



**HAL**  
open science

# Etude par ARN interférence de l'expression du gène ASPM dans les cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

Sandra-Nadia Ngwabyt-Bikeye Ngwabyt - Bikeye

► **To cite this version:**

Sandra-Nadia Ngwabyt-Bikeye Ngwabyt - Bikeye. Etude par ARN interférence de l'expression du gène ASPM dans les cellules souches tumorales des gliomes de haut grade. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T030 . tel-00633421

**HAL Id: tel-00633421**

**<https://theses.hal.science/tel-00633421>**

Submitted on 18 Oct 2011

**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.

# UNIVERSITE PARIS SUD XI

## FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

ANNEE : 2011

N°

### THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS SUD XI

Spécialité : Cancérologie

---

## « ETUDE PAR ARN INTERFERENCE DE L'EXPRESSION DU GENE ASPM DANS LES CELLULES SOUCHES TUMORALES DES GLIOMES DE HAUT GRADE »

Présentée et soutenue par  
**Sandra-Nadia NGWABYT BIKEYE**  
Le 29 Juin 2011

### MEMBRES DU JURY

PRESIDENT	: Pr Charles DUYCKAERTS
DIRECTEUR	: Pr Jean-Yves DELATTRE
Co-DIRECTEUR	: Pr Marc SANSON
RAPPORTEUR	: Pr Antoine CARPENTIER
RAPPORTEUR	: Dr Jean-Sébastien GUILLAMO
EXAMINATEUR	: Dr Philippe BASTIN
EXAMINATEUR	: Pr Charles DUYCKAERTS

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

**ETUDE PAR ARN INTERFERENCE DE L'EXPRESSION DU  
GENE *ASPM* DANS LES CELLULES SOUCHES TUMORALES DES  
GLIOMES DE HAUT GRADE**

## REMERCIEMENTS

Au **Pr Jean-Yves Delattre**, merci de m'avoir accordé votre confiance en m'accueillant au sein de votre équipe. Vos encouragements et vos précieux conseils m'ont été d'un apport inestimable.

J'exprime ma profonde gratitude au **Pr Marc Sanson**, pour avoir co-encadré ce travail et surtout pour m'avoir confié un sujet de thèse si intéressant. Merci pour votre amitié.

Sincères remerciements au **Pr Charles Duyckaerts**, pour avoir accepté de présider ce jury.

Profonds remerciements aux rapporteurs, **Pr Antoine Carpentier** et **Dr Jean-Sébastien Guillamo**, pour avoir pris de votre temps et accepté de juger ce travail.

Au **Dr Philippe Bastin**, merci pour tout et profonds respects.

Profonds remerciements au **Dr Boris Zalc**, pour m'avoir accueilli au sein de son unité UMR 975.

Merci à tous les membres de l'**unité U711** pour leurs aides, leurs précieux conseils, leurs sourires et surtout leur amitié prononcée.

A l'équipe spéciale de **Neuro-oncologie** : merci du fond du cœur :

-aux *Drs Karima Moktari* et *Rousseau*, pour votre disponibilité et tous vos encouragements;

-au *Dr Hoang-Xuan*, pour ta gentillesse et tes encouragements,

-au *Dr Ahmed Idbah*, pour avoir toujours été là et pour tes précieux conseils ; au *Dr François Ducray*, pour ton soutien scientifique et ta gentillesse.

A vous, *Blandine*, *Catherine* (tu ne dis jamais « non ») et *Marianne* merci pour votre amitié, ces fous rires, ces coups de gueules...*Blandine* ton soutien technique à été précieux dans ce travail. *Yannick* pour ton enthousiasme et ta motivation. Merci *Sophie* pour ton amitié et ton côté rassurant. Sans oublier *Emmanuelle*, et les anciens thésards *Sibille*, *Soufiane*, *Jihane* et *Elodie*, pour toutes ces soirées de galère passées en pièce de culture...

Sincères remerciements à tous ceux qui ont collaboré à la réalisation de ce travail : Au **Dr Philippe Ravassard**, pour ton soutien dans le ciblage des gènes et pour l'accès au P3, **Yasmine**, pour toute ton aide technique.

Enfin, merci aux secrétaires pour leur gentillesse, leur bonne humeur et leurs soutiens administratifs : **Patricia** (U711), **Marie-Claude Barthod** (Mazarin) et **Murielle Nicoletti** (Ecole Doctorale).

**A mes parents post-mortem**

Merci de m'avoir enseigné toutes ces valeurs...

**A mon cher compagnon Roland,**

Sans ton amour et ta confiance,

ce travail n'aurait pas été achevé....

Merci de m'avoir accompagnée durant toutes ces années et de m'avoir donné une magnifique petite fille.

**A ma fille Gaïa,** tu as été mon cheval de bataille

**A mes sœurs Nany, Annick et Diane**

Qui avez une foi inouïe en moi, merci....

A ces belles rencontres,

Mon cher **Charles**, pour cette belle amitié et la passion des CS

A ma **Carole**, j'ai trouvé en plus d'une équipière

exceptionnelle, une magnifique amitié

A mes amis,

*Diane-Ethna, Tatiana, Pascaline, Renée et Danièle*

pour toutes ces soirées au téléphone au moment des incertitudes et des doutes.

A ma famille

*Eric-Hervé, Pépé Francisca, Grâce-Raïssa, Luc-Hervé,*

merci d'avoir cru en moi....

Merci à l'Association pour la Recherche Contre les Tumeurs Cérébrales, pour avoir financé et permis la réalisation de ce travail.

Enfin, une profonde pensée aux autorités de mon pays, le Gabon, pour l'accompagnement dans mes études.

## SOMMAIRE

---

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
-----------------------	----------

### **1<sup>ère</sup> partie : Introduction bibliographique**

<b>I. Les tumeurs cérébrales primitives.....</b>	<b>12</b>
--	-----------

A. Description de l'organe modèle .....	12
---	----

A.1- Le système nerveux central .....	12
---------------------------------------	----

A.2- Classification histologique des gliomes.....	14
---	----

A.2.1 - Les gliomes astrocytaires.....	16
--	----

A.2.2- Les gliomes oligodendrocytaires.....	17
---	----

A.2.3- Les gliomes mixtes.....	18
--------------------------------	----

A.3- Limites de la classification diagnostique actuelle des gliomes...	21
--	----

A.4- Altérations génétiques et épigénétiques .....	23
--	----

A.4.1- Mutations de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 ( <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> ).....	23
--	----

A.4.2- Codélétion 1p /19q.....	25
--------------------------------	----

A.4.3- Dérégulation du cycle cellulaire, activation de la transduction du signal et prolifération gliale.....	26
---	----

A.4.4- Activation de <i>BRAF</i> dans le cas particulier des astrocytomes pilocytiques.....	30
---	----

A.4.5- Méthylation du promoteur du gène de la <i>MGMT</i> et altérations épigénétiques.....	31
---	----

A.4.6- Rôle des micro-ARNs (miRNAs).....	32
--	----

A.5- Vers une classification histo-moléculaire .....	32
--	----

A.5.1- Apport des études génomiques.....	33
--	----

A.5.2- Apport des études transcriptomiques.....	34
---	----

A.5.2.a- Identification de marqueurs diagnostiques.....	34
---	----

A.5.2.b-	Identification des marqueurs pronostiques.....	35
A.5.2.c-	Identification des marqueurs prédictifs de la réponse au traitement.....	35
A.5.2.d-	Identification de nouveaux sous-types de gliomes.....	37
A.6-	Les traitements des glioblastomes .....	38
<b>II.</b>	<b>Neurogenèse et cellules souches neurales.....</b>	<b>39</b>
A-	La neurogenèse embryonnaire.....	39
A.1 :	Les cellules précurseurs du lignage neuronal .....	41
A.2 :	Les cellules précurseurs du lignage glial.....	43
B-	Divisions symétriques et asymétriques.....	45
C-	Contrôle de la balance division symétrique-division asymétrique...	48
D-	La neurogenèse adulte.....	52
D1:	La zone sous-ventriculaire.....	52
D2:	La zone sous-granulaire.....	54
<b>III.</b>	<b>Cellules souches tumorales et glioblastome.....</b>	<b>56</b>
A-	Les cellules souches tumorales (CST) de glioblastome.....	56
B-	Les gènes marqueurs des cellules souches.....	57
 <b>2<sup>ème</sup> partie : Etude de gènes de cellules souches tumorales dans les gliomes</b>		
<b>I.</b>	<b>Le modèle gliomasphère.....</b>	<b>62</b>
A/	Caractérisation du modèle gliomasphère.....	62
B/	Validation du modèle gliomasphère.....	64
<b>II.</b>	<b>Article 1 : Etude du rôle du gène <i>ASPM</i> dans les gliomes .....</b>	<b>66</b>
A/	Présentation de l'article.....	66
B/	Publication.....	66
C/	Résultats complémentaires non publiés.....	81
<b>II.</b>	<b>Article 2 : Etude du rôle du gène <i>NANOG</i> dans les gliomes .....</b>	<b>89</b>
A/	Présentation de l'article.....	89

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales  
des gliomes de haut grade

B/ Publication.....	91
C/ Conclusions de l'article.....	108
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>110</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>119</b>

#### ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and aggressive form of primary brain tumors in adults; it is characterized by its resistance to current treatments (surgery, chemotherapy and radiotherapy). The prognosis is grim with a median survival of only 15 months underlining the importance to develop new therapeutic strategies. The recent development of the “tumor stem cell” (TSC) concept in hemopathies has been secondarily applied to gliomas with the identification of subpopulations of GBM cells which express neural stem cell markers and fulfill the criteria for stemness. Some evidences also suggest that this subpopulation could play a primary role in resistance to radio- and chemotherapy.

*ASPM* (Abnormal Spindle Like Microcephaly Associated) is a protein regulating the proliferation of neuroblasts, highly expressed in the embryonic stage but weakly expressed in the adult brain. Preliminary reports suggesting that it could be involved in the development of gliomas (Horvath et al., 2007, Hagemann et al., 2008) prompted us to analyze further the role of this protein, focusing on its potential as a relevant candidate therapeutic target.

In a series of 175 gliomas samples of various grades, we found that *ASPM* mRNA expression was strongly correlated with increasing tumor grade. We also found that *ASPM* expression increased at recurrence when compared to the initial lesion. Subsequently, we could demonstrate *in vitro* and *in vivo* that *ASPM* expression also increased over serial passages in gliomaspheres and in a mouse glioma xenograft model. In a therapeutic perspective, the effect of lentivirus-mediated shRNA post-transcriptional silencing of ASPM was evaluated in two different gliomasphere models and a dramatic proliferation arrest and cell death was observed. Taken together, these data suggest that ASPM is involved in the malignant progression of gliomas, possibly through expansion of a cancer stem cell compartment, and could be an attractive therapeutic target in glioblastoma multiforme.

Another potential candidate tumor stem cell target in glioma is the sonic hedgehog pathway (hedgehog-Gli) which is required for GBM growth and stem cell expansion. In a collaborative study, it was found that *NANOG*, a transcription factor critically involved with self-renewal of undifferentiated embryonic stem cells, modulates gliomasphere clonogenicity, CD133+ stem cell behavior and proliferation. *NANOG* was regulated by hedgehog-Gli signalling and was essential for GBM tumourigenicity in orthotopic xenografts suggesting that it could also be a useful potential therapeutic target.

Conclusions: Accumulating evidences suggest that tumor stem cells play an important role in the oncogenesis of gliomas and in their resistance to treatment. Our data support this concept and suggest that specific stemness markers may become useful targets to improve treatment of this devastating disease.

**Mots clés :** Gliomes, ASPM, GBM, shRNA, cellules souches, thérapies ciblées.

## Liste des abréviations

- ASPM: Abnormal Spindle Like Microcephly
- CGHa: Comparative Genomic Hybridization array
- CSN : Cellules souches neurales
- CST : Cellules souches tumorales
- EGF: Epidermal Growth Factor
- EGFR: Récepteur au facteur de croissance épidermique
- FGF: Fibroblast Growth Factor
- FoxO: Forkhead O Transcription factors
- GBM: Glioblastome
- GFAP : Protéine Acide Gliale Fibrillaire
- NANOG : Facteur de transcription à homéodomaine
- MGMT : Methylguanine DNA methyltransferase
- MTOC : centre d'organisation des microtubules
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- OS : Survie globale (Overall Survival)
- PDGFRA: Plated-derived growth factor A
- PFS : Survie sans progression (Progression Free Survival)
- PTEN: Phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10
- SHH : Sonic Hedgehog
- SGZ : Zone sous granulaire
- SN : Système nerveux
- SNC : Système nerveux central
- SNP : système nerveux périphérique
- SNV : Système nerveux végétatif ou autonome
- shRNA : Short hairpin RNA
- SVZ : Zone sous ventriculaire

## Préambule

---

La compréhension de l'oncogenèse des tumeurs cérébrales passe par l'étude des altérations de gènes (oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs,...) impliqués dans la division cellulaire. Au cours des deux dernières décennies, un nombre important d'altérations géniques récurrentes a été identifié dans les gliomes. Ces altérations génétiques multiples ont pour conséquence l'activation de voies moléculaires (voie des récepteurs tyrosine kinase, voie de la *P53*, voie du gène *Rb*) qui sont actuellement relativement bien connues dans les gliomes et qui aboutissent à une prolifération cellulaire incontrôlée. La cellule d'origine des tumeurs gliales reste en revanche inconnue. S'agit-il de la transformation d'une cellule mature ou la tumeur prend-elle naissance dans des cellules souches neurales ou des précurseurs gliaux ? Quelle qu'en soit l'origine, le concept de « cellules souches tumorales », initialement décrit dans les hémopathies, s'est étendu aux tumeurs solides, notamment aux gliomes posant le problème de leur identification par des marqueurs dont la spécificité pourrait également être exploitée en vue d'un ciblage thérapeutique.

C'est dans cette thématique que s'est inscrit mon projet de thèse.

## INTRODUCTION

## **I. Les tumeurs cérébrales primitives**

---

### A – Description de l'organe modèle

#### **A.1 - Le système nerveux central**

Le système nerveux (SN) est divisé en 3 principaux sous-ensembles : le système nerveux central (SNC), le système nerveux périphérique (SNP) et le système nerveux végétatif ou autonome (SNV). Ces trois systèmes, bien qu'arbitrairement individualisés, sont en étroite relation anatomophysiologique.

Sur le plan histologique, le SNC est constitué de 3 principales populations cellulaires différenciées : les cellules gliales, les neurones et les cellules vasculaires (endothéliales et péricytes). Entre ces différents types cellulaires se loge la matrice extracellulaire.

Il existe 2 types de cellules gliales: (1) les cellules microgliales et (2) les cellules macrogliales. Les premières dériveraient du système des monocytes-macrophages sanguins (ayant la même origine mésodermique) et jouent principalement un rôle immunitaire. Les cellules macrogliales (dont dériveraient les tumeurs gliales) sont subdivisées en 3 principaux types cellulaires selon leur morphologie et leurs fonctions : les astrocytes, les oligodendrocytes et les épendymocytes (**fig. 1**).

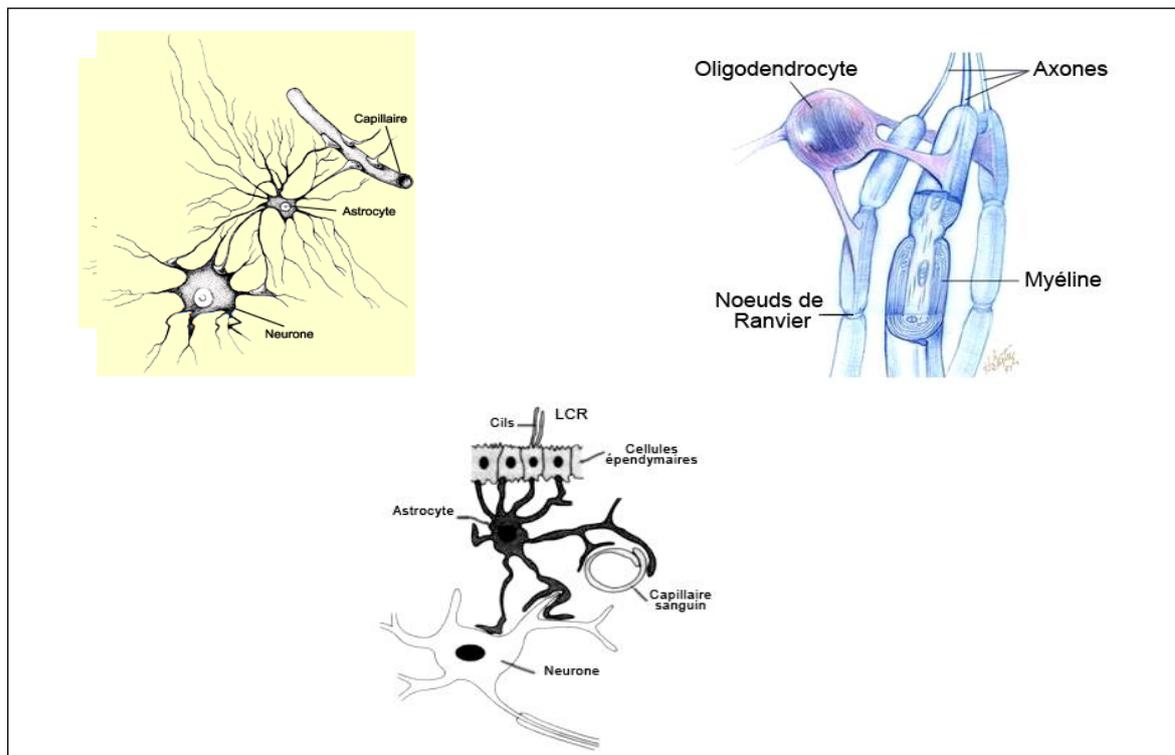
Les astrocytes (**fig. 1.A**) sont les cellules les plus grosses et les plus nombreuses de l'encéphale (représentant 20-50% du volume de certaines régions du cerveau). Ils ont de multiples fonctions, émettent des prolongements au contact des capillaires sanguins et participent à la constitution de la barrière hémato-encéphalique. D'autres prolongements entourent la fente synaptique, régulent la transmission et empêchent la dispersion des neuromédiateurs. Capables de stocker le glucose sous forme de glycogène, les astrocytes ont également un rôle nourricier pour les neurones. Enfin, organisés en maillage tridimensionnel autour des neurones, les astrocytes forment le véritable support architectural du tissu nerveux

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

(**fig.2**). Plusieurs études ont démontré leur rôle dans la guidance axonale, la formation synaptique et la plasticité ((Nedergaard et al., 2003),(Ullian et al., 2004))

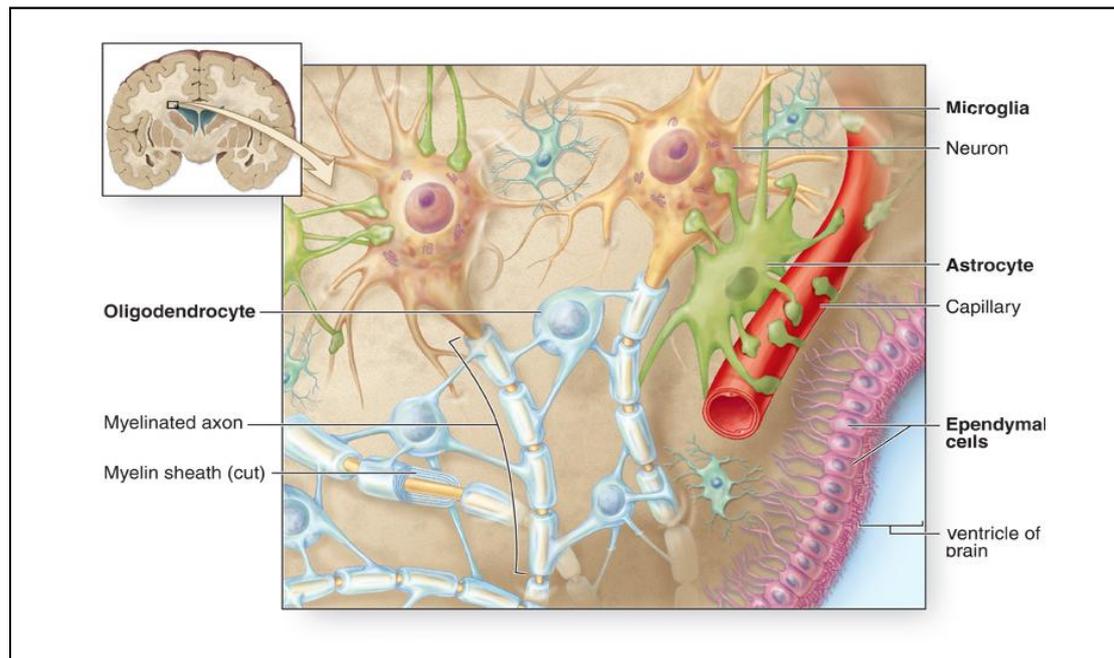
Les oligodendrocytes (**fig. 1.B**) sont plus petits que les astrocytes et portent moins de prolongements terminaux. Ils donnent naissance aux gaines de myéline entourant les axones qui naissent des corps cellulaires des neurones voisins. Les axones entourés des oligodendrocytes participent à la formation des fibres nerveuses (**fig.2**).

Les épendymocytes (**fig. 1.C**), sont des cellules cylindriques ciliées qui forment un épithélium simple cilié qui délimite les différentes cavités du SNC : les ventricules cérébraux et le canal épendymaire médullaire. Ils participent à la régulation des échanges entre le SNC et le liquide céphalorachidien (**fig.2**).



**Fig.1** : Différents types cellulaires du SNC : A : Astrocyte ; B : Oligodendrocyte ; C : Ependymocytes.

- <http://www.benbest.com/cryonics/Astrocyte.jpg>  
- <http://blustein.tripod.com/Oligodendrocytes/08-zoom.jpg> -  
- [http://schwann.free.fr/la\\_glie.html](http://schwann.free.fr/la_glie.html) -



**Fig.2** : Schéma de l'organisation cellulaire du SN par examen du microscope optique (M.O)  
-[http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201\\_mckinley/f14\\_6\\_cellular\\_organization\\_c.jpg](http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/f14_6_cellular_organization_c.jpg) -

Les tumeurs gliales ou gliomes sont formées de cellules tumorales présentant un phénotype voisin des cellules macrogliales normales.

## A.2 – Classification histologique des gliomes

L'incidence des tumeurs gliales augmente avec l'âge passant de 1,8 / 100000 habitants par an entre 20 et 29 ans, à 18,6 / 100000 habitants par an entre 70 et 79 ans. Les études récentes ont montré une incidence relativement stable des gliomes dans les différents groupes d'âge, sauf pour les patients de plus de 65-70 ans où l'augmentation de l'incidence a été signalée à plusieurs reprises ((Behin et al., 2003); (Baldi et al., 2010); (Legler et al., 1999); (Lonn et al., 2004)); les raisons de cette augmentation d'incidence chez les sujets âgés restent mal connues.

La cause des gliomes est inconnue dans la très vaste majorité des cas. A côté des rares formes génétiques, le seul facteur prédisposant réellement incriminé, dans

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

l'apparition de tumeur gliale est la radiothérapie encéphalique ((Ohgaki & Kleihues, 2005); (Muscat et al., 2006)).

Il existe plusieurs sous-types de gliomes qui sont de pronostic très différent, en fonction du caractère infiltrant ou non, du grade histologique et de la localisation de la tumeur dans le SNC.

La première classification histologique des tumeurs cérébrales fut établie en 1926 par Bailey et Cushing ((Bailey & Cushing, 1925)), sur le principe de l'histogenèse et la théorie des restes embryonnaires de Conheim. Selon ce principe, le développement des tumeurs s'effectuerait à partir des cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de développement et susceptibles de se différencier. Ils classèrent les tumeurs cérébrales en fonction de leur similarité cytologique avec les différents stades de différenciation au cours de l'embryogenèse et décrivent ainsi quatre types de gliomes astrocytaires : glioblastome, spongioblastome polaire, astroblastome et astrocytome fibrillaire ou protoplasmique, ainsi qu'un type d'oligodendrogliome.

En 1949, Kernohan ((Kernohan, 1949)) introduisit la notion de *grading* histologique de malignité. A la suite de ses travaux, la classification des gliomes fut basée sur des critères histologiques : densité cellulaire, polymorphisme nucléaire, nombre de mitoses, prolifération vasculaire endothéliale et nécrose notamment.

En 1979, la première classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) établit un consensus en associant des éléments de la classification de Bailey et Cushing à celle de Kernohan. Plusieurs révisions ont été validées depuis (1993-2000-2007) mais elle n'a pas fondamentalement changé.

Dans cette classification, ((Kleihues & Sobin, 2000); (Louis et al., 2007)) les gliomes sont classés selon deux paramètres : 1) l'aspect phénotypique des cellules tumorales et 2) le grade de malignité :

**Gliomes astrocytaires**

Grade **I** : Astrocytomes pilocytiques

Grade **II** : Astrocytomes diffus

- Astrocytomes fibrillaires
- Astrocytomes protoplasmiques
- Astrocytomes gémistocytiques

Grade **III** : Astrocytomes anaplasiques

Grade **IV** :

- Glioblastomes
- Glioblastomes à composante oligodendrogliale

**Gliomes oligodendrocytaires :**

Grade **II** : Oligodendrogliomes

Grade **III** : Oligodendrogliomes anaplasiques

**Gliomes mixtes :**

Grade **II** : Oligoastrocytomes

Grade **III** : Oligoastrocytomes anaplasiques

A.2.1 – Les gliomes astrocytaires

Ils constituent donc le phénotype le plus fréquent. Parmi les gliomes astrocytaires, la classification de l'OMS distingue les grades I qui sont des gliomes circonscrits (astrocytome pilocytique), des grades II (astrocytome diffus), III (astrocytome anaplasique) et IV (glioblastome) (**Tableau I**). L'astrocytome de grade I correspond principalement à l'astrocytome pilocytique (AP), et est observé le plus souvent chez l'enfant et représente 1/3 des tumeurs gliales pédiatriques. Il constitue une entité à part entière et se retrouve essentiellement au niveau du cervelet, du tronc cérébral, du chiasma et du nerf optique, et il n'est constitué que de tissu tumoral. Son traitement repose donc principalement sur l'exérèse chirurgicale, lorsqu'il est accessible à cette approche. Sa transformation en astrocytome de plus haut grade de malignité est exceptionnelle ((Alpers et al.,

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

1982)). L'astrocytome de grade II est défini par une cellularité augmentée par rapport à la substance blanche normale et des atypies cytonucléaires (**Tableau I**). Il touche plus volontiers les sujets jeunes aux alentours de la quarantaine ((Ohgaki & Kleihues, 2005); (Cavaliere et al., 2005)).

La présence d'atypies cyto-nucléaires et de mitoses définit l'anaplasie (astrocytome de grade III). La nécrose et /ou la prolifération endothélio-capillaire (**Tableau I**) font porter le diagnostic de glioblastome (GBM). Ce dernier représente la forme la plus fréquente et la plus maligne des gliomes : la médiane de survie du GBM, peu améliorée depuis 50 ans, reste d'environ 15 mois ((Stupp et al., 2007)).

Selon leur mode d'apparition et le terrain sur lequel ils surviennent, deux types de GBM sont individualisés : (1) les GBM primaires ou « de *novo* » et (2) les GBM secondaires ((Kleihues & Ohgaki, 1999)). Les premiers surviennent d'emblée, généralement chez les sujets âgés de plus de 50 ans. Les GBM secondaires, en revanche, surviennent chez des sujets jeunes et résultent de la progression d'un astrocytome de plus bas grade (II ou III).

Enfin, notons que bien qu'actuellement classés dans les tumeurs astrocytaires, certains glioblastomes peuvent associer un contingent oligodendrogial (((Ino et al., 2000); (He et al., 2001)) et sont donc appelés « glioblastomes à composante oligodendrogliale » (GBMO).

#### A.2.2 – Les gliomes oligodendrocytaires

L'OMS classe les oligodendrogliomes en deux grades : le grade II (OII) et le grade III anaplasique (OIII). Ces gliomes sont composés de cellules tumorales arrondies à noyaux réguliers, à cytoplasmes clarifiés avec un aspect caractéristique dit « **en nid d'abeille** ». Ils comportent généralement des zones microkystiques, des calcifications et leur vascularisation est représentée par un réseau dense de capillaires fins et branchés. Des atypies cytonucléaires marquées et d'occasionnelles mitoses restent compatibles avec un grade II. En revanche, selon les termes très

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

subjectifs employés dans la classification de l’OMS, une activité mitotique « significative », une prolifération endothélio-capillaire « marquée » ainsi qu’une nécrose « possible » indiquent une progression vers un grade III (**Tableau I**).

### A.2.3 – Les gliomes mixtes

Les gliomes mixtes ou oligoastrocytomes posent des difficultés diagnostiques avec les oligodendrogliomes « purs » d’une part et les astrocytomes d’autre part. Il n’existe pas à l’heure actuelle de consensus clair sur la proportion minimale nécessaire de chacun des deux contingents cellulaires pour établir un diagnostic de gliome mixte. En effet, le pourcentage de chaque composante tumorale, variable selon les études, paraît impossible à établir en pratique. Les oligoastrocytomes sont gradés II ou III en fonction des critères de malignité énoncés par l’OMS : densité cellulaire, atypies nucléaires, activité mitotique, nécrose et prolifération vasculaire (**Tableau I**). Il faut signaler que dans la nouvelle classification de l’OMS, la découverte de foyers nécrotiques au sein d’un gliome mixte anaplasique amène également à porter le diagnostic de glioblastome à composante oligodendrogliale.

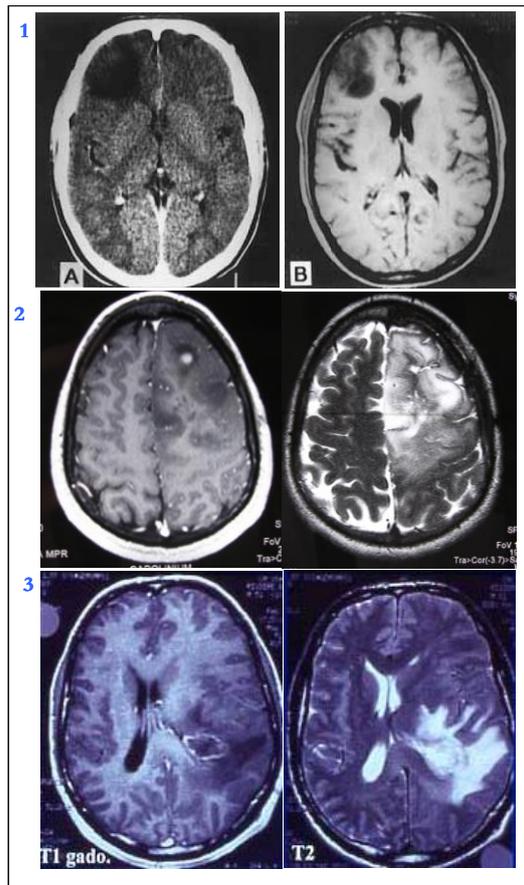
Actuellement, aucun marqueur biologique n’est clairement validé en clinique à l’échelon individuel pour les patients atteints de tumeurs cérébrales. De même, aucun marqueur immuno-histochimique n’est spécifique d’un type ou sous-type de gliome et n’est proposé dans la classification diagnostique de l’OMS. Cependant, l’identification de certains antigènes cellulaires constitue une aide précieuse en permettant d’orienter le diagnostic (positif et différentiel) du phénotype et d’évaluer l’agressivité de la tumeur.

Tableau I : Classification histologique des tumeurs gliales selon l'OMS (2007) (Cahill et al., 2007; Figarella-Branger & Bonnier, 2005)

Type histologique	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Astrocytomes diffus (grade II)	haut degré de différenciation	modérée	occasionnelles	absente ou 1 mitose	absente	absente
<b>Tumeurs astrocytaires</b>						
Astrocytomes anaplasiques (grade III)	anaplasie focale ou dispersée	augmentée diffusément ou focalement	présentes	présente	absente	absente
Glioblastomes (grade IV)	faible	élevée	marquées	marquée	présente	présente
<b>Tumeurs oligodendrogiales</b>						
Oligodendrogliomes (grade II)	bien différencié	modérée	possiblement marquées	absente ou mitoses occasionnelles	absente ou peu conséquente	non proéminente
Oligodendrogliomes anaplasiques (grade III)	Anaplasie focale ou diffuse	éventuellement augmentée	éventuellement marquées	éventuellement forte	possible	possible
<b>Tumeurs oligoastrocytaires</b>						
Oligoastrocytomes (grade II)	bien différencié	faible ou modérée	-	absente ou faible	absente	absente
Oligoastrocytomes anaplasiques (grade III)	-	éventuellement forte	éventuellement présentes	éventuellement forte	absente	possible

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

Une autre classification clinique et histo-radiologique a été proposée par le service de neuropathologie de l'hôpital Sainte-Anne ((Daumas-Duport et al., 1997a); (Daumas-Duport et al., 1997b)). Elle est d'utilisation plus simple et distingue 3 types de gliomes: (1) les tumeurs oligodendrogiales de type A, (2) les tumeurs oligodendrogiales de type B et (3) les GBM. La distinction entre les tumeurs oligodendrogiales de type A et de type B est basée sur l'existence d'une angiogenèse tumorale objectivée par la présence d'une prise de contraste sur l'imagerie par résonance magnétique (**images IRM et Scanner**). Plus récemment, un groupe de tumeurs glioneuronales malignes a été individualisé (Varlet, JNS).



**Fig.3** : Classification de Ste-Anne :

- 1) Aspect d'un oligodendrogliome de grade A, à gauche scanner et IRM à droite. Pas de prise de contraste après injection de gadolinium
- 2) Oligodendrogliome de grade B En IRM, prise de contraste après injection de gadolinium
- 3) aspect d'un GBM en IRM après injection de gadolinium.

Bien qu'en apparence simple, la classification de Ste-Anne soulève d'autres difficultés en pratique neuro-oncologique car elle regroupe dans des catégories des tumeurs biologiquement différentes. Elle est moins utilisée de nos jours, au profit de la classification OMS qui constitue actuellement la classification « standard ».

### A.3 – Limites de la classification diagnostique actuelle des gliomes

La classification OMS repose sur des critères morphologiques, subjectifs et d'une reproductibilité inconstante ((Daumas-Duport et al., 2000)). Le taux de discordance diagnostique inter-anatomopathologiste se situe entre 20 et 50% dans la littérature ((Mittler et al., 1996); (Coons et al., 1997); (Prayson et al., 2000); (Giannini et al., 2001)). Outre la difficulté à déterminer le grade de la malignité de la tumeur, différencier une tumeur astrocytaire d'une tumeur oligodendrocytaire n'est pas non plus aisé en pratique courante ((Coons et al., 1997); (Daumas-Duport et al., 2000); (Daumas-Duport et al., 1997a); (Giannini et al., 2001)) car il n'existe pas de marqueurs immuno-histochimiques discriminatifs formels ((Fortin et al., 1999)) même si l'apport de nouveaux marqueurs immuno-histochimiques comme l'interneuxine alpha sont des apports utiles ((Ducray et al., 2010)).

La dispersion des survies au sein d'un même groupe neuropathologique traduit également la difficulté de la classification neuropathologique de l'OMS à identifier des groupes de tumeurs au comportement clinique homogène. Les GBM sont relativement bien reconnus avec une faible dispersion des survies. En revanche, la survie varie de façon très importante dans les gliomes anaplasiques et les gliomes de bas grade comme l'indique le tableau II ci-dessous.

**Tableau II** : Hétérogénéité et dispersion de la survie globale et de la réponse à la chimiothérapie au sein des tumeurs gliales (Louis et *al.*, 2001).

		Astrocytome	Oligoastrocytome	oligodendrogliome
Grade II	OS	3 – 10 ans	5 – 12 ans	8 – 20 ans
	RC	inconnu	31 – 82 %	50 – 82 %
Grade III	OS	2 – 5 ans	2 – 8 ans	2 – 10 ans
	RC	10 – 30 %	20 – 60 %	40 – 80 %
Grade IV	OS	1 – 2 ans		
	RC	10 %		

**OS** : Survie globale

**RC** : Réponse à la chimiothérapie

## A.4- Altérations génétiques et épigénétiques

Les altérations génétiques impliquées dans l'histogénèse des gliomes sont actuellement mieux connues (**fig.6**). La gliomagenèse fait intervenir des altérations moléculaires telles que des amplifications, des mutations, des réarrangements ou des délétions chromosomiques. Ces altérations chromosomiques affectent différents proto-oncogènes (*Egfr*, *Pdgfr*, *Mdm2*..) et gènes suppresseurs de tumeur (*p16*, *p53*, *Rb*, *Pten*...).

L'enchaînement de ces altérations génétiques est à l'origine de la progression tumorale, certains gènes étant altérés de façon précoce, d'autres intervenant plus tardivement au cours de l'évolution.

Certaines altérations génétiques emblématiques comme la co-délétion 1p-19q ou la mutation *IDH1* sont bien caractérisées mais leurs conséquences fonctionnelles sur l'oncogénèse gliale restent inconnues. En revanche, les conséquences fonctionnelles des autres altérations génétiques sont plus claires puisqu'elles affectent à un degré ou à un autre le contrôle du cycle cellulaire et/ou la transduction du signal.

### A.4.1) Mutations de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (*IDH1* et *IDH2*)

---

Les mutations du gène *IDH1* ont été identifiées en 2008 au cours du séquençage systématique d'une série de 22 glioblastomes ((Parsons et al., 2008)). La protéine *IDH1* correspond à l'isoforme cytoplasmique de l'isocitrate déshydrogénase. *IDH1* catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate et permet la réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH. Les mutations d'*IDH1* surviennent toujours au niveau du même codon et dans la très grande majorité des cas (>90%) correspondent à une mutation CGT→CAT, qui entraîne une substitution Arg<sup>132</sup>→His. Certains patients, n'ayant pas de mutation d'*IDH1*, ont une mutation

du gène *IDH2* qui code pour l'isoforme mitochondriale de l'isocitrate déshydrogénase. Environ 70-80% des gliomes de bas grade, 50-70% des gliomes anaplasiques et 80-90% des glioblastomes secondaires ont une mutation d'*IDH1* ou d'*IDH2* contre 5% seulement des glioblastomes primaires *de novo* ((Nobusawa et al., 2009); (Sanson et al., 2009); (Watanabe et al., 2009)). La mutation d'*IDH1* semble donc être un évènement génétique très précoce survenant initialement dans les lésions de bas grade et se maintenant au cours de la transformation anaplasique de la tumeur jusqu'au stade ultime de glioblastome « secondaire ». En revanche, le rôle de la mutation *IDH1* apparaît très marginal dans les glioblastomes primaires. Les mutations d'*IDH1* ou d'*IDH2* semblent spécifiques des gliomes diffus et ne sont pas retrouvées dans les autres types de tumeurs cérébrales (astrocytomes pilocytiques, épendymomes, médulloblastomes) ((Bleeker et al., 2009); (Sanson et al., 2009)). Il existe une corrélation étroite entre les mutations d'*IDH1/IDH2* et le profil génétique. En effet, tous les gliomes avec une codélétion 1p/19q ont une mutation d'*IDH1/IDH2* ((Labussiere et al., 2010)). La mutation d'*IDH1* est associée à un meilleur pronostic et ceci indépendamment du grade, de l'âge, du statut MGMT, du profil génomique et du traitement ((Sanson et al., 2009)). Par exemple, au sein des gliomes anaplasiques, la survie des patients *IDH1* mutés, est 4 fois supérieure à celle des patients *IDH1* non mutés (81 mois versus 19 mois) ((Sanson et al., 2009)).

Les mutations qui surviennent à l'état hétérozygote suffisent pour inactiver l'enzyme qui fonctionne à l'état de dimère. Il a été montré que la mutation d'*IDH1* entraînait non seulement une perte de la fonction de décarboxylation oxydative de l'enzyme mais également un gain de fonction puisque l'enzyme mutée devient capable de réduire l'alpha-cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate ((Dang et al., 2009)). Dans cette perspective, il est intéressant de noter que les patients qui ont des anomalies du métabolisme du 2-hydroxyglutarate ont un risque accru de développer une tumeur cérébrale. L'hypothèse actuelle est que dans les cellules *IDH1* mutées, la diminution du NADPH (et ainsi la diminution du glutathion

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

réduit) et l'accumulation de 2-hydroxyglutarate augmente le stress oxydatif. La mutation d'*IDH1* pourrait à la fois contribuer à la gliomagenèse (le stress oxydatif augmentant l'instabilité génomique) et à l'augmentation de la sensibilité aux traitements qui, comme la radiothérapie augmente le stress oxydatif ((Fu et al., 2010)).

Le développement récent d'anticorps dirigés spécifiquement contre la mutation *IDH1*, R132H devrait nettement faciliter l'utilisation du statut *IDH1* à visée diagnostique, en utilisant l'immuno-histochimie sur coupes paraffines ((Capper et al., 2009); (Capper et al., 2010)).

#### A.4.2) Codélétion 1p/19q

La codélétion 1p/19q est une altération génomique précoce des oligodendrogliomes ((Aldape et al., 2007); (van den Bent, 2007)). Elle correspond à une translocation centromérique déséquilibrée  $t(1;19)(q10;p10)$ , ce qui se traduit au plan génomique par une perte complète des chromosomes 1p et 19q ((Idbaih et al., 2005); (Jenkins et al., 2006)). Elle est retrouvée dans 60 à 80% des oligodendrogliomes purs. Elle est associée à une topographie préférentiellement frontale de la tumeur ((Zlatescu et al., 2001); (Mueller et al., 2002), (Megyesi et al., 2004)), à une meilleure sensibilité aux traitements, que ce soit la radiothérapie ou la chimiothérapie et à un meilleur pronostic (survie sans progression et survie globale) ((Aldape et al., 2007); (van den Bent, 2007)). Il est important de distinguer la perte complète (c'est-à-dire la « vraie » codélétion 1p/19q qui correspond à la translocation), des pertes partielles qui elles, au contraire, sont plus fréquentes dans les tumeurs astrocytaires de haut grade et sont associées à un mauvais pronostic ((Idbaih et al., 2005)). Les conséquences fonctionnelles de la co-délétion 1p-19q sont inconnues. Actuellement, une hypothèse est que l'haplo-insuffisance d'un grand nombre de gènes serait à l'origine d'une activité oncogénique.

#### A.4.3 Dérégulation du cycle cellulaire, activation de la transduction du signal et prolifération gliale

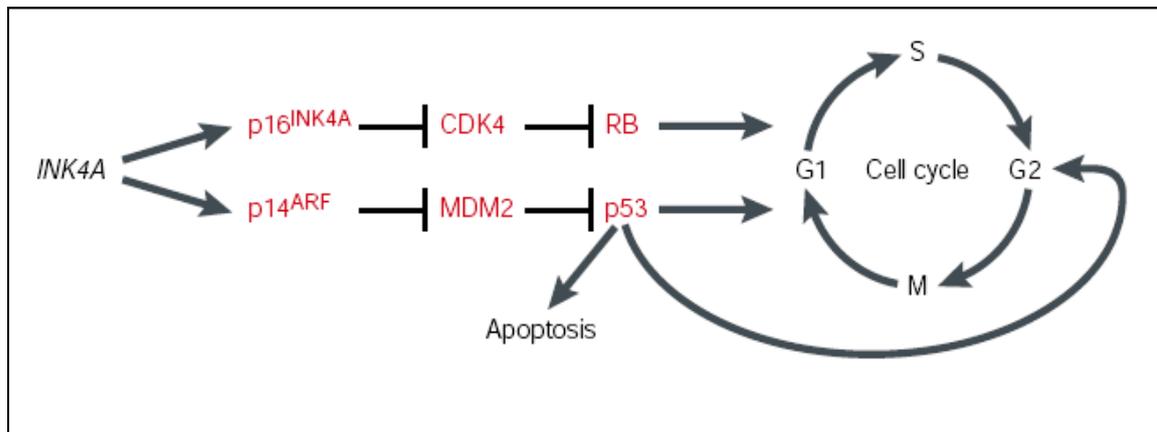
L'inactivation de p53 qui est associée au phénotype astrocytaire de la tumeur est une altération génétique précoce, souvent détectée dans les astrocytomes diffus de bas grade (II), persistant au cours de la « transformation anaplasique » secondaire. A l'inverse, la délétion de p16/CDKN2A, l'inactivation de *RB1* en 13q, et l'amplification de CDK4, mutuellement exclusives, sont plus fréquentes dans les gliomes de haut grade. L'inactivation de *PTEN* en 10q et l'amplification d'*EGFR* s'observent préférentiellement dans les glioblastomes.

Ces altérations génétiques affectent principalement 3 grandes voies impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la transduction du signal : celle de **p53**, celle de **RB1** et celle des **récepteurs tyrosine kinase** aux facteurs de croissance. Au stade de glioblastome, deux études génomiques à haut débit ont montré que dans une vaste majorité des cas (>80%) il existait une altération conjointe de ces 3 grandes voies ((Parsons et al., 2008); The Cancer Genome Atlas Network Project 2008).

- La voie de p53 régule la réponse cellulaire aux altérations de l'ADN à l'hypoxie et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire avec, soit une entrée en apoptose de la cellule, soit la mise en place de mécanismes de réparation. Cette voie peut être inactivée par la mutation de p53, ou par l'amplification de MDM2, ou plus rarement par celle de MDM4 qui entraîne la dégradation de p53, par l'inactivation de p14/ARF (délétion ou inactivation épigénétique) qui inhibe MDM2 (Furnari et *al.*, 2007).
- La protéine RB (produit du gène *RB1*), est hypophosphorylée dans les cellules quiescentes et séquestre ainsi le facteur de transcription E2F. E2F quand il est libéré induit la transcription de gènes qui vont promouvoir l'avancée dans le cycle cellulaire. La phosphorylation de RB par le complexe

Cyclin D1/CDK4/CDK6 entraîne la libération d'E2F. Le contrôle négatif sur la prolifération exercée par RB de par sa liaison à E2F, peut être aboli : soit par inactivation de RB1 (délétion, mutation ou méthylation), soit par amplification de CDK4 ou plus rarement CDK6 qui entraînent la phosphorylation de RB, ou encore par inactivation (délétion ou méthylation) de p16/CDKN2A qui inhibe CDK4 ((Sanson et al., 2004); (Furnari et al., 2007)).

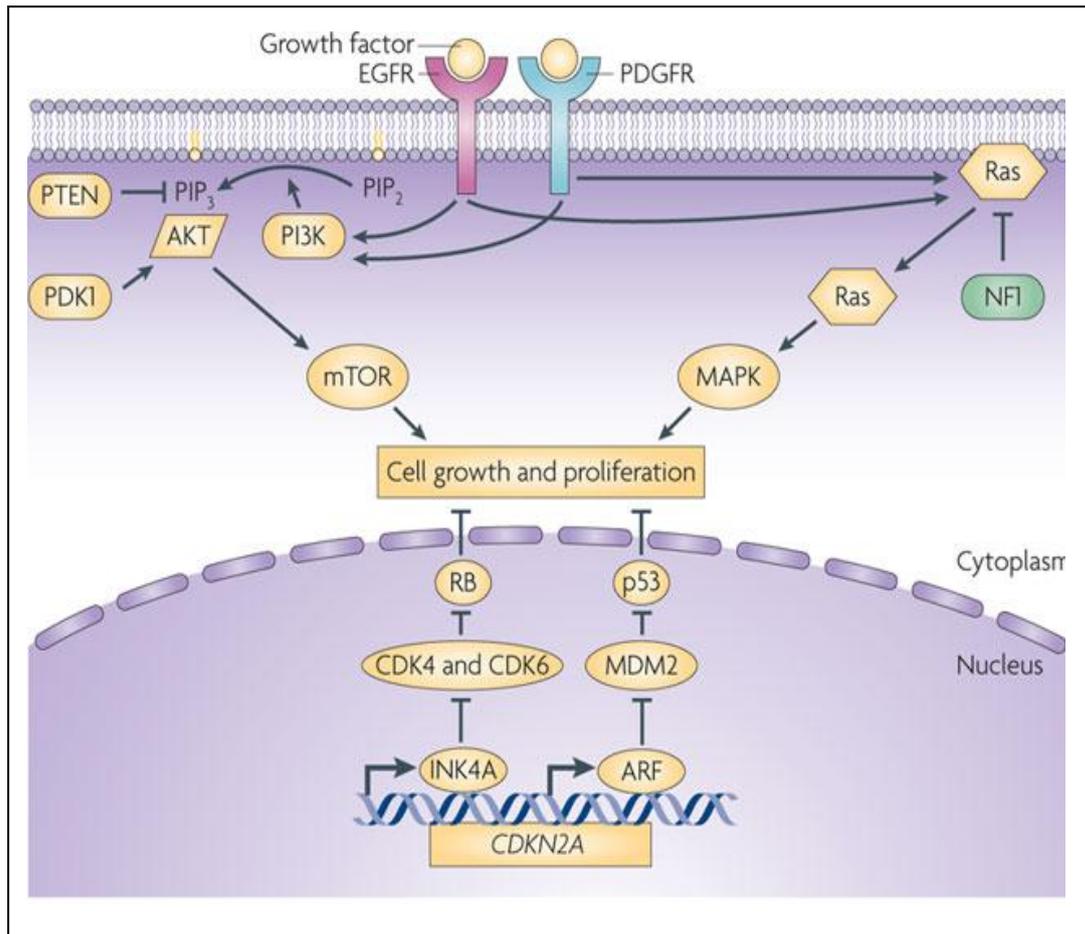
Ainsi, l'inhibition p53 et RB ont pour conséquence de faire progresser le cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S et de lever l'inhibition que *p53* exerce au niveau des phases G1 et G2 (**fig.4**).



**Fig.4** : Voie de régulation du cycle cellulaire contrôlée par INK4<sup>ARF</sup>

-Holland, 2001-

- La voie des facteurs de croissance peut être activée dans les gliomes par plusieurs mécanismes qui vont affecter la prolifération, la différenciation, la mobilité (infiltration) et l'apoptose (**Fig.5**):



**Fig.5** : Voie de signalisations impliquées dans le processus de cancérisation des gliomes RAS/ MAP kinase et PI3 kinase / AKT altérées dans les gliomes.

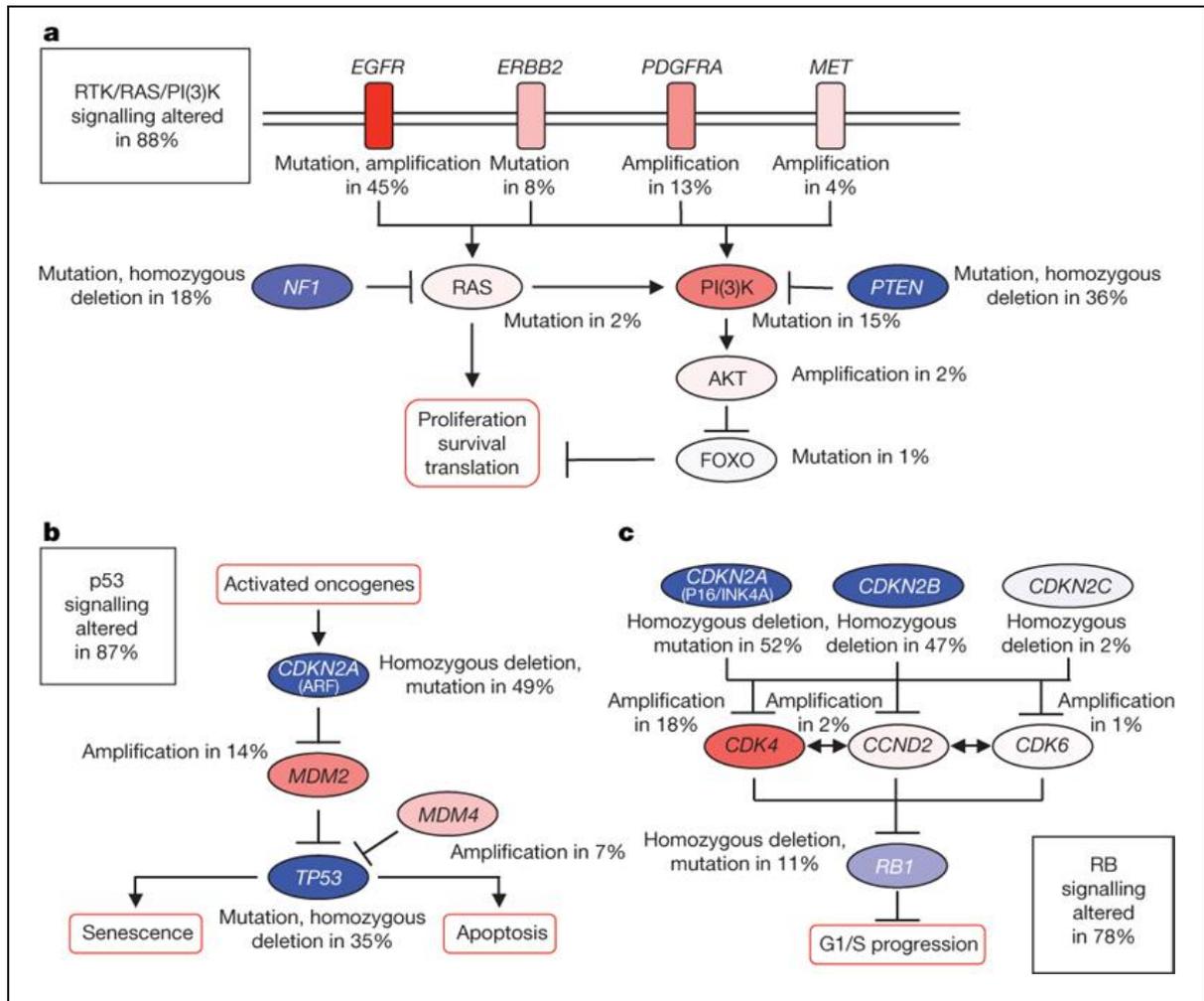
-Holland, 2010-

**1** : surexpression du facteur de croissance et de son récepteur qui forment ainsi une boucle autocrine (PDGF/PDGFR).

**2** : amplification ou mutation du facteur de croissance dont l'exemple le plus caractéristique est l'EGFR, notamment sa forme EGFRvIII qui est une forme tronquée du récepteur auto activé en l'absence de ligand qui s'observe essentiellement dans les glioblastomes primaires ((von Deimling et al., 1993); (Kleihues & Ohgaki, 1999); (Ohgaki & Kleihues, 2007), (Gan et al., 2009); (Louis et al., 2007)).

**3** : inactivation de PTEN qui inhibe normalement la voie de signalisation PI3K/AKT en aval des récepteurs tyrosine kinase aux facteurs de croissance ((Sanson et al., 2004); (Furnari et al., 2007)). La voie des facteurs de croissance active principalement les voies de signalisation oncogéniques

Ras/MAPK et PI3K/AKT. Les mutations de *Ras* sont rares dans les gliomes et cette voie de signalisation est activée en amont du fait de l'hyperactivation des récepteurs. Par contre, des mutations activatrices de PIK3CA, qui activent la voie PI3K/AKT, ont été décrites ((Samuels et al., 2004); (Gallia et al., 2006)). La démonstration que la voie de signalisation oncogénique PI3K/AKT est activée par une multitude de récepteurs tyrosine kinase dans les glioblastomes, permet de mieux comprendre pourquoi les thérapeutiques ciblées « mono-cibles » ont échoué jusqu'à présent et suggère que des thérapeutiques « multi-cibles » devraient être plus efficaces ((Stommel et al., 2007)).



**Fig.6:** Altérations génétiques les plus fréquentes au sein des glioblastomes.

-The Cancer Genome Atlas Network Project, 2008

#### A.4.4) Activation de *BRAF* dans le cas particulier des astrocytomes pilocytiques

Des études génomiques récentes ont mis en évidence l'existence dans environ 2/3 des cas, d'astrocytomes pilocytiques d'un gain en 7q34 correspondant à la duplication de l'oncogène *BRAF* ((Bar et al., 2008); (Deshmukh et al., 2008); (Jones et al., 2008); (Korshunov et al., 2009)). Cette duplication entraîne un réarrangement génique aboutissant à un gène de fusion *KIAA1549::BRAF* et une protéine oncogénique dont l'activité tyrosine kinase est constitutionnellement activée ((Jones et al., 2008)). La recherche du gène de fusion *KIAA1549::BRAF* peut ainsi être

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

utilisée comme marqueur diagnostique dans la mesure où ce gène de fusion est spécifique des astrocytomes pilocytiques ((Korshunov et al., 2009)). D'une manière générale, la voie de signalisation de BRAF est altérée dans 85% des astrocytomes pilocytiques, soit du fait du gène de fusion *KIAA1549:: BRAF*, ou du fait d'une mutation de *NF1* (qui inhibe RAS qui est en amont de BRAF), soit encore du fait de mutations de BRAF ((Jones et al., 2008)). La recherche de cette altération est utile pour différencier les astrocytomes pilocytiques et les astrocytomes diffus de bas grade ((Korshunov et al., 2009)).

#### A.4.5) Méthylation du promoteur du gène de la *MGMT* et altérations épigénétiques

Dans les gliomes, de nombreux gènes suppresseurs de tumeur (p16/CDKN2A, p14/ARF, p15/CDKN2B) sont inactivés par la méthylation d'îlots CpG situés en 5' de leur promoteur, ce qui inhibe leur expression et contribue ainsi à l'oncogenèse des gliomes.

C'est le cas également du gène de la *MGMT*. Le gène *O6 methylguanine DNA methyl-transferase (Mgmt)* est situé en 10q26 et code pour une protéine de réparation de l'ADN. Elle a pour fonction de réparer principalement les adduits alkyls en position O6 des guanines. Cette protéine protège ainsi les cellules normales des adduits alkyls induits par les carcinogènes extérieurs et les cellules tumorales des agents alkylants. Il a en effet été montré que la protéine *MGMT* constitue un mécanisme de résistance aux nitroso-urées et aux agents méthylants (tel le temozolomide) dans des cellules tumorales *in vitro* et dans des xéno greffes ((Gerson, 2004)). L'activité transcriptionnelle du gène codant pour la *MGMT* peut être régulée négativement par méthylation des îlots CpG de son promoteur. Les patients dont le promoteur de la *MGMT* est méthylé ont une survie nettement plus longue après traitement par radio-chimiothérapie concomitante et adjuvante par temozolomide, que les patients non méthylés ((Hegi et al., 2005)). La corrélation entre la méthylation de *MGMT* et son expression est loin d'être parfaite et

paradoxalement, c'est la méthylation de son promoteur et non l'expression de MGMT qui est associée à un meilleur pronostic ((Everhard et al., 2009); (Karayan-Tapon et al.)). Dans les gliomes de bas grade et les gliomes anaplasiques, notamment, cela pose la question de savoir si c'est la méthylation de MGMT en elle-même qui est associée à un meilleur pronostic ou bien si cette méthylation ne serait pas le reflet d'un pattern de méthylation plus global qui serait responsable du meilleur pronostic. Les études récentes du méthylome iraient plutôt dans le sens de cette seconde hypothèse dans la mesure où elles ont montré que certains gliomes, notamment ceux qui ont une mutation d'*IDH1*, ont un phénotype hyperméthylé (CpG island methylator phenotype - CIMP) lequel est associé à un meilleur pronostic ((Laffaire et al., 2010); (Noushmehr et al., 2010)). Néanmoins, le lien entre le statut MGMT et le phénotype hyperméthylé n'a pas encore été précisément étudié.

#### A.4.6) Rôle des micro-RNAs (miRNAs)

Les miRNAs sont des petites molécules de RNA (16-29 nucléotides), très conservées au cours de l'évolution, qui modulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Des données récentes suggèrent que certains miRNA pourraient être impliqués dans l'oncogenèse des gliomes (surtout des glioblastomes) en interférant notamment avec les voies de signalisation ((Li et al., 2009)). Il s'agit par exemple de *miR-26a-2* (surexprimé dans 12% des glioblastomes, qui réprime l'expression de PTEN ((Huse et al., 2009); (Kim et al., 2010)), *mir34-a*, *miR-21*, *miR-7*, *miR-124* et *miR-181*.

### A.5- Vers une classification histo-moléculaire

Malgré les apports liés à la découverte d'altérations génétiques ponctuelles, la classification des gliomes reste fondamentalement morphologique. Toutefois, le développement récent des puces ADN a permis de disposer assez simplement

d'une vision globale du génome et du transcriptome des tumeurs qui devrait déboucher à terme sur l'élaboration d'une « classification histo-moléculaire » des gliomes.

La technologie des puces ADN permet l'analyse simultanée de plusieurs dizaines de milliers de gènes dans un échantillon biologique, aussi bien au niveau de son génome (ADN) que de son transcriptome (ARN) ((Karsten et *al.*, 2004)).

#### A.5.1 Apport des études génomiques

Les études génomiques ont essentiellement confirmé la présence d'altérations préalablement identifiées. Ainsi, les astrocytomes de bas grade ont préférentiellement un gain du 7q, les glioblastomes de *novo* une amplification de l'EGFR, une délétion de CDKN2A et une perte du chromosome 10, les oligodendrogliomes purs une codélétion 1p/19q ((Idbaih et *al.*, 2010)). Plusieurs études ont également confirmé que le profil génomique des glioblastomes secondaires différait de celui des glioblastomes de *novo* ((Roerig et *al.*, 2005); (Maher et *al.*, 2006)). A l'exception de la duplication de l'oncogène *BRAF* dans les astrocytomes pilocytiques, il n'existe donc pas d'altération génomique diagnostique au sein des gliomes.

Les études génomiques ont en revanche permis d'affiner la valeur pronostique de certains marqueurs. Ainsi, c'est grâce à l'utilisation des puces génomiques que la distinction entre délétion partielle et délétion complète du 1p a pu être faite ((Idbaih et *al.*, 2005); (Ichimura et *al.*, 2008)) permettant de distinguer des groupes de pronostic très différents ((Idbaih et *al.*, 2005); (Ichimura et *al.*, 2008)). Par ailleurs, au sein des glioblastomes *de novo*, plusieurs études ont montré que l'absence de gain du chromosome 7, et l'absence de perte du chromosome 10, étaient associées à un meilleur pronostic ((Misra et *al.*, 2005); (Nigro et *al.*, 2005); (Korshunov et *al.*, 2005); (Maher et *al.*, 2006); (Idbaih et *al.*, 2008)). Au sein des

gliomes de bas grade, la présence d'une perte du 9p et/ou du 10q sont associées à un moins bon pronostic ((Houillier et al., 2010)).

La valeur pronostique de certaines de ces altérations génomiques contribue actuellement à la sélection de stratégies thérapeutiques ou d'inclusion dans des essais cliniques. Par exemple, le statut 1p-19q conditionne le type de traitement administré dans les essais cliniques internationaux en cours dans les gliomes anaplasiques.

## A.5.2 Apport des études transcriptomiques

### A.5.2.a) Identification de marqueurs diagnostiques

Les premières études transcriptomiques ((Sallinen et al., 2000); (Ljubimova et al., 2001); (Rickman et al., 2001); (Zhang et al., 2002)) ont montré qu'il était possible de distinguer différents sous-types histologiques de gliomes sur la base de leur profil d'expression génique. Le premier travail ayant montré que l'étude du transcriptome pouvait permettre d'améliorer la classification histologique des gliomes est celui de Nutt ((Nutt et al., 2003)). Dans ce travail, les auteurs ont montré qu'une signature moléculaire issue de la comparaison du profil d'expression génique de glioblastomes et d'oligodendrogliomes classiques permettait, contrairement à l'histologie, de reclasser en 2 groupes à la survie différente, une série de glioblastomes et d'oligodendrogliomes atypiques. Cette étude a également permis de montrer qu'il était ensuite possible d'identifier des marqueurs simples à partir de l'étude du transcriptome, utilisables en immuno-histochimie. En effet, les auteurs ont montré que l'étude immuno-histochimique d'YKL-40 permettait de distinguer de manière fiable les glioblastomes, des oligodendrogliomes anaplasiques ((Nutt et al., 2005)). Cependant, même si YKL-40 semble être un marqueur astrocytaire assez fiable (Rousseau et al., 2006), son étude en immuno-histochimie n'est pas passée en routine pour l'instant.

### A.5.2.b) Identification de marqueurs pronostiques

Une deuxième série de travaux a permis de montrer que l'étude du profil d'expression génique permettait d'identifier des sous-groupes transcriptomiques au pronostic différent au sein de gliomes de même grade ((Freije et *al.*, 2004); (Liang et *al.*, 2005); (Nigro et *al.*, 2005); (Phillips et *al.*, 2006)). Dans l'étude de Phillips et collaborateurs de 2006, les auteurs ont utilisé une stratégie d'analyse semi-supervisée qui a consisté dans un premier temps à sélectionner les gènes les plus associés à la survie puis dans un deuxième temps à classer une série de gliomes de grades III et IV en fonction de l'expression de ces gènes. Ils ont ainsi décrit 3 sous-groupes transcriptomiques de gliomes malins qu'ils ont appelés proneural, mésenchymateux et prolifératif. Ils ont notamment montré que la signature proneurale était associée à un meilleur pronostic indépendamment du grade. Des travaux récents ont montré qu'en réalité les vrais gliomes proneuraux de bon pronostic sont ceux qui ont une mutation d'*IDH1* ((Noushmehr et *al.*, 2010)). A l'heure actuelle, les deux travaux les plus aboutis concernant l'identification de marqueurs pronostiques sont issus de deux méta-analyses de données transcriptomiques, l'une réalisée dans les glioblastomes et l'autre dans les gliomes de haut grade (grades III et IV) (de Tayrac et *al.*, 2011; (Colman et *al.*, 2010)). La méta-analyse des glioblastomes inclus dans 4 études transcriptomiques (incluant l'étude de Phillips), a permis d'identifier une signature à 9 gènes dont l'expression peut être étudiée en RT-PCR sur du tissu inclus en paraffine ((Colman et *al.*, 2010)). Cette signature permet de distinguer deux groupes de glioblastomes aux pronostics différents et ceci de façon indépendante du statut MGMT, de l'âge et de l'index de Karnofsky. Cependant, la médiane de survie de 7 ans du groupe de glioblastomes de meilleur pronostic est franchement inhabituelle et malheureusement, il ne semble pas que dans cette étude, il y ait eu une relecture histologique. A partir d'une stratégie similaire, de Tayrac et collaborateurs ont réalisé une méta-analyse de 276 gliomes de grades III et IV et identifié une signature à 4 gènes, étudiable en

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

PCR et associée à un meilleur pronostic indépendamment du statut MGMT et du statut IDH1 (de Tayrac et *al.*, 2011). L'expression de ces gènes serait étudiable en immuno-histochimie, ce qui devrait considérablement faciliter le développement de l'utilisation de cette signature.

#### **A.5.2.c) Identification de marqueurs prédictifs de la réponse au traitement**

Peu d'études se sont intéressées à la réponse au traitement. L'une d'elles a comparé le profil d'expression génique d'oligodendrogliomes anaplasiques répondeurs et non répondeurs à la chimiothérapie ((French et *al.*, 2005)). Les auteurs ont pu identifier une série de gènes associés à la réponse au traitement, indépendamment de la codélétion 1p/19q, mais cela ne leur a pas permis d'identifier réellement de marqueurs utilisables en routine. L'étude la plus aboutie dans ce domaine est celle qui a étudié le profil d'expression génique de glioblastomes inclus dans l'étude de Stupp et traités soit par radiothérapie seule, soit par radio-chimiothérapie concomitante ((Murat et *al.*, 2008)). La stratégie a consisté à corrélérer l'expression de cluster de gènes à la survie. Ceci leur a permis de montrer que l'expression de gènes de cellules souches neurales, notamment des gènes de la famille HOX, était associée à un moins bon pronostic, tout comme l'expression de gènes associés à la surexpression d'EGFR et de CDK4. Par contre, l'expression de gènes associés à la réponse immune était associée à un meilleur pronostic. Les auteurs ont étudié l'expression du gène HOXA10 en immuno-histochimie et ont montré qu'elle était associée à un moins bon pronostic chez les patients traités par radio-chimiothérapie mais non par radiothérapie seule. Il paraît cependant peu probable que l'étude de l'expression de HOXA10 passera en routine dans la mesure où, dans cette étude, son impact pronostique restait beaucoup plus faible que celui du statut MGMT.

#### **A.5.2.d) Identification de nouveaux sous-types de gliomes**

L'étude la plus aboutie, s'est attachée à classer sur le plan transcriptomique des glioblastomes inclus dans le projet TCGA ((Verhaak et *al.*, 2010)). A partir de l'étude non supervisée de 200 glioblastomes, les auteurs ont pu identifier de manière robuste 4 sous-types de glioblastomes qu'ils ont appelés proneural, classique, mésenchymateux et neural. L'intérêt de cette étude est d'avoir montré qu'il existait une corrélation entre ces 4 sous-groupes et certaines caractéristiques génomiques et génétiques. Ainsi, le groupe proneural est enrichi en glioblastomes ayant une amplification du *PDGFR $\alpha$* , une mutation d'*IDH1* et des mutations de *p53*. Le groupe « classique » est caractérisé par la signature génomique classique des glioblastomes associant amplification de l'*EGFR*, perte du chromosome 10 et délétion de *CDKN2A*, et le groupe mésenchymateux par la plus grande fréquence des altérations du gène *NF1*. Les auteurs ont par ailleurs mis au point une signature moléculaire de 840 gènes permettant de distinguer ces 4 sous-types transcriptomiques. Spontanément, ces 4 sous-types transcriptomiques ont le même pronostic. Cependant, l'évolution en fonction du type de traitement suggérait que les sous-types, classique et mésenchymateux, contrairement aux sous-types proneural et neural, tiraient bénéfice de la radio-chimiothérapie concomitante et/ou d'une chimiothérapie adjuvante. Néanmoins, cet élément reste à valider dans une étude prospective. Malgré son intérêt, cette étude transcriptomique montre les limites d'une classification des glioblastomes se fondant uniquement sur le transcriptome puisque la classification transcriptomique ne permet pas de distinguer des glioblastomes au pronostic différent, alors que la prise en compte d'autres éléments comme le statut *IDH1*, ou le pattern de méthylation qui lui est associé, permet de scinder la classe des glioblastomes proneuraux en 2 sous-groupes au pronostic radicalement différent ((Noushmehr et *al.*, 2010)).

Au total, les études transcriptomiques et génomiques à haut débit montrent bien l'hétérogénéité moléculaire des gliomes et montrent également comment cette technologie peut permettre d'affiner la classification histologique des gliomes. Il reste désormais à réaliser un travail d'harmonisation entre les différentes classifications transcriptomiques dont les résultats diffèrent en fonction des stratégies d'analyse utilisées. Il reste également à réaliser des études intégrant l'ensemble des paramètres transcriptomiques, génomiques, épigénétiques et génétiques pour ensuite identifier des marqueurs simples utilisables en routine.

#### **A.6- Les traitements des glioblastomes**

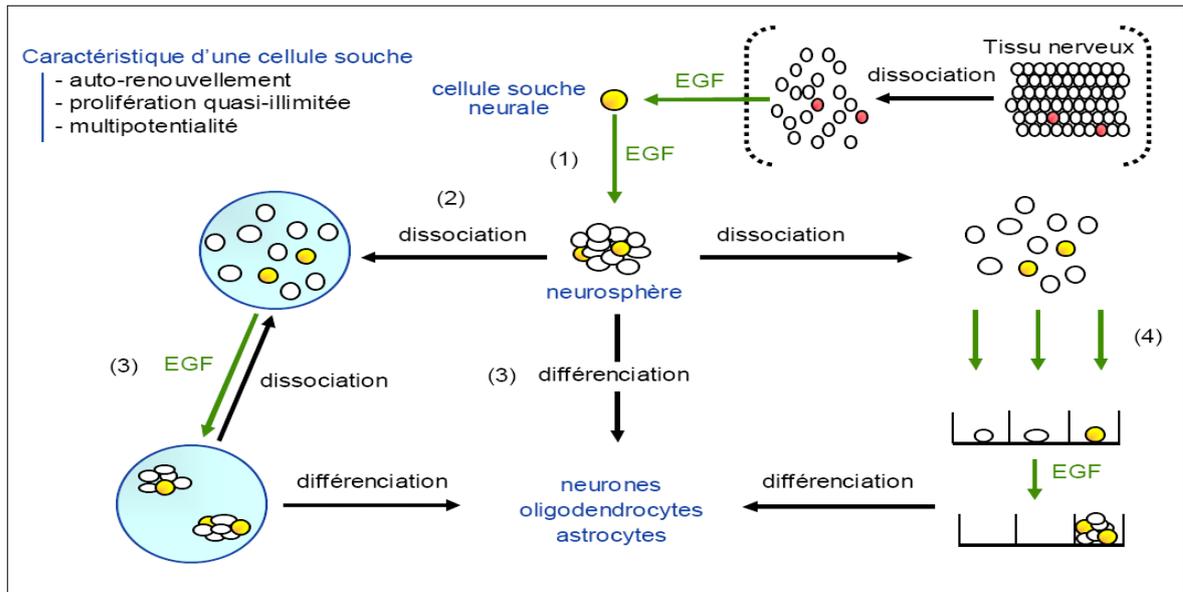
Le traitement standard actuel des glioblastomes est le protocole développé par Stupp et coll ((Stupp et al., 2005)). Ce traitement consiste en l'administration d'une radiothérapie fractionnée, associée à une chimiothérapie concomitante par Témzolomide (75 mg/m<sup>2</sup>/jour) suivie par six cycles d'une chimiothérapie par Témzolomide à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup> pendant 5 jours, répétée tous les 28 jours. Lors des récurrences, les nitroso-urées ont un effet modeste (taux de réponse < 10%), actuellement supplantées par un agent anti-angiogénique, le Bevacizumab (anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF) qui entraîne des taux de réponse de l'ordre de 30-50%. L'effet reste malheureusement transitoire et malgré ces traitements, la médiane de survie globale reste d'environ 15-18 mois, soulignant l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## II. Neurogenèse et cellules souches neurales

---

### A – La neurogenèse embryonnaire

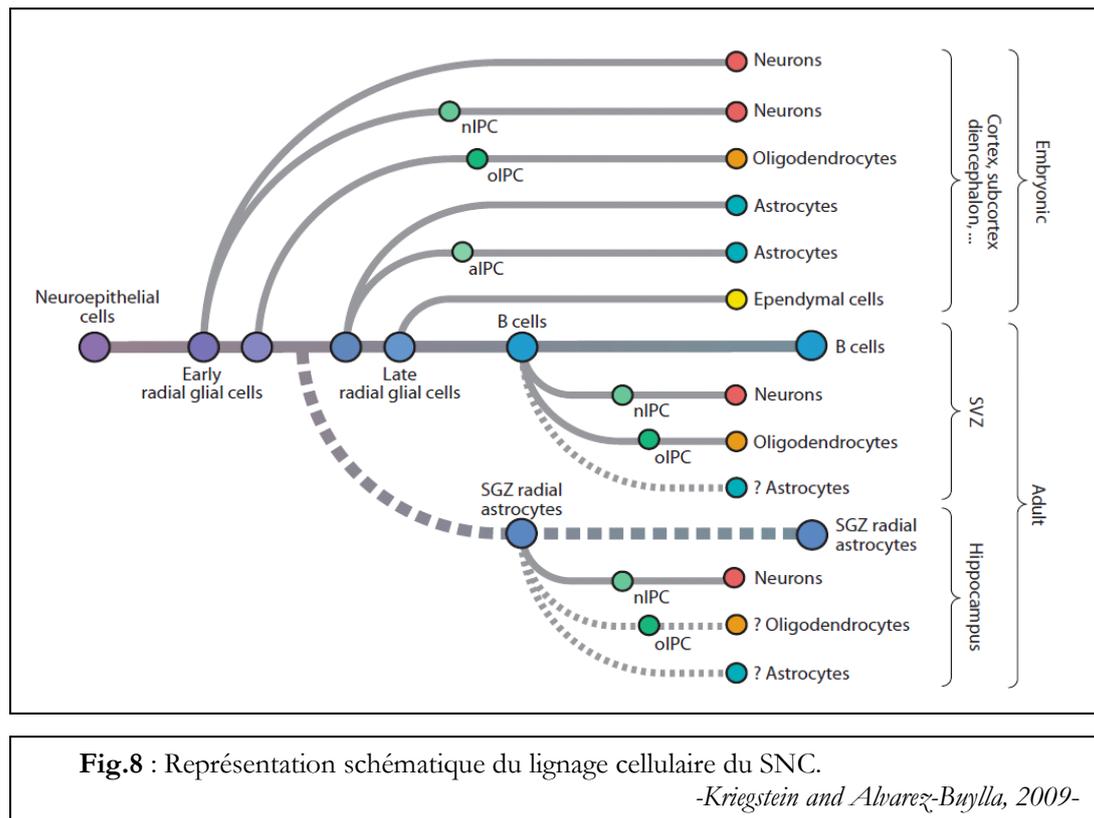
Dans le système nerveux embryonnaire, les cellules souches neurales (CSN) sont présentes tout au long du tube neural, dans la moelle épinière, le rhombencéphale et l'ébauche du cervelet, le domaine baso-ventral du prosencéphale basal, l'hippocampe, et le cortex cérébral (Temple 2001). Le terme de « cellule souche » fait référence à une cellule qui possède quatre propriétés essentielles que sont la prolifération, la multipotence, l'auto-renouvellement et la longévité. La prolifération est définie comme la capacité de produire une neurosphère clonale en réponse à EGF et bFGF ((Reynolds & Weiss, 1992); (Vescovi & Snyder, 1999); (Bonaguidi et al., 2008))(fig.7) ; la multipotence comme la capacité d'une cellule à produire les trois lignées cellulaires principales (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) ((Gage et al., 1995); (Palmer et al., 1997)) ; l'auto-renouvellement comme la capacité des cellules issues de la neurosphère dissociée à produire des colonies secondaires ((Reynolds & Weiss, 1992)) ; la longévité comme le maintien *in vitro* des trois premières caractéristiques sur une longue période, mais aussi le maintien de la cellule *in vivo* durant toute la vie de l'organisme ((Seaberg et al., 2005)). Alors que la cellule souche possède ces 4 propriétés, le terme de « progéniteur » caractérise une cellule qui possède au moins une de ces quatre propriétés et celui de « précurseur » se rapporte plus généralement à une population de cellules à potentialité restreinte ((Seaberg et al., 2005)).



**Fig.7** : Culture de cellules souches neurales en neurosphères

-Reynolds et Weisz, 1996-

Tous les mécanismes de différenciation ont lieu à partir de cellules communes, les cellules souches neuro-épithéliales de la zone ventriculaire (VZ) du tube neural ((Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009)). Ce neuro-épithélium constitue une monocouche pseudo-stratifiée à partir de laquelle la glie radiaire, qui représente la première population de cellules gliales, va se développer et générer les neurones, puis les progéniteurs d'oligodendrocytes et d'astrocytes (**fig.8**).



Plusieurs types de progéniteurs et de précurseurs ont été décrits aussi bien chez le rongeur que chez l'homme ((Mayer-Proschel et *al.*, 1997); (Rowitch et *al.*, 2002); (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009)). Ces cellules ont été isolées au sein de différentes structures du SNC à des étapes de développement différentes, et caractérisées sur la base de marqueurs antigéniques spécifiques (**fig.8**).

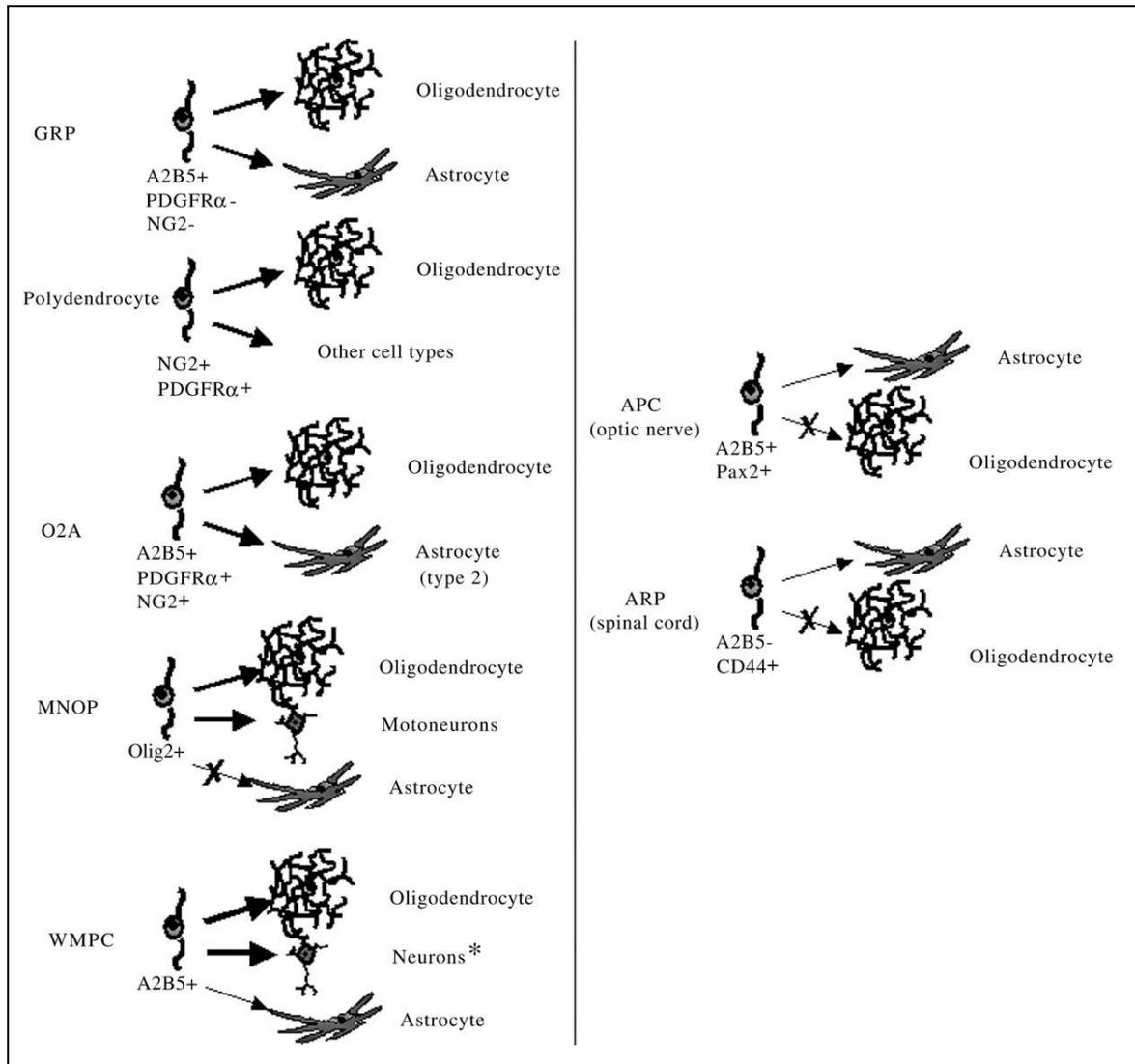
### A.1- Les cellules précurseurs lignage neuronal

Dans l'embryon, la différenciation neuronale apparaît avant la différenciation gliale dans les zones ventrale et dorsale du tube neural ((Rowitch, 2004)). Tous les neurones et les cellules gliales du SNC sont issus des cellules de la glie radiaire, qui possèdent les caractéristiques définissant les cellules souches: auto-renouvellement, capacité de proliférer *quasi-* infinie et capacité de générer les types cellulaires qui constituent le tissu dont elles sont issues. Les neurones issus des divisions asymétriques des cellules progénitrices migrent vers les couches les plus basales du

neuro-épithélium en développement (Kriegstein and Gotz, 2003). Les divisions des cellules de la glie radiaire dans la VZ produisent des neurones post-mitotiques ainsi que des cellules précurseurs intermédiaires qui migrent dans la SVZ. Les cellules précurseurs intermédiaires se divisent symétriquement dans la SVZ pour produire des paires de neurones.

Différents précurseurs neuronaux ont été identifiés. Le précurseur NRP (Neuron-restricted precursor) qui en se différenciant, va exprimer le marqueur des cellules d'adhésion PSA-NCAM (Noble et *al.*, 2004) et donner différents types de neurones (Mayer-Pröschel et *al.*, 1997). Ce précurseur ne peut générer que des neurones uniquement (Cao et *al.*, 2002). Le précurseur MNOP (Motor Neuron-Oligodendrocyte Precursor), au niveau de la moelle ventrale, mis en évidence par double knock-out des gènes *Olig1* et *Olig2* (Zhou et *al.*, 2002), va donner naissance sous l'influence de *Shh*, successivement aux motoneurones, puis aux oligodendrocytes de la moelle épinière (**fig.9**).

## A.2- Les cellules précurseurs du lignage glial



**Fig.9 :** Différents types de précurseurs du lignage cellulaire du SNC.

*-Lui and Rao, 2004-*

Dans le tube neural, les cellules de glie radiaire en se différenciant vont produire trois types cellulaires majoritaires: neurones, astrocytes et oligodendrocytes par le biais de précurseurs neuronaux et gliaux. Plusieurs types de précurseurs intermédiaires existent (Lee et al. 2000 ; Rowitch et al., 2004), et plusieurs ont le potentiel de se différencier en cellules gliales tels que l'oligodendrocyte de type-2 astrocyte précurseur (O2A), le précurseur glial strict (GRP), et le précurseur d'astrocyte (APC).

#### A.2.1: L'O-2A (Oligodendrocyte type-2 Astrocyte)

Le progéniteur O-2A est le mieux caractérisé des progéniteurs gliaux (Noble et al., 1988). Cette cellule est caractérisée par sa morphologie bipolaire, et par une importante capacité de prolifération et des propriétés migratoires. Les progéniteurs O-2A / OPC expriment des gangliosides spécifiques reconnus par l'anticorps A2B5 (Dubois et al., 1990), la protéine de type chondroïtine sulfate protéoglycan NG2 (Nerve / Glial Antigen2), et le récepteur alpha du PDGF (PDGFR $\alpha$ ) ( Nishiyama et al., 1996a et b). Le précurseur O2A se différencie *in vitro* en oligodendrocyte sous l'influence de l'hormone thyroïdienne, de l'acide rétinoïque et du CNTF. Il peut également se différencier *in vitro* en astrocyte de type-2, qui se distingue de l'astrocyte de type-1 par son immuno-réactivité à l'anticorps A2B5 et l'absence d'expression de FGFR (Rao and Mayer-Pröschel, 1997). Le tissu nerveux humain embryonnaire et adulte contient des cellules O-2A-like, présentant les mêmes caractéristiques que les progéniteurs O-2A / OPC identifiés chez le rongeur.

#### A.2.2 : Le GRP (Glial Restricted Precursor)

Le progéniteur glial strict GRP est une cellule précurseur qui va pouvoir évoluer en trois types de cellules gliales : l'oligodendrocyte, l'astrocyte de type-1 et l'astrocyte de type-2. Ces propriétés de différenciation sont conservées *in vivo*, après transplantation chez l'animal. Comme la cellule O-2A, le précurseur GRP exprime des gangliosides reconnus par l'anticorps A2B5. Chez l'homme, dans les cultures de cellules embryonnaires cérébrales, ces progéniteurs gliaux stricts A2B5<sup>+</sup> et tripotentiels, présentent les mêmes caractéristiques que chez le rongeur en développement et se différencient en astrocyte et en oligodendrocyte ((Dietrich et al., 2002)).

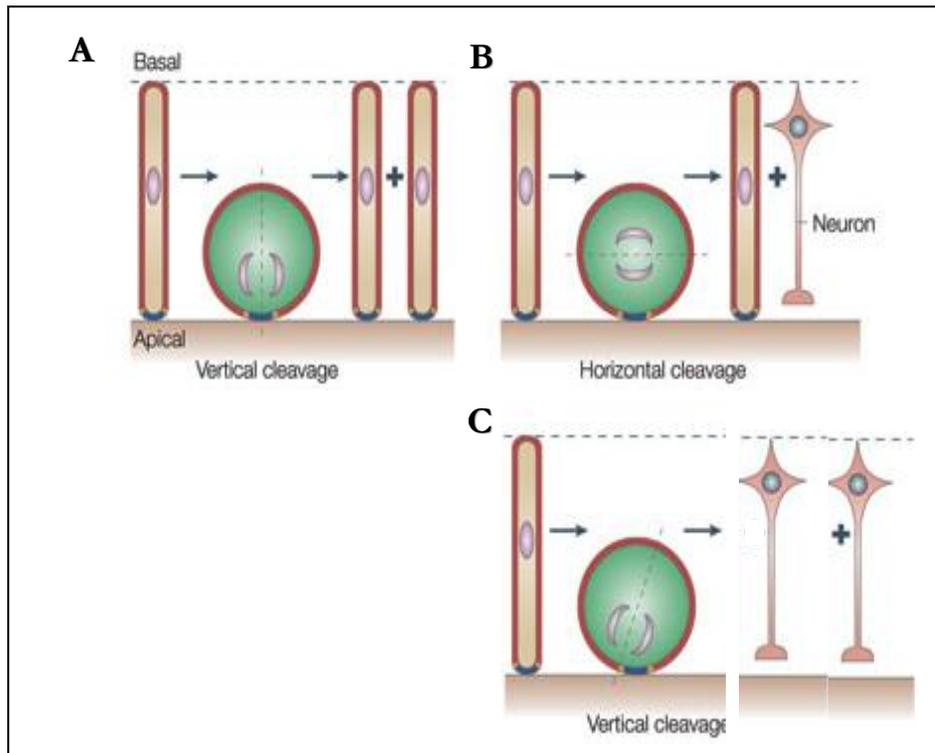
### A.2.3: L'APC (Astrocyte Precursor Cell)

Les cellules précurseurs APC n'expriment ni les gangliosides reconnus par l'anticorps A2B5, ni par la protéine GFAP. Elles gagnent l'expression de ce marqueur astrocytaire en se différenciant exclusivement en astrocyte de type-1 GFAP<sup>+</sup>/A2B5<sup>-</sup> et jamais en oligodendrocyte.

Un certain nombre de marqueurs permettent d'identifier les précurseurs astrocytaires, comme le FGFR3 (Pringle et al., 2010) ou l'expression du facteur de transcription Sox9 associée à l'absence de Sox10.

### B- Divisions symétriques et asymétriques

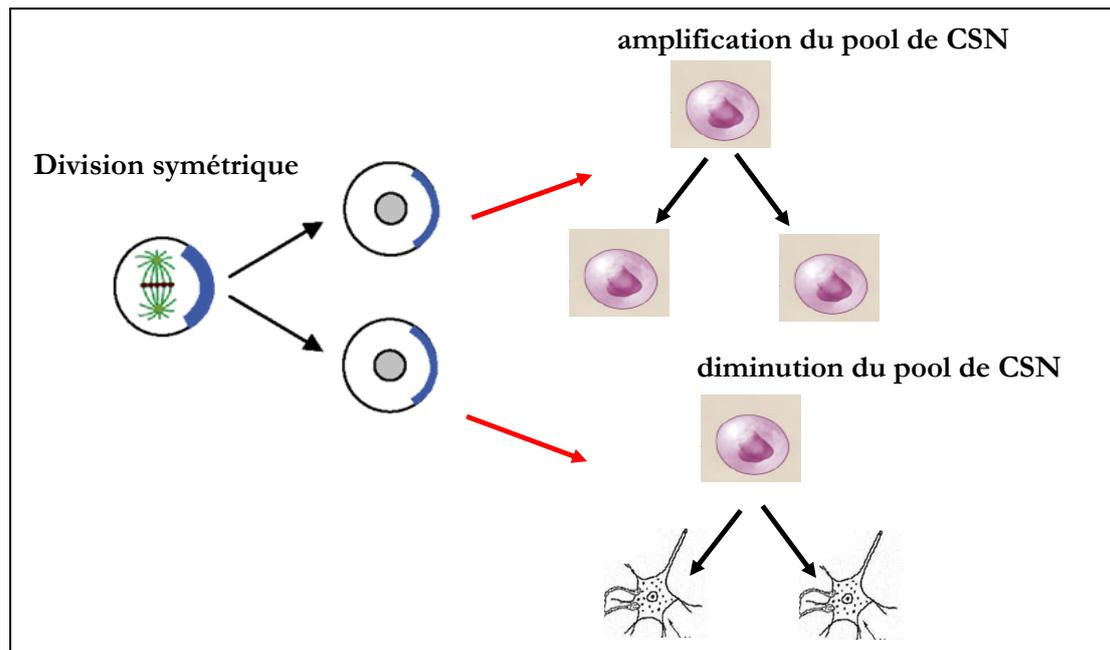
La neurogenèse se fait par une combinaison de plusieurs modes de divisions cellulaires: les divisions symétriques et asymétriques qui sont deux mécanismes qui contrôlent le nombre des cellules souches. Ces mécanismes permettent de créer et de maintenir la diversité cellulaire et tissulaire (identité des tissus, taille relative, ...). Les divisions symétriques élargissent la réserve de cellules précurseurs à moins que les divisions asymétriques des progéniteurs donnent lieu à des cellules de spécificité plus restreinte ((Chenn & McConnell, 1995);( Konno et al., 2008)) en maintenant ou en réduisant (divisions symétriques terminales où une cellule progénitrice se divise pour produire deux cellules spécifiées) le nombre de cellules prolifératives (Cai and Rao 2002 ) (**fig. 10**).



**Fig.10** : Divisions symétriques et asymétriques. Au début de la différenciation des CSN, les divisions cellulaires symétriques se mettent en place, générant des progéniteurs (A) et des neurones (B). Les divisions symétriques génèrent deux cellules identiques : deux progéniteurs qui s'auto-renouvellent ou deux neurones (C).

*-Chen and McConnell, 1996; Gotz and Huttner, 2005-*

Lors de l'élaboration du tube neural, le nombre de cellules neuro-épithéliales est d'abord augmenté par les divisions cellulaires symétriques prolifératives (**fig.11**). En absence de déterminants d'identité cellulaire, une cellule lorsqu'elle se divise va engendrer deux cellules filles identiques entre elles et la cellule mère. Au cours de cette division cellulaire symétrique, le fuseau mitotique et le plan de clivage sont verticaux par rapport à la lumière du tube neural ((Gotz & Huttner, 2005); (Farkas & Huttner, 2008)).



**Fig.11** : Division asymétrique des cellules neuro-épithéliales, modèle d'équilibre entre auto-renouvellement et détermination des Cellules souches.

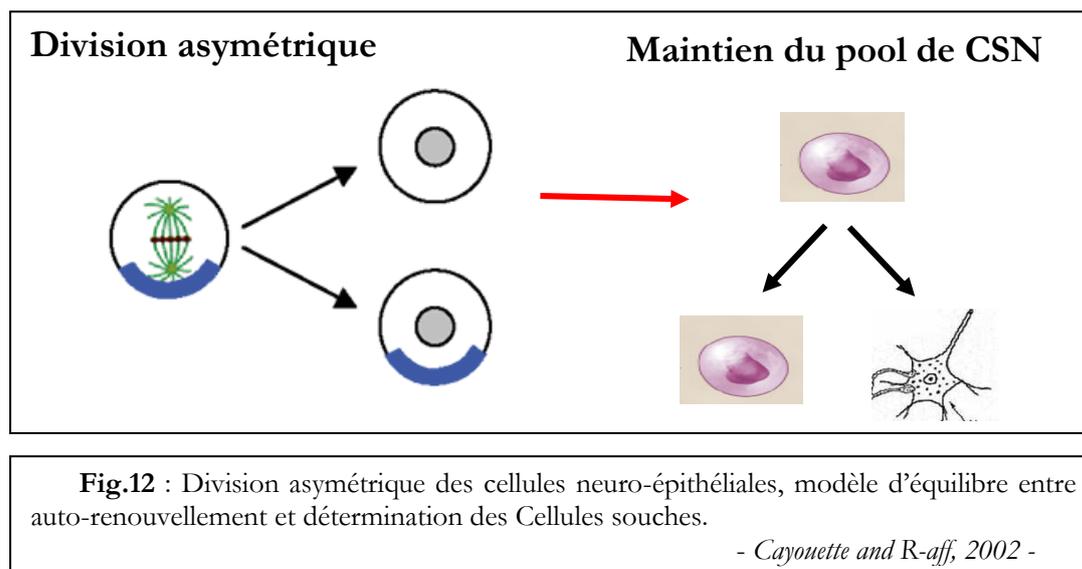
- Cayonette and R-aff, 2002 -

Les différentes orientations du fuseau mitotique permettent différentes répartitions des molécules qui régulent le déterminisme des cellules filles ((Haydar et al., 2003); (Farkas & Huttner, 2008); (Tabler et al., 2010)).

Plus tard au cours de la différenciation, les cellules commencent à montrer des divisions asymétriques qui se produisent dans le plan de clivage horizontal. Il en résulte une cellule identique à la cellule mère et une seconde cellule ayant un état plus différencié, tel qu'un précurseur ou un neurone (**fig.12**) ((Wilcock et al., 2007); (Tabler et al., 2010)). Le devenir des cellules filles dépend de la ségrégation des déterminants d'identité cellulaire. La fission cellulaire est coordonnée par la polarisation avant la division et par la distribution des éléments cellulaires de la cellule mère exclusivement à une cellule fille; ce qui implique la coordination du fuseau mitotique avec l'axe de polarité de la cellule mère. Cependant, la corrélation entre l'angle de division et le devenir des cellules filles ne semble pas stricte.

La division asymétrique joue aussi un rôle dans la capacité qu'ont les cellules souches à se maintenir longtemps. Un des mécanismes invoqués serait la

ségrégation non aléatoire des brins de chromatine néo-formés : ceux-ci –qui comportent un risque de mutation plus important- seraient adressés dans la cellule fille destinée à la différenciation alors que le brin d'origine serait systématiquement conservé dans la cellule souche auto-renouvelable. Toutefois, ce phénomène, décrit dans les cellules épithéliales, les cellules satellites musculaires n'est pas démontré dans les cellules souches neurales ((Morrison & Spradling, 2008)).



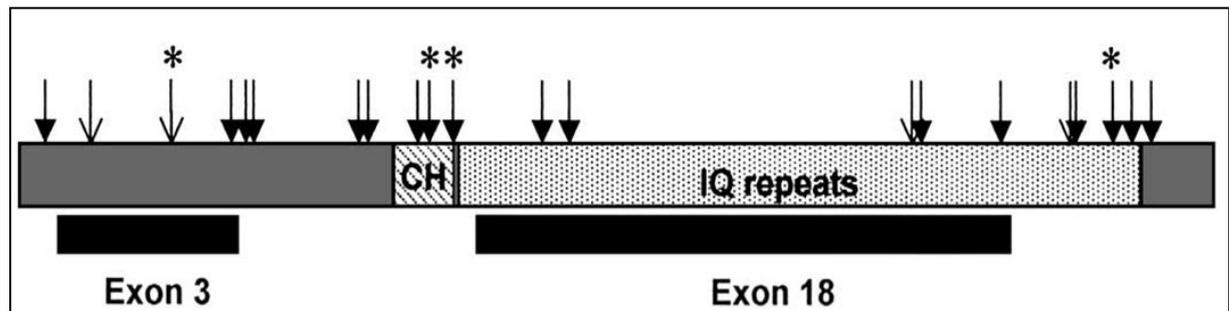
### C- Contrôle de la balance division symétrique-division asymétrique : importance du gène *ASPM*

On sait maintenant qu'au début de la neurogenèse les neuroblastes apparaissent et qu'ils proviennent du neuro-épithélium et de la glie radiaire. La prolifération par division symétrique des neuroblastes détermine le nombre de neurones corticaux (plus précisément de microcolonnes corticales) et donc l'expansion de la surface corticale ((Woods et al., 2005)). La prolifération des neurones dépend de l'orientation du sillon de clivage au cours des divisions symétriques et asymétriques. Une bonne progression du sillon de clivage au cours de la prolifération des neuroblastes exige non seulement que le fuseau mitotique soit correctement positionné avant le début de l'anaphase, mais aussi que son orientation soit

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

maintenue durant l'anaphase et la télophase jusqu'à ce que le sillon de clivage ait atteint la membrane apicale pour la scission ((Farkas & Huttner, 2008)). Il semble que ce positionnement correct soit sous le contrôle des protéines centrosomales telles que ASPM ((Paramasivam et al., 2007)), CENPJ et CDK5RAP2 ((Wood et al., 2007)).

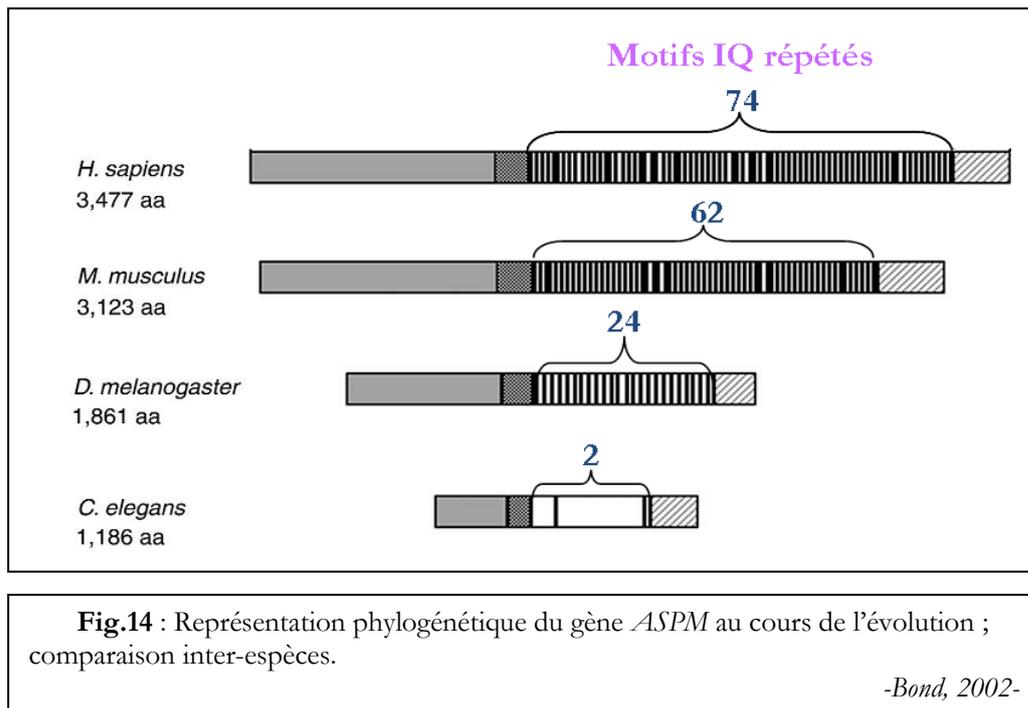
Le gène *ASPM* est l'orthologue humain de la drosophile *Asp* acronyme d'*Abnormal Spindle like Microcephaly Associated*. *Aspm* est un gène de 28 exons (10.4 kb) situé sur le chromosome 1q31 et codant pour une protéine de 3477 acides aminés soit 382,5 KDA. L'essentiel du gène est codé par l'exon 3 (1486 pb) et l'exon 18 (4755 pb).



**Fig.13** : Protéine ASPM et ses domaines fonctionnelles hypothétiques, les astérix indiquant les sites des mutations.

-Bond. M, 2003-

ASPM (**fig.13**) est une protéine présentant des domaines très caractéristiques : un domaine **N-terminal** de liaison aux microtubules ((Saunders et al., 1997b)), un domaine de liaison **calponin-homology** (qui participe à son accrochage au pôle du fuseau mitotique des cellules) et 74 motifs **IQ** (Isoleucine- Glutamine) qui lieraient potentiellement la calmoduline au niveau de l'organisation MTOC (centre d'organisation des microtubules) mais dont les rôles ne sont pas encore bien connus actuellement. Cette protéine est très conservée au cours de l'évolution, entre l'homme, la souris, la drosophile et les nématodes (*C. elegans*) avec une corrélation très significative entre la complexité du système nerveux, la taille de la protéine et le nombre de motifs **IQs** rencontrés (Bond et al., 2002) (**fig. 14**).



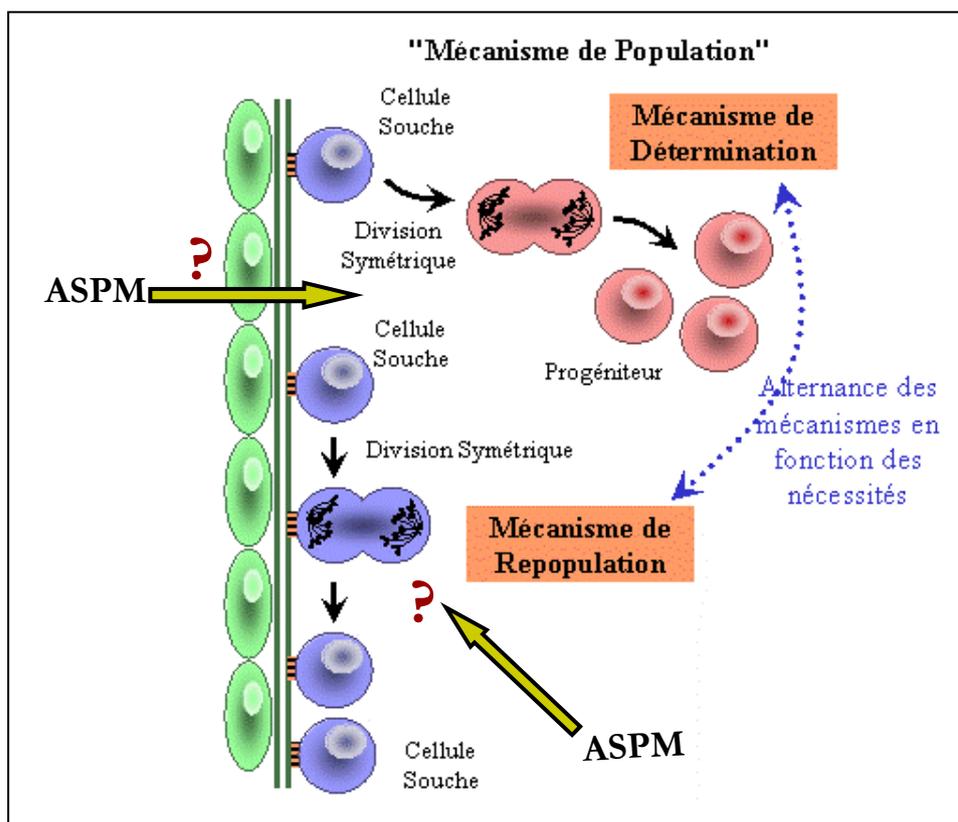
ASPM est une protéine indispensable à la formation du fuseau mitotique au cours de la méiose et de la mitose ((Ripoll et al., 1985); (Wakefield et al., 2001); (Riparbelli et al., 2002)). Après la télophase quand le fuseau se désassemble, la protéine disparaît et ne se retrouve plus qu'aux extrémités négatives des microtubules ((Saunders et al., 1997a); (Wakefield et al., 2001)), elle serait également requise pour la cytodierèse ((Ponting & Jackson, 2005)).

Chez la drosophile, la mutation est létale, les progéniteurs neuronaux n'obéissent plus à la division cellulaire asymétrique avec un arrêt des cellules en métaphase. *ASPM* contrôle donc l'expansion du pool des progéniteurs neuronaux et, est impliqué dans la transition entre division symétrique et division asymétrique.

Chez la souris, ASPM est impliquée dans la production de neurones, est surexprimée dans les régions de neurogenèse active et est down-régulée quand la neurogenèse est complète ((Bond et al., 2002)). Les protéines ASPM, et aussi MCPH1, régulent la prolifération des neuroblastes. Fisher et ses collaborateurs ont caractérisé les gènes qui contrôleraient les divisions symétriques et asymétriques des

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

CS neuro-épithéliales *in vivo* chez la souris. Le type de cellules matures obtenues à la fin du processus dépend de la ségrégation chromosomique de certains de ces gènes au cours du cycle cellulaire. Parmi ces gènes, *Aspm* a été identifié et caractérisé comme indispensable au déroulement de la division symétrique de CS neuro-épithéliales. La perte de la protéine ASPM dans les cellules neuro-épithéliales d'embryon de souris, provoque le détachement des centrosomes au moment de la séparation des chromatides sœurs, conduisant à une perte du clivage dans le plan des cellules neuro-épithéliales (augmentation de la polarité). Ce qui se traduit par un processus de division asymétrique accrue ((Fish et al., 2006)).



**Fig.15** : Rôle potentiel du gène *Aspm*. Dans la division symétrique des cellules neurales immatures (Raff and Cayouette, 2002, Fish et al., 2006 ; Paramasivam et al., 2007)

Chez l'homme, la protéine ASPM est exprimée fortement au stade embryonnaire mais faiblement dans le cerveau adulte. Une mutation dans le gène *Aspm* cause la microcéphalie de type 5 ou MCPH5 ((Bond et al., 2003)), maladie

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

héréditaire mendélienne rare qui se manifeste par une réduction différentielle du volume du cerveau à 1/3 de sa valeur normale (environ 400 cm<sup>3</sup>, comme le cerveau de l'Australopithèque).

## D – La neurogenèse adulte

L'existence de cellules souches neurales chez l'adulte, source putative de neurones, a été démontrée chez les mammifères grâce aux travaux de Joseph Altman en 1965 et ceux de Reynolds en 1992. La mise en culture de cellules du striatum adulte en présence des facteurs de croissance EGF et bFGF, révéla qu'une faible proportion de cellules était capable de se multiplier en suspension, et de former des neurosphères (Reynolds et al., 1992 ; Reynolds and Weiss, 1996). Dans certaines conditions de cultures, ces neurosphères généraient des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones.

La production de neurones dans le cerveau adulte chez l'Homme a été démontrée par l'équipe de *Fred Gage* par injection de BrdU chez des patients cancéreux ((Eriksson et al., 1998)) permettant de visualiser des cellules en phase S du cycle cellulaire dans l'hippocampe.

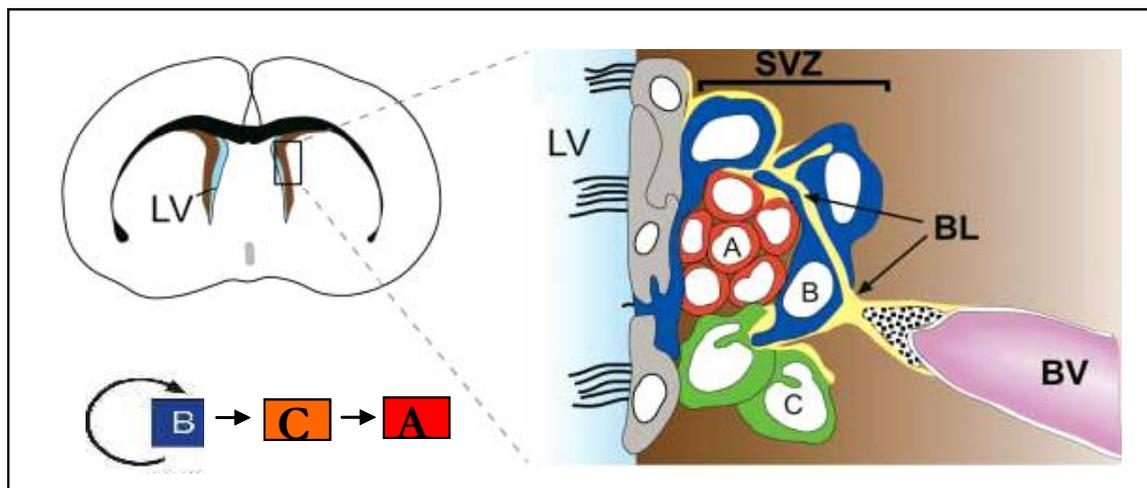
Dans le même temps, des études ont montré que des nouveaux neurones fonctionnels étaient produits par des cellules souches neurales (CSN) pendant toute la vie adulte de la souris dans la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux ((Alvarez-Buylla & Lim, 2004)) et la couche sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe ((Gage, 2000); (Alvarez-Buylla & Lim, 2004); (Lie et al., 2004)).

### D.1 La neurogenèse dans la zone sous ventriculaire (SVZ)

Chez l'adulte, la zone sous-ventriculaire (SVZ) est constituée de cellules situées en bordure de la couche de cellules épendymaires qui couvrent la surface interne du ventricule latéral.

*In vivo*, dans la SVZ de rongeurs adultes, les cellules souches prolifèrent et génèrent des neuroblastes et des cellules gliales (Lois et Alvarez-Buylla, 1993 ; Levison et Goldman, 1993). Les neuroblastes nouvellement générés quittent la SVZ (**fig.16**) puis migrent en direction du bulbe olfactif où ils s'intègrent dans les réseaux neuronaux existants (Carleton et *al.*, 2003).

Les cellules de type «B» possèdent toutes les caractéristiques phénotypiques et ultra-structurales des astrocytes et sont appelées «astrocytes de niche». Certaines de ces cellules présentent *in vitro* et *in vivo* des caractéristiques de cellules souches. On trouve également un autre type cellulaire, dite de type «C» ou **cellule d'amplification transitoire** (transit amplifying progenitor (TA) ; Gargett et *al.*, 2007) ou transit amplifying precursors (TAPs; (Pastrana et al., 2009)) qui forment des petits clusters le long de la SVZ ((Gritti et al., 2002)).

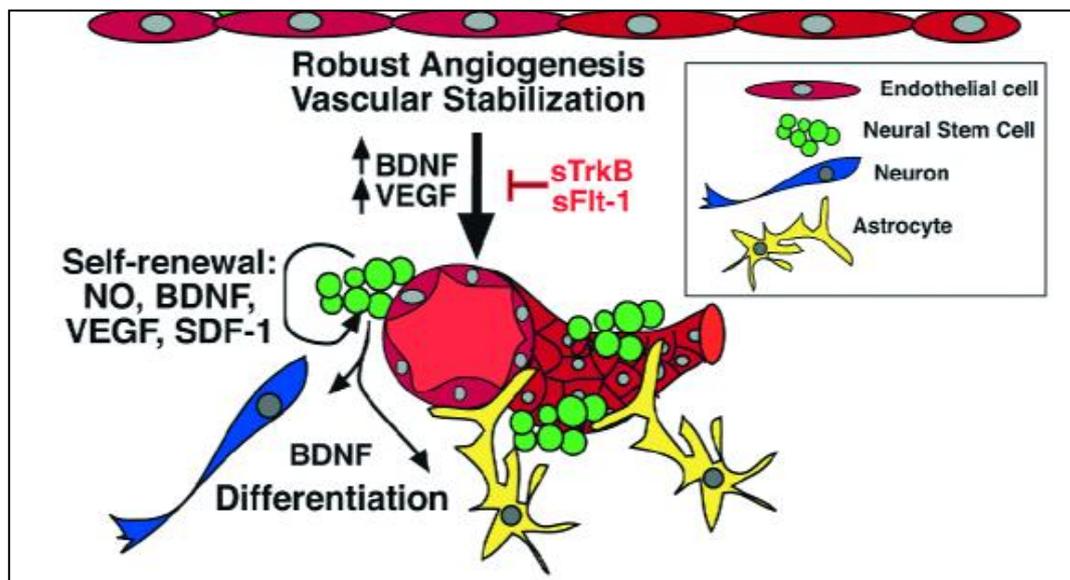


**Fig.16** : Organisation de la SVZ chez la souris adulte et différents types cellulaires. (LV) : ventricules latéraux ; (A) : neuroblastes ; (B) : astrocytes ; (C) : cellules progénitrices.  
-Alvarez-Buylla et *lim*, 2004-

Une autre caractéristique de la SVZ est sa forte vascularisation qui va conférer un rôle important aux vaisseaux sanguins dans la régulation du micro-environnement des CSN adultes ((Goldberg & Hirschi, 2009)). Les CSN et les progéniteurs en phase de prolifération sont situés à proximité immédiate des

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

vaisseaux et des contacts particuliers favorisent le passage de signaux comme les facteurs de croissance, les hormones, les nutriments ou l'oxygène du sang vers les CSN ((Tavazoie et al., 2008))) et les inter-communications entre les cellules endothéliales (EC) et les CSN (Madri, 2009) ((Shen et al., 2008)). Par exemple, la sécrétion des facteurs BDNF et VEGF (**fig.17**) est induite dans les cellules endothéliales par le biais du facteur hypoxique HIF-1 $\alpha$  ((Madri, 2009)), ce qui permet aux cellules endothéliales de moduler la régulation de la neurogenèse ((Tavazoie et al., 2008); (Shen et al., 2008); (Madri, 2009)).



**Fig.17** : Modèle d'interactions cellulaires au niveau de la niche vasculaire : dynamisme de la niche. Le schéma illustre la représentation tridimensionnelle entre les astrocytes, les cellules endothéliales et les CSN autour de la membrane hémato-encéphalique.

- Li and al., 2006; Madri, 2009-

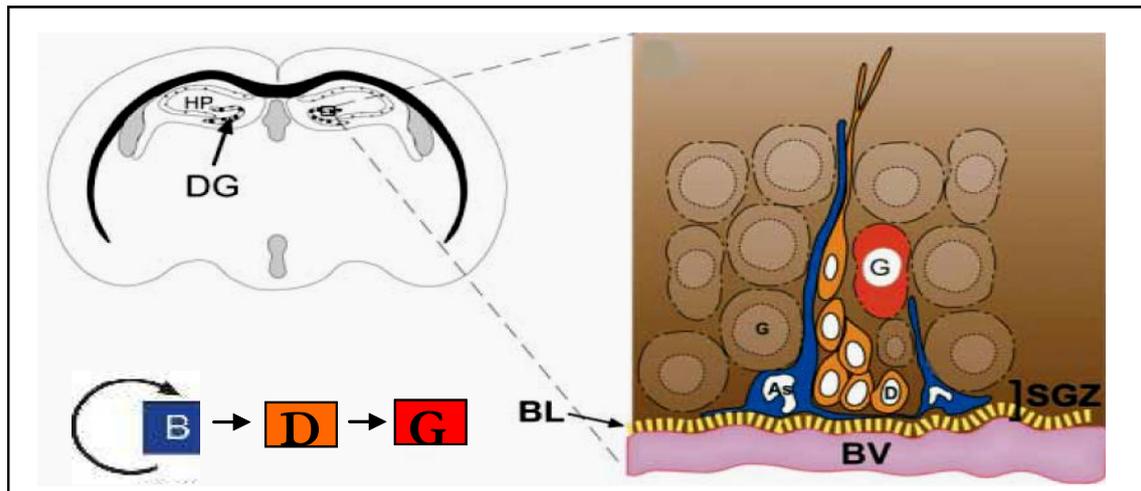
## D.2. La neurogenèse dans le Gyrus denté de l'hippocampe

L'architecture de la zone sous granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe présente le même type d'organisation que la SVZ. Les propriétés des cellules souches neurales de la SGZ ont été attribuées à deux types de cellules portant le marqueur nucléaire Sox2 ((Zhao et al., 2008)) :

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

- Les cellules radiales qui se divisent rarement et pourraient constituer le réservoir de cellules souches dans la SGZ.

- Les cellules non-radiales qui peuvent générer des astrocytes et des neurones ((Aizawa et al., 2009)). Les neurones nés dans la SGZ migrent et deviennent des neurones granulaires du gyrus denté.



**Fig.19** : organisation de la SGZ chez la souris adulte. (DG): gyrus denté de l'hippocampe ; (B): Astrocytes ; (D): Progéniteurs ; (G): Neurones granulaires.

*-Alvarez-Buylla et al., 2004-*

### **III. Cellules souches tumorales et glioblastome**

---

#### **A. Les cellules souches tumorales (CST) de glioblastome**

Les cellules souches tumorales seraient des moteurs essentiels de l'initiation, de la progression et de la résistance aux traitements des tumeurs.

La notion de cellules souches tumorales dans les tumeurs cérébrales apparaît en 2004 grâce aux travaux de Singh et collaborateurs. Ces auteurs ont isolé des CST de tumeurs cérébrales par tri cellulaire sélectionnant les cellules tumorales qui présentaient à leur surface le marqueur CD133, une glycoprotéine retrouvée dans de nombreuses populations de cellules souches adultes, y compris ceux du cerveau humain adulte ((Singh et al., 2003)). Cette sous-population cellulaire tumorale répondait aux propriétés caractéristiques des cellules souches neurales tumorales *in vivo* et *in vitro* (dans un milieu de culture dépourvu de sérum de veau fœtal et supplémenté en EGF et bFGF) : (i) Auto-renouvellement, (ii) Prolifération infinie, (iii) Multipotence et (iv) Tumorigénicité : formation de tumeur après xélogreffe dans les souris SCID de 100 cellules CD133<sup>+</sup>. La tumeur pouvant être ainsi transplantée en série et reproduire une phénocopie de la tumeur initiale. Cette dernière propriété les différencie des cellules souches neurales normales.

Les cellules souches tumorales résident dans des « niches vasculaires protectrices ». Ces sites histologiques composées de cellules différenciées maintiennent via des contacts cellulaires ou la sécrétion de facteurs les cellules souches tumorales quiescentes ((Calabrese et al., 2007)).

Compte tenu de leur rôle dans la gliomagenèse, les cellules souches tumorales et les voies de signalisation impliquées dans leur biologie, constituent des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des glioblastomes.

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

Par exemple, la voie de signalisation Sonic-Hedgehog est largement impliquée dans les gliomes, indispensable à l'auto-renouvellement des CST. Son inhibition par interférence ARN (ARNi) *via* des vecteurs lentiviraux ou par un inhibiteur spécifique, tel la cyclopamine, a montré un effet inhibiteur sur la croissance et l'auto-renouvellement des tumeurs gliales dans un modèle de xéno greffe ((Clement et al., 2007)).

## B. Les gènes marqueurs des cellules souches

Ces différents marqueurs sont utilisés pour l'identification et la purification de cellules souches tumorales d'intérêt (par imm-unohistochimie, cytométrie de flux, tri magnétique). La nomenclature utilisée pour nommer les gènes codant pour les protéines listées est celle de la base **NCBI**.

### ✓ Le marqueur CD133 ou Prominin 1

La protéine CD133 est une glycoprotéine à cinq domaines transmembranaires, initialement décrite comme un marqueur antigénique spécifique des cellules souches hématopoïétiques (Miraglia et al., 1997 ; Yin et al., 1997). Encodée par un gène situé sur le chromosome 4 chez l'homme, elle possède plusieurs isoformes glycosylées, dont certaines sont préférentiellement exprimées au sein des «niches» de cellules souches ((Uchida et al., 2000)). La protéine CD133 intervient dans le maintien de la polarité apicale des cellules neuro-épithéliales. Cette protéine est actuellement le marqueur le plus étudié dans les GBMs.

Les CST CD133+ représentent 1- 25% de la masse tumorale dans les tumeurs cérébrales. On retrouve les gènes comme *c-Myc*, *Oct4*, *Sox2*, *Bmi1*, *E2F2*, *L1cam*, *Nestine* et *Melk* très fortement surexprimés dans la population des CST de GBMs CD133+ en comparaison à la population des CD133- bien que les deux populations soient tumorigènes chez la souris ((Beier et al., 2007)). La surexpression de CD133 serait un facteur de mauvais pronostic dans les GBMs

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

((Murat et al., 2008)) et dans les tumeurs oligodendrogiales de haut grade ((Beier et al., 2008) ;(Rich & Bao, 2007)) possiblement lié à la chimio- et radio-résistance.

### ✓ **Le marqueur Nanog**

Le gène *Nanog* est un facteur de transcription à homéodomaine dont le nom trouve son origine dans l'expression « Tir nan og », qui signifie « pays celtique de la jeunesse éternelle » (Chambers et al., 2003). Son expression est essentielle *in vitro* pour préserver l'état indifférencié des cellules souches. Une diminution de son expression est associée à l'entrée en différenciation des cellules souches, notamment neurales. L'expression de Nanog est régulée par deux autres facteurs de transcription : OCT3/4 et SOX2, qui agissent de manière coopérative. (Kuroda et al., 2005). Ces trois facteurs de transcription sont des marqueurs caractéristiques de l'état indifférencié.

### ✓ **Le marqueur OCT4** (Octamer-binding transcription factor)

Le marqueur OCT 3/4 est un facteur de transcription qui co-régule avec NANOG, le maintien de la fonction de pluripotence des cellules ES. Il est requis pour le maintien et la régulation de la fonction d'auto- renouvellement et la survie des cellules souches de l'embryon. Il est surexprimé dans les astrocytomes, les GBMO et les oligodendrogliomes.

### ✓ **Le marqueur Sox2** (SRY-box 2)

Les facteurs de transcription SOX participent au maintien des cellules souches neurales de mammifères adultes. En effet, chez le rongeur adulte, Sox2 est exprimé dans certaines régions du cerveau dont la SVZ (Ellis et al., 2004). L'inactivation du gène codant pour *Sox2* chez la souris adulte provoque une réduction de la neurogenèse dans la SVZ ((Ferri et al., 2004)). L'expression de SOX2 est surtout

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

impliquée dans le maintien des caractéristiques indifférenciées des cellules souches neurales et de leur capacité à s'auto-renouveler.

Dans les gliomes, le gène *SOX2* est surexprimé dans les cellules ayant acquises les capacités des CSN, il est nécessaire à la prolifération continue de ces cellules ((Gangemi et al., 2009)). Une répression de l'expression du gène *SOX2* dans les CST de GBMs ralentit considérablement la prolifération cellulaire (due à un ralentissement du cycle cellulaire) et fait perdre à ces dernières, leur capacité à être tumorigène chez la souris.

#### ✓ **Le marqueur KLF4**

Le gène *Klf4* (Krüppel-like factor 4) est un facteur de transcription impliqué dans l'expansion cellulaire des cellules ES. Il a récemment été décrit comme un facteur de transcription favorisant le maintien de la prolifération des cellules souches tumorales des tumeurs à composante oligodendrogiales.

#### ✓ **Le marqueur EZH2**

Le gène *Ezh2* est un facteur de transcription qui a été décrit récemment dans les glioblastomes comme un facteur favorisant la prolifération des CST de GBM.

#### ✓ **Le marqueur C-Myc**

Le gène *c-Myc* est un facteur de transcription qui serait impliqué dans la régulation de l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des CST (Wilson et al., 2004). Il régule les cyclines D1, D2 et E des CST de gliomes lors de la transition G1/ S du cycle cellulaire « *in fine* ». L'expression de c-MYC est souvent dérégulée dans les cancers, et associée à un degré de malignité avancée ainsi qu'à un mauvais pronostic. Il a également été impliqué dans les gliomes ((Rich & Eyler, 2008)) ou l'expression de c-MYC est corrélée au grade. L'extinction de c-MYC dans les CST de GBMs réduit considérablement la formation de gliomasphères soulignant son implication dans l'auto- renouvellement de ces cellules.

**Etude des gènes des cellules souches tumorales dans les gliomes**

## **Etude du rôle du gène ASPM dans les gliomes**

---

Nous avons vu dans l'introduction le rôle que joue le gène *ASPM* dans la neurogenèse et dans la division symétrique des cellules souches neuro-épithéliales. Après la naissance, la protéine ASPM reste exprimée chez la souris dans les régions où la neurogenèse persiste (gyrus denté, zone sous-ventriculaire, SVZ).

Plusieurs arguments suggèrent qu'*ASPM* est également impliqué dans l'oncogenèse.

En effet, les travaux de Kouprina (Kouprina et al., 2005) puis de Fisher, ont montré une surexpression de ce gène dans des tissus cancéreux variés, notamment du foie (Lin et al., 2008). Une surexpression d'*ASPM* a également été rapportée dans les tumeurs du système nerveux, notamment les gliomes (Horvath et al; 2007 ; Hagemann et al; 2008). Ainsi, l'expression d'*ASPM* dans les cellules souches tumorales, en ferait une cible thérapeutique potentielle, visant sélectivement une population cellulaire minoritaire mais suspectée de jouer un rôle clef dans la résistance aux traitements.

L'objectif de notre travail a donc été d'évaluer *in vitro* la présence d'*ASPM* dans des gliomasphères et d'évaluer l'effet de son inhibition sur la croissance tumorale. Parallèlement, nous avons confirmé l'expression d'*ASPM* dans une large série de gliomes malins et étudié sa valeur pronostique.

Par ailleurs, dans le cadre d'un travail collaboratif, nous avons contribué à l'étude dans les gliomes d'un facteur de transcription très impliqué dans la prolifération des cellules souches embryonnaires, NANOG.

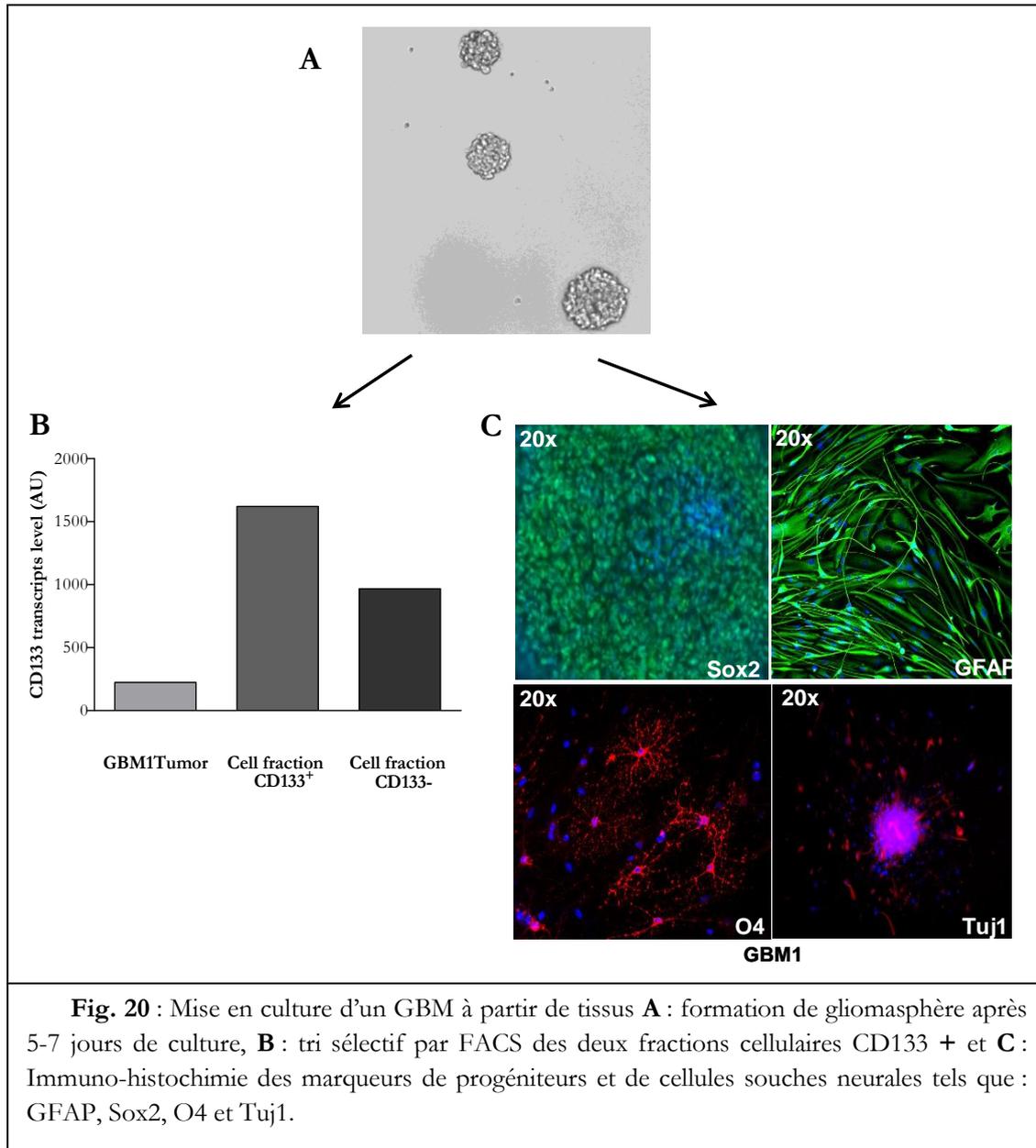
## I. Le modèle gliomasphère

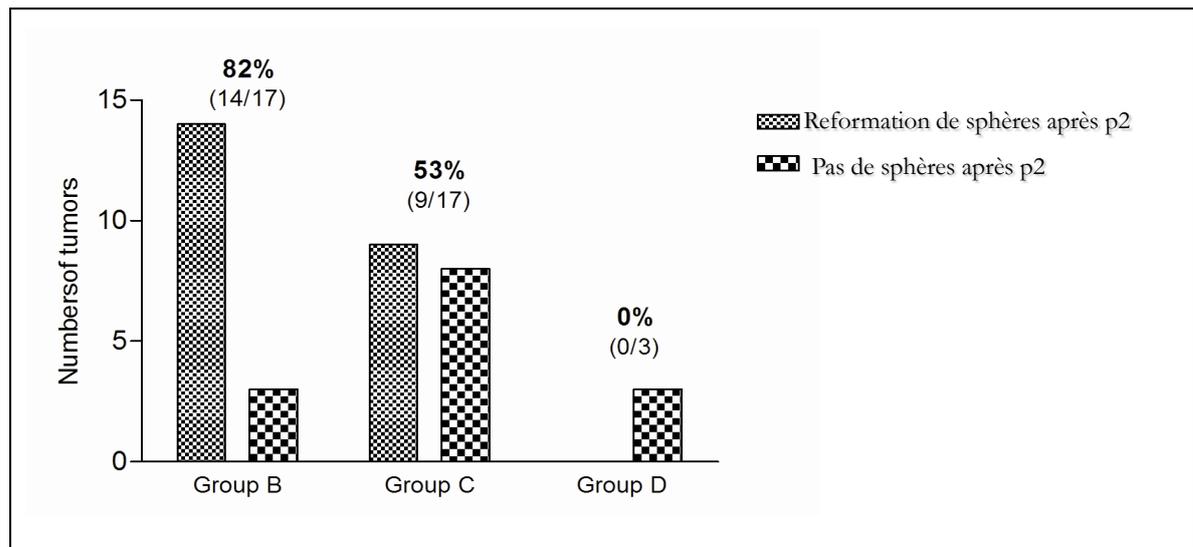
---

### A. Caractérisation du modèle « gliomasphère »

Sur une série de 54 patients opérés d'un glioblastome sur le groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, nous avons durant 2 ans collecté des échantillons tumoraux et réalisé une mise en culture selon le protocole suivant : le tissu tumoral est débarrassé de gros vaisseaux, puis haché jusqu'à obtenir des morceaux de 100-300  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces morceaux sont ensuite collectés à l'aide d'une P1000 puis digérés par la trypsine bovine 5x suivi d'une filtration au tamis moléculaire de 40-70  $\mu\text{m}$ .  $1.10^6$  cellules viables sont ensemencées dans 10 mL de milieu neurosphère dans une T75. Sur la **fig.20.B**, l'expression du marqueur CD133 est vérifiée dans la fraction cellulaire totale via un tri sélectif par FACS. Une fois la mise en culture obtenue, les altérations moléculaires ont été recherchées par hybridation génomique comparative (CGHa) et classées en quatre groupes: **A**: codélétion 1p19q, **B**: amplification du gène *R-EGF*, **C**: absence d'amplification du R-EGF et présence de l'une ou plusieurs des altérations suivantes: gain du 7, délétion du 9p21, délétion du 10q, **D**: autres profils (Idbaih et al., 2005). Pour toute culture avec amplification de l'EGFR (groupe B) la délétion des exons 2  $\rightarrow$ 7 a été recherchée (EGFRvIII, qui rend le récepteur constitutivement actif).

Le taux de succès de la mise en culture était corrélé au profil génétique de la tumeur : aucune tumeur du groupe A n'a atteint le premier passage avec formation de gliomasphères, et aucune tumeur du groupe D n'a proliféré après un 2ème passage. En revanche la capacité à proliférer après 2 passages était clairement corrélée à la présence d'une amplification génique du R-EGF (**fig. 21**).





**Fig.21** : Récapitulatif de la formation de gliomasphères en fonction des différents groupes moléculaires. 80% de réussite dans le groupe B (ou amplification de l'EGFR), 53% dans le groupe C, 0% dans le groupe D le groupe A ne proliférant pas.

Finalement, nous avons gardé pour la suite des expérimentations, deux lignées de gliomasphères (3731-GBM1 et 4371-GBM2). Les deux lignées appartenaient au groupe B (la 3731 possédant en outre la forme tronquée EGFRvIII était capable de proliférer en absence du facteur mitogène EGF).

Ces lignées répondaient aux caractéristiques de cellules souches tumorales : multipotence et capacité de différenciation en présence de sérum (**fig.20.C**), prolifération indéfinie, et enfin reconstitution de la tumeur d'origine par greffe orthotopique.

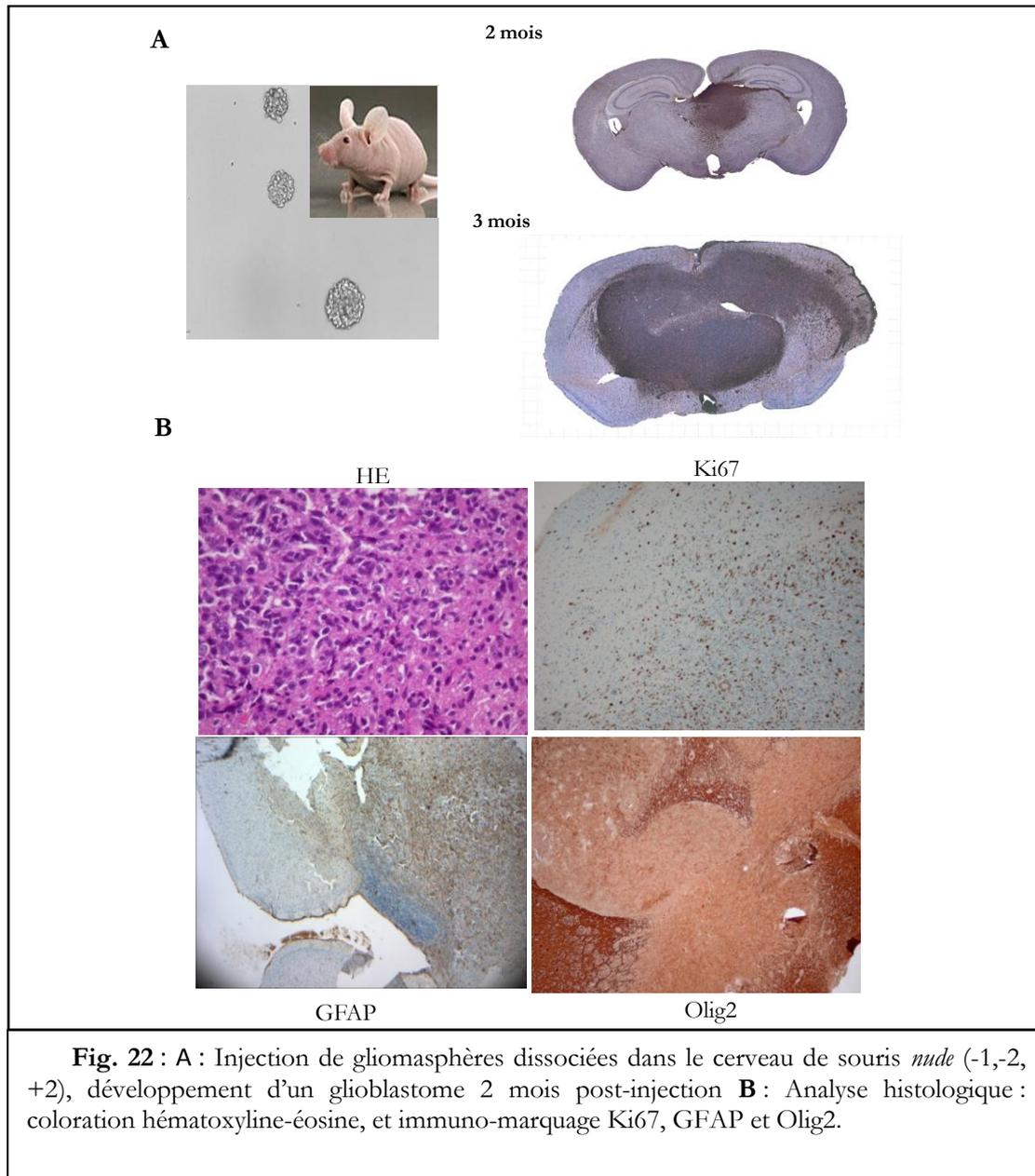
## B. Validation du modèle « gliomasphère »

Pour valider le modèle, nous avons en effet vérifié que les **lignées 3731 et 4371 étaient tumorigènes**, et capables de donner naissance à une tumeur histologiquement analogue à la tumeur initiale après leur transplantation dans le cerveau des souris SCID.  $2 \cdot 10^5$  cellules sont injectées en conditions de stéréotaxie dans le cerveau de souris *nude* (bregma -1 ; -2 ; +2). Deux mois après l'injection des cellules, une tumeur infiltrante est visible sur une coupe fine de cerveau de la souris colorée (**fig.22.A**) à l'hématoxyline-éosine. À trois mois post-injection, des troubles

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

neurologiques apparaissent (troubles sensitifs, paralysie ...) et le cerveau de la souris est complètement envahi par la tumeur.

L'analyse histologique (Dr K Mokhtari) retrouve un aspect caractéristique de glioblastome (**Fig.22.B**) : tumeur proliférative (marquage +++ du Ki67), exprimant la protéine gliofibrillaire (GFAP), et le facteur de croissance Olig2.



**Fig. 22 :** A : Injection de gliomasphères dissociées dans le cerveau de souris *nude* (-1,-2, +2), développement d'un glioblastome 2 mois post-injection **B** : Analyse histologique : coloration hématoxyline-éosine, et immuno-marquage Ki67, GFAP et Olig2.

## II. Article 1

---

### A- Présentation de l'article

Les objectifs de notre travail étaient les suivants :

- analyser l'expression d'*Aspm* dans des gliomes de différents grades, incluant des couples de récurrence afin d'étayer le rôle potentiel d'ASPM dans la progression tumorale.

- démontrer sur les deux gliomasphères les mieux caractérisées (3731 et 4371), le rôle d'ASPM dans la prolifération cellulaire, et l'effet de son inhibition par ARN interférence.

### B- Publication

**ASPM-associated stem cell proliferation is involved in malignant progression of gliomas and constitutes an attractive therapeutic target**

**Authors:** Sandra-Nadia Ngwabyt Bikeye<sup>1</sup>, Carole Colin<sup>2</sup>, Yannick Marie<sup>1</sup>, Raphaël Vampouille<sup>4</sup>, Philippe Ravassard<sup>4</sup>, Audrey Rousseau<sup>5</sup>, Blandine Boisselier<sup>1</sup>, Ahmed Idbaih<sup>1,3</sup>, Charles Félix Calvo<sup>1</sup>, Pascal Leuraud<sup>6</sup>, Myriam Lassalle<sup>6</sup>, Soufiane El Hallani<sup>1</sup> Jean-Yves Delattre<sup>1,3</sup> and Marc Sanson<sup>1,3</sup>.



























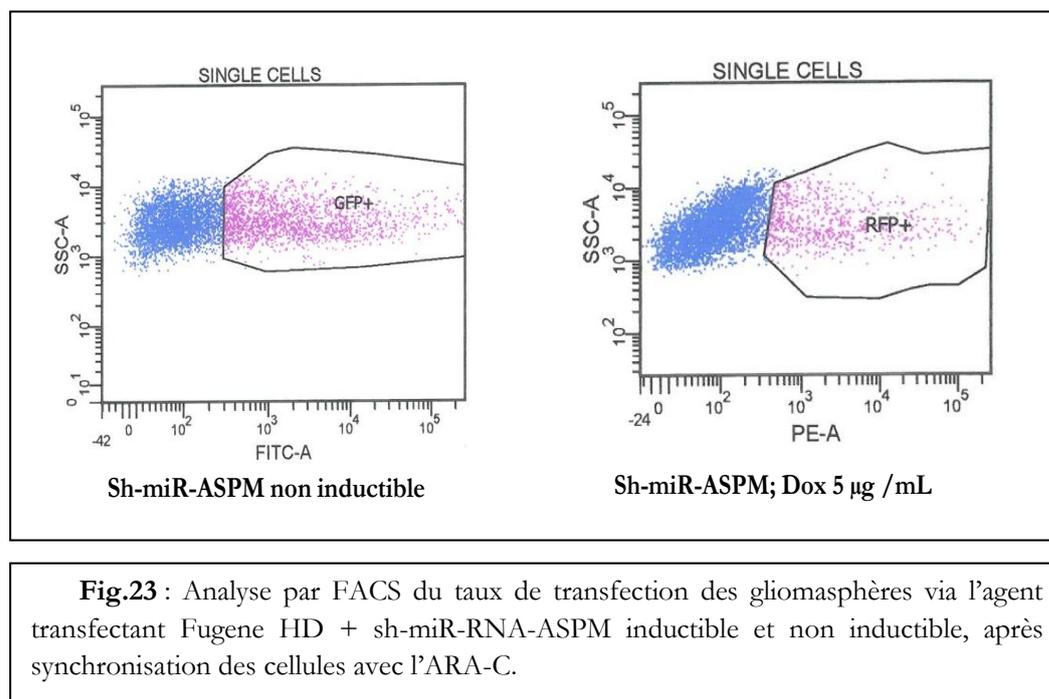
**RESULTATS NON PUBLIES**

## C- Résultats complémentaires non publiés

### C.1- La perte de l'expression du gène *Aspm* perturbe la condensation de l'hétérochromatine

Pour tenter de comprendre l'implication du gène *ASPM* dans la modulation de l'hétérochromatine et la ségrégation des chromosomes au cours des divisions symétriques des CST de glioblastome, nous avons transfecté de façon transitoire les gliomasphères GBM1 avec un sh-miR-RNA-*ASPM* régulé par un répresseur doxycycline. Ce système **Tet-ON/OFF** permet de réduire l'effet de mort massive des cellules, induit par l'extinction totale d'*ASPM* dans les conditions d'invalidation stable.

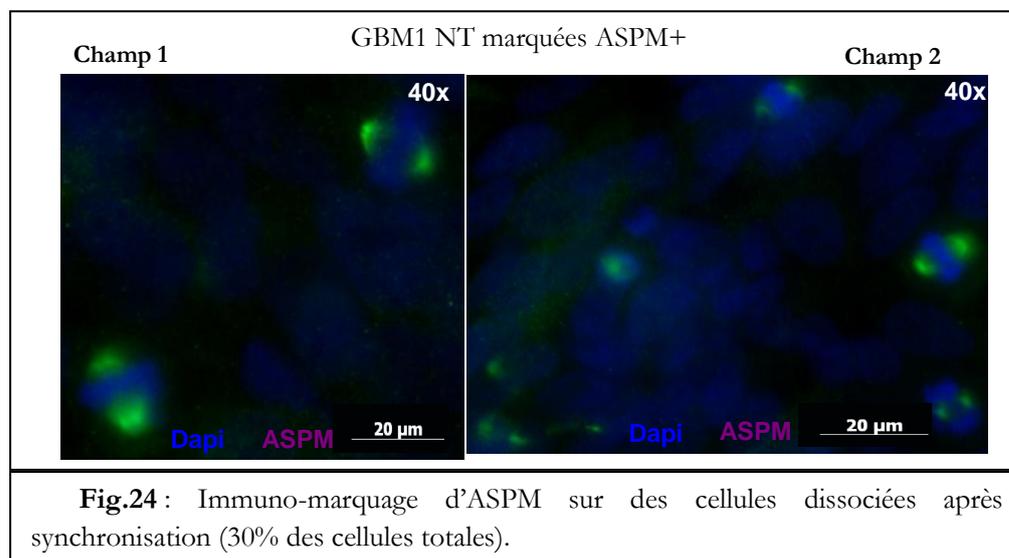
L'analyse par FACS montre un taux de transfection de 39,9% et de 38,7% respectivement pour les plasmides constitutif et inductible (**fig.23**).



Afin d'optimiser les conditions de marquage par immuno-histochimie de la protéine après l'extinction transitoire du gène, nous avons au préalable synchronisé les gliomasphères avec de l'ARA-C (Arabinofuranosyl Cytidine) à 20  $\mu$ M pour

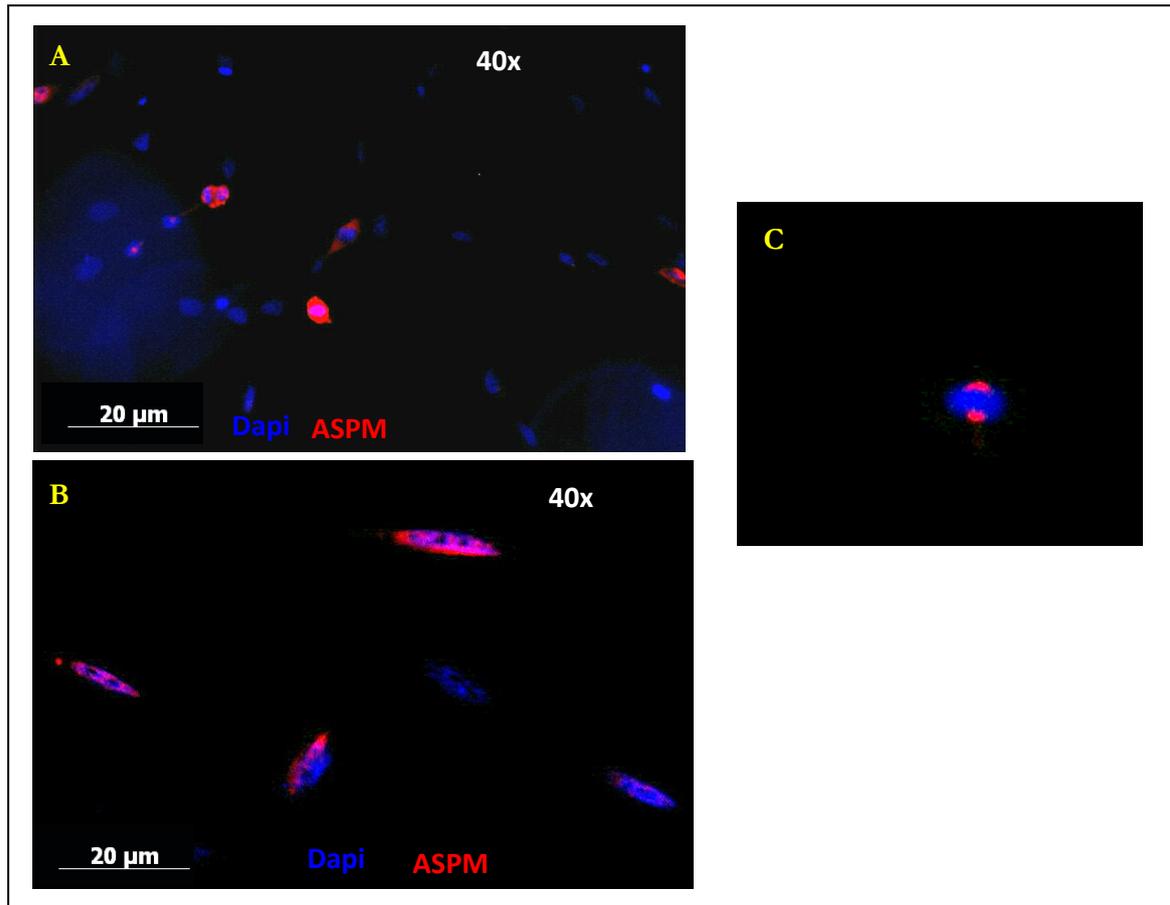
Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

augmenter la proportion de cellules en phase S. La synchronisation permet d'augmenter la proportion de cellules qui entrent en mitose car l'ARA-C bloque les cellules en phase S, ce qui se traduit par une augmentation du nombre de cellules marquées ASPM<sup>+</sup>, elle passe de 10% à 30%. L'ARA-C est retiré du milieu pendant 24h, puis les cellules sont transfectées. Après 72h de transfection, les taux de transfection des cellules sont vérifiés par FACS. Les pourcentages de transfection sont comparables pour le plasmide constitutif (40%) et le plasmide inductible (36,7%).



Malgré l'absence d'augmentation significative du nombre des cellules qui entrent en mitose, le nombre de cellules qui expriment ASPM est bien visualisé (**fig.24**). L'extinction inductible du gène *ASPM* montre une désorganisation de l'étalement de la chromatine au niveau du fuseau mitotique (**fig.25**). On note une proportion conséquente de cellules anormales (25%) avec des chromosomes beaucoup plus condensés en comparaison du marquage normal de la protéine ASPM au niveau du fuseau mitotique.

Ces données suggèrent donc que l'extinction d'*ASPM* s'accompagne d'une désorganisation de la chromatine.



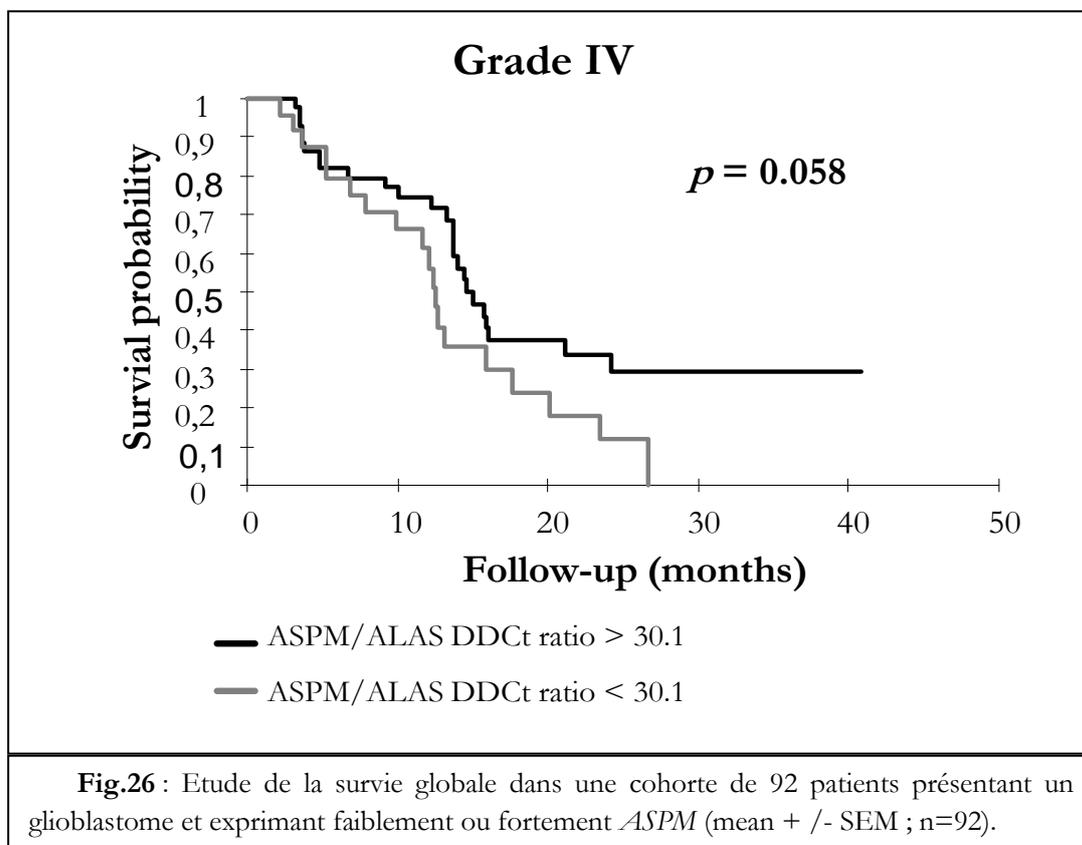
**Fig.25 :** Immuno-marquage d'ASPM après synchronisation et extinction transitoire d'*Aspm*. **A** et **B** : GBM1 transfectées sh-miR-ASPM inductible 5 µg/mL et révélation de la protéine ASPM après 72h. Marquage ASPM<sup>+</sup>/ DAPI<sup>+</sup> 25% des cellules, chromosomes mal étalés, chromatine mal condensée ; **C** : marquage normal d'ASPM sur une cellule, empâtement de la chromatine normale et les deux pôles du fuseau mitotique sont bien distinct.

## C.2- Etude des corrélations entre l'expression du gène *ASPM* et l'évolution des gliomes de haut grade

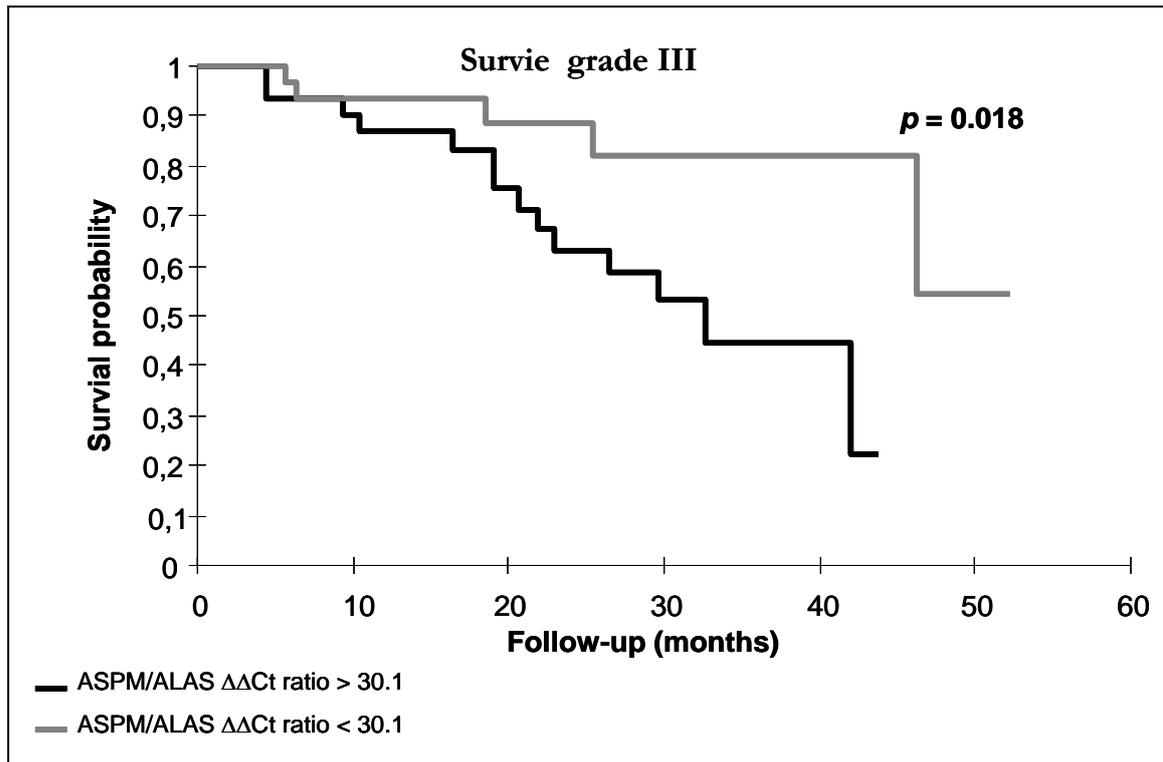
Certaines altérations moléculaires détectables dans les gliomes comme le réarrangement *BRAF* dans les astrocytomes pilocytiques, la codélétion 1p-19q dans les tumeurs oligodendrogiales, la méthylation du promoteur de la *MGMT* dans les gliomes de haut grade, ou les mutations *IDH1* et *IDH2* peuvent avoir un impact sur le diagnostic, le pronostic et/ou la réponse thérapeutique.

Dans cette optique, nous avons recherché des corrélations entre l'expression du gène *ASPM* et le pronostic des gliomes de haut grade dans une série de patients suivis à l'Hôpital de la Salpêtrière.

-Dans une série de 92 glioblastomes, nous avons observé que les patients dont la tumeur surexprimait *ASPM* (ratio ASPM/ALAS > 30.1) avaient une tendance à survivre un peu plus longtemps (14,84 mois) que les autres patients (10,22 mois) mais la différence ( $p=0.058$ ) n'atteignait pas le seuil de significativité (<0.05). Ce résultat, qui apparaît paradoxal, est à vérifier sur une plus grande série.

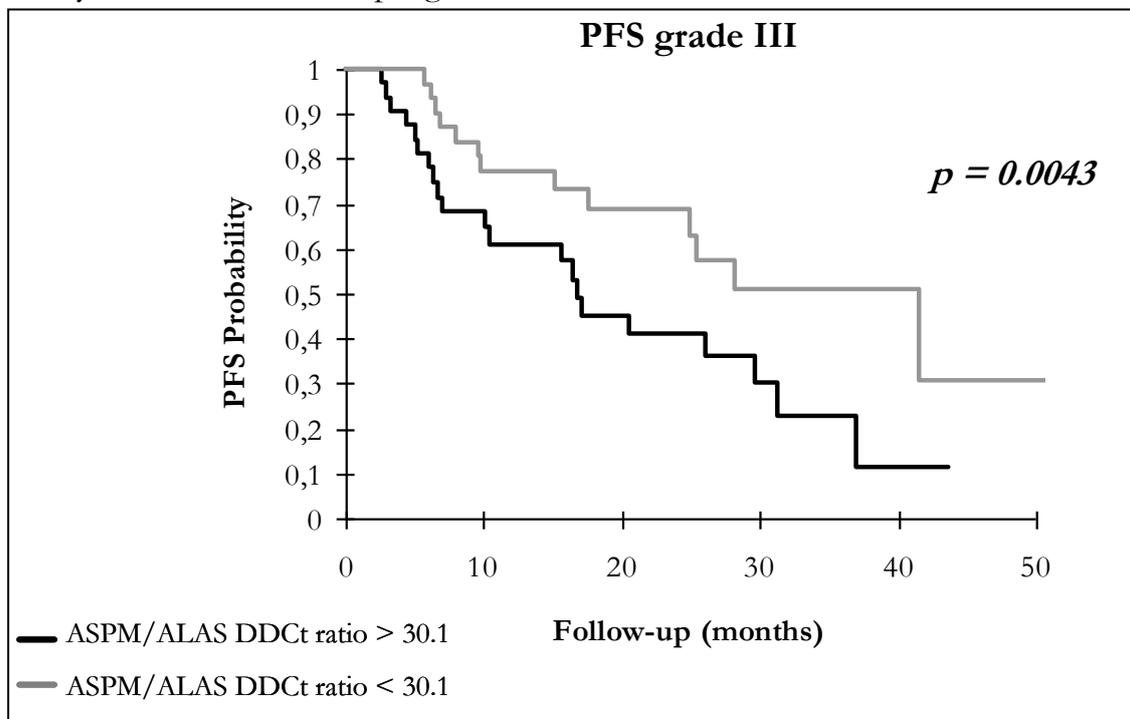


En revanche, dans une série de 77 patients souffrant de gliomes anaplasiques (grade III), nous avons trouvé une corrélation significative entre la surexpression d'*ASPM* et un pronostic plus défavorable en terme de médiane de survie (25,1 vs 35,8 mois,  $p=0.018$ ) et d'intervalle libre de progression (PFS 14,7 vs 28,9 mois,  $p=0.0043$ ).



**Fig.27** : Etude de la survie globale dans une cohorte de 77 patients présentant un grade III et exprimant faiblement ou fortement *ASPM* (mean + /- SEM ; n=77).

Analyse de la survie sans progression.

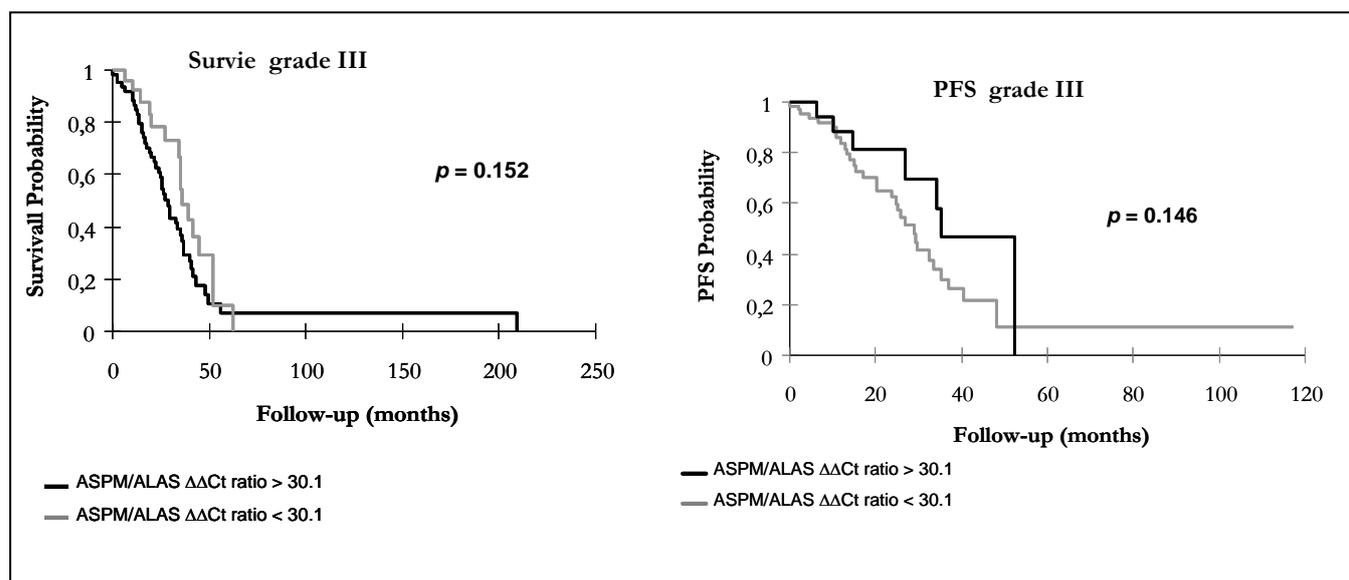


**Fig.28** : Etude de la survie sans progression (PFS) dans une cohorte de 77 patients présentant un grade III et exprimant faiblement ou fortement *ASPM* (mean + /- SEM ; n=77).

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

Malgré ce résultat initial encourageant en analyse univariée, la valeur pronostique de l'expression d'*ASPM* perdait sa significativité lorsque d'autres facteurs pronostiques bien connus comme la co-délétion 1p-19q ou la présence d'une mutation *IDH1* étaient pris en compte. Par exemple, dans une étude complémentaire centrée sur les patients présentant une co-délétion 1p-19q et/ou une mutation *IDH1*, la valeur pronostique d'*ASPM* n'était plus identifiée (**fig.29**).

Analyse de la survie globale et de la PFS.

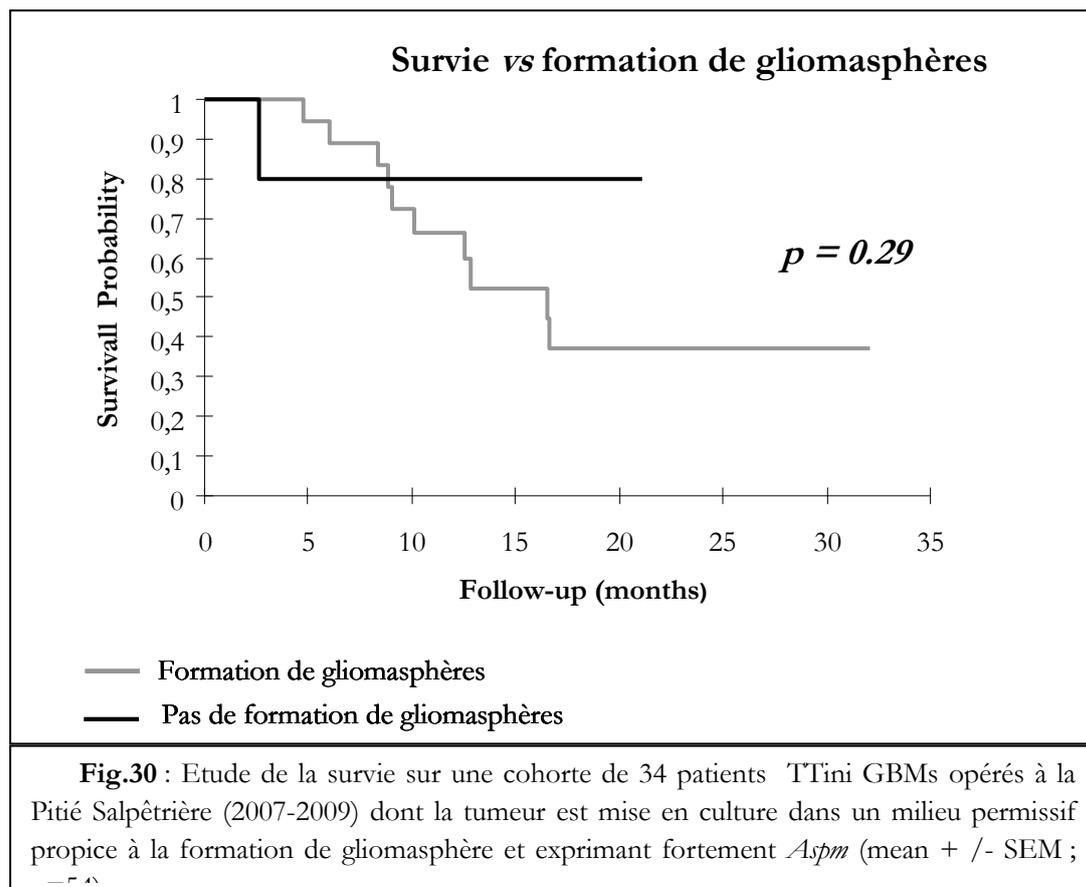


**Fig.29** : Analyse de la survie et de la survie sans progression d'une cohorte de 92 patients présentant un grade III, co-déléte 1p19q et / ou IDH1, et exprimant faiblement ou fortement *ASPM* (mean + /- SEM ; n=92).

Ainsi, même si nos résultats peuvent être critiqués en raison d'un manque de puissance, ces données préliminaires suggèrent que l'expression intra-tumorale d'*ASPM* n'apparaît pas comme un facteur pronostic indépendant utile dans l'évaluation des gliomes de haut grade.

### C.3- Etude des corrélations entre l'expression du gène *ASPM* et l'évolution des gliomes de haut grade

Cette interrogation a été motivée par deux publications (Pallini et *al.*, 2009 puis Laks et collaborateurs) montrant que la formation de neurosphères de glioblastomes à partir de la tumeur initiale était un facteur prédictif péjoratif indépendant.



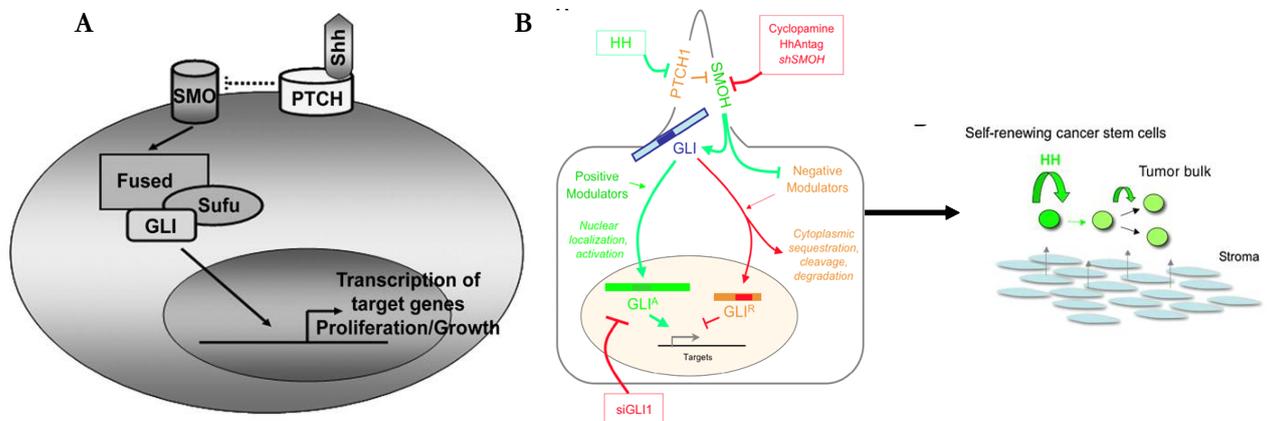
Comme l'indique la figure 30, nous n'avons pas pu reproduire ces résultats qui pourraient également être affectés par un manque de puissance.

**ARTICLE 2**

### III. Article 2

#### A- Présentation de l'article

**Contexte de l'étude :** La protéine Sonic hedgehog (SHH) appartient à la famille des protéines hedgehog tout comme Desert hedgehog et Indian hedgehog. Elle a été mise en évidence chez la drosophile et est fortement conservée dans les différentes espèces incluant l'homme. SHH exerce son action via l'activité combinée de deux récepteurs : le récepteur smoothed (SMO) et le récepteur patched (PTCH). SHH se lie à PTCH et permet à SMO de transduire le signal dans le cytoplasme. Ce signal conduit à l'activation des facteurs de transcription GLI. Après leur translocation dans le noyau, les facteurs GLI vont activer la transcription des gènes spécifiques impliqués dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire.



**Fig.31 :** **A :** Représentation schématique de la signalisation SHH-GLI (-Hedge et al, 2008 -). Cette voie de signalisation aboutit à l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération comme la Cycline-D1 et N-Myc, dans le développement comme les gènes Wnt, le PDGFR $\alpha$  et l'insuline growth factor 2 (IGF2).  
**B :** Modulation et mode d'activation de la voie HH-GLI dans les cancers. Activation des facteurs de transcription dans la boucle du cilium primaire avant qu'ils entrent dans le nucléole pour aller réguler l'expression des gènes.

La protéine SHH joue un rôle clé dans la régulation de l'organogénèse des vertébrés et constitue un exemple de morphogène (molécule qui diffuse selon un

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

gradient de concentration et qui a des effets différents en fonction de sa concentration). La protéine SHH joue également un rôle chez l'adulte, en contrôlant la division cellulaire des cellules souches, notamment en modulant la prolifération de précurseurs neuronaux.

La voie de signalisation SHH-GLI est aussi impliquée dans le développement de plusieurs cancers, notamment des gliomes.

Des études récentes ont montré une dérégulation de la voie de signalisation SHH-GLI dans les gliomes (Dahmane et *al.*, 2001, Lien et *al.*, 2006) avec une surexpression constitutive du gène *GLI1*, particulièrement au niveau de cellules tumorales exprimant certains marqueurs de cellules souches comme : NANOG, KLF4, CD133, SOX, OCT4, Nestin et BMI1 (Clément et *al.*, 2007). Ainsi la voie de signalisation SHH-GLI, semble participer à l'auto-renouvellement des cellules souches tumorales et à leur survie via l'activité régulatrice de *GLI1*. L'inhibition constitutive de SMOH par shRNA ou par le biais de la cyclopamine inhibe la formation de gliomasphères (Clément et *al.*, 2007 ; Bar et *al.*, 2007) par répression de l'expression de *GLI1*.

Le but de ce travail était d'étudier les interactions entre le gène *NANOG* dont l'expression fait partie de la signature « souche » identifiée dans les glioblastomes et la voie SHH-GLI dans les CST de gliomes.

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

## **B- Publication**

**NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53.**

**Authors:** Marie Zbinden<sup>1</sup>, Arnaud Duquet<sup>1</sup>, Aiala Lorente-Trigos<sup>1</sup>, Sandra-Nadia Ngwabyt<sup>2</sup>, Isabel Borges<sup>1</sup> and Ariel Ruiz i Altaba<sup>1</sup>.

1- Department of Genetic Medicine and development, University of Geneva Medical School, Geneva Switzerland

2- UMR975 INSERM-UPMC, GH Pitié- Salpêtrière, Paris France

































## **C- Conclusions de l'article**

Les résultats de ce travail démontrent que le gène *NANOG* interagit étroitement avec la voie de signalisation HH-GLI et joue un rôle essentiel dans la régulation des CST des glioblastomes.

### **1. *NANOG* est impliqué dans le pouvoir tumorigène des GBMs**

*In vitro*, l'expression de la protéine *NANOG* est indispensable pour maintenir la formation des gliomasphères de GBM et leur prolifération. Les résultats obtenus montrent que les cellules CD133+ expriment plus fortement le gène *NANOG* que les cellules CD133-. L'inhibition post-transcriptionnelle du gène *NANOG* par ARN interférence via un lentivirus *in vitro* et *in vivo* dans les CSTs de GBM et dans les tumeurs orthotopiques de GBM de souris, inhibe de façon drastique la prolifération des CST et réduit la croissance tumorale *in vivo*.

### **2. *NANOG* et *GLI* forment une boucle fonctionnelle**

Les gènes *NANOG* et *GLI1* forment une boucle fonctionnelle dans laquelle le niveau d'expression de l'un dépend de la fonction de l'autre. Le gène *NANOG* est essentiel pour les réponses HH-GLI. *NANOG* a une fonction d'effecteur pour *GLI1*.

### **3. Implications pratiques potentielles**

L'étude de l'expression du gène *NANOG* pourrait ainsi avoir un intérêt comme biomarqueur des CST de GBM. Le couple *GLI-NANOG* pourrait être à cet effet une cible pour des thérapies dirigées préférentiellement contre les CST.

**DISCUSSION, PERSPECTIVES, CONCLUSION**

## Discussion des résultats

---

Dans la mesure où les études sur le gène *ASPM* ont constitué l'essentiel de notre travail de thèse, la discussion est centrée sur cet aspect.

*ASPM* est une protéine indispensable au maintien de la division proliférative au cours de la neurogenèse (Paramsivam et al., 2007). Elle contrôle le nombre de neuroblastes (Bond et al., 2003). Une de ses actions essentielles est de contribuer à la formation et au maintien du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire.

L'étude de l'expression du gène *ASPM* sur une large série de gliomes nous a permis de montrer que l'expression de ce gène était étroitement corrélée au grade de malignité. Ce résultat confirme et étend les travaux antérieurs de Hagemann et collaborateurs qui avaient montré une expression de l'ARNm du gène *ASPM* beaucoup plus élevée dans une série de 15 glioblastomes comparée à une série de 15 astrocytomes de grade II. Au niveau protéique par contre, la surexpression d'*ASPM* a été plus délicate à mettre en évidence par immuno-histochimie et les western blot dans les cultures de glioblastomes *in vitro* et dans les échantillons tumoraux (Hagemann et al., 2008), suggérant que la régulation d'*ASPM* pourrait en partie se faire au niveau translationnel. Dans notre série, nous avons trouvé une expression protéique plus élevée dans les grades IV, mais ce résultat reposait sur un nombre limité d'échantillons.

La surexpression d'*ASPM* a également été rapportée dans d'autres tumeurs neuro-épithéliales comme les médulloblastomes (Vulcani-Freitas et al., 2010) et dans certains épendymomes (Peyre et al., 2010). Une surexpression d'*ASPM* a aussi été signalée dans des cancers systémiques (utérus, ovaire, mélanome, carcinome hépatocellulaire), indiquant un rôle relativement ubiquitaire de ce gène dans l'oncogenèse, dépassant largement le cadre des tumeurs cérébrales.

Il est intéressant de noter que l'expression d'*ASPM* augmente lors des récurrences, y compris dans les récurrences de glioblastomes, tumeurs qui ont dès le stade initial atteint le grade de malignité maximum. Une observation similaire a été

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

faite dans une série d'épendymomes, démontrant une augmentation significative d'ASPM (étudié par micro-array et immuno-histochimie) dans les récives en comparaison avec les tumeurs initiales (Peyre et al., 2010).

Cette donnée suggère que même au stade le plus agressif des gliomes, une sélection dynamique de populations spécifiques se poursuit, impliquant particulièrement des cellules exprimant des marqueurs de cellules souches comme ASPM.

Bien que nos résultats indiquent une claire corrélation entre le grade de malignité et l'expression de l'ARNm d'ASPM, nous n'avons pu démontrer, pour un grade donné, que l'expression de l'ARNm d'ASPM avait un rôle pronostic indépendant, une observation également faite par Hagemann et collaborateurs dans une petite série de glioblastomes et par Vulcani-Freitas et ses collaborateurs dans une série de médulloblastomes.

L'analyse des gliomes anaplasiques est à cet égard intéressante car les tumeurs de grade III ont une évolution très hétérogène d'un patient à l'autre et se sont révélées particulièrement discriminantes pour mettre en évidence des marqueurs moléculaires pronostiques. Même si nous avons trouvé une corrélation entre l'expression de l'ARNm d'ASPM et la survie des gliomes anaplasiques en analyse univariée, le poids pronostic de l'expression d'*ASPM* semble s'effacer lorsque d'autres facteurs moléculaires clefs sont pris en compte comme la co-délétion 1p-19q ou la mutation *IDH1*. Il faut cependant signaler que la taille de notre échantillon reste relativement modeste, ce qui implique un manque de puissance potentielle.

Dans un deuxième temps, nous avons pu démontrer que l'augmentation progressive de l'expression d'*ASPM* au fil du temps était également retrouvée dans des passages successifs de gliomasphères, constituées principalement de cellules ayant des caractéristiques « de cellules souches tumorales ». L'injection d'une de ces gliomasphères dans un modèle de xénogreffe chez la souris nude a montré que

l'augmentation progressive d'*ASPM* existait aussi lors des passages consécutifs sur un modèle *in vivo*.

Ainsi, l'augmentation progressive d'*ASPM* apparaît comme un phénomène « inéluctable », intimement associé au degré d'anaplasie et se poursuivant sans discontinuer, y compris après que la tumeur ait atteint le degré maximal d'agressivité histologique.

Compte tenu du lien étroit entre expression d'*ASPM* et les caractéristiques « souches » des cellules qui l'expriment, une hypothèse est que la promotion de divisions symétriques de cellules souches tumorales induites par ASPM aboutit à un enrichissement progressif de la tumeur en cellules immatures et indifférenciées de type CST. Ce phénomène pourrait contribuer à la résistance des récurrences aux thérapies conventionnelles car de nombreuses évidences indiquent que les CST sont très radio- et chimio-résistantes ((Bao et al., 2006) ;(Bieir et al., 2007) ; (Sakariassen et al., 2007)).

Quelle que soit la cause de cette surexpression progressive d'*ASPM*, cette protéine apparaît au niveau cérébral comme spécifique des cellules tumorales dans la mesure où le cerveau adulte normal ne l'exprime pas ou pratiquement pas. ASPM peut donc constituer une cible thérapeutique intéressante en tant qu'antigène tumoral cérébral mais aussi en raison de son rôle propre dans la gliomagenèse.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'effet d'une inhibition par shRNA d'*ASPM* dans des gliomasphères. Il apparaît clairement qu'une inhibition d'*ASPM* par transduction stable d'un shRNA provoque non seulement une inhibition de la prolifération des gliomasphères, un phénomène préalablement rapporté (Horvath et al., 2007), mais aussi une mortalité cellulaire considérable par apoptose. Ces données indiquent que le gène *ASPM* est indispensable au maintien de la formation de gliomasphère et à la prolifération des CST présentes dans la culture.

Les raisons de cet effet spectaculaire restent peu claires. Il pourrait être simplement lié aux conditions expérimentales. Par exemple, l'inhibition d'*ASPM*

pourrait induire une différenciation accélérée des cellules tumorales qui deviendraient incapables de survivre dans le milieu de culture dépourvu de sérum. Dans ce cas, l'inhibition d'ASPM sur des modèles *in vivo* n'aurait pas la même efficacité. Une hypothèse alternative est que le rôle d'ASPM est plus essentiel à la survie des CST que des cellules souches neurales normales. Les mutations homozygotes d'ASPM sont la cause la plus fréquente de microcéphalie primaire et dans ce contexte, l'extinction d'ASPM produit un cerveau « miniaturisé » en raison d'une réduction du nombre de neurones mais dont l'architecture reste intacte. De même, l'extinction d'ASPM dans les cellules souches neurales par RNAi *via* un siRNA bloque la capacité proliférative mais ne provoque pas de morts cellulaires extensives (Fish et al., 2006).

Les CST sont déjà fragilisées par l'accumulation d'altérations génétiques. Dans ce contexte, il est possible que l'inhibition de l'organisation du fuseau mitotique et des microtubules pendant la division cellulaire, provoquée par l'extinction durable d'ASPM par shRNA, bloque non seulement les cellules en phase G2M du cycle cellulaire mais se révèle finalement létal, notamment en activant un processus apoptotique.

Nos résultats posent ainsi la question du lien fonctionnel entre ASPM et les principales voies dérégulées dans les gliomes malins, particulièrement la voie de l'EGFR.

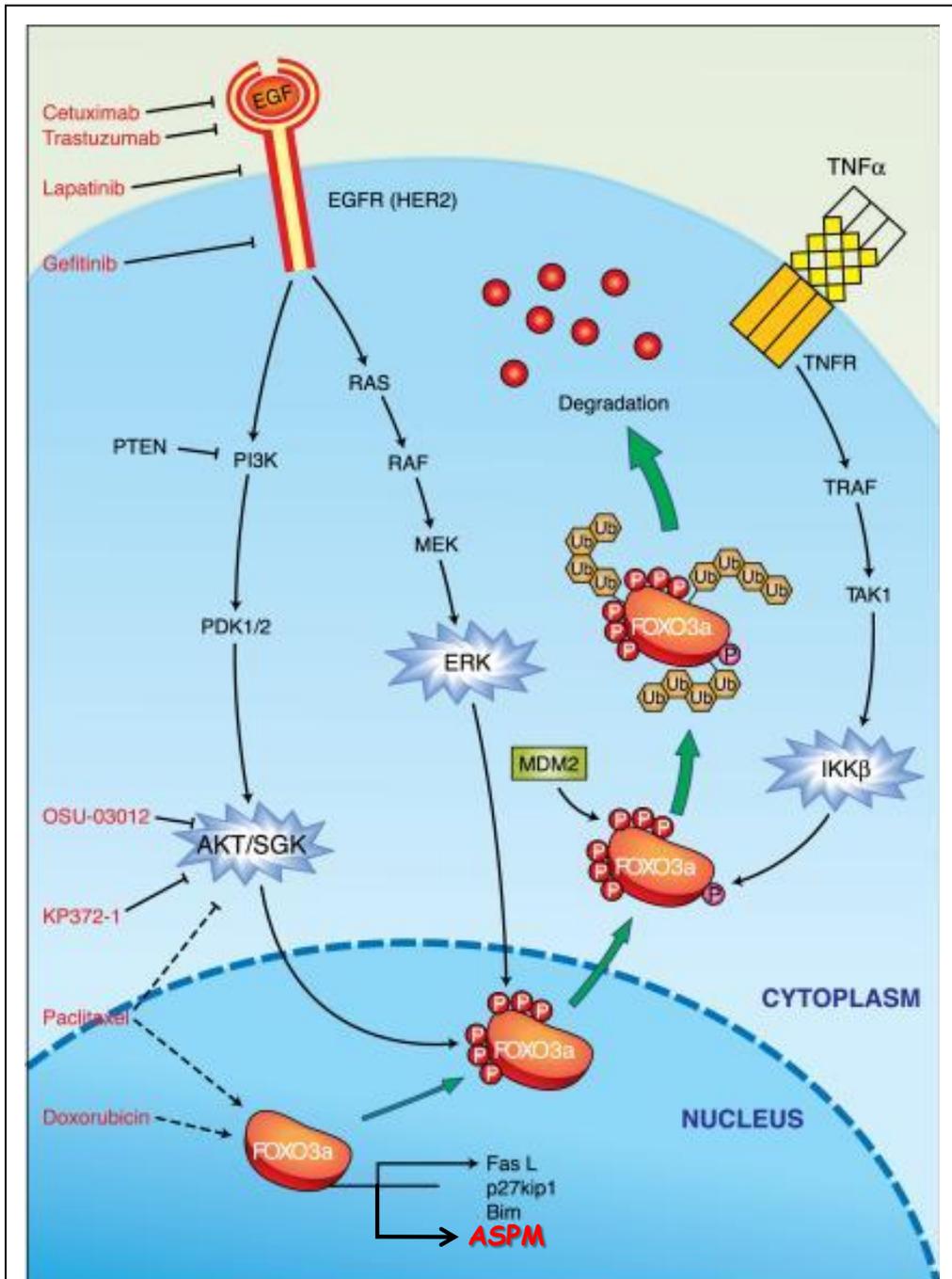
Dans notre laboratoire, la formation de gliomasphères durables, capables de supporter de nombreux passages paraît étroitement liée à la présence d'une amplification du gène de l'EGFR et à la présence de sa forme mutée EGFRvIII (mutation d'EGFR la plus fréquemment observée dans les glioblastomes). Plus de 80% de nos gliomasphères établies présentaient une amplification de l'EGFR. Horvath et collaborateurs ont montré que l'expression d'ASPM augmentait fortement quand la lignée GBM U87 (sans amplification d'EGFR) était transduite par EGFRvIII. Ces auteurs ont suggéré qu'ASPM pourrait être régulé en aval de

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

l'EGFR, au niveau de la voie PI3K-AKT. Ils ont également démontré que l'inhibition de l'EGFR par l'erlotinib inhibait l'expression d'ASPM.

Un effecteur clef des voies de transduction PI3K-AKT est FoxO (Forkhead O Transcription factors) qui compose une famille de facteurs de transcriptions. L'activation de la voie PI3K-AKT par l'EGFR inhibe FoxO 3a, considéré comme un gène suppresseur de tumeur, au niveau post-translationnel (phosphorylation), provoquant sa translocation du noyau vers le cytoplasme ou il est dégradé (Jer-Yen Yang et Hung ; 2009 - 2011). Or, il a été récemment démontré (Paik et al., 2009) que le promoteur du gène *ASPM* est une cible directe de FoxO dans les cellules souches neurales. L'inactivation de FoxO provoque une forte surexpression d'ASPM (mRNA et protéines) dans les cellules souches neurales et l'inhibition d'ASPM par siRNA bloque la prolifération de cellules souches neurales invalidées pour FoxO.

Il existe donc un lien fonctionnel entre EGFR, FoxO, et ASPM comme l'illustre la figure 32. Il reste cependant à démontrer que ce lien est aussi opérationnel dans les CST de gliomes.



**Fig.32** : FoxO 3a est phosphorylé par la voie PI3K / AKT. La phosphorylation de FoxO 3a induit sa sortie du noyau et supprime son activité transcriptionnelle.

*-Yang et Hung, 2009-*

Outre son effet sur la prolifération, des travaux récents suggèrent qu'*ASPM* est impliqué dans les phénomènes d'invasion/métastase (Lin et al., 2008; Kabbara et al., 2010). Dans les mélanomes, Kabbarah et collaborateurs ont montré que la

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

surexpression d'*ASPM* faisait partie d'une signature de gènes prédictifs de métastases. Dans les carcinomes hépatocellulaires, Lin et collaborateurs ont observé que la surexpression d'*ASPM* était clairement associée à un volume tumoral élevé, une invasion vasculaire et à la présence de métastases intra-hépatiques. Les gliomes métastasent exceptionnellement au niveau systémique mais un phénotype très infiltrant est une caractéristique fondamentale de ces tumeurs et la principale cause d'échec thérapeutique.

## Perspectives et conclusion

---

Le travail présenté indique qu'*ASPM* est une cible thérapeutique potentielle dans les gliomes malins mais de nombreux aspects restent à approfondir dont on peut citer quelques exemples:

-La première étape, indispensable, est d'étudier l'effet de l'inactivation de l'expression du gène *ASPM in vivo* sur des xénogreffes tumorales chez la souris *nude*, idéalement sur un modèle orthotopique. Cette approche, plus délicate, n'a pas été mise en œuvre, et reposerait soit sur l'injection de SiRNA *in vivo*, soit sur l'utilisation d'un vecteur inductible.

-Approfondir la connaissance des interactions EGFR-FoxO-ASPM dans les glioblastomes. Dans cette perspective, l'étude des conséquences d'une invalidation d'EGFR sur l'expression d'ASPM serait prioritaire. Il serait également intéressant d'évaluer l'effet d'une augmentation intra-nucléaire de FoxO, obtenue par exemple en utilisant des agents qui maintiennent sa localisation intra-nucléaire, sur l'activité ASPM et la prolifération tumorale.

- Analyser le rôle d'ASPM sur l'infiltration tumorale.

### Conclusion

Ce travail conforte le concept que les cellules souches tumorales constituent une population spécifique des tumeurs gliales, quantitativement limitées au début mais prenant progressivement une importance de plus en plus grande au cours de l'évolution. L'identification de marqueurs spécifiques de ces cellules et leur exploitation comme cibles à des fins thérapeutiques, pourrait contribuer à l'amélioration des traitements de ces redoutables tumeurs.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Aizawa K, Ageyama N, Terao K and Hisatsune T. (2009). *Neurobiol Aging*, **32**, 140-50.
- Aldape K, Burger PC and Perry A. (2007). *Arch Pathol Lab Med*, **131**, 242-51.
- Alpers CE, Davis RL and Wilson CB. (1982). *J Neurosurg*, **57**, 548-51.
- Alvarez-Buylla A and Lim DA. (2004). *Neuron*, **41**, 683-6.
- Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H and Mills AA. (2007). *Cell*, **128**, 459-75.
- Bailey P and Cushing H. (1925). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **11**, 82-4.
- Baldi I, Huchet A, Bauchet L and Loiseau H. *Neurochirurgie*, **56**, 433-40.
- Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC and Eberhart CG. (2008). *J Neuropathol Exp Neurol*, **67**, 878-87.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF and Delattre JY. (2003). *Lancet*, **361**, 323-31.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U and Beier CP. (2007). *Cancer Res*, **67**, 4010-5.
- Beier D, Rohrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B, Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P and Beier CP. (2008). *Cancer Res*, **68**, 5706-15.
- Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni L, Buttitta F, Malatesta S, Marchetti A and Bardelli A. (2009). *Hum Mutat*, **30**, 7-11.
- Bonaguidi MA, Peng CY, McGuire T, Falciglia G, Gobeske KT, Czeisler C and Kessler JA. (2008). *J Neurosci*, **28**, 9194-204.
- Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, Springell K, Mahadevan M, Crow YJ, Markham AF, Walsh CA and Woods CG. (2002). *Nat Genet*, **32**, 316-20.

- Bond J, Scott S, Hampshire DJ, Springell K, Corry P, Abramowicz MJ, Mochida GH, Hennekam RC, Maher ER, Fryns JP, Alswaid A, Jafri H, Rashid Y, Mubaidin A, Walsh CA, Roberts E and Woods CG. (2003). *Am J Hum Genet*, **73**, 1170-7.
- Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, Batchelor TT, Futreal PA, Stratton MR, Curry WT, Iafrate AJ and Louis DN. (2007). *Clin Cancer Res*, **13**, 2038-45.
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A and Gilbertson RJ. (2007). *Cancer Cell*, **11**, 69-82.
- Capper D, Reuss D, Schittenhelm J, Hartmann C, Bremer J, Sahm F, Harter PN, Jeibmann A and von Deimling A. (2010). *Acta Neuropathol*, **121**, 241-52.
- Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C and von Deimling A. (2009). *Acta Neuropathol*, **118**, 599-601.
- Cavaliere R, Lopes MB and Schiff D. (2005). *Lancet Neurol*, **4**, 760-70.
- Chenn A and McConnell SK. (1995). *Cell*, **82**, 631-41.
- Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I and Ruiz i Altaba A. (2007). *Curr Biol*, **17**, 165-72.
- Colman H, Zhang L, Sulman EP, McDonald JM, Shooshtari NL, Rivera A, Popoff S, Nutt CL, Louis DN, Cairncross JG, Gilbert MR, Phillips HS, Mehta MP, Chakravarti A, Pelloski CE, Bhat K, Feuerstein BG, Jenkins RB and Aldape K. (2010). *Neuro Oncol*, **12**, 49-57.
- Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ and Pearl DK. (1997). *Cancer*, **79**, 1381-93.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG and Su SM. (2009). *Nature*, **462**, 739-44.
- Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P and Fallet-Bianco C. (2000). *Ann Pathol*, **20**, 413-28.
- Daumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, Udo N, Koziak M and Chodkiewicz JP. (1997a). *J Neurooncol*, **34**, 61-78.

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, Beuvon F, Cervera P and Chodkiewicz JP. (1997b). *J Neurooncol*, **34**, 37-59.

Deshmukh H, Yeh TH, Yu J, Sharma MK, Perry A, Leonard JR, Watson MA, Gutmann DH and Nagarajan R. (2008). *Oncogene*, **27**, 4745-51.

Dietrich J, Noble M and Mayer-Proschel M. (2002). *Glia*, **40**, 65-77.

Ducray F, Mokhtari K, Criniere E, Idbaih A, Marie Y, Dehais C, Paris S, Carpentier C, Dieme MJ, Adam C, Hoang-Xuan K, Duyckaerts C, Delattre JY and Sanson M. *Eur J Cancer*, **47**, 802-8.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA and Gage FH. (1998). *Nat Med*, **4**, 1313-7.

Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Criniere E, Busato F, Marie Y, Gut IG, Sanson M, Mokhtari K, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY and Thillet J. (2009). *Neuro Oncol*, **11**, 348-56.

Farkas LM and Huttner WB. (2008). *Curr Opin Cell Biol*, **20**, 707-15.

Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S and Nicolis SK. (2004). *Development*, **131**, 3805-19.

Figarella-Branger D and Bouvier C. (2005). *Bull Cancer*, **92**, 301-9.

Fish JL, Kosodo Y, Enard W, Paabo S and Huttner WB. (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10438-43.

Fortin D, Cairncross GJ and Hammond RR. (1999). *Neurosurgery*, **45**, 1279-91; discussion 191.

Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liao LM, Mischel PS and Nelson SF. (2004). *Cancer Res*, **64**, 6503-10.

French PJ, Swagemakers SM, Nagel JH, Kouwenhoven MC, Brouwer E, van der Spek P, Luider TM, Kros JM, van den Bent MJ and Sillevius Smitt PA. (2005). *Cancer Res*, **65**, 11335-44.

Fu Y, Huang R, Du J, Yang R, An N and Liang A. (2010). *Biochem Biophys Res Commun*, **397**, 127-30.

- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA and Cavenee WK. (2007). *Genes Dev*, **21**, 2683-710.
- Gage FH. (2000). *Science*, **287**, 1433-8.
- Gage FH, Ray J and Fisher LJ. (1995). *Annu Rev Neurosci*, **18**, 159-92.
- Gallia GL, Rand V, Siu IM, Eberhart CG, James CD, Marie SK, Oba-Shinjo SM, Carlotti CG, Caballero OL, Simpson AJ, Brock MV, Massion PP, Carson BS, Sr. and Riggins GJ. (2006). *Mol Cancer Res*, **4**, 709-14.
- Gan HK, Kaye AH and Luwor RB. (2009). *J Clin Neurosci*, **16**, 748-54.
- Gangemi RM, Griffero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A and Corte G. (2009). *Stem Cells*, **27**, 40-8.
- Gerson SL. (2004). *Nat Rev Cancer*, **4**, 296-307.
- Giannini C, Scheithauer BW, Weaver AL, Burger PC, Kros JM, Mork S, Graeber MB, Bauserman S, Buckner JC, Burton J, Riepe R, Tazelaar HD, Nascimento AG, Crotty T, Keeney GL, Pernicone P and Altermatt H. (2001). *J Neuropathol Exp Neurol*, **60**, 248-62.
- Goldberg JS and Hirschi KK. (2009). *Regen Med*, **4**, 879-97.
- Gotz M and Huttner WB. (2005). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 777-88.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG and Vescovi AL. (2002). *J Neurosci*, **22**, 437-45.
- Haydar TF, Ang E, Jr. and Rakic P. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2890-5.
- He J, Mokhtari K, Sanson M, Marie Y, Kujas M, Huguet S, Leuraud P, Capelle L, Delattre JY, Poirier J and Hoang-Xuan K. (2001). *J Neuropathol Exp Neurol*, **60**, 863-71.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC and Stupp R. (2005). *N Engl J Med*, **352**, 997-1003.
- Houillier C, Mokhtari K, Carpentier C, Criniere E, Marie Y, Rousseau A, Kaloshi G, Dehais C, Laffaire J, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Sanson M and Delattre JY. (2010). *Neuro Oncol*, **12**, 2-6.

- Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T and Holland EC. (2009). *Genes Dev*, **23**, 1327-37.
- Ichimura K, Vogazianou AP, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Plant K, Baird K, Langford CF, Gregory SG and Collins VP. (2008). *Oncogene*, **27**, 2097-108.
- Idbaih A, Carvalho Silva R, Criniere E, Marie Y, Carpentier C, Boisselier B, Taillibert S, Rousseau A, Mokhtari K, Ducray F, Thillet J, Sanson M, Hoang-Xuan K and Delattre JY. (2008). *J Neurooncol*, **90**, 133-40.
- Idbaih A, Dalmaso C, Kouwenhoven M, Jeuken J, Carpentier C, Gorlia T, Kros JM, French P, Teepen J, Broet P, Delattre O, Mokhtari K, Sanson M, Delattre JY, van den Bent M and Hoang-Xuan K. (2010). *J Neurooncol*.
- Idbaih A, Marie Y, Pierron G, Brennetot C, Hoang-Xuan K, Kujas M, Mokhtari K, Sanson M, Lejeune J, Aurias A, Delattre O and Delattre JY. (2005). *Ann Neurol*, **58**, 483-7.
- Ino Y, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, Jung S, Ramsay DA, von Deimling A, Louis DN and Cairncross JG. (2000). *J Neurosurg*, **92**, 983-90.
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG and Buckner JC. (2006). *Cancer Res*, **66**, 9852-61.
- Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Ichimura K and Collins VP. (2008). *Cancer Res*, **68**, 8673-7.
- Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, Etcheverry A, Hamlat A, Loussouarn D, Campion L, Campone M, Vallette FM and Gratas-Rabbia-Re C. *J Neurooncol*, **97**, 311-22.
- Karsten SL, Kudo LC and Geschwind DH. (2004). *Int Rev Neurobiol*, **60**, 1-23.
- Kernohan JW. (1949). *Arch Neurol Psychiatry*, **62**, 867.
- Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ and Johnson MD. (2010). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 2183-8.
- Kleihues P and Ohgaki H. (1999). *Neuro Oncol*, **1**, 44-51.

Kleihues P and Sobin LH. (2000). *Cancer*, **88**, 2887.

Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, Pfister S, von Deimling A and Hartmann C. (2009). *Acta Neuropathol*, **118**, 401-5.

Korshunov A, Sycheva R and Golanov A. (2005). *Cancer*, **104**, 825-32.

Kriegstein A and Alvarez-Buylla A. (2009). *Annu Rev Neurosci*, **32**, 149-84.

Labussiere M, Idbaih A, Wang XW, Marie Y, Boisselier B, Falet C, Paris S, Laffaire J, Carpentier C, Criniere E, Ducray F, El Hallani S, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY and Sanson M. (2010). *Neurology*, **74**, 1886-90.

Laffaire J, Everhard S, Idbaih A, Criniere E, Marie Y, de Reynies A, Schiappa R, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY, Thillet J and Ducray F. (2010). *Neuro Oncol*, **13**, 84-98.

Legler JM, Gloeckler Ries LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS and Linet MS. (1999). *J Natl Cancer Inst*, **91**, 2050A-22051.

Li Y, Guessous F, Zhang Y, Dipierro C, Kefas B, Johnson E, Marcinkiewicz L, Jiang J, Yang Y, Schmittgen TD, Lopes B, Schiff D, Purow B and Abounader R. (2009). *Cancer Res*, **69**, 7569-76.

Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK, Lamborn KR, Berger MS, Botstein D, Brown PO and Israel MA. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5814-9.

Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL and Gage FH. (2004). *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **44**, 399-421.

Ljubimova JY, Khazenzon NM, Chen Z, Neyman YI, Turner L, Riedinger MS and Black KL. (2001). *Int J Oncol*, **18**, 287-95.

Lonn S, Klaeboe L, Hall P, Mathiesen T, Auvinen A, Christensen HC, Johansen C, Salminen T, Tynes T and Feychting M. (2004). *Int J Cancer*, **108**, 450-5.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW and Kleihues P. (2007). *Acta Neuropathol*, **114**, 97-109.

Madri JA. (2009). *J Physiol Pharmacol*, **60 Suppl 4**, 95-104.

- Maher EA, Brennan C, Wen PY, Durso L, Ligon KL, Richardson A, Khattry D, Feng B, Sinha R, Louis DN, Quackenbush J, Black PM, Chin L and DePinho RA. (2006). *Cancer Res*, **66**, 11502-13.
- Mayer-Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T and Rao MS. (1997). *Neuron*, **19**, 773-85.
- Megyesi JF, Kachur E, Lee DH, Zlatescu MC, Betensky RA, Forsyth PA, Okada Y, Sasaki H, Mizoguchi M, Louis DN and Cairncross JG. (2004). *Clin Cancer Res*, **10**, 4303-6.
- Misra A, Pellarin M, Nigro J, Smirnov I, Moore D, Lamborn KR, Pinkel D, Albertson DG and Feuerstein BG. (2005). *Clin Cancer Res*, **11**, 2907-18.
- Mittler MA, Walters BC and Stopa EG. (1996). *J Neurosurg*, **85**, 1091-4.
- Morrison SJ and Spradling AC. (2008). *Cell*, **132**, 598-611.
- Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, Lanksch W, Kiwit J, Tonn J, Veelken J, Schramm J, Weller M, Wiestler OD, Louis DN and von Deimling A. (2002). *Am J Pathol*, **161**, 313-9.
- Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich PY, Zimmer Y, Cairncross JG, Janzer RC, Domany E, Delorenzi M, Stupp R and Hegi ME. (2008). *J Clin Oncol*, **26**, 3015-24.
- Muscat JE, Hinsvark M and Malkin M. (2006). *Neuroepidemiology*, **27**, 55-6.
- Nedergaard M, Ransom B and Goldman SA. (2003). *Trends Neurosci*, **26**, 523-30.
- Nigro JM, Misra A, Zhang L, Smirnov I, Colman H, Griffin C, Ozburn N, Chen M, Pan E, Koul D, Yung WK, Feuerstein BG and Aldape KD. (2005). *Cancer Res*, **65**, 1678-86.
- Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P and Ohgaki H. (2009). *Clin Cancer Res*, **15**, 6002-7.
- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW and Aldape K. (2010). *Cancer Cell*, **17**, 510-22.

- Nutt CL, Betensky RA, Brower MA, Batchelor TT, Louis DN and Stemmer-Rachamimov AO. (2005). *Clin Cancer Res*, **11**, 2258-64.
- Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR and Louis DN. (2003). *Cancer Res*, **63**, 1602-7.
- Ohgaki H and Kleihues P. (2005). *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**, 479-89.
- Ohgaki H and Kleihues P. (2007). *Am J Pathol*, **170**, 1445-53.
- Palmer TD, Takahashi J and Gage FH. (1997). *Mol Cell Neurosci*, **8**, 389-404.
- Paramasivam M, Chang YJ and LoTurco JJ. (2007). *Cell Cycle*, **6**, 1605-12.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE and Kinzler KW. (2008). *Science*, **321**, 1807-12.
- Pastrana E, Cheng LC and Doetsch F. (2009). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 6387-92.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrester WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG and Aldape K. (2006). *Cancer Cell*, **9**, 157-73.
- Ponting C and Jackson AP. (2005). *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 241-8.
- Prayson RA, Agamanolis DP, Cohen ML, Estes ML, Kleinschmidt-DeMasters BK, Abdul-Karim F, McClure SP, Sebek BA and Vinay R. (2000). *J Neurol Sci*, **175**, 33-9.
- Reynolds BA and Weiss S. (1992). *Science*, **255**, 1707-10.
- Rich JN and Bao S. (2007). *Cell Stem Cell*, **1**, 353-5.
- Rich JN and Eyler CE. (2008). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **73**, 411-20.
- Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, Kuick R, Blaiwas M, Kurnit DM, Taylor J and Hanash SM. (2001). *Cancer Res*, **61**, 6885-91.

- Riparbelli MG, Callaini G, Glover DM and Avides Mdo C. (2002). *J Cell Sci*, **115**, 913-22.
- Ripoll P, Pimpinelli S, Valdivia MM and Avila J. (1985). *Cell*, **41**, 907-12.
- Roerig P, Nessling M, Radlwimmer B, Joos S, Wrobel G, Schwaenen C, Reifenberger G and Lichter P. (2005). *Int J Cancer*, **117**, 95-103.
- Rowitch DH. (2004). *Nat Rev Neurosci*, **5**, 409-19.
- Rowitch DH, Lu QR, Kessler N and Richardson WD. (2002). *Trends Neurosci*, **25**, 417-22.
- Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Helen PT, Schraml P, Kallioniemi OP and Kononen J. (2000). *Cancer Res*, **60**, 6617-22.
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B and Velculescu VE. (2004). *Science*, **304**, 554.
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K and Delattre JY. (2009). *J Clin Oncol*, **27**, 4150-4.
- Sanson M, Thillet J and Hoang-Xuan K. (2004). *Curr Opin Oncol*, **16**, 607-13.
- Saunders RD, Avides MC, Howard T, Gonzalez C and Glover DM. (1997a). *J Cell Biol*, **137**, 881-90.
- Saunders W, Lengyel V and Hoyt MA. (1997b). *Mol Biol Cell*, **8**, 1025-33.
- Seaberg RM, Smukler SR and van der Kooy D. (2005). *Dev Biol*, **278**, 71-85.
- Shen J, Xie L, Mao X, Zhou Y, Zhan R, Greenberg DA and Jin K. (2008). *J Cereb Blood Flow Metab*, **28**, 1460-8.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J and Dirks PB. (2003). *Cancer Res*, **63**, 5821-8.
- Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, Stegh AH, Bradner JE, Ligon KL, Brennan C, Chin L and DePinho RA. (2007). *Science*, **318**, 287-90.

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

- Stupp R, Reni M, Gatta G, Mazza E and Vecht C. (2007). *Crit Rev Oncol Hematol*, **63**, 72-80.
- Stupp R, van den Bent MJ and Hegi ME. (2005). *Curr Neurol Neurosci Rep*, **5**, 198-206.
- Tabler JM, Yamanaka H and Green JB. (2010). *Development*, **137**, 2501-5.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM and Doetsch F. (2008). *Cell Stem Cell*, **3**, 279-88.
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH and Weissman IL. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14720-5.
- Ullian EM, Christopherson KS and Barres BA. (2004). *Glia*, **47**, 209-16.
- van den Bent MJ. (2007). *Neurol Clin*, **25**, 1089-109, ix-x.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM and Hayes DN. (2010). *Cancer Cell*, **17**, 98-110.
- Vescovi AL and Snyder EY. (1999). *Brain Pathol*, **9**, 569-98.
- von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR and Louis DN. (1993). *Brain Pathol*, **3**, 19-26.
- Wakefield JG, Bonaccorsi S and Gatti M. (2001). *J Cell Biol*, **153**, 637-48.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P and Ohgaki H. (2009). *Am J Pathol*, **174**, 1149-53.
- Wilcock AC, Swedlow JR and Storey KG. (2007). *Development*, **134**, 1943-54.
- Wood JL, Singh N, Mer G and Chen J. (2007). *J Biol Chem*, **282**, 35416-23.
- Woods CG, Bond J and Enard W. (2005). *Am J Hum Genet*, **76**, 717-28.
- Zhang W, Wang H, Song SW and Fuller GN. (2002). *Brain Pathol*, **12**, 87-94.
- Zhao C, Deng W and Gage FH. (2008). *Cell*, **132**, 645-60.

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ASPM dans la prolifération des cellules souches tumorales des gliomes de haut grade

Zlatescu MC, TehraniYazdi A, Sasaki H, Megyesi JF, Betensky RA, Louis DN and Cairncross JG. (2001). *Cancer Res*, **61**, 6713-5.