation de ces composés est leur toxicité. En effet, ces pompes sont exprimées dans de nombreux tissus ainsi que dans les cellules souches normales. Il est donc essentiel de développer de nouveaux inhibiteurs spécifiques, dépourvus d'effets secondaires. Dans ce contexte, l'efficacité du PSC833 ou valdospar, un analogue de la ciclosporine A non immunosuppresseur, a été évaluée dans un essai clinique de phase III. Cet essai réalisé en combinaison avec la vincristine, la doxorubicine et la dexaméthasone chez des patients atteints de myélome multiple réfractaire, n'a montré aucun bénéfice réel. Au contraire, une augmentation de la toxicité a été observée [Friedenberg, Rue, Blood *et al.*, 2006]

Une nouvelle piste s'intéresse aux nanoparticules délivrant des agents chimiothérapeutiques (nanoformulation de doxorubicine). Elles présentent l'avantage d'être internalisées dans les cellules par endocytose, et non par diffusion passive. Cette propriété leur permettrait d'échapper aux transporteurs d'efflux, sous certaines conditions [Kunjachan, Rychlik, Storm *et al.*, 2013].

Par ailleurs, l'activité télomérase permet aux cellules souches cancéreuses de proliférer à l'infini. Elle est retrouvée dans de nombreux glioblastomes, et est associée à un pronostic sombre. Il est donc nécessaire de développer des inhibiteurs de télomérase. Dans ce contexte, l'effet de l'Imetelstat combiné à la radiothérapie, a été évalué dans un modèle orthotopique murin de glioblastome humain. Une diminution du volume tumoral ainsi qu'une augmentation de la survie ont été observées. De futurs essais cliniques évaluant l'efficacité de cette combinaison, sont nécessaires.

Toutefois, l'utilisation de ces inhibiteurs se heurte à plusieurs obstacles. L'activité télomérase n'est pas le seul mécanisme de protection des télomères existant. Le délai de survenue de l'effet antiprolifératif dépend de la taille initiale des télomères. Enfin, une importante toxicité peut survenir sur les cellules saines de l'organisme, possédant cette activité télomérase (cellules germinales, cellules souches) [Herbert, Pitts, Baker *et al.*, 1999; Ferrandon, Malleval, El Hamdani *et al.*, 2015].

Enfin, une dernière piste s'intéresse au développement de molécules agissant sur le microenvironnement des cellules souches cancéreuses, en réponse aux nombreux travaux soulignant son implication dans la croissance tumorale. Des inhibiteurs de l'angiogenèse sont ainsi développés, parmi eux l'anticorps monoclonal anti-VEGF bevacizumab ou Avastin® qui reste le plus efficace actuellement dans le traitement des glioblastomes [Vredenburgh, Desjardins, Herndon *et al.*, 2007 (a); Vredenburgh, Desjardins, Herndon *et al.*, 2007 (b); Van Meir, Hadjipanayis, Norden *et al.*, 2010].

En conclusion, les cellules souches cancéreuses, définies comme des cellules capables d'initier et de propager une tumeur dans des modèles animaux immunodéprimés ; ont été mises en évidence, *in vitro*, dans différents types de tumeurs dont les glioblastomes. Même si ce concept reste controversé au sein de la communauté scientifique, les récentes avancées notamment l'identification de ces cellules au sein de leur environnement naturel *in vivo*, corroborent cette théorie. L'existence d'une sous-population de cellules souches cancéreuses, capables de se maintenir dans un état quiescent au sein des tumeurs, implique l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques, combinant thérapies ciblées et traitements conventionnels, dans l'espoir de vaincre un jour un maximum de cancers.

## Chapitre II : Travail expérimental

---

# 1. Travail préliminaire au sein de l'UMR 7200

---

## 1.1. Contexte et thématique du laboratoire

Nous avons vu précédemment que les glioblastomes étaient les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus redoutables, notamment à cause de leur caractère infiltrant et de leurs bords diffus, empêchant une exérèse complète. De plus, les récurrences sont quasiment inévitables.

Actuellement, les traitements disponibles sont peu efficaces. Une des raisons est la présence de la BHE, limitant sérieusement le choix des agents chimiothérapeutiques. De plus, le glioblastome est constitué en majorité de cellules de la masse tumorale, mais également d'une petite proportion de cellules souches cancéreuses. Ces dernières sont capables d'échapper aux traitements anticancéreux conventionnels en se maintenant dans un état **quiescent**. Elles peuvent ainsi se propager, entraînant une rechute.

Il est donc indispensable de développer de nouveaux traitements ciblant à la fois les cellules de la masse tumorale et les cellules souches cancéreuses, afin d'éradiquer la tumeur à long terme, comme décrit précédemment.

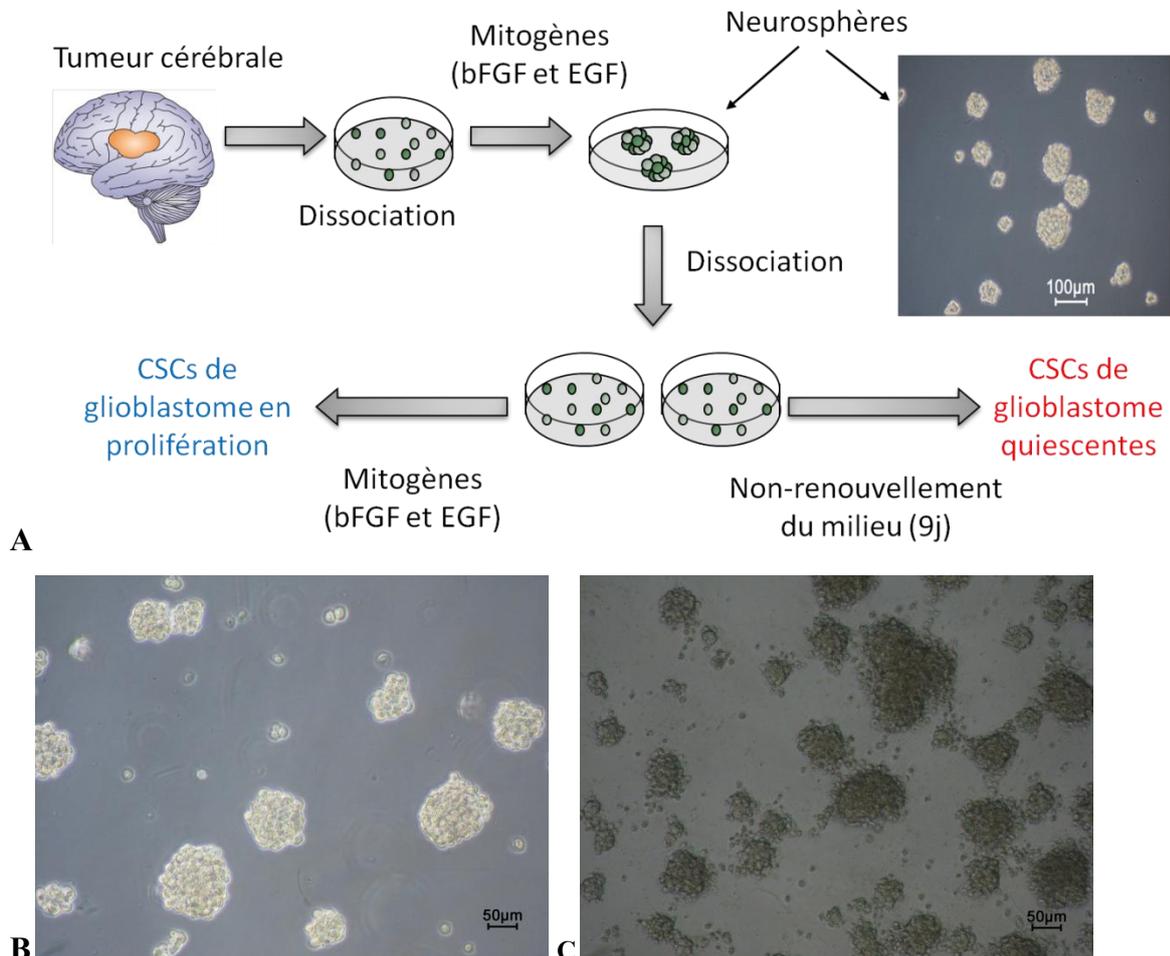
Dans ce contexte, un des premiers objectifs de mon équipe d'accueil au sein du laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200, Faculté de Pharmacie) a été d'identifier des composés actifs sur les cellules souches cancéreuses de glioblastome.

## 1.2. Développement et caractérisation d'un modèle d'étude *in vitro* de glioblastome

La première étape du projet a consisté à développer un modèle cellulaire d'étude de glioblastome, pertinent et représentatif. Pratiquement, des biopsies réalisées sur plusieurs patients atteints de cette tumeur (Hôpital Sainte-Anne, Paris, France), ont permis de collecter des cellules souches cancéreuses *in vitro* possédant différentes caractéristiques moléculaires, notamment les cellules TG1 auxquelles je me suis principalement intéressées au cours de mon stage. Ces cellules ont ensuite été caractérisées par l'équipe du Dr H. Chneiweiss (Neuroscience Paris Seine, Institut de Biologie Paris Seine, Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 8246, Inserm U1130, UMCR 18, Paris, France).

Tout d'abord, leur capacité de **prolifération** a été mise en évidence par le test des neurosphères. Ce test qui constitue notre modèle d'étude, consiste à dissocier les cellules prélevées lors des biopsies, puis à les cultiver dans un milieu contenant les facteurs de croissance bFGF et EGF, mais dépourvu de sérum. Dans ces conditions particulières, les seules cellules qui vont survivre à long terme et se propager en formant des neurosphères, sont les cellules cancéreuses qui possèdent des propriétés souches.

Le maintien de ces cellules dans du milieu frais en présence de ces facteurs de croissance, permet de propager les cellules en prolifération. Cependant, *in vivo*, les cellules souches se trouvent majoritairement dans un état quiescent. Dans notre modèle, cet état est obtenu en absence de renouvellement du milieu de culture pendant 9 jours (Figure 13).



**Figure 13 : Modèle cellulaire d'étude.**

**A)** Technique d'isolement des cellules souches de glioblastome à partir d'une biopsie (test des neurosphères)

**B)** Cellules TG1 en prolifération formant des neurosphères en suspension *in vitro*

**C)** Cellules TG1 quiescentes obtenues en absence de renouvellement du milieu de culture pendant 9 jours. Ces cellules forment également des neurosphères *in vitro*.

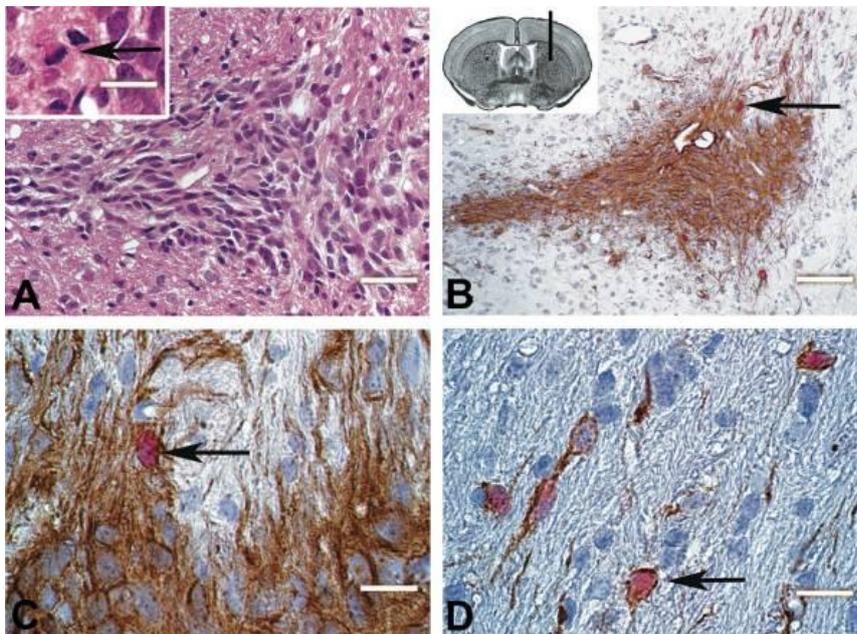
D'autre part, en ajoutant du SVF dans le milieu de culture, les différents types de cellules souches cancéreuses de glioblastome de notre modèle, sont capables de **se différencier** en neurones, astrocytes ou oligodendrocytes. Ces cellules différenciées vont alors adhérer aux parois de la flasque.

De plus, une analyse des **marqueurs de surface** effectuée par cytométrie en flux sur ces cellules souches cancéreuses, a permis de détecter CXCR4, normalement présent chez les progéniteurs neuronaux.

Par ailleurs, ces cellules expriment la nestine, une protéine des filaments intermédiaires retrouvée dans les cellules souches et progénitrices neurales, ainsi que le facteur de transcription Olig2, un marqueur de cellules progénitrices impliqué dans la différenciation oligodendrogliale. Elles expriment également les marqueurs de pluripotence Sox2, Oct4, et Nanog.

Une **analyse caryotypique** de ces cellules par hybridation *in situ* en fluorescence a mis en évidence de nombreuses **anomalies**, notamment une hypotriploïdie, une surexpression des chromosomes 7 et 14, des gains ou pertes sur différents chromosomes (Figure 11) [Patru, Romao, Varlet *et al.*, 2010].

Enfin, le **pouvoir tumorigène *in vivo*** a été évalué en déterminant la présence de cellules initiatrices de tumeur. Ce test consiste à greffer 200 à 1000 cellules souches cancéreuses de glioblastome de notre modèle, dans le cerveau de souris *nude*. Ces souris sont mises à mort 12 à 22 semaines post-greffe et une identification de la masse tumorale est ensuite réalisée par la coloration à l'hématoxyline/éosine. La présence de cellules humaines chez les souris greffées est révélée grâce à un anticorps reconnaissant uniquement la forme humaine de la vimentine (marqueur glial). Ces cellules sont capables de proliférer (comme le montre le marquage MCM2 : *minichromosome maintenance 2*) et de migrer loin du site d'injection. Ces observations sont en faveur de la présence de cellules initiatrices de tumeurs (Figure 14) [Patru, Romao, Varlet *et al.*, 2010; Zeniou, Feve, Mameri *et al.*, 2015].



**Figure 14 : Evaluation du pouvoir tumorigène *in vivo* de cellules souches cancéreuses de glioblastome après greffe dans le cerveau de souris immunodéprimées.**

A. Identification de la masse tumorale après coloration à l'hématoxyline-éosine

B. Identification de cellules humaines par un anticorps spécifique de la forme humaine de la vimentine (brun)

C-D. Identification de cellules humaines en prolifération par un double-marquage vimentine (brun) et MCM2 (rouge). L'image en D met en évidence la capacité des cellules humaines à migrer loin du site d'injection.

Barre d'échelle : 100 µm en B, 50 µm en A, 20 µm en C, D. D'après Patru, Romao, Varlet *et al.*, (2010).

### 1.3. Chimiothèque et criblage moléculaire

L'étape suivante a consisté à réaliser un criblage à l'aide d'une librairie constituée de 1120 molécules organiques : la chimiothèque commerciale de Prestwick<sup>®</sup>. Il s'agit de molécules toutes approuvées par la FDA et pour la plupart déjà commercialisées en tant que médicaments à usage humain. Leur structure chimique et leurs indications sont très variées. Cette approche appelée « reprofilage » ou « repositionnement », consiste à trouver une nouvelle cible pour un ancien médicament. Elle est utilisée pour des maladies ne disposant pas, actuellement, de traitement efficace.

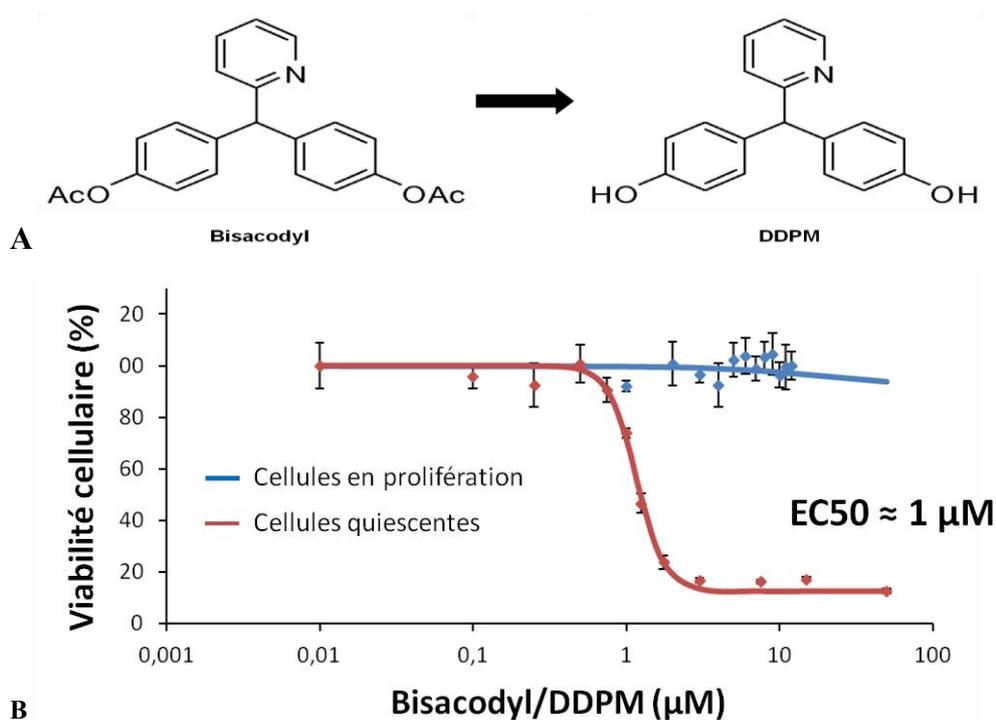
Dans notre cas, le but est de rechercher des composés inhibant la survie des cellules souches cancéreuses de glioblastome dans deux conditions, l'état prolifératif et l'état quiescent obtenu en absence de renouvellement du milieu de culture pendant 9 jours.

Pratiquement, des cellules souches TG1 en prolifération, ont été mises en contact avec chacun des 1120 médicaments composant la chimiothèque. Après 24 heures d'incubation, une mesure du taux d'ATP a permis d'évaluer la viabilité cellulaire. En parallèle, le même traitement a été réalisé avec des cellules TG1 quiescentes.

Parmi les 24 touches retenues, une molécule en particulier a retenu l'attention de l'équipe : le bisacodyl. Ce composé est actuellement utilisé comme laxatif dans le traitement de la constipation occasionnelle, et administré par voie orale.

Le bisacodyl présente un intérêt dans notre étude : en effet, il a un effet cytotoxique sur les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes (EC50 de 1  $\mu$ M), et n'affecte quasiment pas les cellules en prolifération (limitant les effets indésirables des chimiothérapies), ni les cellules non cancéreuses (astrocytes primaires, cellules souches neurales). Ce profil d'activité est intéressant parce que l'état quiescent semble représenter l'état *in vivo* de ces cellules, et que les cellules quiescentes sont particulièrement résistantes aux traitements. Dans le milieu de culture, le bisacodyl, pro-drogue, est rapidement hydrolysé pour former le DDPM (dihydroxydiphényl-pyridyl methane ou désacetylbisacodyl), son métabolite actif (Figure 15).

En tenant compte de ces résultats, nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement au mode d'action du DDPM sur les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes, en utilisant ce composé à une concentration de 10  $\mu$ M (nettement supérieure à l'EC50). En effet, dans ces conditions, la majorité des cellules quiescentes sont tuées.



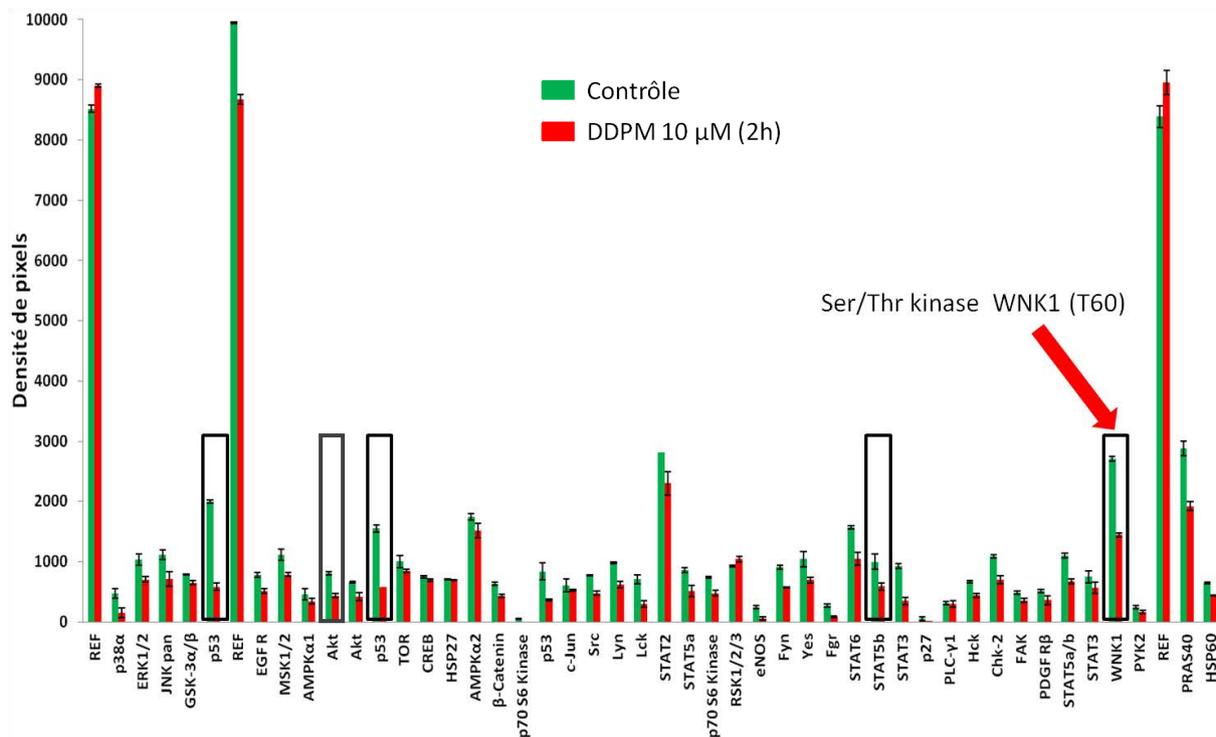
**Figure 15 : Le bisacodyl et son métabolite actif, le DDPM, ciblent les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes.**

**A)** Structure chimique du bisacodyl et de son métabolite actif, le DDPM.

**B)** Le bisacodyl (ou le DDPM) provoque la mort des cellules quiescentes avec un EC<sub>50</sub> (concentration produisant 50% de l'effet maximum) de 1 μM mais n'affecte pas les cellules en prolifération (temps d'incubation de 24 heures). Cet effet sur les cellules quiescentes est intéressant car l'état quiescent est l'état majoritaire des cellules souches cancéreuses *in vivo*. Cet état est une des causes de la résistance aux traitements anticancéreux actuels. D'autre part, la majorité des molécules utilisées habituellement en chimiothérapie, cible les cellules en prolifération.

#### 1.4. Etude des voies de signalisation perturbées par le DDPM

Afin d'identifier et étudier les voies de signalisation activées par le bisacodyl et le DDPM dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes, nous avons étudié l'effet de ces composés sur le niveau de phosphorylation d'un certain nombre de protéines, notamment des kinases retrouvées dans les principales voies de signalisation dérégulées dans les tumeurs à l'aide des *Human Phospho-Kinase Arrays (R&D systems®)*. Cette étude a permis de mettre en évidence des protéines dont la phosphorylation est modifiée par le DDPM dans les cellules souches de glioblastome en quiescence, notamment la *With No lysine (K) WNK1*, une sérine-thréonine kinase dont la phosphorylation diminue au niveau de son résidu thréonine 60 en présence du composé (Figure 16).



**Figure 16 : Etude de la phosphorylation de plusieurs protéines après traitement des cellules souches de glioblastome quiescentes par le bisacodyl, utilisation des *Human Phospho-Kinase Arrays* de *R&D Systems*<sup>®</sup>.** Le niveau de phosphorylation de 44 sites potentiellement phosphorylables situés dans 38 protéines différentes a été détecté sur une puce à la suite d'une stimulation ou non par le DDPM (10 μM pendant 2 heures, concentration nettement supérieure à l'EC50, permettant ainsi de tuer le maximum de cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes), puis analysé grâce au logiciel ImageJ. Dans ces conditions, le composé affecte le niveau de phosphorylation de plusieurs protéines dont AKT, et les facteurs de transcription P53 et STAT5b. Une diminution du niveau de phosphorylation de la kinase WNK1 au niveau de son résidu thréonine 60 est également observée à la suite du traitement avec le composé.

La kinase WNK1 appartient à une famille de 4 sérine-thréonine kinases (WNK1, 2, 3 et 4). Ces enzymes diffèrent des 7 autres familles majeures de kinases par une variation de séquence typique dans le domaine catalytique conservé : la perte de la lysine catalytique du sous-domaine II (K250) remplacée par une lysine alternative conservée du sous-domaine I (K233). Ce sont des protéines de grande taille constituées de 2382, 2297, 1743 et 1243 acides aminés et avec des masses moléculaires de 251, 243, 192 et 135 kDa, respectivement. Elles présentent une expression ubiquitaire [Moniz and Jordan, 2010].

Au laboratoire, nous avons choisi d'étudier plus en détail la voie de signalisation impliquant les kinases WNK pour plusieurs raisons.

Premièrement, ces kinases sont peu connues actuellement et seules quelques données de la littérature les relient à ce jour aux cellules souches cancéreuses.

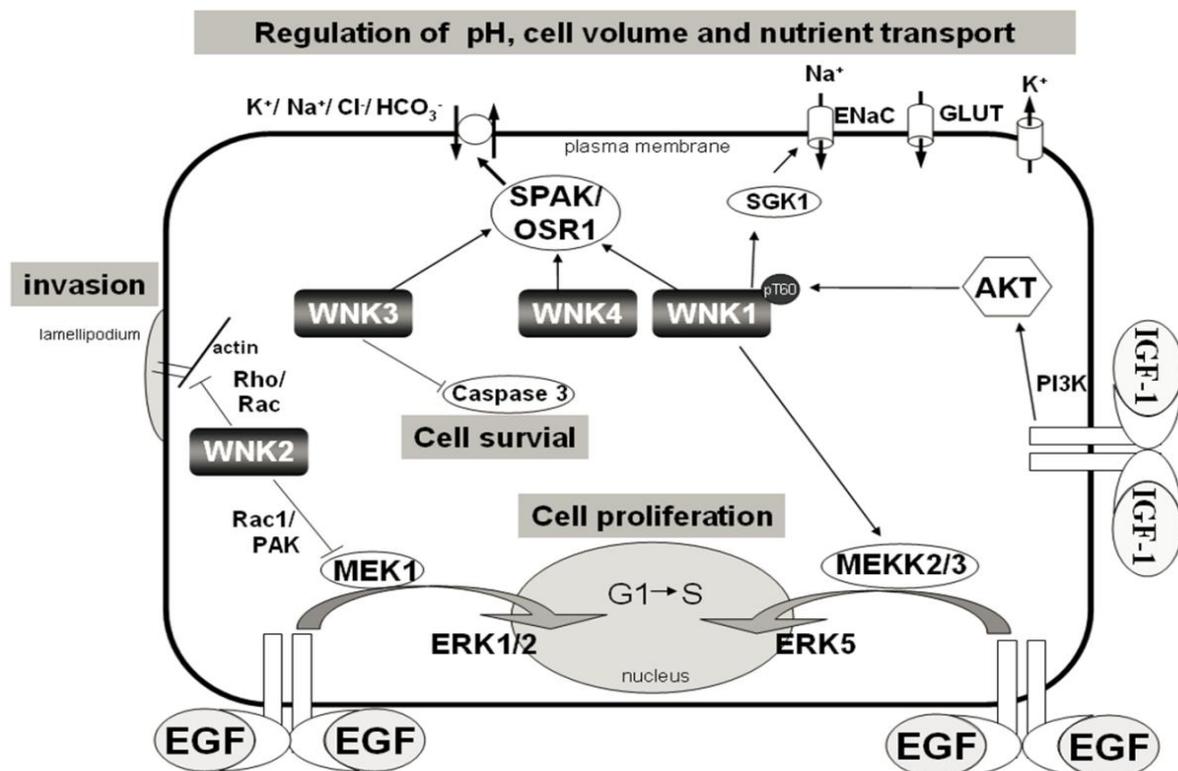
Deuxièmement, ces protéines sont impliquées dans le développement tumoral. En effet, des mutations des gènes *WNK* ou une surexpression de certains de leurs substrats, notamment NKCC1 (cotransporteur Na-K-Cl), ont été observées dans différents types de tumeurs dont les gliomes (Figure 17) [Moniz and Jordan, 2010]. De plus, ces kinases

interviennent dans la migration cellulaire en interagissant avec les protéines Rho-GTPases, ainsi que dans l'invasion cellulaire en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse *via* la voie TGF  $\beta$ . Elles contrôlent également la prolifération cellulaire (voie PI3K/AKT, signalisation MAP-kinases) et l'apoptose. Ces processus sont fréquemment dérégulés lors du développement tumoral (Figure 17) [Moniz and Jordan, 2010; McCormick and Ellison, 2011].

D'autre part, les kinases WNK sont impliquées dans la régulation de différents canaux ioniques et/ou cotransporteurs, intervenant notamment dans le pH et l'homéostasie des électrolytes au niveau des cellules tumorales [Richardson and Alessi, 2008].

Cette observation est corrélée avec le mode d'action du bisacodyl en tant que laxatif. En effet, ce dernier « augmente (...) la sécrétion intestinale d'eau, d'électrolytes » (Vidal), certainement *via* la régulation de différents canaux ioniques.

De plus, dans notre modèle d'étude de glioblastome, l'activité du DDPM dépend du pH extracellulaire, modulé à la suite de la mise en quiescence des cellules souches TG1.

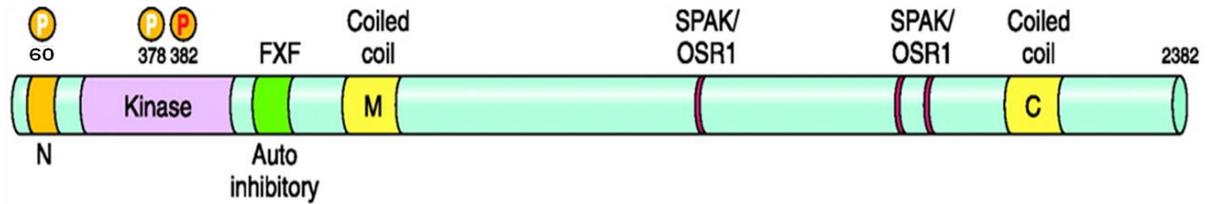


**Figure 17 : Vue d'ensemble des principaux processus cellulaires régulés par la voie de signalisation WNK et impliqués dans la biologie des cellules cancéreuses.**

Les voies impliquant les protéines WNK, AKT, SPAK et OSR1, permettent de réguler la prolifération, la survie cellulaires, le pH, le volume cellulaire ainsi que les processus de migration et d'invasion (schéma de Moniz and Jordan., (2010).

Les kinases WNK exercent leurs fonctions soit par l'intermédiaire d'interactions avec des effecteurs soit en phosphorylant leurs substrats. Leur propre activité est régulée par des phosphorylations sur plusieurs résidus. Notamment, la phosphorylation de WNK1 au niveau de la thréonine 60 (qui a été identifiée comme étant modifiée par le bisacodyl dans les cellules

souches de glioblastome quiescentes grâce aux *Human Phospho-Kinase Arrays (R&D systems®)*) ne semble pas affecter l'activité catalytique de l'enzyme mais plutôt ses interactions avec d'autres partenaires. L'activité phosphotransférase de WNK1 est modifiée par la phosphorylation de deux résidus sérine dans le domaine kinase, la sérine 378 et la sérine 382 (Figure 18) [McCormick and Ellison, 2011].



**Figure 18 : Représentation schématique des différents domaines de WNK1.**

La kinase WNK1 possède plusieurs régions hautement conservées. Le domaine kinase situé en N-terminal, le domaine auto-inhibiteur constitué de motifs FXF (phénylalanines séparées par un acide aminé dont le type peut varier), et enfin deux domaines *coiled-coil* situés au milieu et à l'extrémité C-terminale de la protéine. Trois résidus phosphorylables sont représentés, notamment la thréonine 60 à l'extrémité N-terminale, située en dehors du domaine kinase. Le rôle de sa phosphorylation n'est actuellement pas bien connu. Elle ne semble pas affecter son activité catalytique mais plutôt ses interactions avec d'autres partenaires. Enfin, les sérines 378 et 382 dont la phosphorylation est essentielle à l'activation de WNK1, sont situées dans le domaine kinase (schéma adapté de McCormick and Ellison., (2011)).

## 2. Travail personnel réalisé au sein de l'UMR 7200

---

### 2.1. Objectifs

Afin d'identifier et étudier les voies de signalisation activées par le bisacodyl et le DDPM dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes, des *Human Phospho-Kinase Arrays* ont été réalisés avant mon arrivée.

Au début du stage, notre but a été de confirmer ces résultats en étudiant par immunoblot, le niveau de phosphorylation de WNK1 au niveau de la thréonine 60, dans les cellules souches de glioblastome traitées avec le DDPM ou un dérivé inactif (LPI 2450 synthétisé par le Dr Songlin Niu, un des chimistes du laboratoire participant au projet).

Ensuite, l'objectif principal a été d'étudier plus en détail l'action du DDPM sur la voie de signalisation impliquant WNK1.

Ainsi nous nous sommes intéressés à l'effet de ce composé sur la phosphorylation de partenaires connus de WNK1, notamment la protéine kinase B (PKB) également dénommée AKT, agissant en amont.

Nous avons ensuite voulu déterminer plus précisément si le DDPM modifiait l'activité phosphotransférase de WNK1. Cette observation a été réalisée indirectement, en s'intéressant à 2 substrats connus de cette protéine, les kinases SPAK (*STE20 and SPS1-related Proline Alanine rich Kinase*) et OSR1 (*Oxidative Stress Response kinase 1*).

Enfin, WNK1 exerce ses fonctions dans la cellule en régulant différents canaux ioniques et/ou cotransporteurs, plus ou moins directement. Afin de déterminer l'implication éventuelle de certains de ces composés dans l'effet du DDPM, différents inhibiteurs ont été testés avant mon arrivée. Un seul d'entre eux s'est montré efficace, le composé S0859, un inhibiteur de cotransporteurs sodium bicarbonate NBC, notamment NBCe1. Nous avons donc voulu étudier plus précisément l'effet du DDPM sur les cellules souches de glioblastome à la suite de l'inhibition de ce cotransporteur.

Le but de ce travail est de permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité du DDPM. Ceci est un objectif à atteindre pour le développement de cette molécule en tant que nouveau candidat médicament dans le traitement du glioblastome.

## 2.2. Matériels et méthodes

### 2.2.1. Culture cellulaire

Les cellules TG1 sont des cellules souches cancéreuses issues d'un patient atteint d'un glioblastome (Hôpital Sainte-Anne, Paris, France). Ces cellules ont été isolées et caractérisées par l'équipe du Dr H. Chneiweiss, comme détaillé précédemment. Elles présentent toutes les caractéristiques attribuées habituellement aux cellules souches cancéreuses (Figure 10) [Patru, Romao, Varlet *et al.*, 2010]. Elles sont cultivées dans le milieu NS34 : DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) : F-12 (1:1) contenant les suppléments N2, G5 (qui contient le bFGF et l'EGF) et B27 (Invitrogen, France) selon le protocole établi par cette équipe. Dans ces conditions, ces cellules forment des neurosphères (Figure 13A). Leur temps de génération est d'environ 3 jours.

Remarque : Pour les expériences, des cellules de passage 20 à 30 sont utilisées.

Procédure de division des cellules : le passage des cellules est effectué deux fois par semaine. Les cellules en suspension sont collectées au moyen d'une pipette de 10 mL dans un tube Falcon de 50 mL et centrifugées pendant 5 minutes à 220 x g (1100 rpm) et à 21°C. Le surnageant, récupéré dans un autre Falcon de 50 mL, constituera le milieu conditionné. Le culot cellulaire est repris dans 1 mL de milieu conditionné et les sphères sont dissociées mécaniquement en effectuant 100 allers-retours avec une pipette 1000 réglée sur 400 µL.

Comptage des cellules : les cellules sont diluées dans un peu de milieu conditionné afin de ne pas avoir une suspension cellulaire trop dense. Pour le comptage, 20 µL de suspension cellulaire sont mélangés à 4 µL de bleu de Trypan puis déposés sur une cellule de comptage constituée d'une grille de 10 carrés (Fast-Read 102® Biosigma). La concentration cellulaire est calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Nombre de cellules/mL} = N/2 * 10^4 * (24/20)$$

avec N correspondant au nombre de cellules présentes dans un carré dont la dimension est de 1 mm<sup>2</sup> et le volume de 0,1 µL.

Le pourcentage de cellules mortes (cellules ne pouvant pas expulser le bleu de Trypan et qui restent bleues) est calculé à chaque passage.

Division des cellules : la suspension cellulaire restante est diluée avec du milieu conditionné afin d'obtenir une concentration de 2.5 x10<sup>6</sup> cellules/mL. 10% de milieu conditionné contenant les cellules à cette concentration sont ajoutés dans une flasque en présence de 90% de milieu frais. La suspension est incubée à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> sous atmosphère humide. Les cellules TG1 semblent « adhérer » beaucoup plus dans les flasques nouvellement utilisées que dans les flasques qui ont déjà servi pour la culture. La flasque utilisée lors du passage n'est donc changée qu'une fois par mois.

Mise en quiescence des cellules souches cancéreuses de glioblastome : les cellules en quiescence sont obtenues à partir de cellules en prolifération sans renouvellement du milieu de culture pendant 9 jours (Figure 13). Un test d'incorporation de l'EdU (5-éthynyl-2'-déoxyuridine) (*Click-iT™ EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit* de Invitrogen) est utilisé pour vérifier la quiescence. L'EdU est un nucléoside analogue de la thymidine. Il est incorporé à l'ADN pendant la phase S (phase de synthèse) du cycle cellulaire, comme le BrdU. Toutefois, la détection ne fait pas intervenir d'anticorps. Elle est basée sur une réaction click, une réaction covalente entre un azide (EdU) et un alcyne (Alexa Fluor 488) catalysée par du cuivre.

Pratiquement, après incubation des cellules en présence d'EdU pendant 24 heures, ces dernières sont fixées puis perméabilisées. L'Alexa Fluor 488 est ajouté : il s'agit de la réaction click. Le pourcentage de cellules en phase S est alors déterminé par cytométrie en flux, en mesurant la fluorescence émise par les cellules ayant incorporé l'EdU.

***Détermination préalable des 9 jours (temps de quiescence) :***

Le taux d'incorporation de l'EdU par les cellules TG1 viables, a été mesuré pendant 16 jours sans renouvellement du milieu de culture. Ce test a mis en évidence une faible prolifération cellulaire après 7 jours (15% environ). En parallèle, la viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide d'un marquage à la 7-aminoactinomycine D sur cette même période. Pendant les 9 premiers jours, un taux élevé (supérieur à 70%) a été observé, suivi d'une diminution (environ 40%) aux jours suivants. Ainsi, au bout de 9 jours, les cellules se divisent peu tout en conservant une bonne viabilité.

Remarque : Ce phénomène de quiescence est réversible. En effet, en réintroduisant les cellules quiescentes (9 jours sans renouvellement du milieu de culture), dans du milieu NS34 frais au 9<sup>ème</sup> et au 13<sup>ème</sup> jours, elles vont de nouveau proliférer (augmentation du taux d'incorporation d'EdU).

Les tests de prolifération et de viabilité cellulaires, la réversibilité de l'état quiescent ainsi que d'autres analyses complémentaires non détaillées ici (analyse du cycle cellulaire, absence de sénescence, d'apoptose et conservation du caractère souche des cellules TG1 après 9 jours sans renouvellement du milieu de culture), ont permis de s'assurer du caractère quiescent des cellules TG1 placées dans ces conditions particulières [Zenjou, Feve, Mameri *et al.*, 2015].

### 2.2.2. Extraction et quantification protéiques

Les extraits protéiques sont préparés à partir de cellules TG1 quiescentes (9 jours sans renouvellement du milieu). Les suspensions cellulaires sont collectées dans des tubes Falcon de 50 mL et centrifugées pendant 5 minutes à 220 x g (1100 rpm). Les culots cellulaires sont dissociés mécaniquement et comptés à l'aide de bleu de Trypan comme décrit ci-dessus.

Cinq millions de cellules au minimum sont nécessaires pour chaque condition et sont ajoutés dans une flasque T75 contenant du milieu conditionné afin d'obtenir un volume total de 10 mL. Ensuite elles sont stimulées avec le DDPM (0,1% de diméthylsulfoxyde (DMSO))

provenant de la société Sigma-Aldrich, son dérivé inactif, le LPI 2450 ; pendant 10 minutes, 30 minutes ou 2 heures. Dans les deux cas, le contrôle correspond aux cellules non traitées, incubées avec 0,1% de DMSO pendant 2 heures.

A la fin des traitements, les flasques sont transférées sur de la glace et les cellules récupérées sont centrifugées 5 minutes à 220 x g (1100 rpm) à 4°C. Le culot est lavé avec 10 mL de PBS (*Phosphate buffered Saline*) froid. Les cellules sont à nouveau centrifugées 5 minutes à 220 x g (1100 rpm) à 4°C. Le culot est ensuite repris dans une quantité de tampon RIPA complet (*RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) Lysis Buffer System:sc-24948, Santa Cruz Biotechnology*) ajustée en fonction du nombre de cellules (250 µL de Tampon RIPA complet pour 5 x 10<sup>6</sup> cellules). La composition de 1 mL de tampon RIPA complet est la suivante : 1 mL de tampon de lyse 1X ; 10 µL de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle, inhibiteur de protéases) à 200 mM ; 10 µL d'orthovanadate de sodium (inhibiteur de phosphatases) à 100 mM ; 10 µL de cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Le culot est passé plusieurs fois à travers une seringue de diamètre externe 23G (ou 0,60 mm) et laissé sur de la glace pendant 1 heure. Après une centrifugation à 20 800 x g (14000 rpm) pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant (extrait protéique total) est prélevé et les protéines qu'il contient sont quantifiées grâce au test *DC Protein Assay* de Bio-Rad. Ce dosage colorimétrique sur plaque 96 puits est une version améliorée de la méthode de Lowry, basée sur la réaction des protéines extraites avec une solution de tartrate de cuivre alcalin et le réactif de Folin (Annexe 3). L'absorbance à 750 nm, proportionnelle à la quantité de protéines présentes, est mesurée avec le lecteur de plaques *EnVision® Multilabel Plate Reader platform*. En parallèle, une gamme de concentration (0-0,2-0,5-0,8-1-1,6-2 mg/mL) d'albumine de sérum bovin (BSA) est réalisée.

### 2.2.3. Immunoblot

Dans cette expérience nous utilisons des extraits protéiques de cellules TG1 quiescentes préparés et quantifiés comme décrit ci-dessus.

20 µg de protéines de chaque échantillon sont d'abord mélangés au bleu de dépôt (composition finale après dilution : 60 mM Tris/HCl pH6,8, 5% glycérol, 1,7% SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), 100 mM DTT (dithiothréitol) et 0,002% de bleu de bromophénol) et sont chauffés à 95°C pendant 10 minutes puis séparés sur gel de polyacrylamide pré-coulé (4-15% de Bio-Rad) (migration pendant 25 minutes, 200V).

Un transfert est ensuite réalisé sur membrane PVDF (*polyvinylidene fluoride*) pendant 13 minutes (à 25V et 1,3A par gel), en utilisant l'appareil *Trans Blot Turbo* de Bio-Rad. Les membranes sont réactivées pendant une minute dans de l'éthanol pur, puis, bloquées dans une solution de *Tris Buffered saline* (TBS) 1x (50 mM Tris/HCl pH7,6, 150 mM NaCl), 0,1% *Tween 20*, contenant 5% de lait écrémé pendant 1 heure à température ambiante. Des anticorps primaires de lapin sont incubés avec les membranes pendant la nuit à 4°C sous agitation.

Les anticorps primaires anti-GAPDH (#5174 ; 1/10000), anti-WNK1 (#4979 ; 1/1000), anti-phospho WNK1 (thréonine 60) (#4946 ; 1/500), anti-SPAK (#2281 ; 1/500), anti-OSR1 (#3729 ; 1/1000), anti-AKT (#9272 ; 1/1000), anti-phospho-AKT (sérine 473) (#9271 ; 1/500) proviennent de la société *Cell Signaling Technology*.

Les anticorps primaires anti-phospho-SPAK (sérine 373) / phospho-OSR1 (sérine 325) (# 07-2273 ; 1/1000) ont été obtenus chez Millipore.

Le lendemain, les membranes sont lavées 4 fois consécutives pendant 10 minutes avec une solution de TBS 1x, 0,1% *Tween* 20, sous agitation.

Les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de Raifort HRP (anticorps de chèvre anti-lapin) sont dilués dans le tampon de blocage (1/10 000) et incubés avec les membranes pendant 1 heure à température ambiante.

Ensuite on effectue 4 lavages de 10 minutes de ces membranes avec une solution de TBS 1x, 0,1% *Tween* 20, sous agitation. Enfin la détection est réalisée grâce au kit de révélation *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (*GE Healthcare Life Science, Amersham*) et à l'appareil *ImageQuant LAS4000* (Annexe 4).

#### 2.2.4. Effet du composé S0859, un inhibiteur de cotransporteurs NBC, sur les cellules souches TG1 quiescentes

Dans cette expérience, les cellules TG1 quiescentes sont collectées dans des tubes Falcon de 50 mL et centrifugées pendant 5 minutes à 220 x g (1100 rpm). Les culots cellulaires sont dissociés mécaniquement, repris dans 3 mL de milieu conditionné puis comptés à l'aide de bleu de Trypan comme décrit dans le paragraphe II.2.2.1.

Les suspensions cellulaires sont ensuite diluées avec du milieu conditionné pour obtenir une densité de  $0.8 \times 10^6$  cellules/mL. 50  $\mu$ L de cellules sont déposés dans une plaque 96 puits (correspondant à 40 000 cellules quiescentes par puits) et incubés à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> sous atmosphère humide.

Une gamme de concentration du composé S0859 (0-50-75-100-125-150-175-200  $\mu$ M) (*Sigma-Aldrich SML0638 5 mg*) avec 1% de DMSO est réalisée à partir d'une solution stock à 20 mM. 50  $\mu$ L provenant de cette gamme sont déposés dans la plaque 96 puits préparée précédemment. Cette plaque est ensuite incubée pendant 24 heures à 37°C.

Le lendemain, 50  $\mu$ L de DDPM à 30  $\mu$ M (concentration finale de 10  $\mu$ M) sont ajoutés à la plaque qui est ensuite incubée pendant 24 heures à 37°C dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub>.

Une mesure de la viabilité cellulaire est alors réalisée grâce au kit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* de Promega. Cette méthode est basée sur la quantification d'ATP présente dans les cellules (marqueur de l'activité métabolique) (Annexe 5). La luminescence est mesurée avec le lecteur de plaques *EnVision® Multilabel Plate Reader platform*.

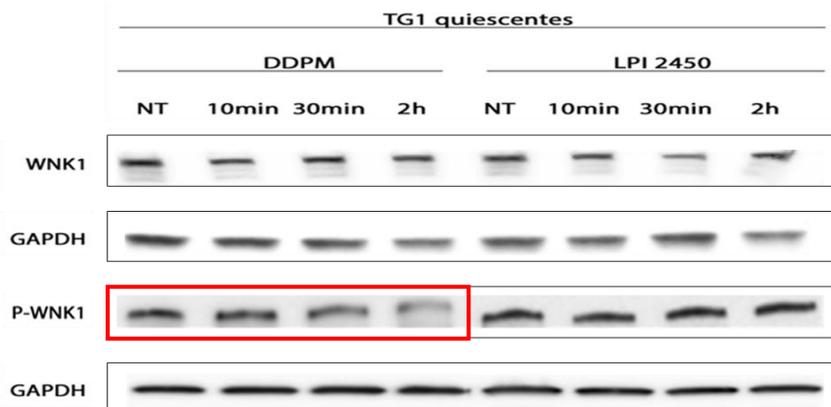
## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Etude du niveau d'expression et de phosphorylation de la thréonine 60 de WNK1 dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome, après traitement par le DDPM (immunoblot)

Les cellules souches cancéreuses retrouvées au sein des glioblastomes, sont en partie responsables de la résistance aux traitements. Afin de cibler ces cellules, un criblage moléculaire à l'aide de la chimiothèque commerciale de Prestwick<sup>®</sup>, a été réalisé avant mon arrivée. Il a permis de mettre en évidence le composé bisacodyl et son métabolite actif, le DDPM, comme des composés cytotoxiques uniquement sur les cellules souches de glioblastome quiescentes (Figure 15).

Pour identifier les voies de signalisation activées par le bisacodyl et le DDPM dans ces cellules, l'équipe a étudié l'effet du bisacodyl sur le niveau de phosphorylation d'un certain nombre de protéines, notamment des kinases retrouvées dans les principales voies de signalisation dérégulées dans les tumeurs (prolifération, survie, défense) à l'aide des *Human Phospho-Kinase Arrays* de la société *R & D Systems*<sup>®</sup>. Cette étude a permis de mettre en évidence des modifications de la phosphorylation de certaines protéines par le bisacodyl dans les cellules souches de glioblastome, notamment une diminution de la phosphorylation de la kinase WNK1 au niveau de son résidu thréonine 60 (Figure 16).

Ainsi, un des premiers objectifs de mon stage a été de confirmer les résultats des *Human Phospho-Kinase Arrays*, en étudiant la phosphorylation de WNK1 au niveau de la thréonine 60, dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome par immunoblot. Les extraits protéiques ont été préparés à partir de cellules TG1 quiescentes traitées avec 10  $\mu$ M de DDPM ou avec 10  $\mu$ M d'un analogue inactif du composé, la molécule LPI 2450, pendant 10 minutes, 30 minutes ou 2 heures. Un extrait préparé à partir de ces mêmes cellules non traitées (0,1% de DMSO) a été utilisé comme contrôle.



**Figure 19 : Niveau d'expression et de phosphorylation de la kinase WNK1 dans les cellules souches TG1 de glioblastome traitées avec le DDPM ou le dérivé inactif LPI 2450.**

Immunoblot réalisé sur des extraits protéiques de cellules TG1 quiescentes stimulées avec 10  $\mu$ M de DDPM (0,1% de DMSO) pendant 10 minutes, 30 minutes ou 2 heures, ou de ces mêmes cellules traitées avec 10  $\mu$ M du dérivé inactif LPI 2450. Le contrôle correspond aux cellules non traitées (NT), incubées avec 0,1% de DMSO pendant 2 heures. Le niveau d'expression de GAPDH permet de normaliser la quantité de protéines déposée pour chaque échantillon. Les résultats concernant WNK1 présentés sont représentatifs des données obtenues dans plusieurs expériences (au moins trois expériences indépendantes).

Comme montré dans la Figure 19, le niveau d'expression de WNK1 n'est pas modifié dans les cellules souches cancéreuses TG1 quiescentes, dans les différentes conditions de traitement avec le DDPM ou le composé LPI 2450 testées.

Par contre, une diminution du niveau de phosphorylation de la thréonine 60 de cette kinase est observée en fonction du temps de traitement, uniquement dans les cellules traitées avec le composé actif (encadré rouge).

Ces données ont permis de confirmer le résultat obtenu précédemment au laboratoire à l'aide des puces phosphoprotéiques *Human Phospho-Kinase Arrays* de *R & D Systems*<sup>®</sup>.

### 2.3.2. Etude du niveau d'expression et de phosphorylation de partenaires connus de WNK1 après traitement par le DDPM

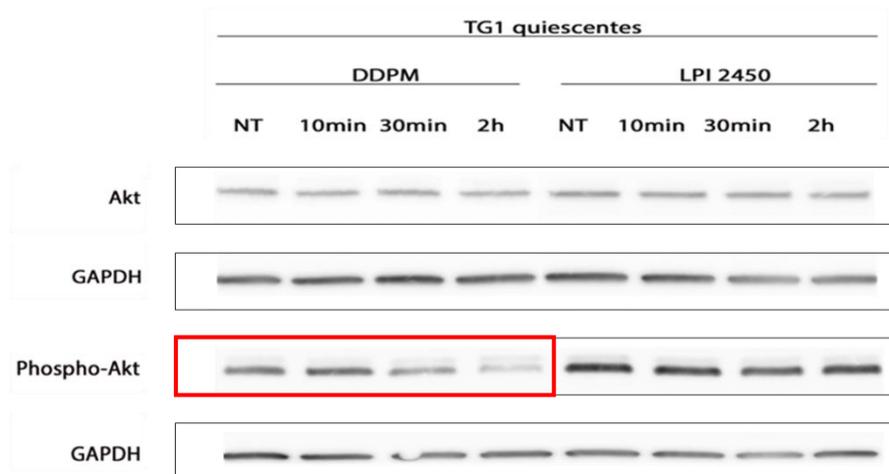
Nous avons montré ci-dessus que le DDPM diminue la phosphorylation de WNK1 au niveau de sa thréonine 60. Dans la littérature, la protéine kinase AKT a été identifiée comme étant une des kinases capables de phosphoryler ce résidu [McCormick and Ellison, 2011]. Dans ce contexte, nous nous sommes demandé si le DDPM pouvait également modifier l'activité de partenaires connus de la kinase WNK1.

Chez l'Homme, il existe 3 gènes de la famille AKT : *AKT1*, *AKT2*, et *AKT3* qui codent 3 isoformes protéiques : AKT1 ou (PKB $\alpha$ ), AKT2 ou PKB $\beta$ , AKT3 ou PKB $\gamma$ . AKT1 est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaires, en inhibant l'apoptose. AKT2 joue un

rôle dans la signalisation cellulaire de l'insuline, et est nécessaire au transport du glucose. Le rôle d'AKT3 est moins clair. Cette isoforme est majoritairement exprimée dans le cerveau.

L'activation d'AKT est amorcée par la phosphorylation de sa thréonine 450 par la kinase JNK (*c-Jun NH2-terminal Kinase*), permettant ainsi à PDK1 de phosphoryler la thréonine 308 située dans la boucle d'activation (domaine kinase) d'AKT. En parallèle, l'enzyme mTOR phosphoryle la sérine 473 dans la partie C-terminale d'AKT [Alessi, Andjelkovic, Caudwell *et al.*, 1996; Sarbassov, Guertin, Ali *et al.*, 2005; Jacinto, Facchinetti, Liu *et al.*, 2006]. La phosphorylation de ces 2 résidus est nécessaire à l'activation de cette kinase, et lui permet ainsi de réguler différentes cibles, notamment WNK1 en phosphorylant sa thréonine 60 (Figure 17).

Afin de vérifier si en présence du DDPM, le niveau d'expression d'AKT et le niveau de sa phosphorylation sur le résidu sérine 473 sont affectés, un immunoblot a été réalisé avec des anticorps adéquats. Les extraits protéiques ont été préparés à partir de cellules TG1 quiescentes traitées avec 10  $\mu$ M de DDPM ou 10  $\mu$ M du composé inactif LPI 2450 pendant 10 minutes, 30 minutes ou 2 heures, ou de ces mêmes cellules non traitées (0,1% de DMSO).



**Figure 20 : Niveau d'expression et de phosphorylation de la kinase AKT dans les cellules souches TG1 de glioblastome traitées avec le DDPM ou le dérivé inactif LPI 2450.**

Immunoblot réalisé sur des extraits protéiques de cellules TG1 quiescentes stimulées avec 10  $\mu$ M de DDPM (0,1% de DMSO) pendant 10 minutes, 30 minutes ou 2 heures, ou de ces mêmes cellules traitées avec 10  $\mu$ M du dérivé inactif LPI 2450. Le contrôle correspond aux cellules non traitées (NT), incubées avec 0,1% de DMSO pendant 2 heures. Le niveau d'expression de GAPDH permet de normaliser la quantité de protéines déposée pour chaque échantillon. Les expériences concernant la kinase AKT n'ont été effectuées qu'une seule fois lors de mon stage, mais ont été confirmées par la suite (au moins trois expériences indépendantes).

Comme montré dans la Figure 20, le niveau d'expression de la kinase AKT n'est pas modifié dans les cellules souches cancéreuses TG1 quiescentes, dans les différentes conditions de traitement avec le DDPM ou le composé LPI 2450 testées.

En revanche, une diminution du niveau de phosphorylation de la sérine 473 de cette kinase en fonction du temps de traitement, est constatée dans les cellules quiescentes traitées avec le

DDPM (encadré rouge). Ces résultats sont en adéquation avec ceux observés à l'aide des *Human Phospho-Kinase Arrays (R&D systems®)*.

Dans les cellules quiescentes traitées avec le composé inactif, le niveau de phosphorylation n'est pas altéré.

Donc la diminution du niveau de phosphorylation de la thréonine 60 de WNK1 observée précédemment, semble reliée à la diminution de la phosphorylation de la sérine 473 d'AKT.

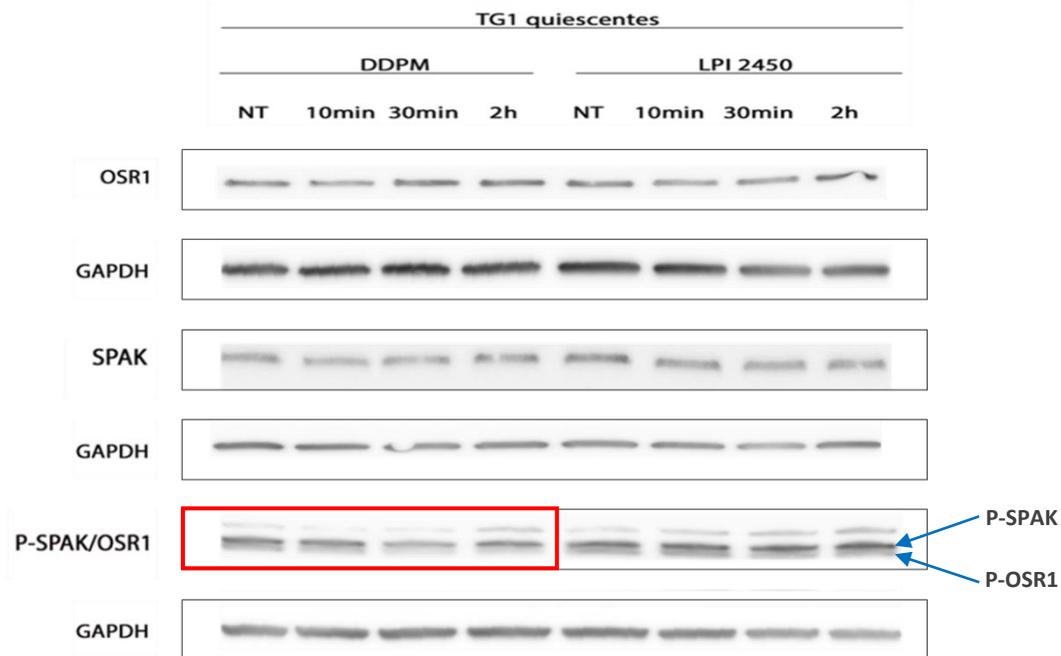
### 2.3.3. Etude de modifications éventuelles de l'activité kinase de WNK1 après traitement par le DDPM

La phosphorylation de WNK1 au niveau de sa thréonine 60, diminuée en présence du DDPM ; ne semble pas affecter son activité kinase, comme détaillé précédemment. Dans ce contexte, nous nous sommes demandé si le DDPM était également capable de modifier l'activité kinase de cette protéine.

La régulation de cette activité nécessite la phosphorylation des sérines 378 et 382 localisées dans le domaine kinase présent dans la partie N-terminale de WNK1 (acides aminés 221 à 449) [Moniz and Jordan, 2010; McCormick and Ellison, 2011]. A cause de la non-disponibilité d'anticorps commerciaux reconnaissant les formes phosphorylées de ces deux résidus sérine, nous n'avons pas pu mettre en évidence de variations de la phosphorylation de ces résidus. Nous nous sommes donc intéressés indirectement à l'activité kinase de WNK1, en observant l'effet du DDPM sur deux effecteurs connus de WNK1, les protéines kinases SPAK et OSR1.

En effet, la kinase WNK1 est impliquée dans la régulation du pH et du volume cellulaire à la suite de certains *stimuli* (stress osmotique) ; et son activation, dans ces conditions, va permettre la phosphorylation de SPAK (phosphorylation de la thréonine 233 située dans la boucle d'activation du domaine kinase et de la sérine 373) et OSR1 (phosphorylation de la thréonine 185 dans la boucle d'activation et de la sérine 325). Les kinases SPAK et OSR1 activées, régulent ensuite la fonction de différents canaux et transporteurs ioniques (Figure 17).

Afin d'observer si la phosphorylation de la sérine 373 de SPAK et de la sérine 325 d'OSR1 sont modifiées par l'action du DDPM dans les cellules souches cancéreuses TG1 de glioblastome, un immunoblot a été réalisé. Les extraits ont été préparés comme précédemment.



**Figure 21 : Niveau d'expression et de phosphorylation des kinases SPAK et OSR1 dans les cellules souches TG1 de glioblastome traitées avec le DDPM ou le dérivé inactif LPI 2450.**

Immunoblot réalisé sur des extraits protéiques de cellules TG1 quiescentes stimulées avec 10  $\mu$ M de DDPM (0,1% de DMSO) pendant 10 minutes, 30 minutes ou 2 heures, ou de ces mêmes cellules traitées avec 10  $\mu$ M du dérivé inactif LPI 2450. Le contrôle correspond aux cellules non traitées (NT), incubées avec 0,1% de DMSO pendant 2 heures. Le niveau d'expression de GAPDH permet de normaliser la quantité de protéines déposée pour chaque échantillon. Les résultats concernant SPAK et OSR1 présentés sont représentatifs des données obtenues dans plusieurs expériences (au moins trois expériences indépendantes).

Les données obtenues montrent que le niveau d'expression de SPAK et OSR1 ne varie pas dans les différentes conditions de traitement avec le DDPM testées.

En ce qui concerne le niveau de phosphorylation de ces deux kinases, une diminution est observée en fonction du temps de traitement avec le DDPM dans les cellules en quiescence. Cette diminution est suivie d'un retour au niveau initial de phosphorylation après 2 heures de traitement (encadré rouge). Ces variations sont plus marquées pour la kinase SPAK et ne sont pas observées quand les cellules souches de glioblastome quiescentes sont traitées avec le composé dépourvu d'activité cytotoxique (Figure 21).

Donc, il semblerait que le DDPM induise également des modifications de l'activité kinase de WNK1, en plus des variations de sa phosphorylation au niveau de la thréonine 60. Néanmoins, les cinétiques observées pour ces deux effets ne sont pas similaires.

#### 2.3.4. Etude de l'implication éventuelle de canaux/cotransporteurs substrats de WNK1, dans l'activité cytotoxique du DDPM

La kinase WNK1 exerce ses fonctions au sein de la cellule en agissant sur différents canaux ioniques et/ou cotransporteurs soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire des kinases SPAK et OSR1 (Figure 17). Afin de déterminer l'implication éventuelle de certains transporteurs ioniques dans l'effet cytotoxique du DDPM sur les cellules souches cancéreuses de glioblastome, Jihu Dong, doctorant au sein de l'équipe, s'est intéressé à des inhibiteurs des canaux NKCC (bumétanide), NCC (clopamide) ou du cotransporteur NBC (S0859 :  $C_{29}H_{24}ClN_3O_3S$ ). L'expérience a consisté à prétraiter les cellules TG1 quiescentes en présence de ces inhibiteurs (seuls et en combinaison), pendant 24 heures (à une concentration donnée), puis à ajouter 10  $\mu$ M de DDPM pendant 24 heures supplémentaires. Il a ainsi montré que seul le cotransporteur NBC semblait impliqué dans l'activité cytotoxique du composé.

Le transporteur NBCe1, un sous-type de transporteurs NBC, est un des substrats connus des kinases WNK1 et SPAK (Figure 17). Il appartient à la famille SLC4 et possède un rôle dans l'homéostasie acide-base, en régulant la sécrétion et l'absorption de bicarbonate, et donc le pH intracellulaire et extracellulaire [Theparambil, Ruminot, Schneider *et al.*, 2014].

Le gène *SLC4A4* code 5 variants d'épissage de NBCe1 : NBCe1-A prédominant dans les reins et les yeux, NBCe1-B dans le pancréas, le duodénum, le colon et d'autres tissus notamment le cerveau, NBCe1-C dont l'expression est principalement limitée au cerveau, NBCe1-D et E [Zhu, Kao, Azimov *et al.*, 2010; George Seki, 2012; Suzuki, Seki, Yamada *et al.*, 2012].

Dans les astrocytes, ce cotransporteur semble moduler l'excitabilité neuronale en régulant le pH localement.

L'activité de NBCe1 est inhibée suite à sa phosphorylation par SPAK. Cette inhibition nécessite l'intervention de WNK1, qui permet le recrutement de SPAK au niveau du cotransporteur. Le mécanisme sous-jacent, bien qu'actuellement inconnu, est indépendant de l'activité kinase de WNK1. Il pourrait impliquer la phosphorylation de sa thréonine 60, à l'origine de ses interactions avec d'autres partenaires [Yang, Li, So *et al.*, 2011; Hong, Yang, Shcheynikov *et al.*, 2013].

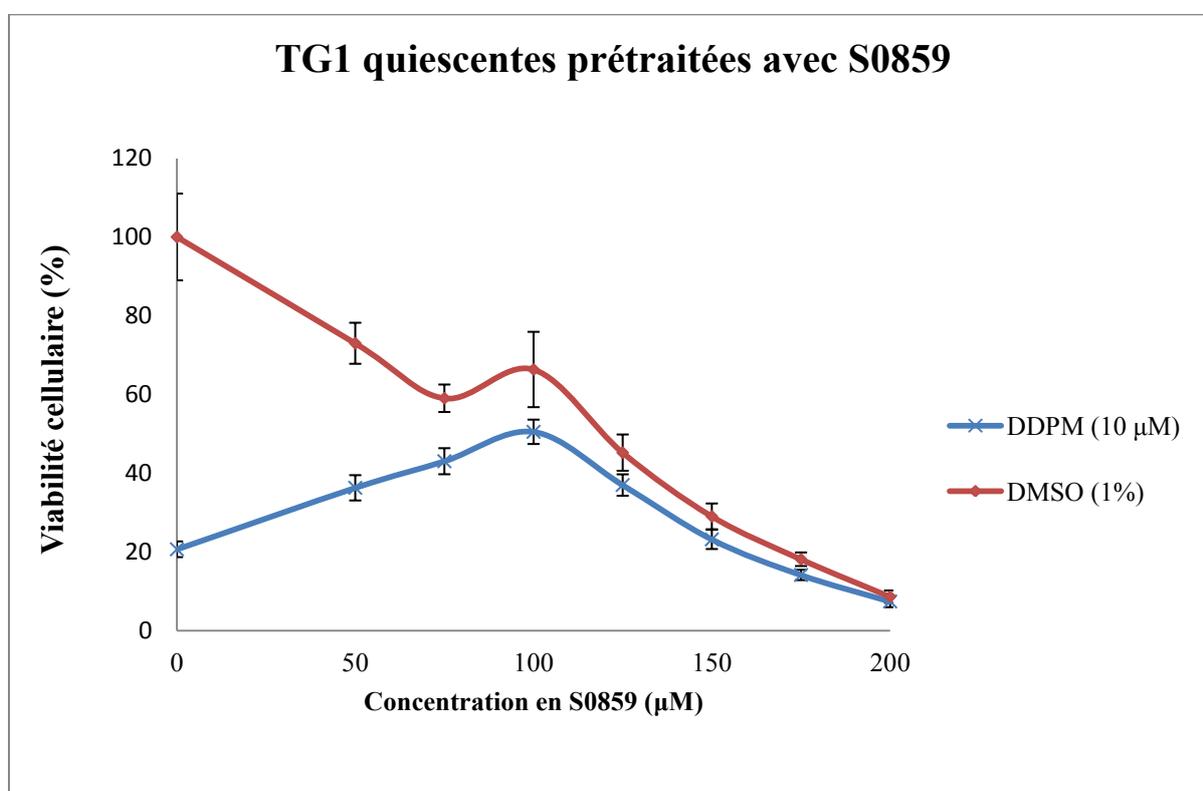
Afin de vérifier plus précisément si le DDPM nécessite l'activation du cotransporteur NBCe1 pour exercer son activité cytotoxique sur les cellules TG1 quiescentes, une expérience similaire à celle présentée ci-dessus, a été réalisée, en utilisant dans le cas présent, une gamme de concentration du composé S0859.

Pratiquement, les cellules ont été prétraitées avec cet inhibiteur à différentes concentrations pendant 24 heures, puis traitées pendant 24 heures supplémentaires avec 10  $\mu$ M de DDPM. Le contrôle utilisé est représenté par les cellules prétraitées pendant 24 heures avec l'inhibiteur, puis incubées en présence de DMSO (1%) pendant 24 heures supplémentaires.

Sur la Figure 22, on observe que le composé S0859 seul affecte partiellement la survie des cellules souches quiescentes à partir de 50  $\mu\text{M}$ .

Le traitement des cellules avec 10  $\mu\text{M}$  de DDPM, en absence de S0859, conduit à la mort des cellules souches de glioblastome quiescentes comme attendu d'après nos précédents résultats. Le prétraitement des cellules avec S0859 à des concentrations jusqu'à 100  $\mu\text{M}$  protège les cellules de l'effet cytotoxique du DDPM. Néanmoins, à des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{M}$ , la cytotoxicité de S0859 seul est trop importante et masque son effet protecteur.

Donc, l'activation du cotransporteur NBCe1 semble nécessaire à l'effet cytotoxique du DDPM. Ces données ont permis de confirmer les résultats préliminaires obtenus par Jihu Dong.



**Figure 22 : Effet du prétraitement des cellules souches de glioblastome quiescentes avec le composé S0859, un inhibiteur de cotransporteurs NBC dont NBCe1, sur l'activité cytotoxique du DDPM.**

Les cellules souches de glioblastome quiescentes sont prétraitées avec S0859 à différentes concentrations pendant 24 heures. Ce prétraitement est suivi d'un traitement pendant 24 heures supplémentaires avec 10  $\mu\text{M}$  de DDPM. Le contrôle utilisé est représenté par les cellules prétraitées pendant 24 heures avec différentes concentrations de S0859, puis incubées en présence de DMSO (1%) pendant 24 heures supplémentaires. Le taux d'ATP (marqueur de l'activité métabolique) dans chaque puits, qui peut être relié au nombre de cellules viables, a été mesuré à l'aide du kit *CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay* de Promega. La luminescence est mesurée avec le lecteur de plaques *EnVision<sup>®</sup> Multilabel Plate Reader platform*. Cette expérience est représentative de 3 expériences indépendantes ayant abouti au même résultat.

## 2.4. Discussion

Les cellules souches cancéreuses sont retrouvées dans de nombreuses tumeurs, notamment le glioblastome. Elles sont capables d'initier et de propager une tumeur dans des modèles animaux immunodéprimés, ainsi que d'entrer en quiescence, état qui les protège de la plupart des traitements anticancéreux actuels.

Avant mon arrivée, un criblage à haut-débit avait permis d'identifier le bisacodyl et son métabolite actif, le DDPM, comme des composés à activité cytotoxique envers les cellules souches de glioblastome en quiescence. De plus, ces composés n'affectent pas la survie des cellules saines utilisées comme contrôle (résultats non présentés). A cause de la résistance des cellules souches de glioblastome aux traitements conventionnels et de la difficulté à cibler plus particulièrement les cellules quiescentes, le profil d'activité du DDPM semble être extrêmement prometteur.

Le développement futur de ce composé en tant que nouveau candidat médicament suppose, entre autres, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans son activité. De plus, l'étude des voies de signalisation conduisant à la mort des cellules souches cancéreuses quiescentes permettrait de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques mis en œuvre dans ces cellules. Ceci pourrait aboutir au développement de nouvelles stratégies pour cibler efficacement ces cellules.

Afin d'identifier les voies de signalisation activées par le bisacodyl et le DDPM dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes, des *Human Phospho-Kinase Arrays* ont été réalisés. Ils ont permis d'étudier le niveau de phosphorylation de différentes kinases et de leurs substrats protéiques, en absence et en présence du bisacodyl. En effet, des dérégulations de la phosphorylation sont fréquemment observées dans de nombreux cancers, altérant les fonctions de nombreuses protéines. Cette étude a permis de mettre en évidence une diminution de la phosphorylation de la thréonine 60 de la kinase WNK1 à la suite du traitement avec le composé d'intérêt. Au cours du stage, nous avons tout d'abord confirmé ces résultats par immunoblot.

La phosphorylation de WNK1 au niveau de la thréonine 60 n'est pas reliée à l'activité kinase de cette protéine mais plutôt à ses interactions avec d'autres partenaires. En effet, la régulation de l'activité phosphotransférase de WNK1 implique la phosphorylation des sérines 378 et 382 localisées dans le domaine kinase présent dans la partie N-terminale de la protéine (acides aminés 221 à 449) [Moniz and Jordan, 2010; McCormick and Ellison, 2011].

Après avoir confirmé les résultats obtenus précédemment au laboratoire sur le niveau d'expression de WNK1 et sur le niveau de sa phosphorylation au niveau de la thréonine 60, nous nous sommes intéressés aux éventuelles modifications de l'expression et du niveau de phosphorylation d'autres protéines participant aux voies de signalisation impliquant WNK1.

La protéine AKT est une des kinases impliquées dans la phosphorylation de la thréonine 60 de WNK1. En effet, il a été montré dans les adipocytes 3T3-L1 et dans les cellules HEK 293, que cette protéine est capable d'interagir avec WNK1 et de phosphoryler son résidu thréonine 60. Ceci conduit à l'activation d'une autre protéine kinase, SGK1 (Serum-

and Glucocorticoid-induced Kinase 1). Cette dernière phosphorylerait à nouveau WNK1 amplifiant la signalisation de l'*Insulin-like Growth Factor I* (IGF-1). Ces événements moléculaires modèleraient la prolifération cellulaire (Figure 17) [Moniz and Jordan, 2010; McCormick and Ellison, 2011].

Les résultats obtenus suggèrent que de la même façon que pour WNK1, le niveau d'expression de la kinase AKT ne varie pas dans les différentes conditions testées. A l'inverse, le niveau de phosphorylation de cette kinase au niveau de son résidu sérine 473, situé dans le motif hydrophobe en C-terminal, semble diminuer en fonction du temps de traitement avec le DDPM. Cette diminution est bien corrélée avec la diminution de la phosphorylation de la thréonine 60 de WNK1 discutée ci-dessus. Donc, AKT pourrait être la kinase phosphorylant la thréonine 60 de WNK1 dans les cellules souches de glioblastome après une stimulation de ces cellules par le DDPM. Par manque de temps, nous n'avons pas pu répéter les expériences concernant AKT pendant mon stage, mais ces résultats ont ensuite été confirmés par des expériences supplémentaires.

Par ailleurs, SGK1 a été également impliquée dans la phosphorylation de ce résidu de WNK1 dans d'autres systèmes, à la suite de son activation par WNK1 elle-même (Figure 17). Cette activation semble médiée par la phosphorylation de la thréonine 256 de SGK1 située dans sa boucle d'activation et constituant le site cible de la kinase PDK1 [McCormick and Ellison, 2011]. Ainsi, il serait intéressant d'étudier par immunoblot, le niveau de phosphorylation de la thréonine 256 de SGK1, à la suite de l'action du DDPM sur les cellules souches cancéreuses de glioblastome.

La phosphorylation de WNK1 au niveau de sa thréonine 60, diminuée en présence du DDPM ; ne semble pas affecter son activité kinase. Ainsi, nous avons voulu déterminer si le DDPM entraînait également une modification de l'activité kinase de cette protéine. A cause de la non-disponibilité d'anticorps commerciaux reconnaissant les formes phosphorylées des sérines 378 et 382 essentielles à cette activité, nous n'avons pu réaliser cette observation que de manière indirecte. Ainsi, nous avons étudié l'effet du DDPM sur les kinases SPAK et OSR1, 2 substrats connus de WNK1. Nos résultats montrent que les profils d'expression de ces deux protéines restent constants dans les différentes conditions testées. En revanche, la phosphorylation de ces protéines sur des résidus cibles de l'activité kinase de WNK1, diminue pendant les temps de traitement relativement courts (jusqu'à 30 minutes) et revient à son niveau initial après 2 heures. Ces modifications de la phosphorylation de SPAK/OSR1 en présence du DDPM, à des sites connus pour être la cible des kinases WNK, suggèrent que l'activité kinase de WNK1 serait également modulée par le DDPM. D'autres expériences seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle éventuel de différents canaux ioniques et/ou cotransporteurs substrats de WNK1, dans l'activité cytotoxique du DDPM, dans les cellules souches de glioblastome quiescentes. Après une expérience préliminaire montrant que seul le cotransporteur NBC semblait intervenir dans l'activité cytotoxique du DDPM, nous nous sommes intéressés plus précisément à ce cotransporteur. Notre hypothèse était que si

l'effet cytotoxique du DDPM nécessitait l'activité de ce cotransporteur, S0859 exercerait un effet protecteur sur les cellules souches cancéreuses traitées avec ce composé. Les résultats observés dans les cellules souches de glioblastome quiescentes vont dans ce sens, et confirment les données de l'expérience préliminaire.

Il est intéressant de noter que toutes les modifications du niveau de phosphorylation des protéines étudiées, qui ont été observées après traitement des cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes avec le DDPM, ne sont pas présentes quand ces cellules sont traitées dans les mêmes conditions, avec un dérivé inactif du composé dépourvu d'activité cytotoxique. Des résultats similaires ont été observés dans les cellules souches de glioblastome en prolifération, qui sont également insensibles à l'activité du DDPM dans ces conditions (résultats non présentés). Ces résultats suggèrent que les modifications de la voie de signalisation de WNK1 observées en présence du DDPM, pourraient participer à l'action cytotoxique du composé.

Nous nous sommes alors demandé quels mécanismes, à l'échelle moléculaire, permettraient d'expliquer le lien observé entre la modulation de la voie de cette kinase provoquée par le DDPM, et la mort des cellules souches de glioblastome quiescentes induite par le composé.

Les kinases WNK phosphorylent et/ou interagissent avec de nombreuses protéines cibles, régulant ainsi leur activité. Actuellement, il existe peu de données dans la littérature sur cette famille de kinases, mais il a récemment été mis en évidence un rôle émergent de ces protéines dans plusieurs types de cancers [Moniz and Jordan, 2010] dont les gliomes. Elles interviennent notamment dans la migration, l'invasion, la prolifération cellulaires et l'apoptose (Figure 17) [Moniz and Jordan, 2010; McCormick and Ellison, 2011].

D'autre part, les kinases WNK sont impliquées dans la régulation de différents canaux ioniques et/ou cotransporteurs, permettant notamment de contrôler le pH et le volume cellulaire (Figure 17).

En effet, dans des conditions de stress osmotique ou d'hypertonie, la phosphorylation de WNK1 provoquerait l'activation des kinases SPAK/OSR1. Ces kinases activeraient les cotransporteurs NKCC et NCC (cotransporteur Na-Cl) et inhiberaient le cotransporteur KCC (cotransporteur K-Cl), afin de réguler le pH et l'homéostasie des électrolytes au niveau des cellules tumorales [Richardson and Alessi, 2008].

Cette observation est corrélée avec le mode d'action du bisacodyl en tant que laxatif. En effet, ce dernier « augmente (...) la sécrétion intestinale d'eau, d'électrolytes » (Vidal), certainement via la régulation de différents canaux ioniques.

Les kinases WNK1 et SPAK sont également responsables de l'inhibition du cotransporteur NBCe1, via sa phosphorylation [Yang, Li *et al.* 2011]. Dans le cerveau, NBCe1 semble moduler l'excitabilité neuronale en régulant localement le pH. En effet, la dépolarisation des cellules gliales à l'origine de l'excitation neuronale, entraîne une hausse du

calcium intracellulaire. Cette hausse activerait le cotransporteur provoquant une libération de protons dans le milieu extracellulaire. L'acidose extracellulaire résulterait alors l'excitabilité neuronale [Suzuki, Van Paesschen, Stalmans *et al.*, 2010, Hong, Yang, Shcheynikov *et al.*, 2013].

Le DDPM en modifiant la phosphorylation de la thréonine 60 de WNK1, pourrait ainsi diminuer les interactions de WNK1 avec ses partenaires, notamment SPAK. Ce dernier n'étant pas recruté au niveau de NBCe1, serait donc incapable d'inhiber l'activité de ce cotransporteur. Ainsi, les modifications de la voie de signalisation de WNK1 observées en présence du DDPM, provoqueraient la mort des cellules TG1. Cette mort cellulaire pourrait s'expliquer par 2 mécanismes. Tout d'abord, l'activation du cotransporteur NBCe1 observée en présence du DDPM, pourrait être à l'origine d'une importante accumulation de sodium dans le milieu interne, toxique pour les cellules TG1. Une autre hypothèse est que l'activation de ce cotransporteur en présence du DDPM, entraînerait une acidification du milieu extracellulaire. Ceci pourrait ainsi conduire à des perturbations de l'homéostasie du pH des cellules souches cancéreuses de glioblastome, qui seraient à l'origine de la mort cellulaire observée en présence du composé. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour préciser les mécanismes à l'origine de cette toxicité, notamment une mesure du pH à l'intérieur des cellules TG1 traitées avec le DDPM (sondes fluorescentes BCECF) [Yang, Li, So *et al.*, 2011; Hong, Yang, Shcheynikov *et al.*, 2013].

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la mise en quiescence des cellules *in vitro* conduit à l'acidification de leur milieu de culture ( $\approx$  pH 6,6), et que cette acidification est nécessaire pour l'activité du DDPM. En effet, d'autres résultats obtenus au laboratoire, montrent que si le pH extracellulaire des cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes est ramené à des valeurs physiologiques, l'activité cytotoxique du DDPM est diminuée. A l'inverse, les cellules souches cancéreuses de glioblastome en prolifération traitées avec le composé en conditions acides deviennent plus sensibles à son action. Notre hypothèse est que l'activité de WNK1 et de ses activateurs/effecteurs, serait nécessaire à la survie des cellules dans des conditions particulières comme le sont l'état quiescent et/ou l'acidité extracellulaire. Le DDPM diminuerait l'efficacité de ce système, conduisant à la mort cellulaire.

L'éventuelle perturbation de l'homéostasie du pH par le DDPM, est d'autant plus intéressante qu'au sein des tumeurs, les cellules souches cancéreuses sont capables de survivre dans les conditions défavorables d'acidité et d'hypoxie du microenvironnement tumoral, et voient leur caractère indifférencié et leur agressivité augmenter dans ces conditions [Heddleston, Li, McLendon *et al.*, 2009]. Le DDPM, en perturbant la voie de WNK1 pourrait empêcher les cellules de s'adapter à ces environnements hostiles, et conduire à leur élimination.

## 2.5. Analyse critique

Le travail réalisé au cours de mon stage est fondé sur l'existence de cellules souches cancéreuses au sein des glioblastomes. Nous avons vu précédemment que le concept de cellules souches cancéreuses restait controversé au sein de la communauté scientifique (paragraphe I.2.3). Ainsi peut se poser la question de la validité de notre modèle d'étude cellulaire.

D'autre part, différents outils méthodologiques ont été utilisés afin d'étudier l'effet du DDPM sur les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes. Ces outils présentent certaines limites qu'il paraît important de préciser.

### 2.5.1. Outils méthodologiques

Après identification du bisacodyl et de son métabolite actif, le DDPM, par criblage à haut-débit, une des premières étapes au laboratoire, a consisté à étudier les voies de signalisation perturbées par le bisacodyl à l'aide des *Human Phospho-Kinase Arrays* (R&D systems®). Ces puces permettent de détecter simultanément les niveaux de phosphorylation relatifs de 44 sites situés dans 38 protéines différentes. Leur conception a donc limité notre étude à certains sites de phosphorylation situés dans certaines protéines spécifiques. De plus, leur coût (645 € le kit) ne nous a permis de tester qu'un certain nombre de conditions (contrôle et bisacodyl pendant 2 heures).

Ensuite, des expériences d'immunoblot nous ont aidés à confirmer les résultats obtenus à l'aide des *Human Phospho-Kinase Arrays*, puis à étudier plus précisément les voies de signalisation de WNK1 dans les cellules souches de glioblastome. Une des principales limites de cette technique est la qualité des anticorps utilisés. Ainsi, il est nécessaire de s'assurer de leur spécificité, notamment par immunoblot.

D'autre part, nous avons été restreints dans notre étude par la non-disponibilité commerciale de certains anticorps dirigés contre les sérines 378 et 382 du domaine kinase de WNK1. Ces anticorps nous auraient permis de détecter des variations de l'activité kinase de la protéine directement par immunoblot.

La dernière partie de notre investigation a consisté à étudier l'effet du DDPM sur les cellules souches de glioblastome, à la suite de l'inhibition de cotransporteurs NBC, notamment NBCe1. Pour y parvenir, nous avons utilisé un test de viabilité cellulaire (*CellTiter-Glo® Cell Viability Assay* Promega) permettant de déterminer le nombre de cellules viables en culture en se basant sur la mesure du taux d'ATP. Cependant, l'ATP est un marqueur de l'activité métabolique, et une baisse de cette activité n'est pas nécessairement corrélée à la mort cellulaire. Il s'avère donc nécessaire de confirmer le pourcentage de viabilité par une autre approche, notamment un test au bleu trypan, le test MTT (sel de tétrazolium), ou par des tests de détection de l'apoptose (Annexine 5, caspase 3...).

### 2.5.2. Modèle d'étude

Actuellement, la théorie des cellules souches cancéreuses demeure controversée au sein de la communauté scientifique. Dans ce contexte, il est essentiel de s'assurer que nos cellules possèdent toutes les caractéristiques fonctionnelles définissant les cellules souches. Nous avons ainsi détaillé précédemment les différentes analyses réalisées par l'équipe du Dr H. Chneiweiss pour définir les cellules souches cancéreuses de glioblastome provenant de plusieurs patients, notamment les cellules TG1 utilisées lors de mon stage (paragraphe II.1.2.).

D'autre part, nous pouvons nous interroger sur la représentativité du modèle *in vitro* par rapport à la croissance tumorale *in vivo*, notamment en ce qui concerne les caractéristiques de ces cellules souches sorties de leur microenvironnement naturel. Ainsi ces cellules humaines en culture risquent de perdre une partie de leurs potentialités (paragraphe I.2.3). Dans ce cas, sommes-nous toujours capables de reproduire *in vitro* l'hétérogénéité observée entre les différents patients atteints de glioblastome ?

Une autre contrainte est liée à la plasticité des cellules souches. En effet, à un instant donné, la population présente au sein de nos cultures n'est pas forcément homogène, des cellules possédant des propriétés souches pouvant côtoyer des progéniteurs plus ou moins différenciés. De plus, nos cellules pourraient subir d'éventuelles modifications de leurs caractéristiques au cours des passages, notamment d'un point de vue génétique.

Afin de pallier ces limites, une caractérisation fonctionnelle régulière des cellules est réalisée, et ces cellules sont utilisées à des passages bien définis : 20 à 30. En dessous du passage 20, leur nombre est insuffisant pour permettre des manipulations, au-delà de 30, les cellules subissent des modifications génétiques, notamment une amplification ou des délétions de régions localisées sur le chromosome 7.

Par ailleurs, un point capital pour la valorisation du DDPM, est de développer des modèles d'étude de l'efficacité de ce composé *in vivo*.

Le modèle *in vivo* classique de développement de glioblastomes, est un modèle orthotopique consistant à injecter dans le cerveau de souris immunodéprimées (*Nude*, *NOD/SCID*), les cellules de la lignée humaine U87, obtenue à partir d'un patient de 44 ans atteint d'un glioblastome primaire. Après quelques semaines de développement tumoral, un ou plusieurs anticancéreux sont administrés afin d'étudier leur capacité à diminuer la taille de la tumeur. Ce modèle présente peu d'intérêt dans notre cas, le DDPM étant très peu actif sur les cellules U87. C'est pourquoi deux modèles plus pertinents sont proposés ; un modèle ectopique et un modèle orthotopique, développés à partir des cellules TG1.

Le modèle ectopique consiste à injecter dans le flanc de souris immunodéprimées, une petite quantité de cellules souches cancéreuses de glioblastome TG1, préalablement cultivées *in vitro* en présence de bisacodyl. Après 21 jours, un marquage à la vimentine permet d'observer l'efficacité du composé, en fonction de la présence ou de l'absence d'un développement tumoral.

Le second modèle est un modèle orthotopique dans lequel une petite proportion de cellules souches cancéreuses de glioblastome TG1, est directement injectée dans le cerveau de

souris immunodéprimées. La tumeur se développe pendant environ 6 mois. Ensuite, le bisacodyl seul ou associé à d'autres anticancéreux, est administré à la souris afin d'observer son efficacité. Une des limitations de ce modèle est le temps de formation des glioblastomes.

Enfin une limitation principale au développement de médicaments agissant au niveau cérébral, est la capacité de ces molécules à franchir la BHE afin d'exercer leurs effets. Pour être efficace, le DDPM doit parvenir au sein du glioblastome afin de cibler les cellules souches cancéreuses. Dans ce contexte, une injection intra-péritonéale de 300 mg/kg 2 fois par jour chez la souris, a mis en évidence une absence de toxicité (notamment une absence d'effets laxatifs) et la présence d'une concentration moyenne de 1,4  $\mu\text{M}$  (supérieure à l'EC50 de 1  $\mu\text{M}$ ) dans le cerveau après 6 heures, témoignant de la traversée de cette BHE par le DDPM.

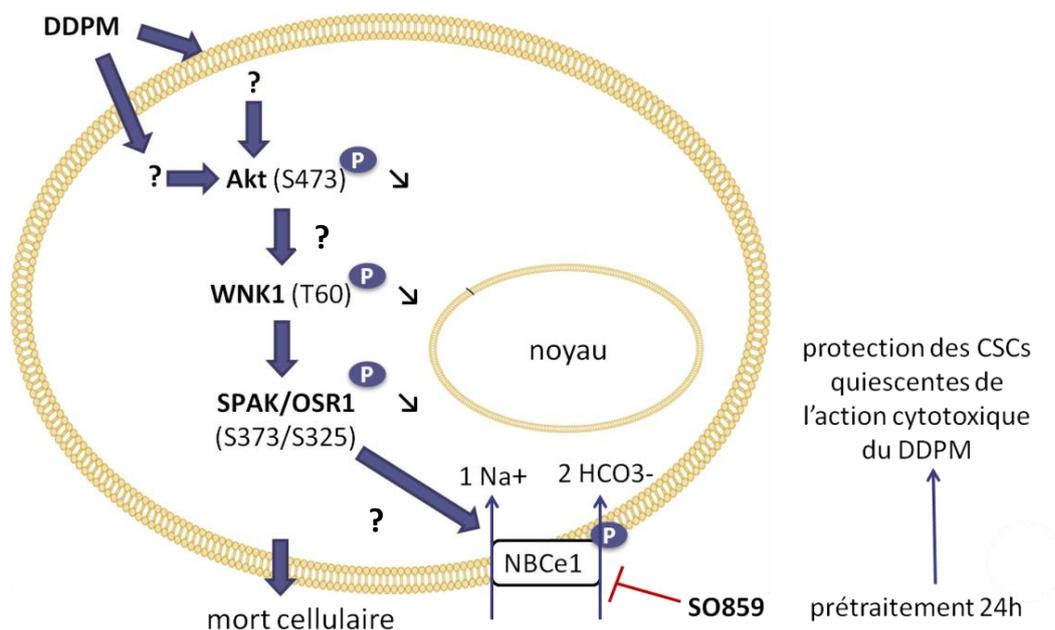
### 3. Conclusion et perspectives du travail expérimental

#### 3.1. Conclusion : Modèle proposé pour l'action du DDPM

La synthèse des différents travaux réalisés au cours de mon stage nous a permis de proposer un modèle d'action du DDPM.

Les observations actuelles sont insuffisantes pour déterminer la manière dont ce composé commence à exercer son effet cytotoxique sur les cellules souches cancéreuses quiescentes de glioblastome. En effet, il pourrait soit interagir avec des protéines situées à la surface de la membrane plasmique des cellules quiescentes ; soit pénétrer directement à l'intérieur de ces dernières par un mécanisme encore inconnu, provoquant à terme, la mort de ces cellules.

Toutefois, les diverses manipulations réalisées ont montré, en présence de ce composé, une diminution de la phosphorylation de la thréonine 60 de WNK1, ainsi que de la sérine 473 d'AKT, un partenaire de WNK1 agissant en amont. La diminution de la phosphorylation des sérines 373 et 325 de SPAK et OSR1 respectivement, a permis de mettre en évidence des modifications de l'activité kinase de WNK1 en présence du DDPM. Enfin, en inhibant le cotransporteur NBCe1, un substrat de SPAK et WNK1, par l'intermédiaire du composé S0859, les cellules quiescentes sont partiellement protégées de l'activité cytotoxique du DDPM (Figure 23).



**Figure 23 : Modèle proposé pour l'action du DDPM.**

Une perturbation de la voie de signalisation impliquant la kinase WNK1 et certains de ses partenaires : les kinases AKT, SPAK/OSR1 ainsi que le cotransporteur NBCe1 ; est observée à la suite de l'action du DDPM sur les cellules souches cancéreuses (CSCs) de glioblastome quiescentes. Les mécanismes à l'origine des modifications observées dans cette voie, sont actuellement inconnus.

Ainsi nous avons pu mettre en évidence la perturbation d'une voie de signalisation impliquant la kinase WNK1 et certains de ses partenaires : les kinases AKT, SPAK/OSR1 ainsi que le cotransporteur NBCe1, à la suite de l'action du DDPM sur les cellules souches cancéreuses TG1 quiescentes. Les manipulations futures doivent permettre de préciser le mécanisme d'action de ce composé au sein de cette voie, mais également son implication éventuelle dans d'autres voies de signalisation.

### 3.2. Perspectives

Les résultats présentés ont permis d'impliquer la signalisation de WNK1 dans l'action cytotoxique du DDPM, dans les cellules souches de glioblastome TG1 dérivées de la tumeur d'un patient. Au laboratoire, des cellules souches cancéreuses de glioblastome provenant d'autres patients sont disponibles. Le DDPM a également une activité cytotoxique envers ces cellules, qui possèdent chacune des caractéristiques moléculaires propres, d'où l'intérêt de ce composé. Ainsi, il est prévu de vérifier si les mêmes perturbations de signalisation sont observées dans ces cellules.

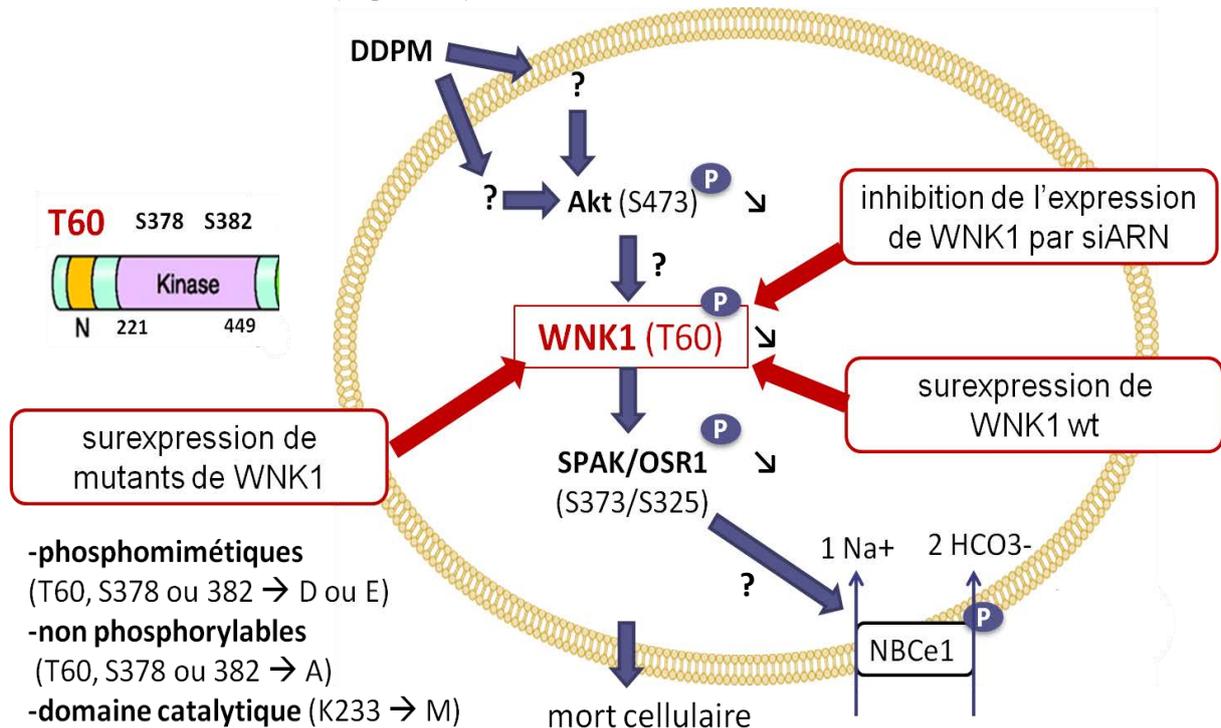
Il est également envisagé d'étudier l'effet du DDPM dans le cas où la voie de WNK1 est perturbée, soit par l'inhibition de l'expression de cette kinase par une approche d'ARN interférence, soit par la surexpression de cette protéine dans les cellules souches de glioblastome. Pour cette raison, nous avons commencé à développer lors de mon stage, les outils moléculaires (vecteurs d'expression recombinants) nécessaires à la réalisation de ces expériences. Les clonages qui permettront la surexpression d'ARN interférents dans les cellules sont actuellement terminés, et les différentes constructions sont fonctionnelles. La séquence codant le variant le plus fréquent de WNK1, a été obtenue par synthèse totale réalisée par la société *GeneArt<sup>®</sup> Gene Synthesis, Life Technologies (ThermoFisher Scientific)*.

Les résultats suggèrent que des modifications de la phosphorylation de la kinase WNK1 au niveau de la thréonine 60, pourraient jouer un rôle dans l'activité cytotoxique du DDPM. Ces variations perturberaient les interactions de WNK1 avec ses partenaires. Afin de confirmer la nécessité de ces variations pour l'action du DDPM, il est prévu d'étudier l'effet du composé en présence de mutants phosphomimétiques (thréonine (T) mutée en acide aspartique (D) ou en acide glutamique (E)) ou de mutants non phosphorylables (thréonine (T) mutée en alanine (A)) au niveau de ce résidu.

De plus, il est envisagé de déterminer si l'activité kinase de WNK1 est également requise pour l'action du DDPM, comme suggéré par les résultats obtenus sur SPAK/OSR1. Pour cela, la cytotoxicité du DDPM sera déterminée en présence de mutants dépourvus d'activité catalytique (mutants *kinase-dead* de WNK1), ou de mutants phosphomimétiques et non phosphorylables des résidus sérine du domaine kinase, dont la phosphorylation est

nécessaire pour l'activité phosphotransférase. Ces différents mutants seront obtenus par une approche de mutagenèse dirigée.

Lors de la surexpression de ces différents mutants de WNK1, le niveau endogène de la protéine sauvage pourrait influencer les résultats. Afin de s'en affranchir, les siARN exprimés à partir des séquences insérées dans le plasmide choisi, éteindront l'expression de WNK1 endogène, en même temps que les formes mutées (ou non) de la kinase seront surexprimées. Pour cela, des mutations silencieuses seront créées par mutagenèse dirigée, sur la séquence codant la protéine WNK1 exogène, obtenue par synthèse totale (société *GeneArt® Gene Synthesis, Life Technologies*). Elles lui permettront ainsi d'échapper à l'action des siARN sans affecter son activité (Figure 24).



**Figure 24 : Validation du rôle de WNK1 et de ses activités impliquées dans l'effet cytotoxique du DDPM.**

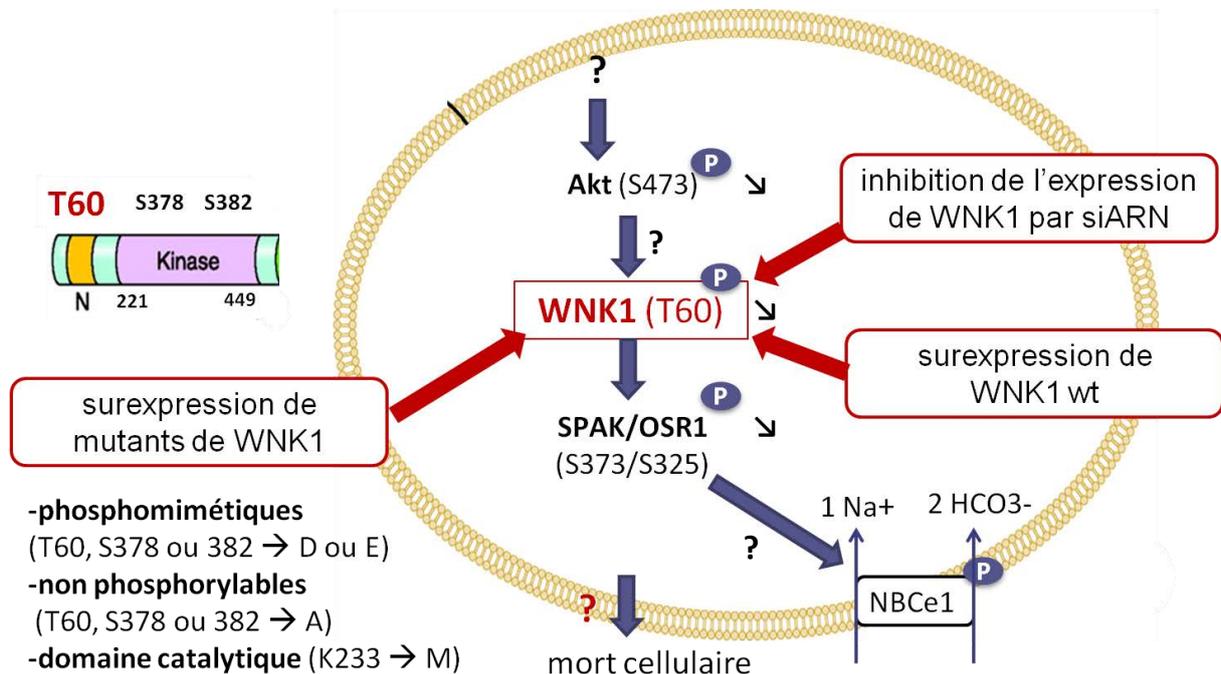
Afin d'observer l'effet du DDPM à la suite de perturbations de la voie de WNK1, deux approches sont envisagées. La première consiste à inhiber l'expression de WNK1 par ARN interférence. Ainsi après mon stage, des séquences codants pour des siARN ciblant différentes régions de WNK1, synthétisées par la société *Eurofins Genomics*, ont été insérées dans un plasmide pEGFP-N2 modifié, ensuite transfecté dans les cellules souches de glioblastome. Ces constructions sont actuellement fonctionnelles. La deuxième approche consiste à surexprimer la kinase WNK1 sauvage en insérant sa séquence codante, obtenue par synthèse totale par la société *GeneArt® Gene Synthesis, Life Technologies (ThermoFisher Scientific)*, également dans ce plasmide pEGFP-N2 modifié, derrière le promoteur fort CMV. Afin de permettre à cette protéine d'échapper à l'action des siARN sans affecter son activité, des mutations silencieuses sur sa séquence codante seront créées par mutagenèse dirigée. D'autre part, afin de déterminer les activités de WNK1 nécessaires à l'effet cytotoxique du DDPM, différents mutants affectant soit l'activité catalytique de WNK1 (Lysine 233, Sérine 378 ou 382, du domaine catalytique), soit ses interactions avec d'autres partenaires (Thrénine 60) seront surexprimés. Pour cela, des mutants phosphomimétiques ou non phosphorylables seront construits, en modifiant différents sites de WNK1 (Sérine 378, 382 ou Thrénine 60). Des mutants dépourvus d'activité catalytique (*kinase-dead*) seront obtenus en remplaçant la lysine 233 du domaine kinase par une méthionine empêchant le positionnement correct de l'ATP. En parallèle, une approche d'ARN interférence permettra d'inhiber le niveau endogène de cette kinase afin qu'il n'interfère pas avec nos résultats.

Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence une des voies qui semblerait impliquée dans l'action cytotoxique du DDPM.

Néanmoins, les cibles directes du composé sont, à ce jour, inconnues. Afin de les identifier, une approche de chromatographie d'affinité couplée à de la spectrométrie de masse en collaboration avec l'équipe du Dr Cianférani (LSMBO UMR 7178, IPHC, Strasbourg), est envisagée. Plus précisément, la chromatographie d'affinité consistera à greffer le DDPM sur des billes de sépharose B (résine) activées par du bromure de cyanogène (CNBr). Ces billes seront ensuite incubées en présence d'extraits de cellules souches cancéreuses de glioblastome afin de retenir préférentiellement les cibles directes du DDPM. Les molécules non fixées seront éliminées par lavages. Les cibles seront ensuite récupérées par élution et analysées par spectrométrie de masse.

D'autre part, comme mentionné précédemment, seules quelques données de la littérature relient actuellement les kinases WNK à la physiopathologie des cellules souches cancéreuses. Or nos résultats suggèrent que ces kinases pourraient jouer un rôle au moins dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome (différences de phosphorylation entre cellules en prolifération et quiescentes et à différents pH).

Les outils développés actuellement seront donc aussi utilisés pour les études du rôle des kinases WNK dans ce contexte (Figure 25).



**Figure 25 : Etude du rôle de WNK1 dans la physiopathologie des cellules souches cancéreuses de glioblastome.**

Les outils développés précédemment (Figure 24) seront utilisés pour étudier plus précisément le rôle de la kinase WNK1 dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome en général, indépendamment du traitement par le DDPM.

L'ensemble de ce travail devrait conduire à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à la cytotoxicité du bisacodyl/DDPM. Ceci est indispensable pour le développement futur de ce composé, en tant que médicament candidat dans le traitement du glioblastome, notamment en association avec le témozolomide qui cible les cellules de la masse tumorale. Ceci dans l'espoir d'éradiquer la tumeur à long terme.

De plus, il pourrait être envisagé d'élargir l'utilisation du bisacodyl/DDPM au traitement d'autres types de tumeurs, au sein desquelles sont également retrouvées des cellules souches cancéreuses. Dans ce contexte, il existe un brevet en France concernant l'utilisation du bisacodyl et de ses analogues dans le traitement des cancers.

## Conclusion générale

---

Les Glioblastomes ou astrocytomes de grade IV (OMS 2007) [Louis, Ohgaki, Wiestler *et al.*, 2007], sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus agressives. Ces dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés, notamment dans la caractérisation de ces tumeurs sur le plan moléculaire avec la classification du NIH, ainsi que dans leur prise en charge (techniques neurochirurgicales, médecine personnalisée, nanomédecine). Cependant, le pronostic de ces tumeurs demeure très sombre avec une médiane de survie d'environ 14 mois avec le traitement conventionnel (protocole de Stupp), augmentée de 6 mois seulement par l'ajout de thérapies ciblées.

Une des origines de ce mauvais pronostic est l'hétérogénéité tumorale. En effet, on retrouve au sein de ces tumeurs une majorité de cellules de la masse tumorale possédant une capacité proliférative limitée, mais également une petite proportion de cellules dotées de propriétés particulières : les cellules souches cancéreuses.

Les cellules souches cancéreuses ont été mises en évidence dans différents types de tumeurs dont les glioblastomes, même si ce concept reste controversé au sein de la communauté scientifique. Les cellules souches cancéreuses sont définies comme des cellules capables d'initier et de propager une tumeur dans des modèles animaux immunodéprimés. Elles sont capables de se maintenir au sein des tumeurs dans un état quiescent, état qui leur permet d'échapper aux traitements anticancéreux actuels. Ainsi, il s'avère nécessaire de développer de nouveaux traitements ciblant à la fois les cellules de la masse tumorale et les cellules souches cancéreuses.

Dans ce contexte, le laboratoire d'Innovation Thérapeutique de la faculté de pharmacie de Strasbourg a mis en évidence à la suite d'un criblage à haut-débit, une molécule ; le bisacodyl et son métabolite actif ; le DDPM. Ces composés semblent prometteurs dans la mesure où ils exercent leur effet cytotoxique uniquement sur les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes.

Afin d'identifier et d'étudier les voies de signalisation activées par le bisacodyl et le DDPM dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome quiescentes, une étude réalisée à l'aide de puces phosphoprotéiques a mis en évidence une diminution de la phosphorylation de la thréonine 60 de la kinase WNK1. Un immunoblot nous a permis de confirmer ces résultats. Nous avons ensuite montré que le DDPM affectait la phosphorylation d'autres protéines participant à la même voie, notamment la kinase AKT agissant en amont de WNK1. De plus, la diminution en présence du DDPM, de la phosphorylation de SPAK/OSR1 à des sites connus pour être la cible des kinases WNK, suggère que ce composé modulerait l'activité kinase de WNK1. Enfin, l'inhibition du cotransporteur NBCe1, un des substrats de WNK1 et SPAK, protège partiellement les cellules TG1 quiescentes de l'action cytotoxique du DDPM, preuve de l'implication de ce cotransporteur dans l'efficacité du composé.

Des études futures doivent permettre de mieux comprendre le mécanisme d'action du DDPM dans le but d'utiliser un jour, ce composé comme nouveau candidat médicament dans le traitement du glioblastome, notamment en association avec le témozolomide.

## Références bibliographiques

---

- Addeo, R., S. Zappavigna, C. Parlato, *et al.* (2014). "Erlotinib: early clinical development in brain cancer." *Expert Opin Investig Drugs* **23**(7): 1027-1037.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, *et al.* (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3983-3988.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, *et al.* (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." *EMBO J* **15**(23): 6541-6551.
- American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2015). "Tumor Treating Fields Device Extends Glioblastoma Survival, but Cost Questions Raised." Retrieved 28/08/2015, from <https://am.asco.org/tumor-treating-fields-device-extends-glioblastoma-survival-cost-questions-raised>.
- Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, *et al.* (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature* **444**(7120): 756-760.
- Barker, C. A., A. J. Bishop, M. Chang, *et al.* (2013). "Valproic acid use during radiation therapy for glioblastoma associated with improved survival." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **86**(3): 504-509.
- Berendsen, S., M. Broekman, T. Seute, *et al.* (2012). "Valproic acid for the treatment of malignant gliomas: review of the preclinical rationale and published clinical results." *Expert Opin Investig Drugs* **21**(9): 1391-1415.
- Bezacny, P. (2014). "Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical experience." *Med Oncol* **31**(6): 985.
- Calabrese, C., H. Poppleton, M. Kocak, *et al.* (2007). "A perivascular niche for brain tumor stem cells." *Cancer Cell* **11**(1): 69-82.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* **455**(7216): 1061-1068.
- Capela, A. and S. Temple (2002). "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal." *Neuron* **35**(5): 865-875.
- Carrondo Cottin, S. (2008). Expression et localisation de la connexine 43 dans le glioblastome: implication pour la thérapie génique. Philosophiæ doctor (Ph.D.) Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire, Laval.
- Chan, A. K., J. C. Pang, N. Y. Chung, *et al.* (2014). "Loss of CIC and FUBP1 expressions are potential markers of shorter time to recurrence in oligodendroglial tumors." *Mod Pathol* **27**(3): 332-342.
- Chen, J., Y. Li, T. S. Yu, *et al.* (2012). "A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy." *Nature* **488**(7412): 522-526.
- Chiocca, E. A. (2002). "Oncolytic viruses." *Nat Rev Cancer* **2**(12): 938-950.
- Ciardiello, F. and G. Tortora (2008). "EGFR antagonists in cancer treatment." *N Engl J Med* **358**(11): 1160-1174.
- Clarke, M. F., J. E. Dick, P. B. Dirks, *et al.* (2006). "Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells." *Cancer Res* **66**(19): 9339-9344.
- Collins, A. T., P. A. Berry, C. Hyde, *et al.* (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* **65**(23): 10946-10951.
- Danhier, F., E. Ansorena, J. M. Silva, *et al.* (2012). "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications." *J Control Release* **161**(2): 505-522.

- Danhier, F., K. Messaoudi, L. Lemaire, *et al.* (2015). "Combined anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNA-loaded chitosan-lipid nanocapsules decrease temozolomide resistance in glioblastoma: In vivo evaluation." *Int J Pharm* **481**(1-2): 154-161.
- De Sousa, E. M. F., I. Guessous, L. Vermeulen, *et al.* (2011). "[Cancer stem cells and future therapeutic implications]." *Rev Med Suisse* **7**(289): 774-777.
- Driessens, G., B. Beck, A. Caauwe, *et al.* (2012). "Defining the mode of tumour growth by clonal analysis." *Nature* **488**(7412): 527-530.
- Eramo, A., F. Lotti, G. Sette, *et al.* (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." *Cell Death Differ* **15**(3): 504-514.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, *et al.* (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* **4**(11): 1313-1317.
- EuroStemCell. (2010). "Cancer: une maladie des cellules souches ?", from <http://www.eurostemcell.org/fr/factsheet/cancer-une-maladie-des-cellules-souche>.
- Fan, X., L. Khaki, T. S. Zhu, *et al.* (2010). "NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts." *Stem Cells* **28**(1): 5-16.
- Fang, D., T. K. Nguyen, K. Leishear, *et al.* (2005). "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." *Cancer Res* **65**(20): 9328-9337.
- Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC). "Les Tumeurs Cérébrales." Retrieved 28/08/2015, from <http://www.frc.asso.fr/Le-cerveau-et-la-recherche/Les-maladies-neurologiques/les-tumeurs-cerebrales>.
- Ferrandon, S., C. Mallevall, B. El Hamdani, *et al.* (2015). "Telomerase inhibition improves tumor response to radiotherapy in a murine orthotopic model of human glioblastoma." *Mol Cancer* **14**: 134.
- Figarella-Branger, D., C. Colin, A. Tchoghandjian, *et al.* (2010). "[Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]." *Neurochirurgie* **56**(6): 441-448.
- Frank, N. Y., A. Margaryan, Y. Huang, *et al.* (2005). "ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma." *Cancer Res* **65**(10): 4320-4333.
- Friedenberg, W. R., M. Rue, E. A. Blood, *et al.* (2006). "Phase III study of PSC-833 (valsopodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valsopodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group." *Cancer* **106**(4): 830-838.
- Friedman, H. S., T. Kerby and H. Calvert (2000). "Temozolomide and treatment of malignant glioma." *Clin Cancer Res* **6**(7): 2585-2597.
- Friedman, H. S., M. D. Prados, P. Y. Wen, *et al.* (2009). "Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma." *J Clin Oncol* **27**(28): 4733-4740.
- Galanis, E., K. A. Jaeckle, M. J. Maurer, *et al.* (2009). "Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study." *J Clin Oncol* **27**(12): 2052-2058.
- George Seki, S. H., Masashi Suzuki, Osamu Yamazaki and Hideomi Yamada (2012). Pathophysiological Roles of Mutations in the Electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Cotransporter NBCe1. *Mutations in Human Genetic Disease*. D. N. C. a. J.-M. C. Ed.: 167-180.
- Glioblastome Association Michèle Esnault (GFME). (2013). "La Chimiothérapie, généralités" Retrieved 28/08/2015, from <http://gfme.free.fr/therap/chimio.html>.

- Glioblastome Association Michèle Esnault (GFME). (2013). "La radiothérapie externe et la radiochimiothérapie de Témodal, RTCE." Retrieved 28/08/2015, from <http://gfme.free.fr/therap/rayons.html>.
- Guyotat, J. (2013) "Surgical management for glioblastoma: technological evolutions." *Académie nationale de chirurgie* **12**, 067-072.
- Haberer, S., A. Assouline and J. J. Mazeron (2010). "[Malignant gliomas]." *Cancer Radiother* **14 Suppl 1**: S14-22.
- Hasselbalch, B., U. Lassen, S. Hansen, *et al.* (2010). "Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial." *Neuro Oncol* **12**(5): 508-516.
- He, J., Y. Liu, T. Zhu, *et al.* (2012). "CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays." *Mol Cell Proteomics* **11**(6): M111 010744.
- Heddleston, J. M., Z. Li, R. E. McLendon, *et al.* (2009). "The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype." *Cell Cycle* **8**(20): 3274-3284.
- Herbert, B., A. E. Pitts, S. I. Baker, *et al.* (1999). "Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14276-14281.
- Hong, J. H., D. Yang, N. Shcheynikov, *et al.* (2013). "Convergence of IRBIT, phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate, and WNK/SPAK kinases in regulation of the Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporters family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(10): 4105-4110.
- Hottinger, A. F., R. Stupp and K. Homicsko (2014). "Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme." *Chin J Cancer* **33**(1): 32-39.
- Huse, J. T. and E. C. Holland (2010). "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma." *Nat Rev Cancer* **10**(5): 319-331.
- Ignatova, T. N., V. G. Kukekov, E. D. Laywell, *et al.* (2002). "Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro." *Glia* **39**(3): 193-206.
- Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN). (2014). "La radiothérapie." Retrieved 28/08/2015, from <http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/applications-medicales/radiotherapie/Pages/La-radiotherapie.aspx>.
- Institut National Du Cancer (INCa). (2010). "Les tumeurs du cerveau." from <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/tumeurs-du-cerveau/les-tumeurs-du-cerveau>.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, *et al.* (2006). "SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity." *Cell* **127**(1): 125-137.
- Keime-Guibert, F., O. Chinot, L. Taillandier, *et al.* (2007). "Radiotherapy for glioblastoma in the elderly." *N Engl J Med* **356**(15): 1527-1535.
- Krauze, A. V., S. D. Myrehaug, M. G. Chang, *et al.* (2015). "A Phase 2 Study of Concurrent Radiation Therapy, Temozolomide, and the Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid for Patients With Glioblastoma." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **92**(5): 986-992.
- Kunjachan, S., B. Rychlik, G. Storm, *et al.* (2013). "Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions." *Adv Drug Deliv Rev* **65**(13-14): 1852-1865.
- Kuo, Y. C. and Y. C. Chen (2015). "Targeting delivery of etoposide to inhibit the growth of human glioblastoma multiforme using lactoferrin- and folic acid-grafted poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles." *Int J Pharm* **479**(1): 138-149.
- Labussiere, M., M. Sanson, A. Idbaih, *et al.* (2010). "IDH1 gene mutations: a new paradigm in glioma prognosis and therapy?" *Oncologist* **15**(2): 196-199.

- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, *et al.* (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* **367**(6464): 645-648.
- Larsen, C. (2007). "[14th scientific meeting of the Growth Factors Club. Stem cells and cancer]." *Bull Cancer* **94**(3): 307-312.
- Larsen, C. (2010). "[Genetic and molecular abnormalities of glioblastomas (GBM)]." *Bull Cancer* **97**(11): 1389-1407.
- Lassen, U., M. Sorensen, T. B. Gaziell, *et al.* (2013). "Phase II study of bevacizumab and temsirolimus combination therapy for recurrent glioblastoma multiforme." *Anticancer Res* **33**(4): 1657-1660.
- Lee, E. Q., D. A. Reardon, D. Schiff, *et al.* (2015). "Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma." *Neuro Oncol.*
- Li, C., D. G. Heidt, P. Dalerba, *et al.* (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." *Cancer Res* **67**(3): 1030-1037.
- Li, X., Y. Liu, K. J. Granberg, *et al.* (2015). "Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma." *Oncogene* **34**(13): 1619-1628.
- Ligue contre le Cancer. (2015). "cellules souches cancéreuses: les racines du mal ?", from [http://www.ligue-cancer.net/vivre/article/26509\\_cellules-souches-cancereuses-les-racines-du-mal](http://www.ligue-cancer.net/vivre/article/26509_cellules-souches-cancereuses-les-racines-du-mal).
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, *et al.* (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* **114**(2): 97-109.
- Ma, D. J., E. Galanis, S. K. Anderson, *et al.* (2015). "A phase II trial of everolimus, temozolomide, and radiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma: NCCTG N057K." *Neuro Oncol* **17**(9): 1261-1269.
- McCormick, J. A. and D. H. Ellison (2011). "The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions." *Physiol Rev* **91**(1): 177-219.
- Moniz, S. and P. Jordan (2010). "Emerging roles for WNK kinases in cancer." *Cell Mol Life Sci* **67**(8): 1265-1276.
- Neyns, B., J. Sadones, E. Joosens, *et al.* (2009). "Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma." *Ann Oncol* **20**(9): 1596-1603.
- Nottebohm, F. (1981). "A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain." *Science* **214**(4527): 1368-1370.
- Oncolie. (2011). "Neuro-oncologie de l'adulte : Glioblastome de l'adulte." Retrieved 28/08/2015, from <http://www.oncolie.fr/espace-medecins/les-referentiels/classement-anatomique/neuro-oncologie-de-ladulte/neuro-onco-glioblastome/>.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Liao, *et al.* (2014). "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011." *Neuro Oncol* **16 Suppl 4**: iv1-63.
- Parisotto, M., H. Brodeur, P. V. Bhat, *et al.* (2006). "[Retinoid metabolism and cancer]." *Med Sci (Paris)* **22**(12): 1101-1106.
- Patru, C., L. Romao, P. Varlet, *et al.* (2010). "CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors." *BMC Cancer* **10**: 66.
- Pecuchet, N., T. Cluzeau, C. Thibault, *et al.* (2010). "[Histone deacetylase inhibitors: highlight on epigenetic regulation]." *Bull Cancer* **97**(8): 917-935.
- Piccirillo, S. G., B. A. Reynolds, N. Zanetti, *et al.* (2006). "Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells." *Nature* **444**(7120): 761-765.
- Pourquier, P. and J. Robert (2011). "[General overview on DNA repair]." *Bull Cancer* **98**(3): 229-237.

- Raizer, J. J., L. E. Abrey, A. B. Lassman, *et al.* (2010). "A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy." Neuro Oncol **12**(1): 95-103.
- Ratajczak, M. Z., M. Tarnowski, S. Borkowska, *et al.* (2013). The Embryonic Rest Hypothesis of Cancer Development: 150 Years Later. Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research. H. U. E. Rodrigo R. Resende, Springer: 51-64.
- Razis, E., P. Selviaridis, S. Labropoulos, *et al.* (2009). "Phase II study of neoadjuvant imatinib in glioblastoma: evaluation of clinical and molecular effects of the treatment." Clin Cancer Res **15**(19): 6258-6266.
- Reardon, D. A., A. Desjardins, J. J. Vredenburgh, *et al.* (2010). "Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma." J Neurooncol **96**(2): 219-230.
- Reardon, D. A., A. Desjardins, J. J. Vredenburgh, *et al.* (2012). "Phase II study of Gleevec plus hydroxyurea in adults with progressive or recurrent low-grade glioma." Cancer **118**(19): 4759-4767.
- Reardon, D. A., G. Freeman, C. Wu, *et al.* (2014). "Immunotherapy advances for glioblastoma." Neuro Oncol **16**(11): 1441-1458.
- Recamier, J. (1829). Recherches sur le traitement du cancer, par la compression méthodique simple ou combinée, et sur l'histoire général de la même maladie. G. Ed. Paris.
- Remak, R. (1854). Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Krebshaften geschwülste. D. Klinik. **6**: 170-175.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, *et al.* (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-1710.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, *et al.* (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-115.
- Ricci-Vitiani, L., R. Pallini, M. Biffoni, *et al.* (2010). "Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells." Nature **468**(7325): 824-828.
- Rich, J. N., D. A. Reardon, T. Peery, *et al.* (2004). "Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma." J Clin Oncol **22**(1): 133-142.
- Richardson, C. and D. R. Alessi (2008). "The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway." J Cell Sci **121**(Pt 20): 3293-3304.
- Roa, W., P. M. Brasher, G. Bauman, *et al.* (2004). "Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial." J Clin Oncol **22**(9): 1583-1588.
- Sahm, F., C. Koelsche, J. Meyer, *et al.* (2012). "CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas." Acta Neuropathol **123**(6): 853-860.
- Sampson, J. H., A. B. Heimberger, G. E. Archer, *et al.* (2010). "Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma." J Clin Oncol **28**(31): 4722-4729.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, *et al.* (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.
- Schlaak, M., P. Schmidt, C. Bangard, *et al.* (2012). "Regression of metastatic melanoma in a patient by antibody targeting of cancer stem cells." Oncotarget **3**(1): 22-30.
- Schuster, J., R. K. Lai, L. D. Recht, *et al.* (2015). "A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study." Neuro Oncol **17**(6): 854-861.

- Shackleton, M., E. Quintana, E. R. Fearon, *et al.* (2009). "Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution." Cell **138**(5): 822-829.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, *et al.* (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Spalding, K. L., O. Bergmann, K. Alkass, *et al.* (2013). "Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans." Cell **153**(6): 1219-1227.
- Stummer, W., U. Pichlmeier, T. Meinel, *et al.* (2006). "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial." Lancet Oncol **7**(5): 392-401.
- Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason, *et al.* (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncol **10**(5): 459-466.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, *et al.* (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.
- Sun, T., N. M. Warrington, J. Luo, *et al.* (2014). "Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males." J Clin Invest **124**(9): 4123-4133.
- Sutter, R., G. Yadirgi and S. Marino (2007). "Neural stem cells, tumour stem cells and brain tumours: dangerous relationships?" Biochim Biophys Acta **1776**(2): 125-137.
- Suzuki, M., G. Seki, H. Yamada, *et al.* (2012). "Functional Roles of Electrogenic Sodium Bicarbonate Cotransporter NBCe1 in Ocular Tissues." Open Ophthalmol J **6**: 36-41.
- Suzuki, M., W. Van Paesschen, I. Stalmans, *et al.* (2010). "Defective membrane expression of the Na(+)-HCO(3)(-) cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(36): 15963-15968.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.
- Tallman, M. S., C. Nabhan, J. H. Feusner, *et al.* (2002). "Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies." Blood **99**(3): 759-767.
- Tamura, M., J. Gu, H. Tran, *et al.* (1999). "PTEN gene and integrin signaling in cancer." J Natl Cancer Inst **91**(21): 1820-1828.
- Theparambil, S. M., I. Ruminot, H. P. Schneider, *et al.* (2014). "The electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 is a high-affinity bicarbonate carrier in cortical astrocytes." J Neurosci **34**(4): 1148-1157.
- Todaro, M., M. P. Alea, A. B. Di Stefano, *et al.* (2007). "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4." Cell Stem Cell **1**(4): 389-402.
- Tosi, G., B. Bortot, B. Ruozi, *et al.* (2013). "Potential use of polymeric nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier." Curr Med Chem **20**(17): 2212-2225.
- Tsai, H. C., K. C. Wei, C. N. Tsai, *et al.* (2012). "Effect of valproic acid on the outcome of glioblastoma multiforme." Br J Neurosurg **26**(3): 347-354.
- Van den Bent, M. J., M. E. Hegi and R. Stupp (2006). "Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours." Eur J Cancer **42**(5): 582-588.
- Van Meir, E. G., C. G. Hadjipanayis, A. D. Norden, *et al.* (2010). "Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma." CA Cancer J Clin **60**(3): 166-193.
- Vescovi, A. L., R. Galli and B. A. Reynolds (2006). "Brain tumour stem cells." Nat Rev Cancer **6**(6): 425-436.

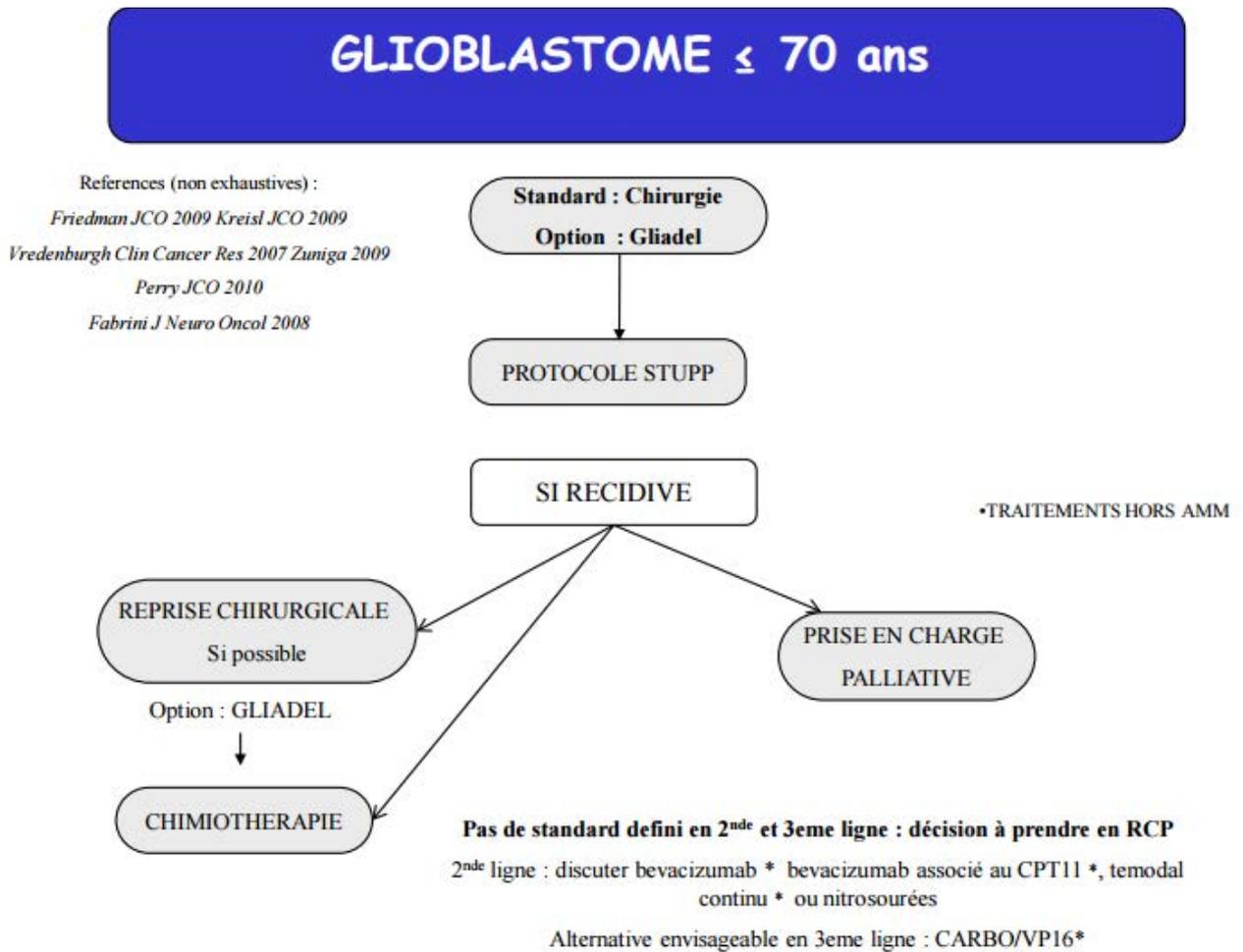
- Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, J. E. Herndon, 2nd, *et al.* (2007). "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma." Clin Cancer Res **13**(4): 1253-1259.(a)
- Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, J. E. Herndon, 2nd, *et al.* (2007). "Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme." J Clin Oncol **25**(30): 4722-4729.(b)
- Wang, J., T. P. Wakeman, J. D. Lathia, *et al.* (2010). "Notch promotes radioresistance of glioma stem cells." Stem Cells **28**(1): 17-28.
- Watanabe, K., O. Tachibana, K. Sata, *et al.* (1996). "Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas." Brain Pathol **6**(3): 217-223; discussion 223-214.
- Watanabe, T., S. Nobusawa, P. Kleihues, *et al.* (2009). "IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas." Am J Pathol **174**(4): 1149-1153.
- Watt, F. M. and B. L. Hogan (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." Science **287**(5457): 1427-1430.
- Wen, P. Y., W. K. Yung, K. R. Lamborn, *et al.* (2006). "Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08." Clin Cancer Res **12**(16): 4899-4907.
- Woo, S. R., Y. T. Oh, J. Y. An, *et al.* (2015). "Glioblastoma specific antigens, GD2 and CD90, are not involved in cancer stemness." Anat Cell Biol **48**(1): 44-53.
- Yang, D., Q. Li, I. So, *et al.* (2011). "IRBIT governs epithelial secretion in mice by antagonizing the WNK/SPAK kinase pathway." J Clin Invest **121**(3): 956-965.
- Yuan, Y., W. Xiang, M. Qing, *et al.* (2014). "Survival analysis for valproic acid use in adult glioblastoma multiforme: a meta-analysis of individual patient data and a systematic review." Seizure **23**(10): 830-835.
- Zeniou, M., M. Feve, S. Mameri, *et al.* (2015). "Chemical Library Screening and Structure-Function Relationship Studies Identify Bisacodyl as a Potent and Selective Cytotoxic Agent Towards Quiescent Human Glioblastoma Tumor Stem-Like Cells." PLoS One **10**(8): e0134793.
- Zhu, J., J. Zuo, Q. Xu, *et al.* (2011). "Isocitrate dehydrogenase mutations may be a protective mechanism in glioma patients." Med Hypotheses **76**(4): 602-603.
- Zhu, Q., L. Kao, R. Azimov, *et al.* (2010). "Topological location and structural importance of the NBCe1-A residues mutated in proximal renal tubular acidosis." J Biol Chem **285**(18): 13416-13426.

## Annexes

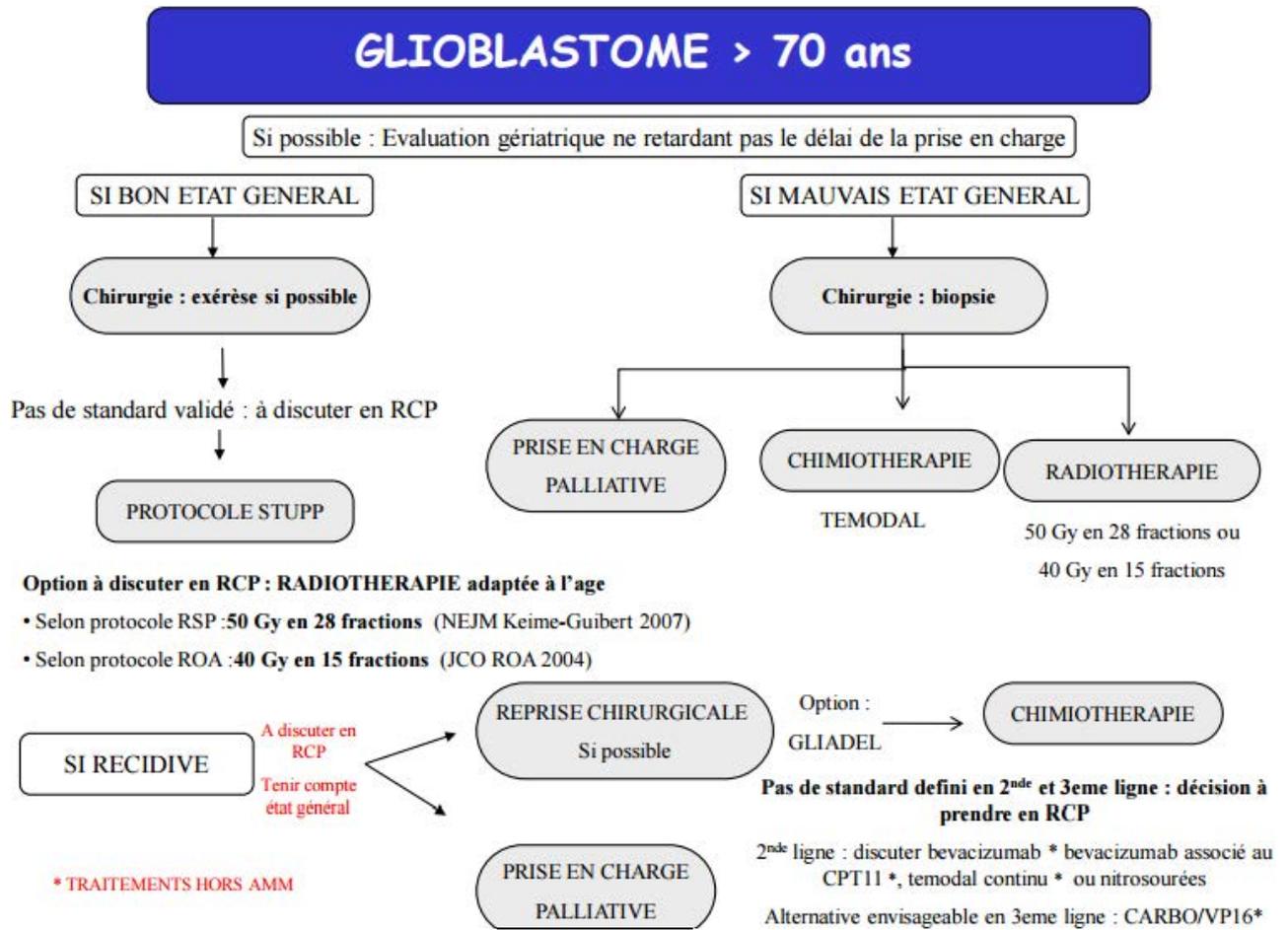
---

**Annexe 1 : Arbre décisionnel de prise en charge des glioblastomes chez les patients de moins (A) et de plus (B) de 70 ans, selon le référentiel régional de neurologie Oncomip (réseau de cancérologie de midi-pyrénées), mars 2011. (RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire).**

A) Patients âgés de 70 ans ou moins



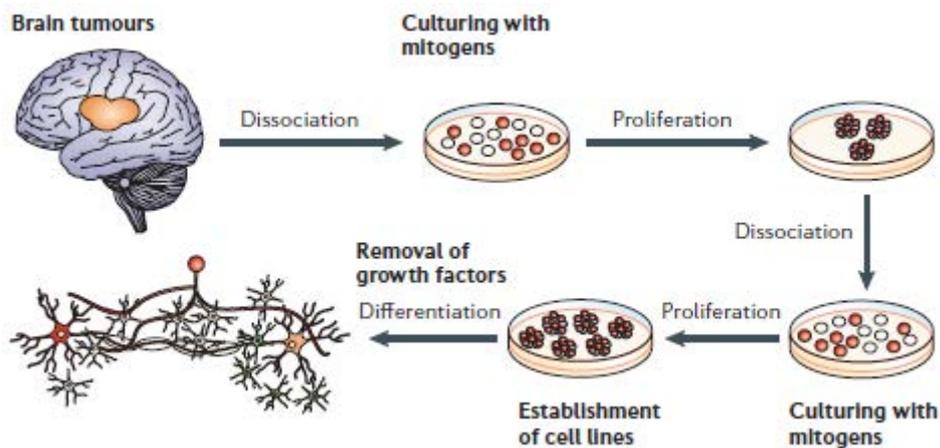
B) Patients âgés de plus de 70 ans



## Annexe 2 : Test des neurosphères pour l'isolement et la propagation de cellules souches de tumeurs cérébrales en culture.

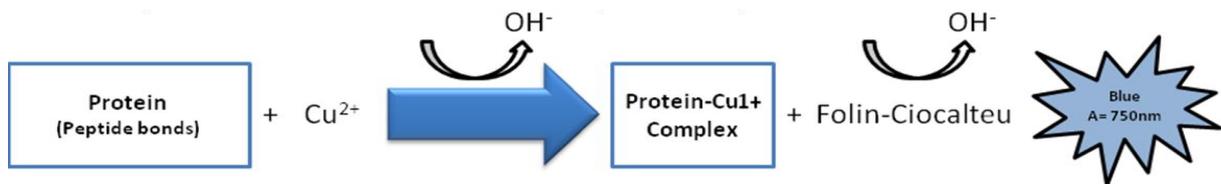
Le test des neurosphères est un système de culture sélectif, dépourvu de sérum mais contenant les facteurs de croissance EGF et FGF2.

Dans ce milieu sont dissociées puis cultivées des cellules prélevées lors de la biopsie d'un patient atteint d'une tumeur cérébrale. Dans ces conditions particulières, les seules cellules qui vont survivre à long terme et se propager en formant des neurosphères, sont les cellules cancéreuses qui possèdent des propriétés souches. Ces cellules peuvent ensuite être dissociées et cultivées dans un milieu frais afin de produire des neurosphères secondaires et ainsi de suite, permettant la génération de nombreux progéniteurs (descendants). En supprimant les facteurs de croissance, les cellules peuvent alors se différencier en formant des neurones, astrocytes, oligodendrocytes. D'après Vescovi, Galli and Reynolds, (2006).



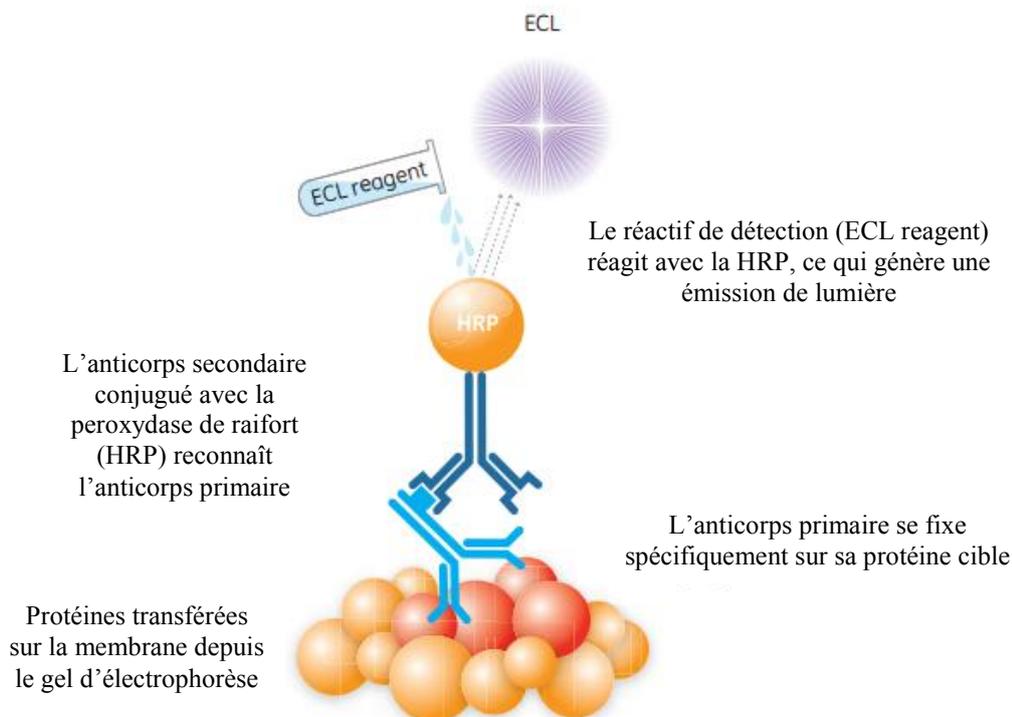
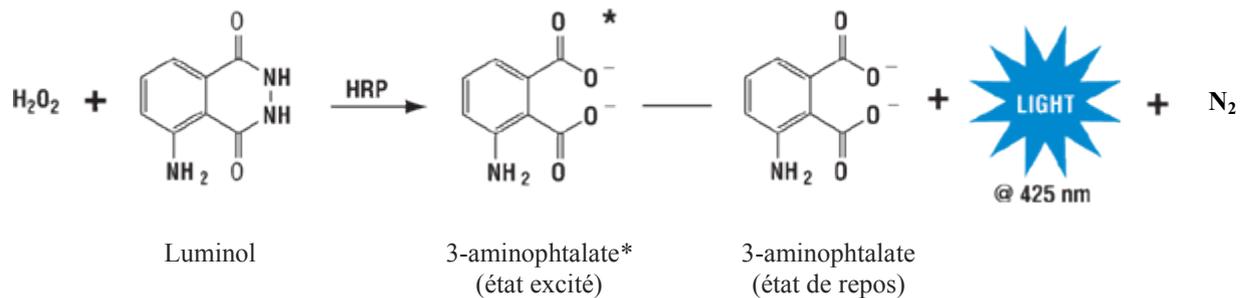
### Annexe 3 : Quantification des protéines par la méthode de Lowry.

Deux étapes entraînent la formation d'une couleur bleue principalement due aux acides aminés tyrosine et tryptophane. La réaction entre la protéine et du cuivre en milieu alcalin conduit à la formation d'un complexe protéines-Cuivre. Ce complexe entraîne alors la réduction du réactif de Folin par la perte de 1, 2 ou 3 atomes d'oxygène, produisant ainsi une ou plusieurs formes réduites possibles de ce réactif colorées en bleu avec une absorbance maximale à 750 nm. La coloration bleue obtenue est proportionnelle à la quantité de protéine.



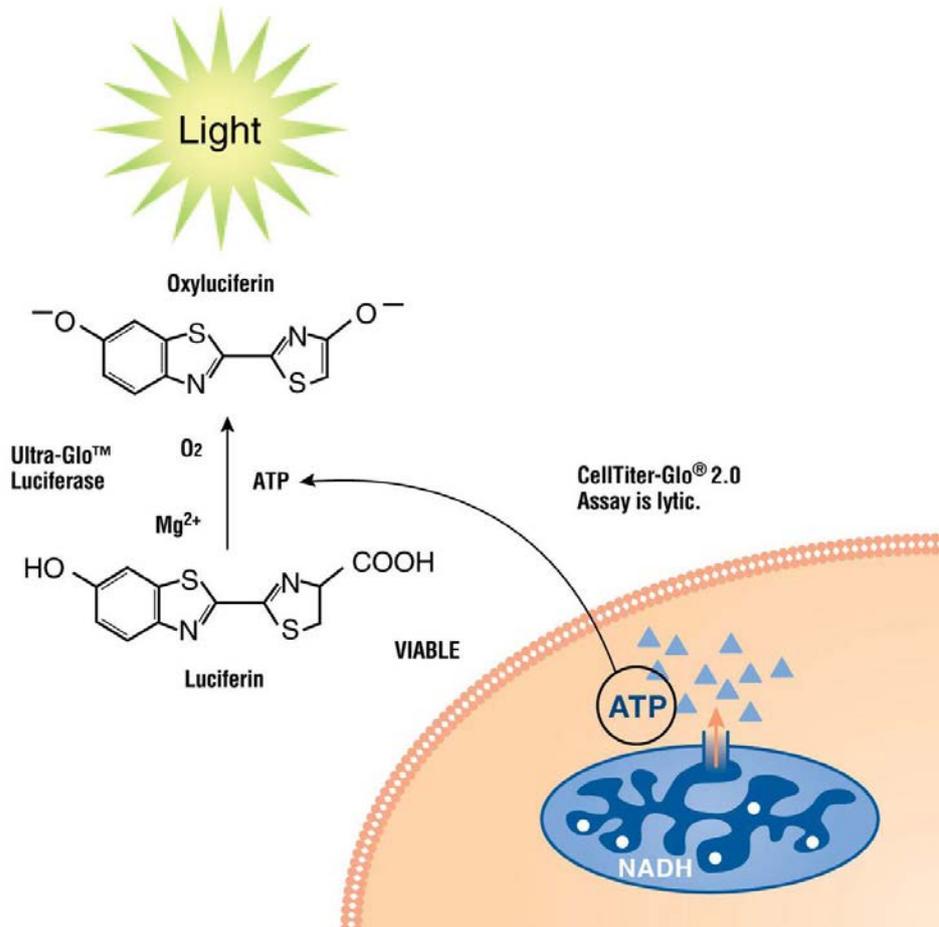
#### Annexe 4 : Principe du kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*.

La chimiluminescence est l'émission de lumière produite dans une réaction à plusieurs étapes dans laquelle la peroxydase catalyse l'oxydation de luminol. En présence d'activateurs et de catalyseurs chimiques, l'intensité et la durée de l'émission de lumière sont grandement accrues : processus de chimiluminescence amplifiée (ECL). Cette technique basée sur la peroxydase de Raifort (HRP) conjuguée aux anticorps secondaires est une méthode de détection sensible où l'émission de lumière est proportionnelle à la quantité de protéines (*GE Healthcare Life Sciences*).



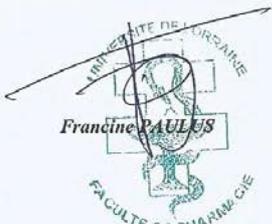
**Annexe 5 : Principe du kit *CellTiter-Glo*<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay.**

Cette méthode homogène, en une étape, utilise l'action de la luciférase pour déterminer le nombre de cellules viables en culture. Elle est basée sur la quantification de l'ATP présente dans les cellules, ce marqueur de l'activité métabolique étant directement lié à la viabilité. La mono-oxygénation de la luciférine est catalysée par la luciférase en présence de  $Mg^{2+}$ , d'ATP et d'oxygène moléculaire.



## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : mercredi 30 septembre 2015

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : Laëtitia CHEZEAU</p> <p><u>Sujet :</u></p> <p>CELLULES SOUCHES CANCEREUSES ET GLIOBLASTOME : ETUDE DU MODE D'ACTION D'UN COMPOSE ACTIF</p> <p><u>Jury :</u></p> <p>Président : M. RIHN, Professeur      Directeur : M. JOUBERT, Maître de Conférences      Juges : Mme ZENIOU, Maître de Conférences      Mme CESARONI, Pharmacien      M. DOMENJOUR, Maître de Conférences      M. BINET, Pharmacien      M. GATE, Responsable d'études</p>	<p align="right">Vu, Nancy, le 2/09/15</p> <p align="center">Le Président du Jury      Directeur de Thèse</p> <p><b>Professeur B. RIHN</b> Université de Lorraine</p> <p>M. Bertrand RIHN</p> <p>Dr Olivier JOUBERT, PhD MCU Toxicologie EA 3452 Plateforme TRANS-BIO Faculté de Pharmacie Nancy-Université</p> <p>M. Olivier JOUBERT</p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 3.09.2015</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">   <b>Francine PAULES</b>      FACULTE DE PHARMACIE   </p>	<p align="right">Vu, Nancy, le 15.09.2015</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center"> <b>Pierre MUTZENHARDT</b>      Pour le Président et par délégation      Le Vice-Président   </p> <p align="center">       Martial DYLIGNON   </p> <p>N° d'enregistrement : 7095 -</p>

N° d'identification :

**TITRE**

***Cellules souches cancéreuses et glioblastome :  
Etude du mode d'action d'un composé actif***

**Thèse soutenue le 30 septembre 2015**

**Par : Laëtitia CHEZEAU**

**RESUME :**

Les glioblastomes ou astrocytomes de grade IV (OMS 2007), sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus agressives. Malgré les traitements actuels combinant chirurgie, radio- et chimiothérapies, les glioblastomes présentent un mauvais pronostic, notamment à cause de leur hétérogénéité. En effet, ils sont constitués en majorité de cellules de la masse tumorale, mais également d'une petite proportion de cellules particulières : les cellules souches cancéreuses (CSCs). Les CSCs sont définies comme des cellules possédant la capacité d'initier et de propager une tumeur. Elles sont dotées de propriétés qui leur permettent d'échapper aux traitements anticancéreux actuels. Elles sont notamment capables de se maintenir au sein des tumeurs dans un état quiescent qui les protège des molécules antiprolifératives.

Un criblage à haut-débit a permis d'identifier le bisacodyl et son métabolite actif, le DDPM, comme des composés ayant une activité cytotoxique spécifiquement dirigée envers les CSCs de glioblastome quiescentes. Le but de notre projet est d'identifier et d'étudier les voies de signalisation activées par le DDPM dans les cellules souches de glioblastome quiescentes. Une étude effectuée avant mon arrivée, à l'aide de puces phosphoprotéiques, a permis de mettre en évidence une diminution de la phosphorylation de la thréonine 60 de la protéine kinase WNK1, en présence du composé.

Le premier objectif de mon stage a été de confirmer par immunoblot, les résultats obtenus précédemment. Nous avons montré que le DDPM affectait également la phosphorylation d'autres protéines participant à la même voie, dont la kinase AKT agissant en amont de WNK1. De plus, la diminution en présence du DDPM, de la phosphorylation de SPAK/OSR1 à des sites connus pour être la cible des kinases WNK, suggère que ce composé modulerait l'activité kinase de WNK1. Un dérivé inactif du DDPM n'a pas d'effet sur le niveau de phosphorylation de ces protéines, suggérant que les modifications observées pourraient être liées à l'action cytotoxique du composé. Enfin, nous avons montré que l'inhibition du cotransporteur NBCe1, un des substrats de WNK1 et SPAK, protège partiellement les CSCs de glioblastome quiescentes de l'action cytotoxique du DDPM, suggérant un rôle de cette protéine dans l'efficacité du composé.

Ces études devraient permettre une meilleure compréhension du mécanisme d'action du DDPM sur les CSCs. Ceci est un des objectifs à atteindre pour le développement de ce composé en tant que nouveau candidat médicament dans le traitement du glioblastome, notamment en association avec le témozolomide.

**MOTS CLES :** glioblastome, cellules souches cancéreuses, quiescence, kinase WNK1

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Olivier JOUBERT	Unité de recherche CITHEFOR-EA 3452 : Cibles thérapeutiques, formulation et expertise préclinique du médicament	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

- 1 – Sciences fondamentales
- 3 – Médicament
- 5 –  Biologie

- 2 – Hygiène/Environnement
- 4 – Alimentation – Nutrition
- 6 – Pratique professionnelle