

De la compréhension du comportement des cellules initiatrices de cancer dans les glioblastomes au développement d'une nanomédecine adaptée. Focalisation sur le marqueur de cellules souches cancéreuses AC133 / CD133

Erika Bourseau

▶ **To cite this version:**

Erika Bourseau. De la compréhension du comportement des cellules initiatrices de cancer dans les glioblastomes au développement d'une nanomédecine adaptée. Focalisation sur le marqueur de cellules souches cancéreuses AC133 / CD133. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Angers, 2011. Français. NNT : . tel-00662253

HAL Id: tel-00662253
https://theses.hal.science/tel-00662253

Submitted on 23 Jan 2012

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.

Université d'Angers 2011

n°1104

De la compréhension du comportement des cellules initiatrices de cancer dans les glioblastomes au développement d'une nanomédecine adaptée.

Focalisation sur le marqueur de cellules souches cancéreuses AC133 / CD133

Thèse de doctorat

Spécialité : Neurosciences

Ecole doctorale Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 avril 2011

Par **Erika Bourseau-Guilmain**

Devant le jury ci-dessous

Dr Lucie Karayan-Tapon, MCU-PH, Université de Poitiers	Rapporteur
Pr Robert Kiss, Université Libre de Bruxelles,	Rapporteur
Dr Patrick Midoux, DR1 INSERM, CNRS UPR 4301, Orléans	Examinateur
Dr Didier Wion, CR1 INSERM, INSERM U836, Grenoble	Examinateur
Pr Jean-Pierre Benoit, PU-PH, Université d'Angers	Examinateur
Dr Emmanuel Garcion, CR1 INSERM, INSERM U646	Directeur de thèse

INSERM U646

IBS-CHU Angers

4 rue Larrey

49933 Angers cedex 9

ED N° 502-BS

Université d'Angers 2011

n°1104

De la compréhension du comportement des cellules initiatrices de cancer dans les glioblastomes au développement d'une nanomédecine adaptée.

Focalisation sur le marqueur de cellules souches cancéreuses AC133 / CD133

Thèse de doctorat

Spécialité : Neurosciences

Ecole doctorale Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 avril 2011

Par **Erika Bourseau-Guilmain**

Devant le jury ci-dessous

Dr Lucie Karayan-Tapon, MCU-PH, Université de Poitiers	Rapporteur
Pr Robert Kiss, Université Libre de Bruxelles,	Rapporteur
Dr Patrick Midoux, DR1 INSERM, CNRS UPR 4301, Orléans	Examinateur
Dr Didier Wion, CR1 INSERM, INSERM U836, Grenoble	Examinateur
Pr Jean-Pierre Benoit, PU-PH, Université d'Angers	Examinateur
Dr Emmanuel Garcion, CR1 INSERM, INSERM U646	Directeur de thèse

INSERM U646

IBS-CHU Angers

4 rue Larrey

49933 Angers cedex 9

ED N° 502-BS

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier le Pr Jean-Pierre Benoit, directeur de l'INSERM U646, de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire de recherche.

Je remercie également le Dr Emmanuel Garcion, mon directeur de thèse, de m'avoir encadrée et de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans des conditions favorables. Merci pour le temps que tu m'as consacré et les conseils que tu as pu me donner, qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail, ainsi que pour les conversations scientifiques ou philosophiques que nous avons eues.

Je remercie le Dr Lucie Karayan-Tapon (Université de Poitiers) et le Pr Robert Kiss (Université Libre de Bruxelles) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, et pour le l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je remercie le Dr Patrick Midoux (CNRS 4301, Orléans) d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Je lui dois d'être en partie à l'origine de mon envie de faire une thèse.

Je remercie le Dr Didier Wion (INSERM U836, Grenoble), d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, et pour le regard bienveillant porté sur ce travail, tout au long de cette thèse.

Je remercie également le Conseil général de Maine-et-Loire et la Ligue Nationale contre le Cancer pour l'aide financière dont j'ai bénéficié pour effectuer cette thèse.

Je remercie les membres de l'INSERM U646 et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Merci à Laurent Lemaire, pour ton expertise en IRM et pour toutes les heures que tu as passées à faire des images du cerveau de mes petites souris.

Merci à François Hindré, Claire Vanpouille et Emilien Porcher pour leur collaboration radioactive. Claire et Emilien, merci pour ces heures qu'on a passées enfermés en salle de radioactivité à écouter de tout, et surtout n'importe quoi.

Merci à Frank Boury et Maud Gonnet pour votre collaboration et la mise au point des nanocapsules d'acide rétinoïque.

Merci à Anne Clavreul, Laurence Sindji et Claudia Montero-Menei pour ses conseils et son expertise en Biologie.

Merci également au personnel de la plateforme du SCCAN et particulièrement à Catherine Guillet, pour m'avoir montré les moindres ficelles du cytomètre.

Et au personnel de l'animalerie, Pierre, Jérôme, Dominique et Laurent de vous être aussi bien occupés de mes petites souris.

Jérôme, merci pour ton savoir faire de chimiste. Tu as été d'une grande aide pour ces immuno-nano. Sans toi ce projet ne serait pas arrivé là.

Merci à la Garcion's team :

Archibald, mon co-thésard et collègue de Banania. Ton enthousiasme inégalable a été une bulle d'air. Je garderai précieusement mon bol en souvenir de nos pauses et des doses de banania ingurgitées.

Marie W, merci pour toutes les discussions que l'on a pu avoir sur les nanocapsules et autres sujets beaucoup moins professionnels. Ta taille est proportionnelle à la taille de ta gentillesse. Je te souhaite beaucoup de courage pour ta nouvelle vie à Toulouse.

Audrey, jeune recrue de l'équipe, merci pour toute l'aide que tu as pu m'apporter pendant ton stage et ton début de thèse. Merci aussi pour tes mauvaises vibrations au FACS. Grâce à toi, il n'a plus de secret pour moi. Je te souhaite bon courage la fin de ta thèse.

Merci à Clovis, Marion, Myriam, Anne-Marie et Sonia, pour l'enthousiasme avec lequel vous avez travaillé sur ce projet.

Merci à mes collègues de bureau de l'IBT… :

Sandy, tu as été mon soutien féminin du bureau et nous avons été les meilleures secrétaires du monde je pense. Ne lâche pas le morceau pour la fin de ta rédaction. Dis aussi merci à Mindy pour les exercices de secourisme.

JP et Emilien, vous êtes mes employeurs de cœur. Pensez à moi dans quelques années quand vous aurez besoin d'une secrétaire particulière. Dr Moumoute, bon courage pour ces quelques mois qu'il te reste à faire. Tu tiens le bon bout et le prix Nobel avec.

Brice, le bricolo du bureau, si par hasard tu dois te reconvertir un jour, pense à un boulot dans la mécanique.

Merci à feu Bubulle Gaspard Adélaïde McFish Price d'avoir toujours pris le temps de nous écouter sans jamais râler.

…Les gars d'à côté :

Florian, le seul footballeur reggaeman humoriste. Tu as réussi à nous faire rire avec des jeux de mots dont toi seul as le secret. Dès que tu montes ton one man show, pense à me mettre des billets de côté. Je te souhaite bon courage pour la suite.

Jérôme, ta mauvaise humeur est légendaire, mais n'enlève rien au gars attachant que tu peux être. Reste comme tu es ou presque…

…Et de l'IRIS.

Anne-Laure, on s'est connu un peu tard, mais merci pour ta bonne humeur et ton grain de folie. Grâce a toi, mes séjours à Angers n'ont pas été les mêmes. Merci pour ma euh… ta chambre et pour ton accueil.

Marie M, tu es partie j'étais là. Tu es revenue et j'étais toujours là. Contente de t'avoir retrouvée pour ces derniers mois de thèse. Et cette fois c'est à mon tour. Je te souhaite plein de bonnes choses à Angers et sous le soleil de Montpellier.

Mathilde, tu as rendu ces heures passées en L2, L1, à l'animalerie etc… beaucoup plus agréables à vivre. Merci pour le soutien que tu m'as apporté. Bon courage pour ton post-doc en Angleterre.

Un grand Merci aussi à tous ceux qui ont participé à rendre cette thèse aussi agréable Séverine, merci pour ces moments passés à « refaire le monde ». Je te souhaite de réussir à trouver ta route, Emilie, j'ai enfin trouvé quelqu'un qui pouvait aimer la danse autant que moi, Gaëtan le seul capable de m'oublier pour aller manger au RU, Nolwenn, la fille qui court plus vite que son ombre, Maud G. la seule avec qui j'ai pu avoir des discussions modes dignes de ce nom, Stéphanie, Jérôme C., Edith, Olivier, Guillaume et Maud P., Anne-Claire, Pauline, Elodie, Nicolas, Leïla, Samüli, Camille, Sidonie, Nathalie, Frank et Céline, Kien, Thanh, Trinh, Kaies, Catherine Chapon, Livia, Elisa, Thomas, en espérant n'oublier personne.

Merci à Marie M, Mathilde, Florian, Jérôme et Guillaume pour mon futur cancer du poumon.

Enfin je souhaite adresser de grands remerciements :

A Michaël et Sarah pour m'avoir soutenue à distance.

A Maria pour avoir été ma confidente de tous les instants.

A mes parents, Mimi et Olympe, pour le soutien sans faille que vous m'avez apporté pendant toutes ces années. Sans vous quatre, je n'en serais sûrement pas là.

A mon mari William, ça n'a pas été de tout repos de faire nos thèses en même temps, mais tu as réussi à me supporter et tu as toujours répondu présent quand j'en ai eu besoin. Merci pour ta patience et tes bons petits plats.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS **3**

SOMMAIRE **9**

ABBREVIATIONS **13**

INTRODUCTION **17**

I. Le glioblastome **20**

II. Les cellules souches cancéreuses **23**

1. Concept des cellules souches cancéreuses 23
2. Les cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes 28
3. AC133, marqueur de cellules souches cancéreuses 32

III. La protéine CD133 ..... **43**

1. Découverte de Prominine-1 43
2. Structure 44
3. Localisation de la prominine-1 / CD133 dans des protrusions membranaires et microdomaines spécifiques de la membrane plasmique. 47
4. AC133 marqueur de cellules épithéliales indifférenciés 53
5. Fonction de la Prominine-1 54
6. Régulation de la prominine-1 et d'AC133 56

IV. Thérapies ciblées contre les glioblastomes et les cellules souches cancéreuses **59**

1. Thérapies ciblées contre les glioblastomes non vectorisée 61
2. Routage ciblé d'agents anticancéreux. 65
3. Ciblage des cellules souches cancéreuses 74

RESULTATS **77**

I. L'exposition de cellules de glioblastomes humains à une pression en oxygène non physiologique modifie leur expansion *in vitro* et leur aggréssivité *in vivo* au regard de l'expression d'AC133. ..... **79**

II. Développement et caractérisation d'immono-nanocarriers ciblant le marqueur de cellules souches cancéreuses AC133 ..... **113**

III. L’importance du marqueur de cellules souches CD133 dans l’internalisation de transferrine et le métabolisme du fer dans les cellules de cancer du colon Caco-2. 145

DISCUSSION GENERALE 177

I. Glioblastomes et thérapies ciblées..... 178

II. Une fonction pour la protéine CD133..... 180

III. Pertinence d’utilisation d’AC133 comme marqueur pour cibler les CSCs. 184

IV. Perspectives : Encapsuler un agent sensibilisant ou mortel pour les CSCs..... 186

REFERENCES 191

ABBREVIATIONS

^{188}Re : ^{188}Rhenium

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ATP : adénosine triphosphate

Bcl-2 : B-cell lymhoma 2

Bcl-XL : B-cell lymhoma XL

BCNU : bis-chloroethyle nitrosourée BMP : bone morphogenic protein

bFGF : basic fibroblastic growth factor (FGF-2)

BHE : barrière hémato-encéphalique

CD : cluster de différenciation

CED : convection enhanced delivery

CSC : cellules souches cancéreuses

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSN : cellules souches neurales

DIG : detergent-insoluble glycolipid-enriched domains

DMT1 : divalent metal transporter 1

EGF: epithelial growth factor

EGFR: epithelial growth factor receptor

EPR :enhanced retention permeability

Fe-NTA : ferric nitrilotriacetic acid

FDA : food and drugs administration

FGF-2 : fibroblastic growth factor 2 (bFGF)

GFAP: Glial fibrillary acidic protein IAPs : inhibitory apoptosis family

GPI : glycosyl phosphatidylinositol

IAP : inhibitory apoptosis family

IGF-1 : insulin growth factor

IRE : iron responsive element

IRP : iron responsive protein

HIF : Hypoxia inducible factor

HRE : hypoxia responsive element

MDR : multi drug resistance

MGMT : O6-methylguanine-DNA methyltransférase

MMAF : monométhyl auristatine F MMP-2 : métalloprotéinase-2

mTOR : mamalian target of rapamicyn ou la voie

NCLs nanocapsules lipidiques

ODD : oxygen-dependent degradation

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PDGF platelet-dérived growth factor PEG : poly(ethylene glycol)

PDPH : 3-(2-Pyridyldithio)propionyl hydrazide

Pgp : P-glycoprotéine

PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase

PIP2 en PIP3 : phophatidylinositol

PLAP placental alkaline phosphatase

pO2 : pression en oxygène RTK : receptor tyrosine kinase

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

SNC : système nerveux central

SP : side population

TGF-α : transforming growth factor α

UPR : unfolded protein response

UTR : untranslated region

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

VHL : von Hippel-Lindau

INTRODUCTION

PREAMBULE

Les glioblastomes sont des tumeurs primitives du système nerveux central (SNC) au pronostic défavorable. L'échec des thérapies actuelles est notamment lié à la résistance des cellules tumorales aux traitements combinée à sensibilité du tissu sain et à l'isolement du système nerveux central (SNC) du reste de l'organisme par la barrière hémato-encéphalique (BHE) ; le caractère infiltrant de ces tumeurs ayant également pour conséquence des récidives locales importantes. La mise en évidence récente de cellules initiatrices de cancer au sein de ces tumeurs, et l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) viennent étayer la présomption que l'échec des stratégies anti-tumorales classiques puisse être attribué à un problème de cible cellulaire (Singh *et al.* 2003; Singh *et al.* 2004).

En effet, ces CSCs, à l'instar des cellules souches classiques ont un potentiel de division illimitée et une vitesse de prolifération très faible. Elles sont également radio- (Bao et al. 2006) et chimio-résistantes ((Bao *et al.* 2006; Blazek *et al.* 2007) aux traitements usuels visant principalement les cellules cancéreuses classiques dites « non souches », en raison notamment d'une réparation accrue de l'ADN, de la surexpression des pompes d'efflux et de l'action de molécules anti-apoptotiques. Le développement de nouvelles stratégies permettant d'éradiquer spécifiquement les CSCs est par conséquent une piste de recherche à explorer. Le choix de la cible utilisée pour atteindre les CSCs demeure important. Différents marqueurs de CSCs existent dont le plus référencé est AC133, un épitope glycosylé de la protéine CD133 (Singh *et al.* 2004). Toutefois, s'il est connu que CD133 est une glycoprotéine de membrane à 5 domaines transmembranaires (Yin *et al.* 1997; Corbeil *et al.* 1998) capable de se lier au cholestérol et localisée dans les protrusions membranaires et les rafts lipidiques (Roper *et al.* 2000), le sens de son expression n'a pas été clairement établi et sa fonction du point de vue moléculaire n'est pas connue. Des études montrent que l'expression d'AC133 est associée au phénotype de cellules souches dans les glioblastomes, à l'agressivité tumorale et à la résistance cellulaire à la radiothérapie et la chimiothérapie (Liu *et al.* 2006). En raison des caractéristiques des cellules AC133-positives et de l'accessibilité extracellulaire de CD133, le choix initial d'AC133 semble pertinent afin de développer un vecteur capable de reconnaitre spécifiquement les CSCs ou tout au moins de les atteindre.

En ce sens, l'émergence des nanotechnologies et des nanomédecines offre des perspectives intéressantes. Elles peuvent offrir de nouvelles opportunités pour la délivrance de principes actifs vers les CSCs et leur microenvironnement (ou niches), en vue d'une meilleure efficacité, spécificité et sécurité biologique (Peer *et al.* 2007). Par conséquent, le développement et l'évaluation de nanovecteurs d'agents anticancéreux, doués d'une activité particulière sur les CSCs dans les gliomes et capables de réaliser un ciblage adapté représentent un challenge majeur (Stupp and Hegi 2007).

L'objectif de cette thèse a été de contribuer à répondre à trois points majeurs concernant le marqueur de CSCs AC133 :

i) Que traduit l'expression de CD133 ? La régulation d'AC133 en réponse aux éléments constitutifs du micro-environnement et notamment à la pO_2 a été étudiée afin de comprendre si AC133 est un marqueur de cellules initiatrices de cancer, d'agressivité tumorale ou d'hypoxie ?

ii) Peut-on reconnaître AC133 à l'aide de nanovecteurs ? Ayant corroboré l'intérêt de reconnaître les cellules tumorales surexprimant AC133, le développement de nanovecteurs particulaires capables de cibler spécifiquement des cellules cancéreuses AC133-positives a été entrepris. La caractérisation physicochimique et l'évaluation biologique du comportement d'immunonanocapsules lipidiques sur des cellules cancéreuses exprimant AC133 à différents degrés ont été réalisées.

iii) Enfin, quel est le rôle fonctionnel de CD133/AC133 ? Au regard de la distribution subcellulaire de CD133/AC133, son implication dans les mécanismes d'endocytose a particulièrement été appréhendée.

I. Le glioblastome

Le cancer est une maladie caractérisée par la présence d'une tumeur maligne résultant de la multiplication anarchique et incontrôlée de cellules initialement saines de l'organisme alors transformées du fait de l'accumulation de modifications génétiques et/ou épigénétiques et de la corruption de l'environnement tissulaire. Ces modifications ou mutations engendrent l'activation d'oncogènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et/ou l'inactivation de gènes répresseurs de tumeurs, l'échappement à l'apoptose, l'autosuffisance en signaux de croissance et l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance (Hanahan and Weinberg 2000). La tumeur primaire ainsi développée peut évoluer vers la migration de cellules métastatiques vers d'autres organes pour donner des tumeurs secondaires.

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les tumeurs cérébrales représentent moins de 2% de la globalité des cancers (Chatel *et al.* 2005). Il existe différents type de tumeurs primaires du système nerveux central (SNC) selon leur origine cellulaire : parmi elles, les gliomes qui sont issus des cellules gliales. Les gliomes ont été classés en trois sous types : les oligodendrogliomes, les oligoastrocytomes, et les astrocytomes. Ils peuvent être distingués selon leur niveau d'agressivité du grade I au grade IV, l'astrocytome de grade IV encore appelé glioblastome étant le gliome au pronostic le plus dramatique.

Avec environ 5 cas / 100 000 habitants détectés chaque année en France, les gliomes ne présentent qu'une faible incidence dans la population. Cependant, la moyenne de survie après diagnostic estimée à douze mois, avec seulement 10% de patients survivants après deux ans, dans le cas du glioblastome, font de cette maladie un réel problème de santé publique.

Les glioblastomes sont des tumeurs infiltrantes, avec des populations cellulaires hétérogènes exprimant des marqueurs de lignages cellulaires et des marqueurs de cellules indifférenciées. Ce sont des tumeurs nécrotiques avec des zones hypoxiques, un fort pouvoir néo-angiogénique (capacité à former de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux existants) et présentant une instabilité génomique. La résection chirurgicale de la zone macroscopiquement saine ne suffit donc pas à éliminer toutes les cellules tumorales, conduisant à des récidives dans la grande majorité des cas, et une moyenne de survie de six mois (Ashby and Ryken 2006). L'association à la radiothérapie externe a démontré son efficacité pour augmenter la médiane de survie des patients. De plus une chimiothérapie adjuvante notamment avec le Témodal® (témozolomide) un agent alkylant de l'ADN, a permis d'allonger la durée de vie moyenne de 3 mois, ainsi que d'augmenter le nombre de

patients long survivants de 10% à 27% à deux ans (Stupp et al. 2005) **(Figure 1)**. Le mode d'action de ce principe actif est celui des agents alkylants permettant d'ajouter des groupements alkyles à des groupes électronégatifs comme la guanine de l'ADN, ce qui a pour issue finale de bloquer la réplication et d'entrainer la mort de la cellule cible (Friedman *et al.* 2000). Cependant les patients chez qui le gène de la MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) est surexprimé, ont été identifiés comme résistants au traitement par le Témodal® (Gonzaga *et al.* 1992; Karayan-Tapon *et al.* 2010).

.

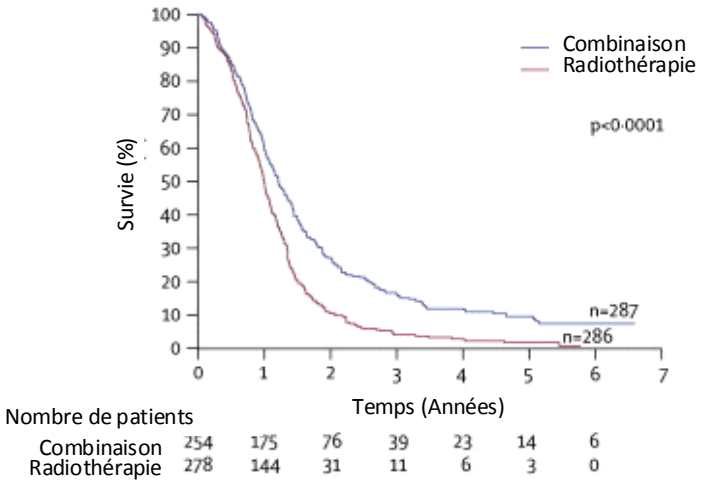


Figure 1: Courbe de survie de patients atteints de glioblastomes traités avec une radiothérapie ou une radiothérapie combinée au Témodal® d'après (Stupp *et al.* 2005)

Des stratégies ont été également développées n'utilisant pas l'administration systémique de médicaments. En effet, le Gliadel®, implant polymère biodégradable de carmustine ou BCNU (autre agent alkylant), peut être employé après résection chirurgicale de la tumeur. Les implants de Gliadel® sont alors placés dans la cavité de résection de la tumeur et la carmustine est libérée par diffusion au sein des tissus (Valtonen *et al.* 1997). Cependant, la faible distribution du principe actif au sein du parenchyme cérébral ne permet pas d'obtenir des résultats suffisants lorsque le Gliadel® est utilisé seul (Wang *et al.* 2002). L'association avec la radiothérapie et le témozolomide permet d'accroître la médiane de survie des patients (Menei *et al.* 2010).

L'émergence des thérapies ciblées fait naitre de nouvelles perspectives thérapeutiques. Il s'agit de traitements dirigés contre des cibles moléculaires spécifiques, impliquées dans les

mécanismes de tumorigenèse. Ils permettent de reconnaître spécifiquement une voie moléculaire impliquée dans l'agressivité, ou de délivrer un principe actif à une cible cellulaire précisément dépendante de cette voie. Ainsi, des traitements basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour bloquer ou activer une voie de signalisation spécifique ont été utilisés pour traiter de nombreux types de cancer. L'Avastin® (bevacizumab) est un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre le VEGF, dans le cadre d'une stratégie anti-angiogénique. Déjà utilisé dans les traitements de tumeurs solides tels que les cancers colorectaux, du sein, du poumon, du rein et des ovaires (Jubb and Harris 2010), l'Avastin® a reçu l'accord de la Food and drugs administration (FDA) en 2009 pour une utilisation dans le traitement du glioblastome seul ou associé à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie (Vredenburgh *et al.* 2007; Kreisl *et al.* 2009; Lai *et al.* 2011).

Cependant aucune de ces thérapies ne conduit à la rémission totale des patients. De nombreux facteurs conduisent à l'échec des traitements contre les glioblastomes. Différents facteurs physiques s'ajoutent au caractère infiltrant de ces tumeurs pour expliquer l'échec des thérapies (Grossman and Batara 2004) : la fragilité du tissu cérébral sain, qui est le siège de notre conscience, l'isolement du système nerveux central par la barrière hémato-encéphalique (BHE), imperméable à la majorité des agents anti-cancéreux, qui conduit à une délivrance non optimale des molécules thérapeutiques, ainsi que l'hétérogénéité des cellules composant la masse tumorale.

De plus, les glioblastomes présentent des mécanismes de résistance multiples aux traitements tels que l'efflux des principes actifs à l'extérieur des cellules tumorales via les pompes d'efflux ATP-dépendantes, l'augmentation des mécanismes de réparation de l'ADN et l'inhibition des mécanismes d'apoptose et de régulation du cycle cellulaire (Bredel 2001).

Les approches classiques du traitement du glioblastome semblent donc entraînées dans une impasse thérapeutique. Il est par conséquent indispensable de développer de nouvelles stratégies innovantes dans le but immédiat d'améliorer la survie des patients atteints de glioblastome, mais aussi de mieux appréhender les mécanismes de développement de ces cancers en s'attachant à traiter des symptômes mais aussi à en éliminer les causes. Dans ce contexte, les cellules souches cancéreuses ou initiatrices de cancers sont de nouvelles cibles à étudier.

II. Les cellules souches cancéreuses

1. Concept des cellules souches cancéreuses

1.1. Les cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, essentielles pendant le développement pour la formation des tissus (*e.g.* cellule œuf totipotente, cellules souches embryonnaires pluripotentes). Il a été également mis en évidence que des stocks de cellules souches sont conservés dans les tissus adultes grâce à leur potentiel de prolifération lent et illimité. Ces cellules sont caractérisées par deux grandes propriétés : l'autorenouvellement et la différenciation. Selon les signaux exogènes qu'elles reçoivent, ces cellules sont soit maintenues dans le compartiment souche par division symétrique, elles se renouvellent ainsi à l'identique (autorenouvellement), soit capables de se diviser par division asymétrique conduisant à deux cellules filles différentes : une cellule souche et un progéniteur précoce. Ce progéniteur, qui a la capacité de se diviser rapidement mais de façon limitée, va ensuite être recruté pour s'engager dans une voie de différenciation, pour donner des cellules matures et fonctionnelles. A partir d'un type de cellules souches adultes multipotentes, il est possible d'obtenir plusieurs types de cellules spécialisées au sein de l'organe dont elles sont issues. Par exemple une cellule souche neurale (CSN) du SNC peut donner naissance à toutes les cellules neurales du SNC (neurones, astrocytes, oligodendrocytes). Ces cellules sont donc importantes dans les mécanismes de morphogénèse, de renouvellement, de réparation et de régénération des tissus (Potten and Loeffler 1990). Par ailleurs, des possibilités de « transdifférenciation », ou d'acquisition d'un phénotype distinct de la voie établie ou en dehors du tissu d'origine, sont encore possibles et des cellules d'origine mésodermique, comme par exemple les cellules souches mésenchymateuses sont capables, sous l'effet de facteurs bien déterminés de produire également des cellules du SNC (Hermann *et al.* 2006), démontrant à la fois les potentialités mais également la complexité du comportement des cellules souches de manière générale.

1.2. L'Hypothèse des cellules souches cancéreuses

Le concept des cellules souches cancéreuses a été émis dès les années 1970, suggérant que les cellules de la masse tumorale qui se divisent rapidement et qui ont un pouvoir prolifératif défini ne peuvent pas conduire seules au développement et à l'hétérogénéité phénotypique d'un cancer, mais que son maintien serait assuré par une population de cellules souches au sein de la maladie. Les premières preuves de l'existence de ces cellules ont été faites grâce à la culture de tumeurs primaires humaines, démontrant les capacités clonogéniques d'un faible pourcentage.

A la suite de ces résultats, deux théories ont été émises **(Figure 2)** : soit toutes les sous-populations tumorales ont la capacité de proliférer et de former de nouvelles tumeurs **(Figure 2a)**, soit une seule sous-population en est capable **(Figure 2b)**.

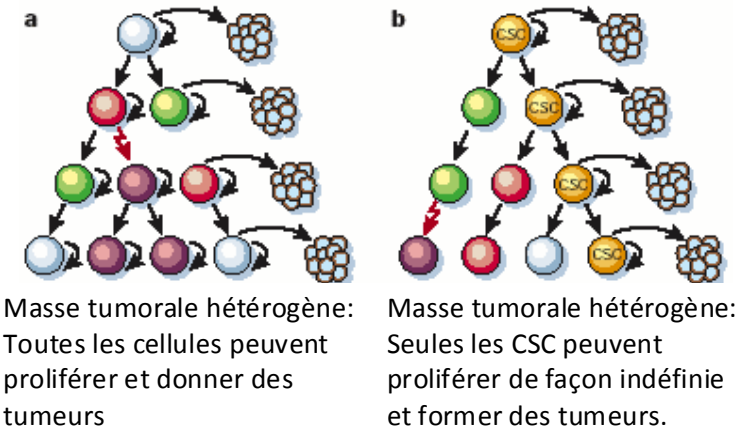


Figure 2 : Deux hypothèses concernant les cellules à l'origine de la formation des tumeurs d'après (Reya *et al.* 2001).

L'utilisation de marqueurs de cellules souches pour trier les population de cellules tumorales issues de leucémies myéloïdes aigües a permis de mettre en évidence une sous-population de cellules CD34+ / CD38- qui présentent les caractéristiques que n'ont pas les autres cellules. En effet, les cellules de leucémies CD34+ / CD38- possèdent la capacité unique d'initier des tumeurs (Lapidot *et al.* 1994), ainsi que de s'autorenouveller de proliférer et de se différencier pour donner des cellules exprimant des marqueurs de surface typique de la tumeur d'origine (Bonnet and Dick 1997).

Après la mise en évidence des CSCs dans les leucémies, c'est dans les tumeurs mammaires que les premières CSCs de tumeurs solides ont été identifiées. Pour démontrer

qu'une sous population de cellules tumorales a des propriétés souches, les cellules ont été sélectionnées via l'expression de la protéine CD44, glycoprotéine impliquée dans les phénomènes d'adhésion et de migration, et la non expression du marqueur CD24. Puis des CSCs ont été isolées dans un grand nombre de tumeurs solides **(Tableau 1)**.

Type de tumeur	origine cellulaire	Type d'isolement	références
sein	tumeur I + II	ESA + CD44+ CD24-	(Al-Hajj *et al.* 2003)
cerveau	tumeur I	neurosphères	(Hemmati *et al.* 2003)
	tumeur I	neurosphères	(Singh *et al.* 2003; Singh *et al.* 2004)
		CD133	
ovaires	tumeur I	clones mortel ou immortel	(Bapat *et al.* 2005)
	tumeur I	CD44	(Alvero *et al.* 2009)
prostate	tumeur I	CD44+ $\alpha 2\beta 1$hi CD133+	(Alvero *et al.* 2009)
colon	tumeur I et II	CD133	(O'Brien *et al.* 2007)
	tumeur I	CD133	(Ricci-Vitiani *et al.* 2007)
pancréas	lignées	CD133	(Hermann *et al.* 2007)
		CD133 CXCR4	
poumon	lignées	SP	(Ho *et al.* 2007)
	tumeur I		
	tumeur I	CD133	(Eramo *et al.* 2008)
		sphères	
foie	lignées + tumeur I	CD133	(Ma *et al.* 2007)
estomac	lignée	SP	(Fukuda *et al.* 2009)
	tumeur I		
	lignées	CD44	(Takaishi *et al.* 2009)
		CD133 CD24 CD166 SSEA-1 et 4 SP	

Tableau 1 : Cellules souches identifiées dans les tumeurs solides et marqueurs de surfaces associés. Tumeur I : tumeur d'origine, Tumeur II : métastases ou récidives.

L'origine exacte de ces CSCs n'a pas été clairement établie **(Figure 3)**. Des altérations génétiques pourraient se produire durant les différents stades de maturation des cellules souches classiques, conduisant à leur mutation ou à la dédifférenciation de différents précurseurs vers des cellules souches néoplasiques. Ces cellules seraient par la suite capables d'être « recrutées » et de se pseudo-différencier afin de donner une masse tumorale hétérogène avec expression anarchique de marqueurs de lignage cellulaire (Reya *et al.* 2001). En effet, il a été mis en évidence chez la souris que des cellules souches neurales ou des progéniteurs neuraux mutés peuvent être à l'origine de la formation de gliomes. la stimulation autocrine par le PDGF dans des astrocytes humains par surexpression du récepteur au PDGF induit une dédifférenciation des astrocytes et induit des oligodendrogliomes (Dai *et al.* 2001). De plus il a été mis en évidence dans des modèles murins que la suppression des gènes PTEN et p53 dans des cellules souches neurales conduit à la formation de glioblastomes (Jacques *et al.* 2010). Ainsi les clones néoplasiques obtenus seraient responsables de l'hétérogénéité cellulaire et d'une hiérarchisation évolutive au sein de la tumeur.

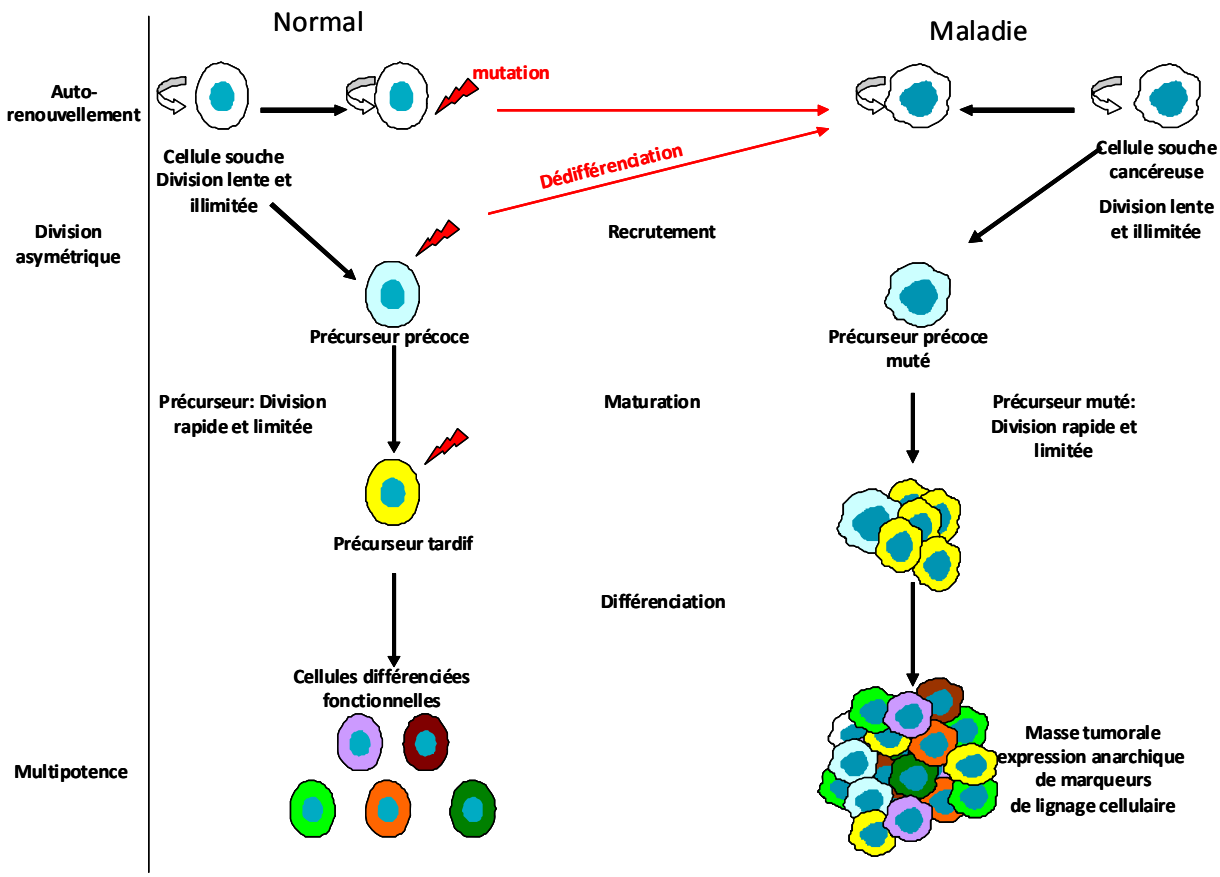


Figure 3 : Hypothèse concernant l'apparition des cellules souches cancéreuses.
L'origine des CSCs est mal connue. Des mutations pourraient se produire au niveau des cellules souches ou cellules précurseurs, conduisant au phénotype de cellules souches cancéreuses ayant des propriétés des cellules souches classiques.

2. Les cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes

2.1. Les marqueurs de CSCs dans les glioblastomes

A ce jour aucun marqueur spécifique de CSCs n'a été identifié. Cependant l'utilisation de marqueurs de CSN a permis également de reconnaitre des CSCs dans les glioblastomes. A défaut de marqueurs « spécifiques », on distingue donc des marqueurs « associés » aux CSCs :

AC133 est un épitope glycosylé de la protéine CD133, une glycoprotéine transmembranaire marqueur de cellules souches et notamment des CSNs (Miraglia *et al.*

1997; Yin *et al.* 1997; Uchida *et al.* 2000). L'expression d'AC133 est perdue au cours de la différenciation au contraire de la protéine CD133 (Kemper *et al.* 2010)

CD15 un antigène glucidique fortement exprimé à la surface de cellules souches pluripotentes (Capela and Temple 2002).

Les cellules SP (side population) (Kondo *et al.* 2004; Bleau *et al.* 2009). L'incubation avec la sonde fluorescente Hoechst 33342 qui se fixe aux régions de l'ADN riches en A-T et est couramment utilisé comme marqueur de cellules souches (Goodell *et al.* 1996).

2.2. Identification de cellules aux « propriétés souches » dans les glioblastomes

Les cellules sont caractérisées par des propriétés spécifiques : Elles ont à la fois la capacité de se diviser à l'identique pour s'autorenouveller et de se différencier selon les signaux qu'elles reçoivent **(Figure 4).**

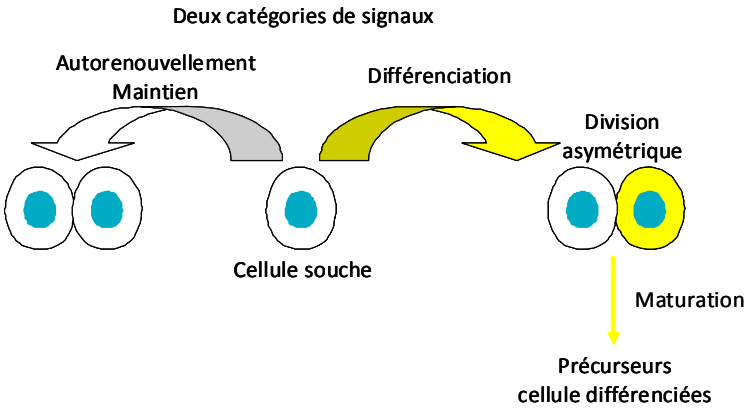


Figure 4: Schéma représentant les propriétés spécifiques des cellules souches

- **Capacité d'autorenouvellement**

Les cellules souches cancéreuses dans les tumeurs cérébrales ont été identifiées par des études réalisées par plusieurs équipes dans des tumeurs cérébrales pédiatriques (Hemmati *et al.* 2003; Singh *et al.* 2003) puis dans des glioblastomes (Galli *et al.* 2004; Kondo *et al.* 2004; Yuan *et al.* 2004; Mao *et al.* 2009) chez le rat ou chez l'humain et utilisant les

différents marqueurs cités ci-dessus. Ces études ont démontré la capacité d'une minorité de cellules issues de tumeurs cérébrales primaires (médulloblastomes, astrocytomes glioblastomes), à former des sphères appelées tumorosphères par analogie aux neurosphères obtenues à partir des CSNs par dilution clonale et culture dans un milieu favorisant le maintien des propriétés souches. Ce milieu est dépourvu de facteurs de différenciation et donc de sérum. Il est complémenté avec de l'EGF (epithelial growth factor) et du bFGF (basic fibroblastic growth factor) (Reynolds and Weiss 1992), facteurs de croissance favorisant la prolifération de cellules souches. Les propriétés d'autorenouvellement de ces cellules ont été démontrées par leur capacité à reformer des sphères après dissociation des tumorosphères et repiquage en série. L'autorenouvellement a été également mis en évidence *in vivo*. Les tumorosphères sont dissociées puis réinjectées chez l'animal. Il a été mis en évidence que lors des transplantations en séries, c'est-à-dire prélèvement de la tumeur, dissociation des cellules et réimplantation consécutives, ces cellules sont toujours capables de donner naissance à de nouvelles tumeurs.

- **Capacité de différenciation**

Les tumeurs solides sont en général constituées de populations cellulaires très hétérogènes. Ces cellules peuvent être identifiées avec des marqueurs correspondant notamment aux différents lignages neuraux. Ainsi, il a été mis en évidence que des tumorosphères exprimaient à leur surface des marqueurs associés aux cellules souches neurales, tels que la Nestine, AC133, Musashi-1, Sox2, Melk, PSP, et Bmi-1 (Hemmati *et al.* 2003; Singh *et al.* 2003; Mao *et al.* 2009). Ces cellules présentent également des propriétés de différenciation après culture en sérum, perdant les marqueurs du « compartiment souche » au profit de marqueurs de différenciation tels que la GFAP (Glial fibrillary acidic protein) classiquement exprimée par les astrocytes, la βIII-tubuline exprimée par les neurones et les Galactocérébroside-C et PDGFR-α marqueurs d'oligodendrocytes. Bien qu'elles expriment des protéines spécifiques de lignages neuraux témoignant d'une différenciation, ces cellules tumorales ne sont pas fonctionnelles dans le sens qu'elles n'exercent ni la fonction astocytaire, ni la fonction neuronale ou oligodendrocytaire.

In vivo, lorsque les CSCs sont implantées, elles sont capables de donner à nouveau des tumeurs hétérogènes. Les tumeurs obtenues sont phénotypiquement semblables à la tumeur

dont elles sont originaires, avec un pourcentage équivalent de cellules capables de donner des sphères et des marqueurs de différenciations similaires.

Ces résultats montrent que comme dans les mécanismes de neurogenèse, il existerait dans les glioblastomes des cellules appelées cellules souches cancéreuses qui présentent des propriétés d'autorenouvellement et de différenciation, pouvant être à l'origine d'un mécanisme dynamique de tumorigenèse.

- **Les cellules souches cancéreuses initiatrices de tumeurs**

Afin de déterminer si les CSCs ont un rôle dans les mécanismes d'initiation des tumeurs, des xénogreffes orthotopiques de CSCs isolées de tumeurs cérébrales ont été réalisées dans des souris immunodéprimées.

Après avoir été isolées, les cellules souches cancéreuses ont été implantées chez l'animal et la croissance tumorale a été comparée aux cellules tumorales dites non souches ou aux CSNs (Galli *et al.* 2004; Kondo *et al.* 2004; Singh *et al.* 2004; Yuan *et al.* 2004; Bao *et al.* 2006; Mao *et al.* 2009). Les CSCs triées par tri magnétique ou des lignées de CSCs ont été utilisées. Ces études mettent en évidence que ces CSCs possèdent des propriétés uniques de tumorigénicité. En effet, lorsque l'on injecte une dose de CSCs de 100 cellules AC133-positives chez l'animal dans les cas de l'étude de Singh et al, elles sont capables de redonner des tumeurs 14 semaines après injection chez l'animal. Au contraire des animaux injectés avec une dose pouvant aller jusqu'à 100 000 cellules tumorales dites non souches (Singh *et al.* 2004) ou 200 000 CSNs fœtales (Galli *et al.* 2004) ne présentent pas de tumeurs après analyse histologique. Ces cellules possèderaient donc des caractéristiques uniques d'initiations de tumeurs. Il a donc été émis l'hypothèse que les CSCs seraient à l'origine des tumeurs.

Ces études démontrent ainsi l'existence d'une petite population de cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes, capables de façon unique d'engendrer une tumeur qui reproduit l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur d'origine après xénogreffe. En plus de leur capacité à initier des tumeurs, il est intéressant d'étudier l'importance que peuvent avoir ces CSCs dans les mécanismes actuels de résistances aux traitements anti-glioblastomes.

3. AC133, marqueur de cellules souches cancéreuses

3.1. Différentes sortes de cellules souches cancéreuses

Parmi les différents marqueurs possibles pour isoler les CSCs à partir de glioblastomes, AC133 a été le plus référencé. Cependant, ce marqueur, qui n'est pas spécifique aux CSCs, montre ses limites dans leur identification. Sur l'ensemble des glioblastomes, tous n'expriment pas l'épitope glycosylé AC133 bien que la protéine soit le plus souvent présente à la surface de la membrane plasmique cellulaire (Kemper *et al.* 2010). La tumorigénicité des cellules issues de tumeurs exprimant, ou non, AC133 a ensuite été analysée après xénogreffe orthotopique chez la souris immunodéprimée, Comme il a déjà été démontré, à partir d'une tumeur exprimant AC133, les cellules AC133-positives conduisent à une tumeur alors que les cellules AC133-négatives ne sont pas tumorigènes. Mais une étude a montré qu'il est possible d'isoler des CSCs issues des tumeurs n'exprimant pas AC133 qui peuvent former des tumeurs. Néanmoins, les tumeurs obtenues à partir de CSCs AC133-négatives ont un pouvoir prolifératif plus faible que les tumeurs issues de CSCs AC133-positives (Beier et al. 2007).

Cette étude indique qu'AC133 ne permet pas à lui seul d'identifier toutes les CSCs des glioblastomes. En revanche, les propriétés de résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie des cellules AC133-positives dans les glioblastomes font d'AC133 une cible intéressante dans le cadre d'une thérapie afin d'améliorer la sensibilité des glioblastomes aux traitements.

3.2. Propriétés des cellules AC133 positives

En comparaison des cellules AC133-négatives, les cellules AC133-positives issues de glioblastomes humains, présenteraient des propriétés accrues de résistances aux traitements. Diverses études suggèrent effectivement qu'en plus de leur potentiel d'initiation de tumeur, les cellules souches cancéreuses AC133-positives seraient, de manière exacerbée par rapport aux autres cellules de la masse tumorale, résistantes aux traitements par chimio et radiothérapeutiqes classiques. Elles seraient donc un facteur important de l'initiation de récidives et de l'échec des thérapies anti-glioblastomes.

Des études de sensibilité aux radiations ionisantes et à certains anticancéreux ont été réalisées sur des cellules isolées de glioblastomes exprimant AC133 en comparaison avec des cellules qui ne l'expriment pas. Les cellules ont été exposées à des radiations ionisantes ou incubées avec diverses catégories ou d'agents chimiothérapeutiques tels que :

-le témozolomide, le BCNU (bis-chloroethyle nitrosourée), le carboplatine, le cisplatine, ou le cholorambucil, des agents alkylants entrainant des modifications chimiques de l'ADN

-le tamoxifène, un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes.

-le paclitaxel, un poison des fuseaux mitotiques.

Les différents essais montrent que l'exposition aux radiations ionisantes de cellules de glioblastomes conduit à un enrichissement de la population AC133-positives (Bao *et al.* 2006; Blazek *et al.* 2007). De plus, ces cellules présentent une sensibilité plus faible aux agents anti-cancéreux comparées aux cellules AC133-négatives (Liu *et al.* 2006; Gal *et al.* 2007), caractérisée par une IC50 plus élevée des principes actifs quelque soit leur mode d'action (Shervington and Lu 2008).

Afin de comprendre les mécanismes qui conduisent à une résistance plus élevée, des comparaisons ont été menées sur les cellules AC133-positives et négatives concernant les gènes impliqués dans les mécanismes de résistances du glioblastomes. En réponse aux radiations, les cellules AC133-positives surexpriment des protéines impliquées dans les mécanismes liés aux dommages à l'ADN. La surexpression des checkpoint kinases 1 et 2 (Bao *et al.* 2006), et de Bmi-1 (Facchino *et al.* 2010) impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, entrainent un arrêt de celui-ci, qui permet aux cellules d'activer le processus de réparation à l'ADN. Par conséquent, l'activation de l'apoptose par reconnaissance des dégradations à l'ADN est contournée, permettant la survie de ces cellules. Les protéines Bcl-2, Bcl-XL, FLIP ainsi que la famille des IAPs (inhibitory apoptosis family) (Liu *et al.* 2006; Shervington and Lu 2008; Zobalova *et al.* 2008) impliquées dans l'inhibition de l'apoptose sont également surexprimées dans les cellules AC133 positives.

De plus, il a été montré que les cellules AC133-positives surexpriment des gènes tels que BCRP-1, gène de la famille des transporteurs ABC impliqués dans l'efflux des principes actifs et contribuant à leur capacité de résistance (Liu et al. 2006; Shervington and Lu 2008). De même, l'expression de la MGMT est impliquée dans les mécanismes de résistance au

témozolomide (Liu et al. 2006; Pistollato et al. 2010). En effet, l'avancée la plus récente en matière de traitement du glioblastome a été l'utilisation du Témodal® (témozolomide) en traitement adjuvant de la radiothérapie permettant d'augmenter la médiane de survie des patients atteints de gliblastome jusqu'à 15 mois (Stupp et al. 2009).

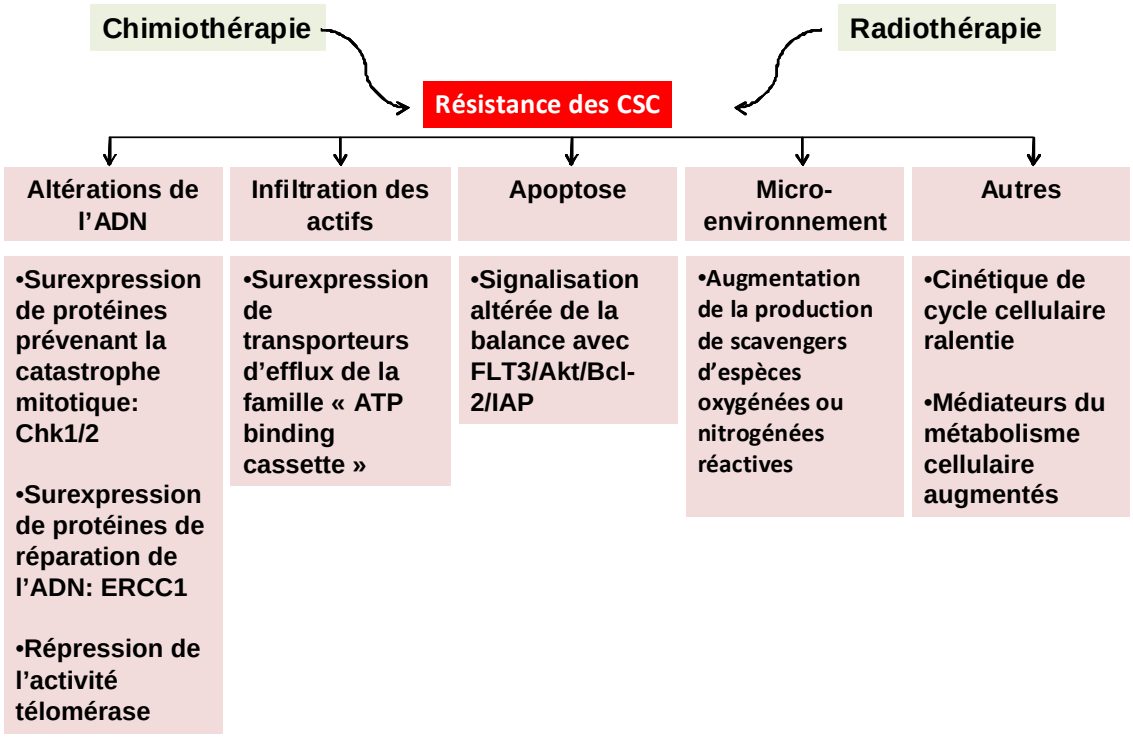


Figure 5 : Mécanismes impliqués dans les processus de résistance des CSCs aux thérapies d'après (Morrison *et al.* 2011)

Les cellules souches cancéreuses démontrent des propriétés intrinsèques de résistance à la chimio et la radiothérapie par la surexpression de protéines impliquées dans différents mécanismes **(Figure 5)**. Néanmoins, il devient évident que le microenvironnement tumoral participe également à favoriser ces mécanismes. A l'instar de la niche permettant le maintien des cellules souches neurales dans leur compartiment souche, un environnement particulier serait nécessaire à la conservation des caractéristiques souches par les CSCs, mais également pour leur permettre d'acquérir des phénotypes plus prolifératifs associés au processus de formation des tumeurs.

3.3. Régulation des cellules AC133-positives par le microenvironnement tumoral

- **Cellules souches et microenvironnement**

Chez le mammifère adulte, les cellules souches neurales du SNC sont principalement issues de deux régions: la zone subventriculaire latérale rostale et la zone subgranulaire de l'hippocampe ou gyrus denté (Temple 2001). Dans ces deux régions, les CSNs sont exposées à un microenvironnement particulier, encore appelé niche, qui fournit une structure nécessaire à la régulation des mécanismes conduisant à la quiescence, à la prolifération ou au recrutement des CSNs vers une voie de différenciation (Doetsch 2003; Scadden 2006). La niche possède à la fois un rôle dans l'ancrage physique, l'apport de facteurs nutritifs, de cytokines et chimiokines de façon paracrine ou endocrine nécessaires à leur maintien **(Figure 6)**. La constitution du microenvironnement est très complexe et fait intervenir différents constituants permettant de maintenir la balance de signaux nécessaires aux CNSs.

Elle est constituée de cellules somatiques telles que les cellules épendymaires, cellules gliales, oligodendrocytes, et de la matrice extracellulaire assurant une régulation paracrine des CSNs. Les cellules stromales sécrètent des facteurs de croissances régulant la prolifération comme le Notch, le FGF-2 ou l'EGF, ou des signaux contrôlant les mécanismes de différenciation comme les BMP, NOGGIN, IGF-1, TGF-α. Les interactions qui se créent entre les CSNs, les cellules de la niche et la matrice extracellulaire, contribuent également soit à la rétention des CSNs dans leur niche soit à leur départ de cet environnement et recrutement vers de nouveaux phénotypes. La matrice extracellulaire est formée notamment de Tenascine C, d'héparan sulfates, de protéoglycans et de collagène. Elle permet une rétention et une modulation de la biodisponibilité et de l'activité des facteurs de croissance et des cytokines. En effet, en dehors de signaux propres souvent engagés au travers de récepteurs intégrines, les molécules de la matrice extracellulaire, dont les héparanes sulfates, sont capables de fixer des molécules morphogènes ou mitogènes comme les BMP-2 et BMP-4, Shh ou Wnt permettant de créer un réservoir à proximité des cellules souches. De plus, la dégradation de la matrice extra cellulaire peut conduire à la libération de ligands destinés à moduler le comportement des CSNs.

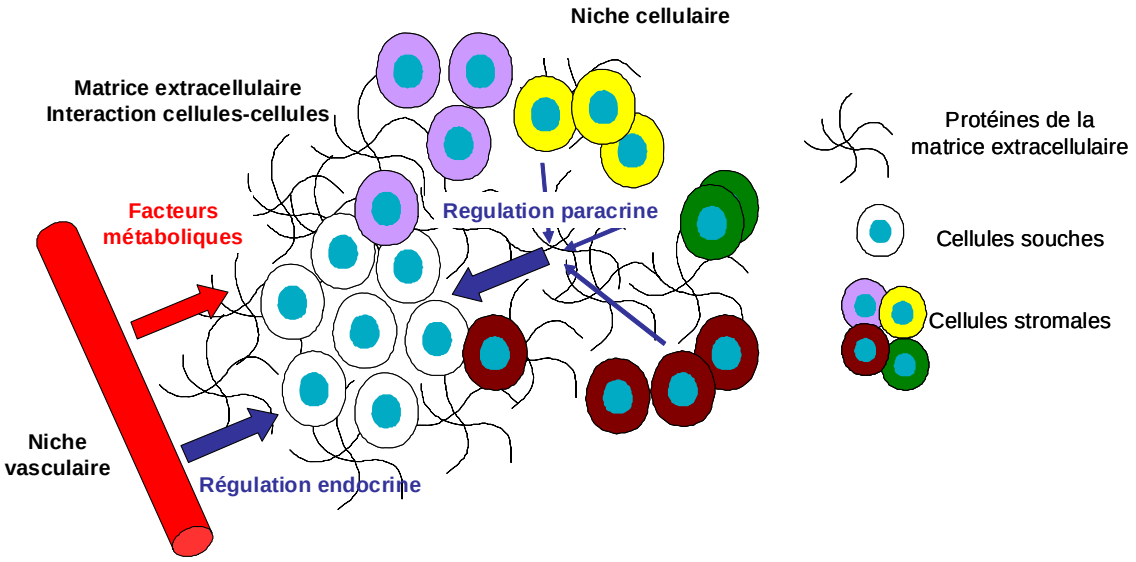


Figure 6 : Régulation des cellules souches neurales par le microenvironnement. *Les cellules souches neurales sont maintenues dans leur niche, composée de cellules stromales qui produisent des facteurs de croissance et interagissent avec les CSNs. La matrice extra cellulaire et la niche vasculaire contribuent également à la régulation de l'autorenouvellement, la prolifération et la différenciation des CSNs.*

En plus de la régulation par les cellules de la niche et la matrice extracellulaire, la niche vasculaire joue un rôle important dans la régénération et la prolifération des CSNs (Palmer *et al.* 2000; Louissaint *et al.* 2002; Tavazoie *et al.* 2008). En effet, il a été montré que les CSNs sont étroitement liées aux vaisseaux dans la zone sous-ventriculaire et que les mécanismes de neurogenèse se produisent dans des régions de la zone sous-ventriculaire fortement vascularisées. (Palmer *et al.* 2000; Shen *et al.* 2008; Tavazoie *et al.* 2008). Les cellules endothéliales produisent de la laminine permettant une adhérence des CSNs via le récepteur intégrine α6β1 (Shen *et al.* 2008). Le sang permet d'apporter des facteurs nutritifs et des signaux nécessaires aux CNSs, contribuant à une régulation non plus paracrine, mais endocrine. De plus, les cellules endothéliales, les cellules périvasculaires et la lame basale contribuent également à la délivrance de signaux régulant les CSNs. Les signaux protéiques ne sont cependant pas les seuls signaux contribuant à la modulation de la réponse des CSNs. L'oxygène apporté par les vaisseaux sanguins aurait un rôle prépondérant dans les

mécanismes liés à la prolifération et la différenciation des CSNs (Morrison *et al.* 2000; Studer *et al.* 2000; Kee *et al.* 2001; Yagita *et al.* 2001; Pistollato *et al.* 2007).

La niche joue donc un rôle prépondérant dans la régulation des CSNs. On peut donc penser que dans les glioblastomes les CSCs seraient soumises également à un microenvironnement spécifique contribuant à leur maintien au sein de la tumeur et/ou dans la zone macroscopiquement saine après résection de la tumeur. Une corruption de la niche, pourrait être à l'origine de la dérégulation de la balance de signaux conduisant à la prolifération incontrôlée des cellules souches pouvant aboutir à la tumeur. En effet un modèle de souris transgénique surexprimant l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, une protéine membranaire capable de lier la laminine présente une modification de sa localisation de la couche basale à la couche suprabasale de l'épiderme. Cette relocalisation conduit à une sensibilité accrue des kératinocytes aux agents chimio-sensibilisant et au développement plus fréquent de papillomes, de carcinomes et de métastases chimio-induits (Owens et al. 2003). Aussi, des interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire pourraient également contribuer au développement de tumeurs par des cellules qui, prises indépendemment ne seraient pas tumorigènes (Garcion et al. 2009). Ainsi, il a été montré, en utilisant des modèles de xénogreffe de cellules humaines, qu'une co-injection de « cancer associated fibroblasts » avec des cellules épithéliales non tumorigènes induisait une transformation maligne permanente des cellules épithéliales non tumorigènes (Olumi *et al.* 1999; Hayward *et al.* 2001). Enfin, les CSCs de glioblastome pourraient contribuer à la genèse de leur propre niche vasculaire puisqu'il a été démontré qu'elles sont capables de se « transdifférencier » en cellules endothéliales (Ricci-Vitiani *et al.* 2010).

- **Microenvironnement tumoral et hypoxie dans les glioblastomes**

Les glioblastomes sont des tumeurs caractérisées par la présence de zones nécrotiques et hypoxiquess ainsi que par une forte vascularisation anarchique identifiable par la prolifération des cellules vasculo-endothéliales, conduisant à la formation de vaisseaux ayant une structure irrégulière et incomplète. L'hypoxie joue un rôle non négligeable dans le développement des glioblastomes. Des études montrent que la présence de zones hypoxiques corrélée positivement avec l'agressivité tumorale dans les tumeurs cérébrales humaines (Evans *et al.* 2004) et contribue à la croissance tumorale (Panchision 2009). Ainsi, la tumeur

peut se développer dans des conditions de faible disponibilité en oxygène avec un faible apport en nutriment en raison d'une mauvaise vascularisation et d'une prolifération cellulaire élevée (Fujiwara *et al.* 2007).

La réponse à la pression en oxygène (pO_2) est essentielle pour assurer la survie de la cellule face aux variations physiologiques et pathologiques du microenvironnement. Le manque d'oxygène peut être transmis au milieu intra cellulaire par les espèces oxygènes réactives (ROS), le changement d'état des molécules thiolées et les canaux ioniques, sensible à la concentration en O_2 (Lopez-Barneo *et al.* 2001). Ainsi différents effecteurs peuvent être activés pour initier la tanscription des gènes impliqués dans la réponse à l'oxygène. Différentes voies ont été identifiées telles que mTOR (mamalian target of rapamicyn) ou la voie UPR (unfolded protein response) (Wouters and Koritzinsky 2008) ou le co-activateur transcriptionnel PGC-1α (Arany *et al.* 2008). Mais la plus étudiée à ce jour est l'activation des protéines de la famille HIF (hypoxia inducible factor).

La famille des protéines HIF est à ce jour constituée de trois membres : HIF-1, HIF-2, et HIF-3. Les protéines HIF-1 et HIF-2 ont été décrites comme étant impliquées dans le développement tumoral des glioblastomes et seront les deux seules protéines HIF abordées par la suite.

Les protéines HIF sont des hétérodimères constitués d'une sous unité alpha cytosolique et une sous unité beta nucléaire toutes deux exprimées de façon constitutives. Cependant, les sous-unités HIF-1α et HIF-2α possèdent une demi-vie courte et sont dégradées rapidement selon un procédé régulé par le taux d'oxygène intracellulaire **(Figure 7)**. En condition de normoxie, la sous unité alpha est hydroxylée par les prolyl hydroxylases sur deux prolines situées dans l'ODD (oxygen-dependent degradation) (Huang *et al.* 1998). La sous-unité alpha hydroxylée est ensuite prise en charge par la protéine VHL (von Hippel-Lindau) conduisant à l'ubiquitination de la sous unité alpha et à sa dégradation par le protéasome (Ivan *et al.* 2001). Par conséquent, dans des conditions de normoxie, HIF-1α et HIF-2α ne sont pas détectables. Lorsque les cellules sont soumises à une diminution de la pression en oxygène, les prolyl hydroxylases sont inhibées ayant pour conséquence une stabilisation de l'expression de HIF-1α et HIF-2α dans le cytoplasme. Elles sont ensuite transloquées vers le noyau et s'hérétodimérisent avec la sous unité beta. L'hétérodimère obtenu devient ainsi un facteur de transcription actif. De par la présence d'une structure hélice-boucle-hélice, les protéines HIF reconnaissent des séquences consensus spécifiques

appelées HRE (hypoxia responsive element) présentes dans les gènes répondant à l'hypoxie (Wenger *et al.* 2005), permettant ainsi leur traduction en cas de faible concentration en oxygène. Les protéines HIFs régulent ainsi des gènes liés à l'angiogenèse, l'érythropoïèse, la survie et la prolifération cellulaire, l'apoptose, le métabolisme du glucose ou la régulation du pH (Carroll and Ashcroft 2005).

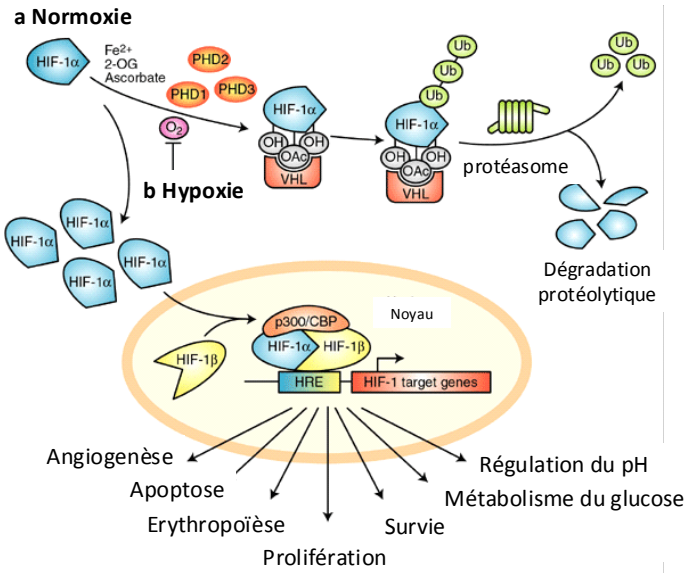


Figure7 : Schéma de régulation de la protéine HIF-1 d'après (Carroll and Ashcroft 2005)

Une surexpression de HIF-1α a été décrite dans les cancers humains et leurs métastases parmi eux les gliomes (Maxwell *et al.* 1997; Zhong *et al.* 1999). Une corrélation directe a été établie entre l'expression de HIF-1α et le grade du gliome (Zagzag *et al.* 2000). Des essais montrent que lorsque l'on inhibe l'expression de la protéine HIF-1α par des mécanismes d'ARN interférence, dans des cellules de glioblastomes, une diminution des capacités de migration des cellules tumorales *in vitro* (Fujiwara *et al.* 2007; Mendez *et al.* 2010), ainsi qu'un ralentissement de la croissance tumorale, lorsque les animaux portant un glioblastomes en sous cutané, sont traités par injection intra-tumorale de siRNA anti-HIF-1α (Gillespie *et al.* 2007). En effet, HIF-1 active des gènes dont l'expression est liée à l'agressivité tumorale tel que le VEGF, impliqué dans les mécanismes de néoangiogenèse (Jensen *et al.* 2006), ou les métalloprotéases, liées aux mécanismes de migration des cellules tumorales (Fujiwara *et al.* 2007; Mendez *et al.* 2010).

La niche étant un élément déterminant dans la régulation des cellules souches, les recherches se sont donc portées sur l'effet du microenvironnement tumoral et particulièrement de la pression partielle en oxygène sur le maintien et la prolifération des cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes.

- **Cellules souches cancéreuses, AC133 et microenvironnement**

L'angiogénèse étant une composante importante dans le glioblastome, des études se sont portées sur la relation qu'il pourrait y avoir entre ce phénomène et les CSCs. Ainsi, des dosages de VEGF ont été effectués après culture de cellules AC33-positives ou AC133-négatives dans des conditions hypoxiques. Il a été mis en évidence que les cellules AC133-positives sécrètent plus de VEGF que les cellules AC133-négatives. De surcroit, elles produisent des facteurs pro-angiogéniques capables de recruter des cellules endothéliales qui par la suite forment des vaisseaux *in vitro* et *in vivo* (Bao *et al.* 2006; Oka *et al.* 2007). Par ailleurs, l'injection de cellules endothéliales dans des modèles de xénogreffes orthotopiques de glioblastome favorise l'initiation et la croissance tumorale et augmente la fraction de cellule souches cancéreuses (Calabrese *et al.* 2007). Ces résultats ont également été confirmés par le fait que la présence de cellules endothéliales avec des CSCs favorisent leur prolifération (Calabrese *et al.* 2007; Borovski *et al.* 2009). Récemment, les expérimentations de Ricci-Vitiani et al. ont permis de mettre en évidence un mécanisme de vasculogenèse (formation de vaisseaux non pas à partir de vaisseaux existants mais avec recrutement de précurseurs) à partir de CSCs CD133-positives qui peuvent se différencier pour donner des cellules endothéliales qui contribuent à la formation de la niche vasculaire dans les glioblastomes (Ricci-Vitiani *et al.* 2010).

Ces résultats corroborent donc l'hypothèse que les CSCs seraient maintenues dans un microenvironnement spécifique au sein de la tumeur. La niche vasculaire est aussi importante pour les CSNs que pour les CSCs. L'hypoxie, autre facteur du microenvironnement tumoral, affecte également la régulation des CSCs dans les glioblastomes.

Des études ont montré que l'expression du marqueur AC133 à la surface des cellules de glioblastomes humains est dépendante de la pression en oxygène *in vitro*. En effet, les cellules cultivées à une faible pression en oxygène (3% d'O_2) montrent un pourcentage de

cellules AC133-positives plus élevé que les cellules cultivées à 21% d'oxygène (Platet *et al.* 2007).

Par la suite, plusieurs études effectuées *in vitro* sur des cellules de glioblastomes, ont confirmé la régulation d'AC133 par la pression en oxygène (McCord *et al.* 2009), mettant également en évidence l'influence de la pO_2 sur les propriétés de prolifération et d'autorenouvellement des CSCs. De même, l'expression des marqueurs associés aux cellules souches tels que la Nestine, Oct-4 ou Sox-2, A2B5, Bmi-1 ou Klf-4 ainsi que la population de cellules SP sont augmentées lorsque les cellules sont maintenues sous une faible pO_2 (McCord *et al.* 2009; Soeda *et al.* 2009; Bar *et al.* 2010; Kolenda *et al.*). De cette façon, l'hypoxie existante dans les glioblastomes favoriserait le maintien des CSCs. L'étude de coupes de glioblastomes issus de résections chirurgicales démontre que les cellules AC133-positives ne sont pas disséminées de façon ubiquitaire dans la tumeur. On les retrouve par clusters de quelques cellules dans le cœur de la tumeur, cette zone présentant également une surexpression de HIF-1 (Pistollato *et al.* 2010).

Afin de confirmer cette hypothèse, des études ont porté sur les mécanismes de réponse à l'hypoxie dans les CSCs, par rapport aux cellules non souches dans les glioblastomes. Ces essais ont mis en évidence que les protéines HIF-1 et HIF-2 favorisent l'expansion et la survie des CSCs en hypoxie (Li *et al.* 2009; Soeda *et al.* 2009; Bar *et al.* 2010). Par ailleurs, une surexpression de HIF-1α conduit à une sur expression de la protéine CD133 indiquant un rôle de HIF-1α dans la régulation de CD133, le rôle de HIF-1α sur l'épitope AC133 n'étant pas démontré dans cette étude (Bar *et al.* 2010). L'étude de Li et al. démontre, d'une part, le rôle des protéines HIF dans les mécanismes d'agressivité des CSCs après inhibition de HIF dans la population de cellules souches cancéreuses et, d'autre part, met en évidence une co-localisation de HIF-2α et AC133 dans les biopsies issues de tumeurs humaines (Li *et al.* 2009). Par ailleurs, l'effet des protéines BMP, caractérisées par leur rôle dans l'inhibition des CSCs dans les glioblastomes de par l'activation de leur différenciation (Piccirillo *et al.* 2006), est inhibé par l'hypoxie et notamment HIF-1α (Pistollato *et al.* 2009).

Les cellules souches cancéreuses sont donc des cellules qui possèdent des propriétés d'autorenouvellement et de prolifération spécifique au sein de la tumeur et peuvent être isolées par l'expression du marqueur AC133. Les multiples mutations génétiques que ces CSCs peuvent aquérir, notamment la mutation du gène IDH (isocytrate deshydrogénase),

définirait l'évolution du glioblastome (Figarella-Branger *et al.*) **(Figure 8)**. Les cellules AC133 ont été identifiées comme résistantes aux chimio et radiothérapies existantes participant à l'échec des traitements et aux récidives chez les patients atteints de glioblastomes. Ces cellules sont à la fois régulées par le microenvironnement tumoral et participent également à l'entretien de celui-ci, favorisant de ce fait le maintien des cellules AC133. L'élimination des CSCs dans les glioblastomes est donc un challenge important dans l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques en vue d'améliorer la survie des patients.

AC133 est à ce jour le marqueur de CSCs le plus étudié pour les isoler dans les glioblastomes. AC133 semble donc un épitope intéressant en vue de reconnaître les CSCs de façon spécifique dans les tumeurs ou dans le tissus macroscopiquement sains après exérèse. Cependant sa fonction exacte n'a pas été identifiée. Le chapitre suivant est donc un état de l'art présentant de la protéine CD133 et de son épitope AC133.

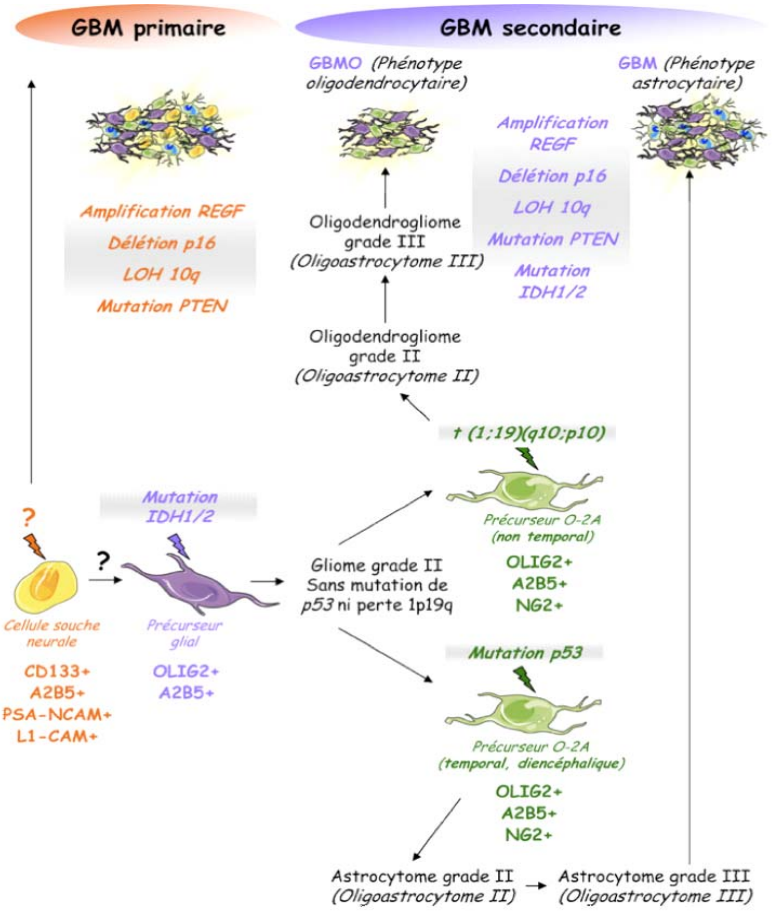


Figure 8 : Schéma de l'évolution des glioblastome en fonction des mutations génétiques observée dans les différents types de gliomes d'après (Figarella-Branger *et al.* 2010)

III. La protéine CD133

1. Découverte de Prominine-1

Deux études publiées de manière concomitante en 1997 relatent la découverte et le clonage de la prominine-1. Ces travaux avaient été mis en œuvre dans le cadre de développement d'anticorps monoclonaux pour l'identification de nouveaux marqueurs pour des cellules neuroépithéliales murines d'une part (Weigmann *et al.* 1997) et des cellules souches hématopoïétiques humaines d'autre part (Yin *et al.* 1997). La prominine-1 a ainsi été nommée en raison de sa localisation au sein de structures proéminentes (« prominent » en Anglais) de la membrane plasmique également connues sous le nom protrusions membranaires.

1.1. Identification de la Prominine-1 chez la souris

Les cellules neuroépithéliales sont des précurseurs neuraux à l'origine des cellules neuronales et de la glie. La membrane plasmique de ces cellules est caractérisée par la présence de deux grands domaines, une zone apicale et une zone baso-latérale de composition lipidique et protéique distinctes conduisant à leur polarisation. Afin d'étudier les mécanismes qui conduisent à l'organisation de la membrane, Weigmann et al. ont développé des anticorps monoclonaux spécifiques du pôle apicale de la membrane des cellules neuroépithéliales (Weigmann *et al.* 1997). Ainsi, l'anticorps monoclonal 13A4 a été généré. Après marquage des cellules neuroépithéliales avec l'anticorps 13A4 et observation en microscopie électronique, il a été mis en évidence un marquage spécifique du pôle apical des cellules et plus particulièrement des microvillosités (saillies très fines de la membrane plasmique qui permettent d'augmenter la surface d'échange avec le milieu extérieur).

1.2. Identification CD133 chez l'Humain

Le mode de sélection des cellules souches hématopoïétiques (CSH) est important à la fois pour des études fondamentales et dans le cadre de leur utilisation à des fins thérapeutiques. Un panel de marqueurs de surface est utilisé afin d'isoler ces cellules. C'est

dans le but d'isoler de nouveaux antigènes spécifiques que de nouveaux anticorps monoclonaux ont été générés à partir de CSHs CD34-positives et de progéniteurs issus de la moëlle osseuse et du foie d'origine humaine. L'anticorps AC133 a ainsi pu être isolé (Yin *et al.* 1997). Au contraire de CD34 qui est exprimé également sur des cellules épithéliales de cordon ombilical ou des fibroblastes, AC133 ne reconnaît que des cellules immatures et par conséquent peut être utilisé pour sélectionner les cellules souches.

1.3. Nomenclature

Le terme Prominine-1 fait référence à la protéine murine ou humaine. Chez l'Homme, l'anticorps AC133 a permis de caractériser l'antigène AC133 : un épitope glycosylé (Yin *et al.* 1997) ou associé à des glycosylations (Miraglia *et al.* 1997), de la protéine prominine-1 encore appelée CD133. La prominine-1 humaine a également été référencée comme prominin (mouse)-like (PROML1).

2. Structure

2.1. Structure du gène

Le gène de la prominine-1 est localisé sur le chromosome 4 chez l'humain et sur le chromosome 5 chez la souris. Les gènes humain et murin ont une taille d'environ 150kb. Le gène est transcrit à partir de cinq promoteurs alternatifs **(Figure 9)**. Les promoteurs P1, P2 et P3 sont localisés dans des régions riches et bases C / G appelées ilots CpG (Shmelkov *et al.* 2004). Ces îlots CpG sont les substrats de l'ADN méthyl-transférase qui ajoute une fonction méthyle à la cytosine. Cette méthylation joue un rôle important dans la régulation de l'expression de gènes. L'influence de la méthylation sur ces promoteurs a été évaluée après transfection d'un plasmide dans laquelle les promoteurs P1, P2 et P3 ont été placés en amont d'un gène rapporteur, la luciférase, dans des cellules de glioblastomes. L'analyse des promoteurs a permis de montrer que leur méthylation conduit à une inhibition de l'activité des promoteurs *in vitro*. De plus, une dé-méthylation restaure l'expression de la prominine-1 (Tabu *et al.* 2008). Par ailleurs, la surexpression de la prominine-1 observée dans les tumeurs

de l'endomètre et les hépatocarcinomes est associée à une hypométhylation du gène de la prominine-1 (Friel *et al.* 2010; You *et al.* 2010).

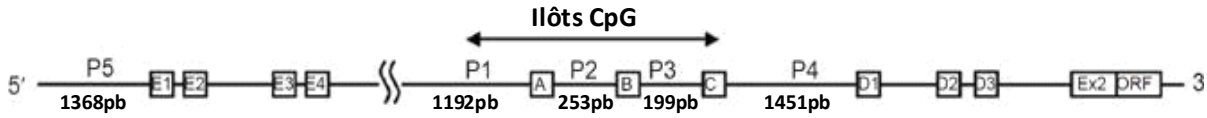


Figure 9 : Structure schématique de la zone 5' UTR du gène de la prominine-1 : P1, P2, P3, P4, et P5 sont les promoteurs. [A] représente les différentes séquences de l'exon 1. D'après (Tabu *et al.* 2008)

Plusieurs isoformes protéiques de la prominine-1 ont été recensés (Fargeas *et al.* 2007). En effet, le gène de la prominine-1 donne naissance à plusieurs transcrits obtenus à partir des cinq promoteurs identifiés dont l'expression est dépendante du tissu d'origine (Shmelkov *et al.* 2004), pouvant être soumis au mécanisme d'épissage alternatif (Corbeil *et al.* 2009; Kemper *et al.* 2010).

2.2. Structure de la protéine

La prominine-1 est une glycoprotéine membranaire composée de 5 domaines transmembranaires, un segment N-terminal extracellulaire, deux grandes boucles extracellulaires, deux petites boucles cytoplasmiques et un segment C-terminal intra cytoplasmique. Elle possède huit sites de N-glycosylation dont cinq sur la première boucle extracellulaire et trois sur la seconde. (Miraglia *et al.* 1997; Weigmann *et al.* 1997) **(Figure 10)**. L'anticorps AC133 reconnaît un épitope de la prominine-1 associé à un des sites de glycosylation. La prominine-1 murine est une protéine de 858 acides aminés. La masse moléculaire prédite de cette protéine est de 96 kDa. La prominine-1 humaine est une protéine de 865 acides amines avec une masse moléculaire apparente de 120 kDa. Cependant, la présence des 8 sites de glycosylation conduit à une masse moléculaire apparente de 115 kDa.

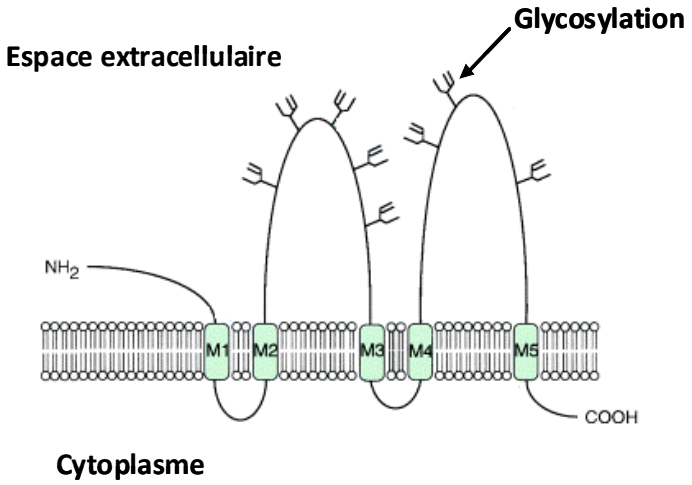


Figure 10 : Schéma de la structure de la prominine-1 ou CD133 d'après (Corbeil *et al.* 2001)

La prominine-1 est une protéine conservée chez les vertébrés et les invertébrés (Weigmann *et al.* 1997). La structure de la prominine-1 ne présente d'homologie qu'avec la protéine de la même famille, la prominine-2 (Zhang *et al.* 2002; Fargeas *et al.* 2003). Les protéines murines et humaines présentent 60% d'identité de séquence. Les séquences des segments transmembranaires des deux protéines présentent plus d'identité (entre 64 et 85% d'identité) que les domaines extra cellulaires (48 à 57% d'identité) (Corbeil *et al.* 1998; Miraglia *et al.* 1998).

La prominine-1 murine présente une zone riche en cystéine à la jonction entre le premier domaine transmembranaire et la première boucle cytoplasmique, dont la fonction n'a pas été identifiée (Miraglia *et al.* 1997; Weigmann *et al.* 1997). Un motif de fixation à des gangliosides, des composants de la membrane plasmique a été mis en évidence par la génération d'un anticorps dirigé contre le segment N-Terminal de CD133 dans des cellules humaines de cancer du colon, HT-29 et Caco-2, dont la fixation est inhibée par la présence du ganglioside GM1 (Taieb *et al.* 2009). De plus, il a été démontré que la prominine-1 peut être phosphorylée sur deux tyrosines sur le segment C-Terminal cytoplasmique par les tyrosines kinases Src et Fyn, dans des lignées de tumeurs cérébrales humaines. La Tyrosine-828 est localisée dans une région contenant un site de reconnaissance des tyrosines kinases mais par la Tyrosine-852 (Boivin *et al.* 2009).

3. Localisation de la prominine-1 / CD133 dans des protrusions membranaires et microdomaines spécifiques de la membrane plasmique.

3.1. La membrane plasmique est structure organisée

- **Les domaines membranaires**

La membrane plasmique est une barrière physique qui permet de séparer le cytoplasme du milieu extérieur. Elle est imperméable aux macromolécules et présente une perméabilité sélective aux ions. Elle est constituée d'une bicouche de phospholipides, de glucides et de protéines transmembranaires ou périphériques et assure de multiples fonctions telles que l'adhésion aux cellules adjacentes ou à la matrice extra cellulaire et le transport sélectif de molécules ou la transmission de signaux entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule.

La structure, l'organisation et la composition de la membrane plasmique sont complexes, varient en fonction du type cellulaire, et compartimentent les fonctions membranaires. Par exemple, les cellules épithéliales présentent une organisation polarisée : avec un pôle apicale et un pôle baso-latérale. Le domaine apical permet d'assurer les fonctions spécifiques de l'organe qu'elle constitue, alors que le domaine baso-latéral assure des fonctions plus communes aux autres cellules. La membrane peut également émettre des prolongements comme les microvillosités qui permettent d'augmenter la surface d'échange avec l'extérieur ou des pseudopodes impliqués dans des phénomènes de migration ou de phagocytose. Ces prolongements sont le résultat d'une association entre les molécules du cytosquelette et la membrane plasmique et afin de créer ces prolongements.

Chacun de ces domaines peut à son tour s'organiser en microdomaines. La membrane plasmique est une structure fluide dans laquelle les composants lipidiques et protéiques sont mobiles. Mais il existe également des îlots plus structurés où des protéines et lipides membranaires interagissent plus étroitement entre eux ou avec les protéines intra-cytoplasmiques ou de la matrice extracellulaire afin de former des plateformes fonctionnelles (Kerjaschki *et al.* 1984) **(Figure 11)**. L'association de ces lipides et protéines spécifiques forme des complexes insolubles dans le Triton X-100, un détergent non ionique (Brown and Rose 1992). Ces structures appelées DIG (detergent-insoluble glycolipid-enriched domains) peuvent être isolées par centrifugation en gradient de sucrose. De part la haute teneur en lipide

qui leur confère une faible densité, ces DIGs peuvent être séparés des autres composants insoluble dans le Triton X-100 comme les protéines du cytosquelette.

Les radeaux lipidiques **(Figure 11)** peuvent être isolés à partir d'un grand nombre de cellules de mammifères (Brown and London 2000). Ce sont des structures dynamiques sur la face extérieure de la bicouche lipidique composée de cholestérol, sphingolipides, de gangliosides et de glycerophospholipides. Elles sont également composées de protéines exclusivement associées à ces radeaux comme les protéines liées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) ou de protéines dont l'affinité avec les radeaux peut être modulée par des stimuli intra ou extra cellulaires. Les radeaux lipidiques sont impliqués notamment dans les mécanismes de transduction du signal et dans les mécanismes d'endocytose, la polarisation cellulaire, la croissance cellulaire, la survie, les mécanismes de mort (Simons and Toomre 2000; Sonnino *et al.* 2007) et particulièrement dans les mécanismes d'endocytose caveolae-dépendants (Watts 1997).

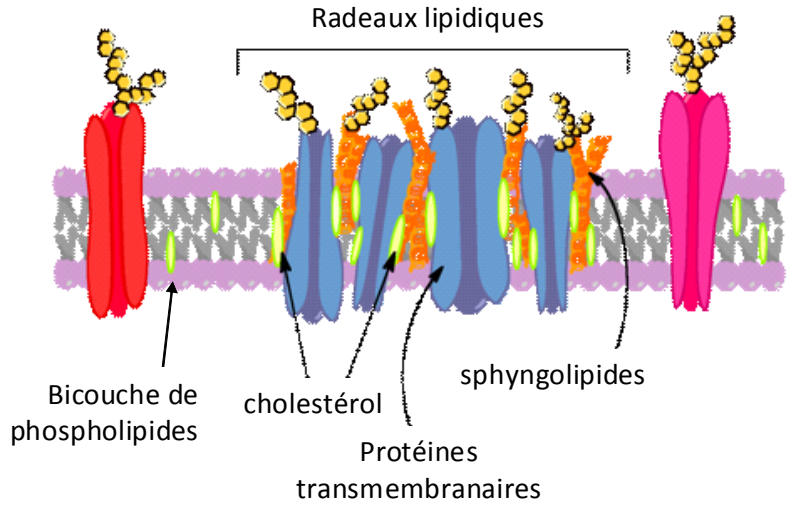


Figure 11 : Schéma de la membrane plasmique comprtant un radeau lipidique d'après http://biocolesterol.blogspot.com/2010_11_01_archive.html

Le cholestérol est un élément essentiel dans la composition de la membrane plasmique et constitue environ 15 à 20% de sa masse globale. Il permet de stabiliser la structure de la bicouche lipidique sans la rendre rigide pour autant, et permet à la membrane d'être moins perméable aux petites molécules hydrophiles. Le cholestérol s'associe préférenciellement aux radeaux lipidiques de par une grande affinité pour les sphingolipides. Cependant, il peut également se localiser dans des zones de la bicouche composée de phospholipides insaturés

non associés à des radeaux lipidiques. La déplétion en cholestérol de la membrane plasmique grâce à l'utilisation de méthyle-β-cyclodextrine combinée à une inhibition de sa synthèse par la lovastatine (inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase) conduit à une désorganisation de la structure des radeaux et à une perte de fonctionnalité des protéines. En effet il a été démontré que la methyl-β-cyclodextrine combinée à la lovastatine inhibe les voies d'endocytose caveolae-dépendantes.

La membrane plasmique est donc le siège de nombreux échanges entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. L'internalisation de molécules est notamment controlée par un mécanisme bien documenté: l'endocytose.

- **La membrane plasmique siège de l'endocytose**

L'endocytose est un mécanisme fondamental permettant de capturer des molécules extra cellulaires en les englobant dans des vésicules issues de la membrane. Au contraire de la diffusion, qui est un mécanisme passif, l'endocytose est un mécanisme énergie-dépendant, utilisé pour capter les nutriments nécessaires à la survie cellulaire ou pour se défendre et protéger leur homéostasie, ou pour se défendre et préserver leur homéostasie. Plusieurs voies d'endocytose ont été décrites et définies en fonction des protéines et lipides membranaires mis en œuvre. Deux grands modes d'endocytose ont été décrits : la phagocytose qui permet de capturer des particules de grosse taille et la pinocytose qui permet d'internaliser des substances fluides et de taille inférieure au micromètre dans des petites vésicules (Conner and Schmid 2003) **(Figure 12).**

La phagocytose est un mécanisme utilisé par certaines cellules spécialisées et mobiles telles que les macrophages, les polynucléaires et les neutrophiles. La phagocytose joue un rôle important dans les mécanismes de défense contre des pathogènes.

La pinocytose peut être classée en sous types (Doherty and McMahon 2009):

La macropinocytose consiste en la formation de protrusions membranaires qui vont se refermer pour former des vésicules appelées macropinosomes d'une taille comprise entre 0,5 et 5µm.

La pinocytose clathrine-dépendante est particulièrement utilisée dans les phénomènes d'internalisation impliquant une reconnaissance spécifique par des récepteurs. Elle se produit dans des sites spécialisés de la membrane plasmique appelés puits et recouvert

d'un réseau protéique en forme de triskèles de clathrine. Des protéines adaptatrices telles que les protéines AP2 et la dynamine sont indispensables à ce mécanisme.

La pinocytose caveolae-dépendante implique la formation d'invaginations appelées caveolae constituant un type de radeaux lipidiques. Ces caveolae sont recouvertes de protéines appelées cavéolines présentant une forte affinité pour le cholestérol. Cette voie est également utilisée pour l'internalisation de molécules par des mécanismes récepteurs-dépendants.

La pinocytose caveolae- et clathrine-indépendante est une détermination générique de mécanismes moins documentés utilisant des vésicules d'endocytose non coatées. Le virus SV40 ou la toxine cholérique utilisent cette voie.

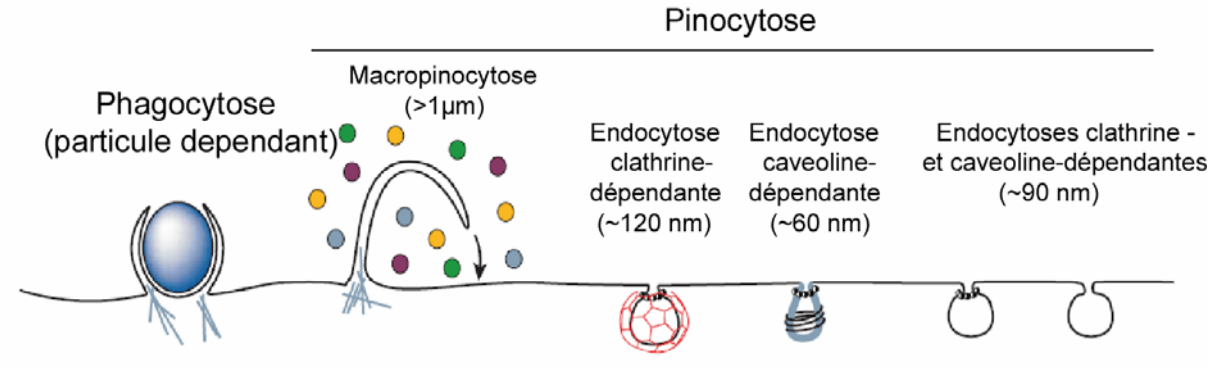


Figure 12 : Schéma des mécanismes d'endocytose d'après (Conner and Schmid 2003)

3.2. La prominine-1 localisée dans les protrusions membranaires

Le marquage effectué à l'origine sur des cellules neuroépithéliales de souris, grâce à l'anticorps 13A4, a permis de mettre en évidence un marquage membranaire de cette protéine. En outre, ce marquage est localisé sur la partie apicale de la membrane plasmique au niveau des microvillosités. La prominine-1 a également été identifiée sur les zones apicales d'autres tissus épithéliaux murins embryonnaires (poumon et uretères) et adultes (tubules de reins et surface épendymaires du cerveau) (Weigmann *et al.* 1997). Le marquage de tubules de rein avec l'anticorps 13A4 marqué à l'or, a également révélé par microscopie électronique une localisation spécifique de la prominine-1 au niveau des microvillosités. L'analyse de la prominine-1 humaine a démontré également que l'expression de la prominine-1 est localisée dans les microvillosités la lignée de cellules épithéliales Caco-2 **(Figure 13A)**, ainsi que dans des protrusions membranaires dans les cellules souches hématopoïétiques **(Figure 13B)** (Corbeil *et al.* 2000; Giebel *et al.* 2004) et des oligodendrocytes **(Figure 13D)** (Corbeil *et al.*

2001), et dans des évaginations membranaires à la base du segment externe des cellules photoréceptrices de la rétine **(Figure 13C)** (Maw *et al.* 2000). En outre, après transfection d'un plasmide exprimant la prominine-1 murine ou humaine dans des cellules non-épithéliales, la protéine n'est pas transportée de façon homogène à la membrane mais est localisée également dans des protrusions de la membrane plasmique **(Figure 13E)** (Weigmann *et al.* 1997; Corbeil *et al.* 2000).

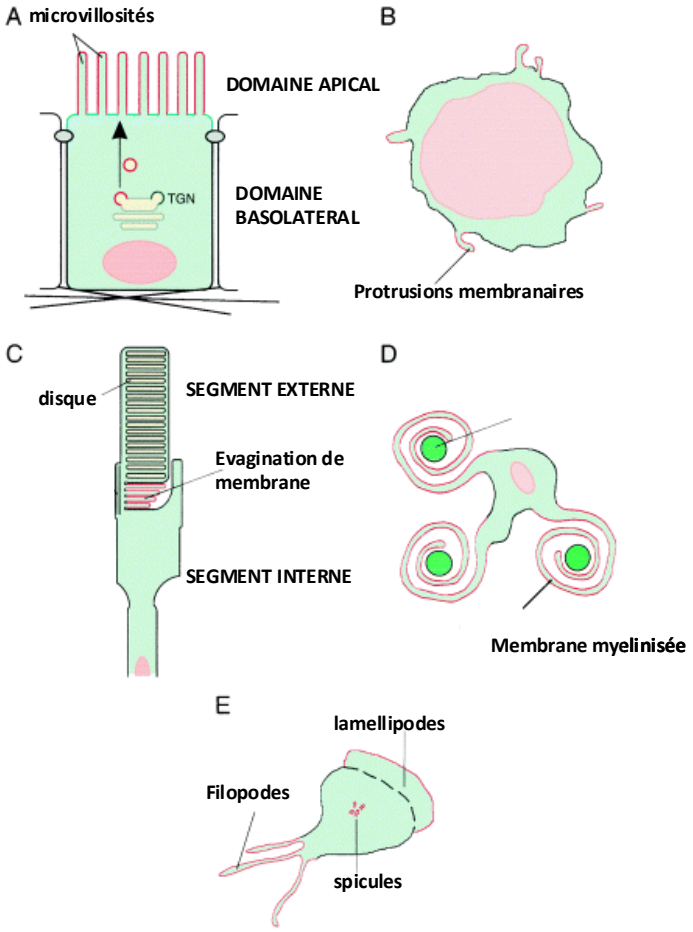


Figure 13 : Localisation de la prominine-1 dans les protrusions membranaires de différents types cellulaires. d'après (Corbeil *et al.* 2001)

3.3. Prominine-1 localisée dans des microdomaines membranaires via une liaison au cholestérol.

La prominine est localisée dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique, les protrusions membranaires. Or, ces protrusions sont souvent associées à la présence de

microdomaines. Dans ce but, des études ont été menées afin d'identifier une éventuelle association entre ces microdomaines et la prominine.

Pour cela, le gène de la prominine-1 murine a été transfectée dans des cellules épithéliales rénales canines MDCK. L'expérience a été menée en comparaison avec la protéine PLAP (placental alkaline phosphatase) une protéine associée au GPI localisée dans la zone plane de la région apicale de la membrane plasmique et associée à des DIGs insolubles en Triton X-100 (Roper *et al.* 2000). Au contraire de la PLAP, la prominine-1 est soluble dans le Triton X-100, mais elle n'est pas soluble dans le Lubrol WX, un autre détergent non ionique. De plus, la centrifugation sur gradient de sucrose montre que l'on obtient des DIGs contenant la prominine-1 après solubilisation des membranes dans du Lubrol WX et non dans du Triton X-100. En outre, la déplétion de cholestérol par la méthyle-β-cyclodextrine conduit à une réorganisation de la distribution de la prominine dans la membrane qui alors que la PLAP n'est pas affectée. Cependant, la prominine-1 n'interagit pas pour autant avec les radeaux lipidiques insolubles dans le Triton X-100. Ces résultats démontrent que la prominine-1 est associée dans un nouveau type de radeaux lipidiques Lubrol WX insoluble, liée au cholestérol dans les microvillosités des cellules épithéliales et différents des rafts lipidiques Triton X-100 insolubles.

Janish et Corbeil ont démontré par la suite, dans les cellules MDCK, que la composition en gangliosides des radeaux lipidiques n'est pas la même selon leur localisation. Le ganglioside GM-1 est présent en faible quantité dans la membrane plasmique par rapport au ganglioside GM-3 que l'on retrouve majoritairement dans la zone plane. Il a été mis en évidence, par microscopie confocale, que le ganglioside GM-1 est co-localisé avec la prominine-1 dans les microvillosités et les cils primaires un autre type de protrusion des cellules épithéliales rénales (Janich and Corbeil 2007). Ces résultats son étayés par le fait que le segment N-terminal possède un site de liaison au ganglioside GM-1 mais pas au ganglioside GM-3 (Chapitre III 2.2).

4. AC133 marqueur de cellules épithéliales indifférenciées

4.1. AC133 marqueur de cellules souches et de cellules souches cancéreuses et de cellules épithéliales.

Des analyses de l'ARNm par Northern blot, effectuées chez la souris et l'humain, ont permis d'identifier son expression dans nombreux organes adultes tels que le cerveau, la moelle épinière, le cœur, les reins, le foie, les poumons, le pancréas, le placenta, les muscles squelettiques et l'intestin (Corbeil *et al.* 2001; Florek *et al.* 2005). Cependant, chez l'humain, l'expression de l'épitope glycosylé AC133 est beaucoup plus restreinte. On retrouve l'expression d'AC133 majoritairement dans des tissus embryonnaires et très peu dans les tissus adultes (Corbeil *et al.* 2000). Après l'identification d'AC133 sur les cellules souches hématopoïétiques humaines, l'intérêt s'est porté sur l'étude d'AC133 à la surface des cellules souches. Des cellules isolées à partir de tissus humains ou murins, sur la base de l'expression d'AC133 associé ou non avec d'autres marqueurs de cellules souches, ont la capacité de se différencier ou de régénérer des tissus (Mizrak *et al.* 2008). AC133 a donc été associé au phénotype de cellules souches. Par la suite, AC133 a été utilisé pour isoler les cellules souches cancéreuses dans différents types de tumeurs (Tableau 1). Chez la souris, la prominine-1 a été identifiée dans des cellules épithéliales. Des études, réalisées à posteriori chez l'homme, ont démontré que l'anticorps AC133 conduisait également à un marquage de cellules épithéliales (Corbeil *et al.* 2000).

4.2. AC133 exprimé à la surface de cellules indifférenciées.

Le marquage par AC133 serait associé exclusivement à un phénotype cellulaire précoce.

Les cellules Caco-2 sont des cellules épithéliales indifférenciées issues de carcinome de colon humain. Elles sont fréquemment utilisées pour leur propriété à se différencier afin de former un épithélium intestinal après 28 jours de culture à confluence dans un milieu approprié. L'analyse de l'épitope AC133 et CD133 a permis de mettre en évidence qu'AC133 après 7 jours de culture. Après différenciation des cellules Caco-2, l'épitope AC133 est perdu alors que la protéine CD133 est conservée avec une légère augmentation de son ARNm par

rapport aux cellules indifférenciées. Les mécanismes de différenciation de cellules épithéliales conduisent à la formation de vésicules contenant la prominine-1, qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et que l'on peut retrouver dans les fluides corporels tels que le liquide séminal, les urines, la salive ou les larmes indiquant des mécanismes de réorganisation de la membrane lors de la différenciation dans lesquels la prominine-1 jouerait un rôle (Marzesco *et al.* 2005; Dubreuil *et al.* 2007; Marzesco *et al.* 2009). Cependant, ces études ne disent pas si l'épitope AC133 est associé à ces vésicules.

Kemper et al. ont également étudié l'épitope AC133 dans le cas de cellules primaires issues de carcinome de colon humain. Leurs travaux démontrent que l'épitope AC133 est également associé aux cellules souches cancéreuses et qu'il est perdu au contraire de l'expression de la protéine, dont l'expression est maintenue (Kemper *et al.* 2010). De plus, ces essais ont mis en évidence que la perte d'expression n'est pas due à une modulation de l'utilisation des promoteurs du gène ou à l'expression d'un autre isoforme de la protéine. En outre, l'étude de la glycosylation de CD133 par western blot démontre que CD133 reste glycosylée même après différenciation, malgré la perte de marquage à la surface des cellules. Par conséquent, la perte d'AC133 ne serait pas forcément une perte de glycosylation, mais un masquage de l'épitope, inhibant sa reconnaissance par l'anticorps.

5. Fonction de la Prominine-1

La prominine-1 et son marqueur AC133 sont reconnus comme marqueurs de cellules souches et de cellules souches cancéreuses (Mizrak *et al.* 2008). Cependant, peu d'études ont été réalisées en ce qui concerne sa fonction et le rôle qu'elle pourrait jouer dans le maintien du phénotype indifférencié des cellules souches ou l'implication qu'elle pourrait avoir sur les mécanismes liés à l'agressivité tumorale.

5.1. Rôle de la prominine-1 dans les dégénérescences rétiniennes

Les premiers signes d'une fonction de la prominine ont été établis en 1997 par Maw et al. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires sont des maladies impliquant un grand nombre de gènes ayant des activités biologiques très variées (Inglehearn 1998). L'analyse génétique d'une famille indienne atteinte d'une dégénérescence rétinienne autosomale récessive a permis de mettre en évidence une mutation dans le gène de la prominine-1. La

délétion du nucléotide 1878 cause un décalage du cadre de lecture conduisant à l'apparition d'un codon stop plus précoce. Cette mutation est à l'origine de la synthèse d'une forme tronquée de la prominine ayant perdu une partie de la seconde boucle extracellulaire, le cinquième domaine transmembranaire et le segment C-terminal, qui n'est plus acheminée à la membrane plasmique (Maw *et al.* 2000). Ultérieurement, d'autres mutations dans le gène de la prominine-1 ont été mises en évidence dans des dégénérations rétiniennes. Une mutation non-sens de la base C remplacée par une base T a pour conséquence l'apparition d'un codon stop et à l'arrêt prématuré de la synthèse protéique (Zhang *et al.* 2007). Un modèle de souris transgénique, exprimant une forme mutée de la prominine-1, a également été développé. A l'origine, la prominine-1 est exprimée à la base des segments externes des photorécepteurs. La substitution d'un acide aminé génère une protéine dont la localisation passe sous la couche de photorécepteurs. Cette étude démontre également par co-immunoprécipitation que la prominine-1 interagit avec la protéine protocadhérine, une protéine d'adhésion cellulaire spécifique des photorécepteurs , et avec les filaments d'actines, protéines du cytosquelette, ces deux molécules ayant un rôle important dans la morphogénèse de la membrane des disques (Yang *et al.* 2008). La génération de souris KO pour le gène de la prominine-1 démontre que la prominine-1 est un régulateur clé de la morphogenèse des disques et que sa perte est à l'origine de dégénérescence des cônes et des photorecepteurs de la rétine (Zacchigna *et al.* 2009).

L'effet de l'extinction de la prominine-1 dans des glioblastomes a également été évalué dans des lignées de glioblastomes U251 et d'hépatocarcinome humain Huh-7, via l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour déterminer l'effet de la prominine sur le maintien du caractère souche. L'inhibition de la prominine-1 dans ces cellules provoque une diminution de la capacité des cellules Huh-7 à former des sphères en culture et une inhibition de la prolifération de ces cellules U251 *in vitro* (Yao *et al.* 2009).

Ces résultats mettent en évidence un rôle important de la prominine-1 dans les phénomènes variés tels que la morphogenèse, la prolifération ou la capacité à former des colonies. De plus, la prominine-1 peut interagir avec des protéines impliquées dans les phénomènes d'adhérence cellules-cellules et avec le cytosquelette. Cependant, les voies par lesquelles la prominine-1 est impliquée dans ce mécanisme restent mal comprisent.

6. Régulation de la prominine-1 et d'AC133

Peu d'études portent sur la régulation de la prominine-1 ou sur l'épitope AC133. Cependant différents niveaux de régulations ont été identifiés.

6.1. Régulation de l'expression du gène de la prominine-1

Des études montrent que trois des 5 promoteurs de ce gène sont localisés dans des îlots CpG et que l'hypométhylation de ces promoteurs est associée à une activation de l'expression du gène. Cependant, les mécanismes conduisant à la méthylation ou la déméthylation des promoteurs de la prominine-1 sont mal connus. Il a cependant été démontré dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain Huh-7 que la protéine TGF-β (transforming growth factor) aurait un rôle dans la méthylation du promoteur de la prominine-1. TGF-β est une cytokine, surexprimée dans les hépatocarcinomes et impliquée dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire et l'apoptose. Par l'intermédiaire de la voie de transduction des SMAD, TGF-β induirait une inhibition de la méthylation du promoteur de la prominine-1 (Friel *et al.* 2010; You *et al.* 2010) par les ADN méthyltransférases DNMT-1 et DNMT-3β **(Figure 14)**.

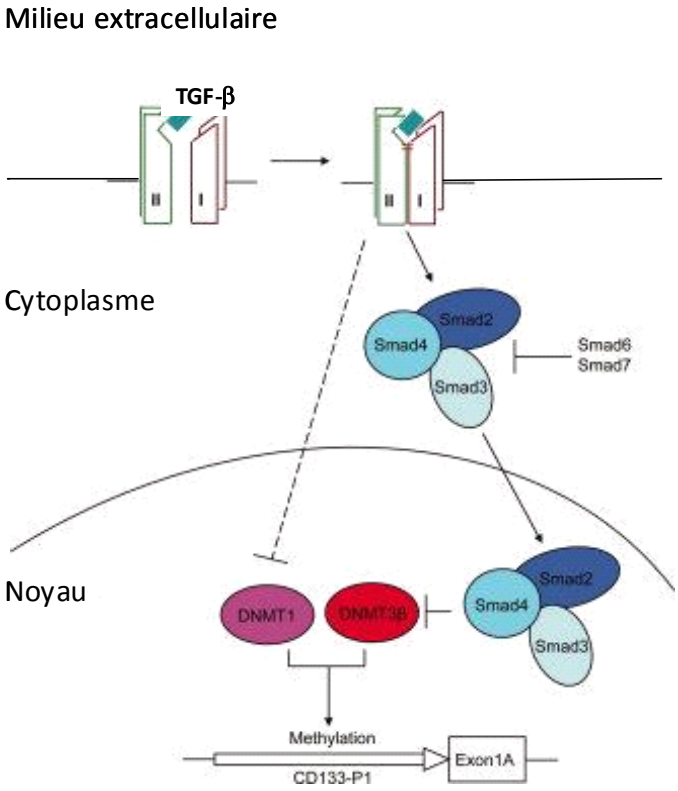


Figure 14 : Schéma de régulation de la méthylation du promoteur du gène de la prominine-1 par le TGF-β.

6.2. La différenciation cellulaire est associée à la perte d'AC133 (ou vice et versa)

Il a été mis en évidence que l'expression de l'épitope AC133 notamment dans les cellules souches, les cellules épithéliales et les cellules souches cancéreuses, était reliée à l'état indifférencié de ces cellules. De plus, il y a une perte de l'épitope AC133 est au cours de la différenciation cellulaire. Différents facteurs, capables de réguler l'expression d'AC133, ont été identifiés :

La protéine BMP-4 (bone morphogenic protein), une protéine impliquée dans l'induction de la différenciation précoce des cellules embryonnaires, provoque une différenciation des cellules AC133-positives dans les glioblastomes et de surcroit, la perte de l'expression d'AC133. (Piccirillo *et al.* 2006),

L'acide rétinoïque, une molécule inductrice de différenciation engendre une perte d'expression de la prominine-1 au cours du mécanisme de différenciation des cellules souches cancéreuses issues de glioblastome humains (Niu *et al.* 2010).

6.3. Régulation par le microenvironnement non protéique.

Le microenvironnement joue un rôle important dans la régulation des cellules souches et des cellules souches cancéreuses. Mais il semble également être impliqué dans la régulation de la prominine-1. En effet, l'hypoxie favorise l'expression d'AC133 par l'intermédiaire des protéines HIF (Platet *et al.* 2007; Li *et al.* 2009; Soeda *et al.* 2009; Bar *et al.* 2010).

Ces résultats sont étayés par une étude réalisée sur des lignées cellulaires de glioblastomes humains U251-MG et D54-MG. L'utilisation de roténone, une molécule bloquant la chaine respiratoire et la déplétion de l'ADN mitochondrial par un traitement à long terme de bromure d'éthidium, conduisent à une sur expression d'AC133. La déplétion de l'ADN mitochondrial est également associé à une inhibition de la phosphorilation oxydative et conduit à une altération de l'homéostasie du calcium et une production accrue de ROS et à une résistance à l'apoptose (Griguer *et al.* 2008).

Une étude réalisée montre chez le rat que la prominine pouvait être également régulée par le glucose. Une forme tronquée dans la partie C-terminale de la prominine-1 de rat (Chang *et al.* 2001) a été transfectée dans les cellules CBRH7019, cellules épithéliales issues d'hépatome de rat. La surexpression de fudenine, dans ces cellules, est associée à une

augmentation de l'ARNm de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, enzyme qui catalyse la première étape de la glycolyse. De plus, l'exposition à un taux de glucose élevé entraine une surexpression de la prominine-1 dans des cellules de muscle squelettique de rat. Par la surexpression de la prominine-1 dans des cellules L6, cellules musculaires de rat, induit une augmentation de l'internalisation du glucose (Yang *et al.* 2007).

De part le rôle de l'hypoxie, de la mitochondrie et du glucose, le métabolisme cellulaire est fortement impliqué dans la régulation de la prominine-1.

IV. Thérapies ciblées contre les glioblastomes et les cellules souches cancéreuses.

Les thérapies actuellement utilisées, ont pour but l'élimination des cellules cancéreuses au niveau du tissu tumoral. Toutefois, les cellules souches cancéreuses, moins affectées par les traitements de par leurs propriétés de radio et chimiorésistance, subsisteraient après thérapie et seraient ainsi à l'origine de récidives, toujours observées dans le cas des glioblastomes, le plus souvent à quelques centimètres du site de résection tumorale **(Figure 15A)**. La possibilité de cibler les cellules souches cancéreuses, ou tout du moins de les atteindre pour les éliminer par de nouvelles stratégies de traitement, doit permettre à la fois de toucher les cellules consituantes de la tumeur, mais aussi de toucher une cause de leur occurrence pour réduire l'apparition de clones néoplasiques résistants et les possibilités de récidives après traitement **(Figure 15B)**.

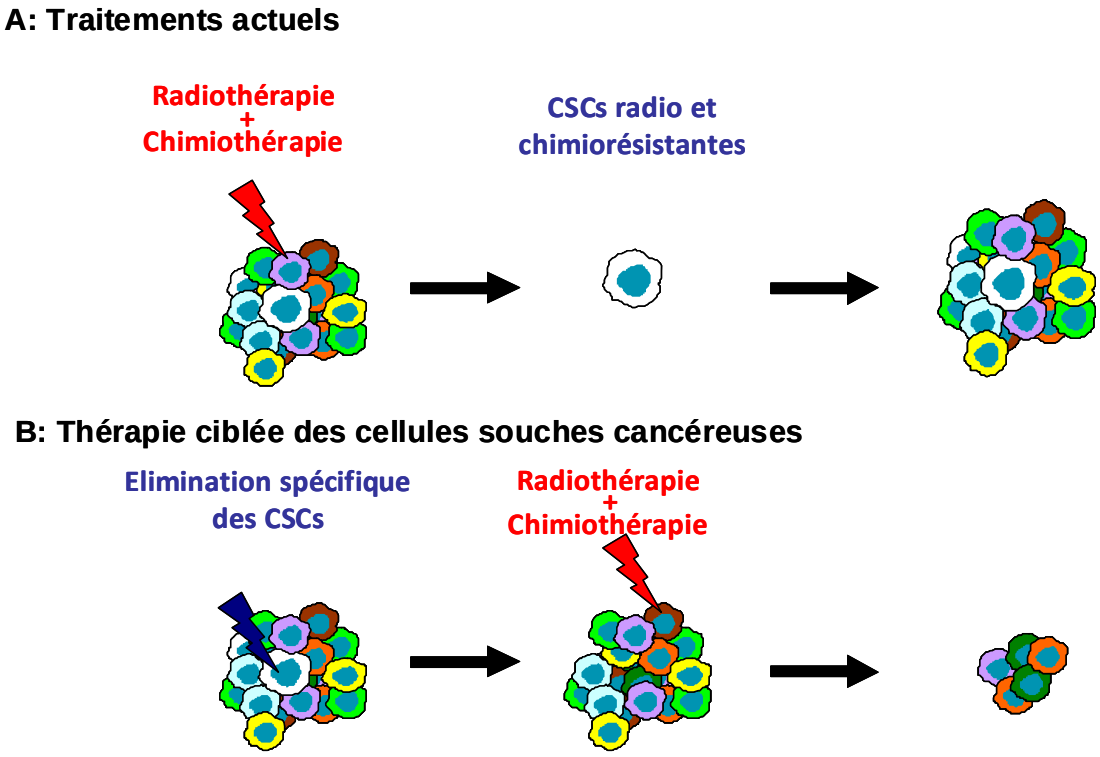


Figure 15: Schéma représentant les thérapies utilisées dans le traitement du glioblastomes et celles à développer pour éliminer les cellules souches cancéreuses.

Le ciblage thérapeutique peut être défini comme un traitement destiné à corriger une ou plusieurs anomalies propres aux cellules cancéreuses, ou profiter de ces anomalies pour rendre les cellules cancéreuses sensibles à un traitement global. Il permet d'agir spécifiquement sur un ou plusieurs mécanismes cellulaires anormaux impliqués dans la transformation des cellules néoplasiques. Les progrès, effectués dans la compréhension des mécanismes liés à l'initiation de l'oncogenèse, ont permis d'identifier plusieurs voies spécifiques des cellules cancéreuses. La mise en évidence de ces voies a permis d'identifier des protéines ou enzymes surexprimées dans les cancers par rapport aux cellules saines. Les thérapies ciblées ont ainsi permis d'agir, non pas sur l'une des conséquences du développement tumoral qu'est la prolifération, mais sur les facteurs en cause dans la perte de contrôle de ce phénomène **(Figure 16)**.

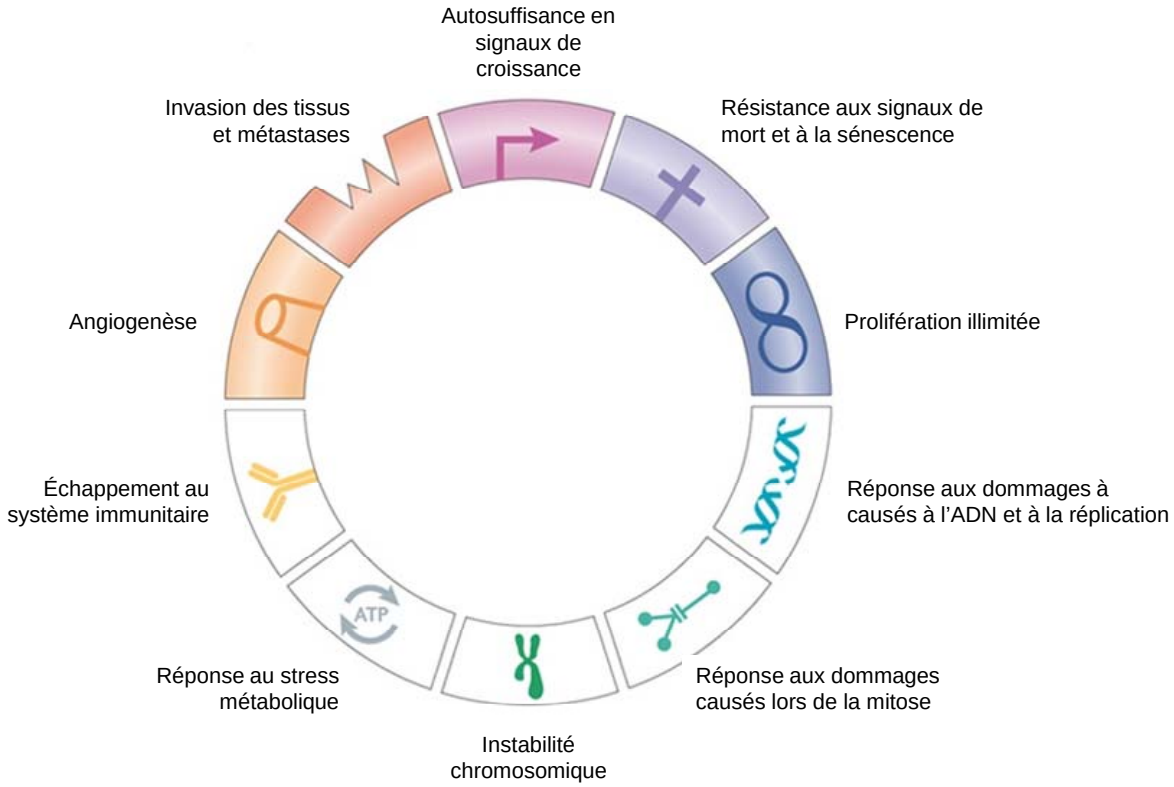


Figure 16 : Schéma représentant les voies impliquées dans les mécanismes d'oncogenèse. D'après (Negrini *et al.* 2010)

Le concept de thérapie ciblée a émergé à la fin du XIX siècle d'après le concept de « magic bullet » émis par Paul Ehrlich, considéré comme le père de l'immunologie et de la chimiothérapie, selon lequel il serait possible d'éliminer un pathogène spécifiquement en apportant directement une toxine jusqu'à sa cible (Winau *et al.* 2004). Une première approche

de la thérapie ciblée a été la mise au point avec l'hormonothérapie contre les cancers hormonodépendants tel que le cancer du sein utilisant le premier antagoniste des œstrogènes, l'éthanoxytriphérol (Lerner *et al.* 1958) puis le tamoxifène (Lippman *et al.* 1976).

1. Thérapies ciblées contre les glioblastomes non vectorisée

1.1. Les inhibiteurs de voie de signalisation

L'amélioration des connaissances des voies de signalisation impliquées dans la cancérisation, a permis l'élaboration de nouvelles molécules améliorant l'efficacité et la sélectivité des chimiothérapies classiques. Ces nouveaux traitements inhibent les voies pro-prolifératives induites par les facteurs de croissance, les cytokines et les hormones, particulièrement actives dans les glioblastomes.

Des études ont ainsi mis en évidence une hyper activation des voies impliquant le facteur de croissance plaquettaire (PDGF), le facteur de croissance épidermique (EGF) et la voie impliquant la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Sathornsumetee and Rich 2008) **(Figure 17)**.

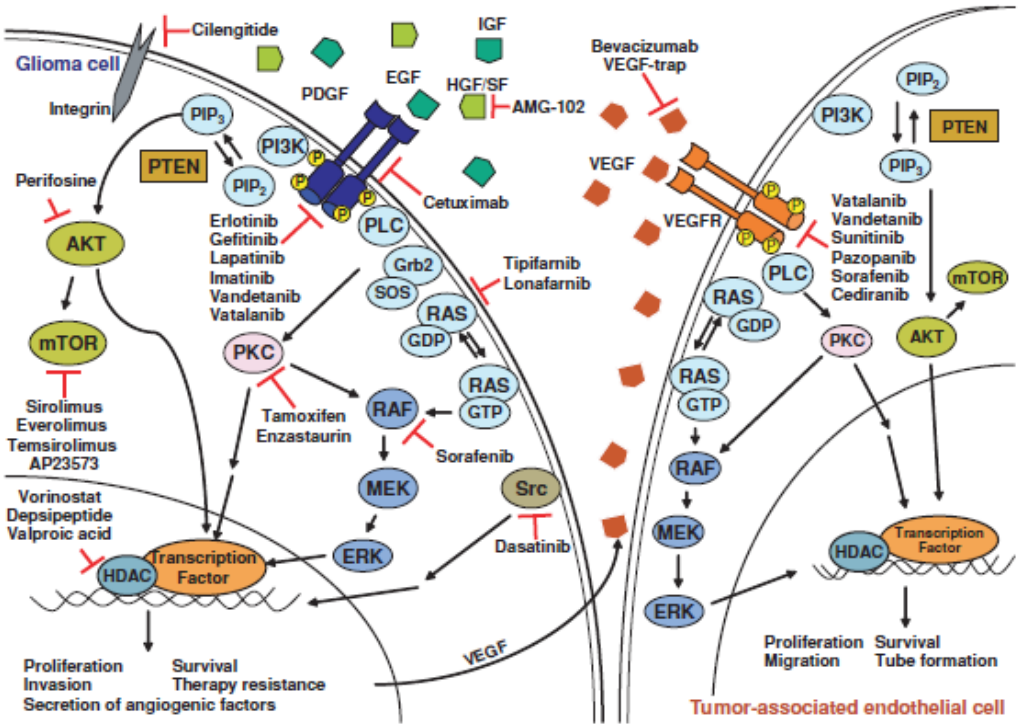


Figure 17 : Voies de signalisation ciblées dans le traitement des glioblastomes. (Sathornsumetee and Rich 2008). *Il existe de nombreuses voies de signalisation impliquées dans les mécanismes d'oncogenèse. Ces voies représentent autant de cibles potentielles pour le développement de thérapies destinées à bloquer ces voies et éliminer les cellules cancéreuses.*

- **Les anticorps monoclonaux**

La fixation des facteurs de croissances comme le VEGF et l'EGF par des anticorps conduit à inhiber l'activation du VEGFR-2 et de l'EGFR.

Les glioblastomes sont des tumeurs richement vascularisées et apparaissent comme des candidats aux thérapies anti-angiogéniques. Le bevacizumab (Avastin®) qui est un anticorps recombinant humanisé ciblant le VEGF, a été approuvé par la FDA en 2009, Le bevasizumab peut être utilisé seul ou associé à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie (Vredenburgh *et al.* 2007; Kreisl *et al.* 2009; Lai *et al.* 2011)

Dans 40 à 50 % des gliomes diagnostiqués, il a été observé que l'EGFR était surexprimé ainsi que sa forme alternativement épissée, active constitutivement (l'EFGRvIII). Un anticorps dirigé contre l'EGFR, le cetuximab, a montré son efficacité à inhiber la croissance tumorale dans un modèle murin (Eller *et al.* 2005) mais n'a pas montré son efficacité à inhiber les glioblastomes chez les patients traités probablement en raison de l'activation de cette voie par des facteurs de croissance redondants (Combs *et al.* 2007; Hasselbalch *et al.* 2010)

- **Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase**

De nombreuses molécules, mimant l'ATP, empêchent la phosphorylation de récepteurs à activité tyrosine kinase et ont montré leur efficacité à inhiber la croissance tumorale.

L'imatinib (Gleevec™) inhibe l'activité tyrosine kinase du PDFR, de c-kit et de la kinase bcr-abl et a montré son efficacité pour traiter les leucémies myéloïdes chroniques. La croissance de lignées de glioblastomes humains, dans le cerveau de souris immunodéprimées, est inhibée par l'administration orale de l'imatinib (Killic *et al.* 2000). L'administration de l'imatinib, en combinaison d'une radiothérapie, à des souris transplantées avec des lignées de glioblastomes humains inhibe la croissance tumorale en bloquant l'activité du PDFR et en induisant l'apoptose (Geng *et al.* 2006). Une étude clinique de phase II a montré l'efficacité de l'imatinib en conjonction avec l'hydroxyurée pour retarder l'apparition de récidives chez des patients atteints de glioblastomes récurrents (Reardon *et al.* 2005).

D'autres inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, comme l'erlonitinib et le gefitinib, ont été testés pour le traitement des glioblastomes. Une étude clinique de phase II sur des patients a montré que l'administration de gefitinib à des patients retardait dans 17% des cas la récidive des glioblastomes après 6 mois de traitement (Reardon *et al.* 2005).

- **Les inhibiteurs des effecteurs intracellulaires.**

Différentes molécules sont actuellement développées afin d'inhiber le fonctionnement de protéines intervenant dans la transduction des signaux come la voie Ras-Raf-MEK-ERK qui est impliquée dans la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaire et hyperactivé dans les gliomes (Shaw and Cantley 2006).

L'inhibition de l'ancrage de la protéine G Ras à la membrane plasmique par des inhibiteurs de la farnésylation, comme le Tipifarnib™, conduit à inhiber l'activation de cette voie et a montré sa capacité à induire un état pré-apoptotique favorisant l'action de la radiothérapie sur des lignées de cellules de gliomes humaines radio-résistantes (Delmas *et al.* 2002). Le Tipifarnib® inhibe l'expression et l'activité de la métalloprotéinase-2 (MMP-2) dans des tumeurs de cellules gliales humaines de la lignée U-87 xénogreffées à des souris. En outre, ce traitement touche aussi les cellules endothéliales et provoque une normalisation de la vascularisation tumorale conduisant à une diminution de l'hypoxie (Delmas *et al.* 2002).

Des essais de phase clinique I/II ont montré que le Tipifarnib™ retardait l'occurence de récidive de patients préalablement atteints de glioblastomes (Cloughesy *et al.* 2006).

Une voie de signalisation, très impliquée dans les glioblastomes, est la voie PI3K-Akt-mTor **(Figure 18)**. L'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase, comme le VEGFR-2 par exemple, conduit au recrutement de la PI3K et à son rapprochement avec la membrane. La PI3K peut alors catalyser la formation de PIP2 en PIP3. Le PIP3 permet à son tour le recrutement de la protéine Akt et sa phosphorylation. Le facteur de transcription Akt ainsi activé favorise la prolifération, la survie et la migration des cellules cancéreuses (Cully *et al.* 2006).

La phosphatase PTEN (phosphatidylinositol-3-kinase-phophatase with tensine homology) catalyse la déphosphorylation du PIP3 en PIP2 conduisant à l'inactivation de la voie Akt. Des études ont montré que dans 43% des gliomes de patients, la PTEN était mutée, conduisant à l'hyper activation de la voie PI3K-Akt (Ang et al., 1999).

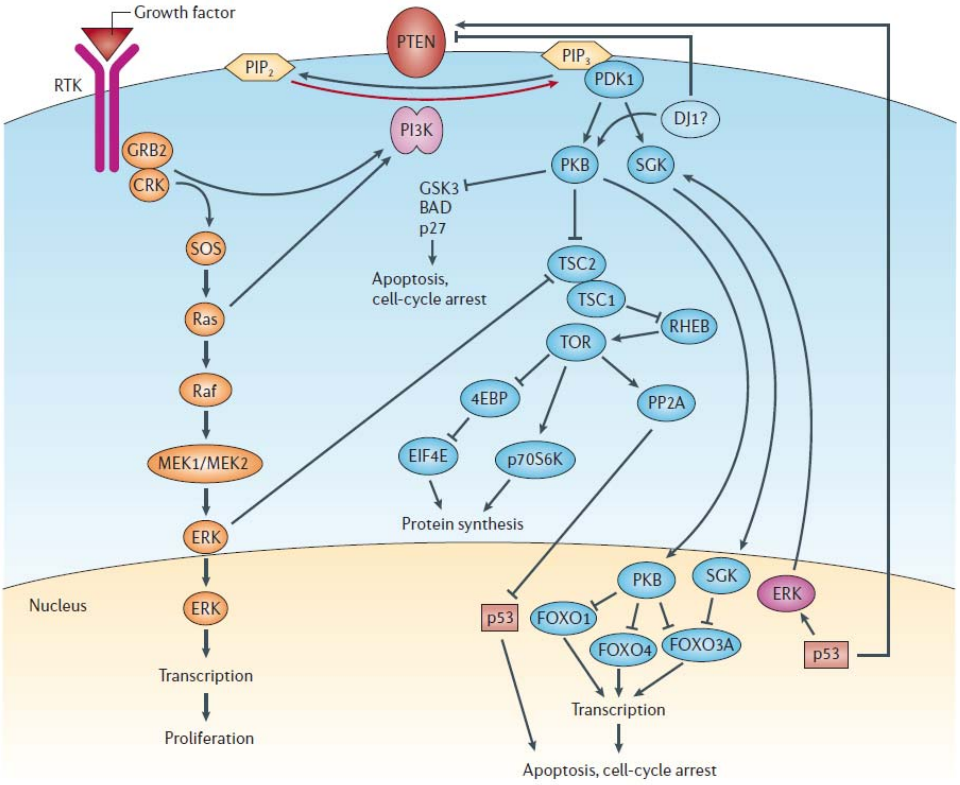


Figure 18 : Les voies de signalisation Ras-Raf-MEK-ERK et PI3K-Akt. (Cully *et al.* 2006)

De plus, l'activation de la voie PI3K est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de gliomes (Chakravarti *et al.* 2004).

La perifosine, un alkylphospholipide (Kondapaka *et al.* 2003), inhibe la fixation de Akt au PIP3 et conduit à l'inhibition de l'activation de la phosphorylation de Akt et Erk1/2 de cellules gliales humaines et induit un arrêt du cycle cellulaire. Le traitement par administration orale de perifosine, seule ou en combinaison avec le témozolomide de souris transplantées (intracrânienne) avec des progéniteurs gliaux murins modifiés génétiquement et présentant une hyper-activation de Akt et de Ras, réduit la croissance tumorale (Momota *et al.* 2005). Une seule étude clinique pour le traitement des glioblastomes humains est actuellement en cours (Sathornsumetee *et al.* 2008).

2. Routage ciblé d'agents anticancéreux.

Les chimiothérapies affectent principalement les cellules se divisant rapidement, en bloquant la mitose ou en altérant l'ADN. Cependant, ces molécules cytotoxiques sont peu sélectives pour les cellules tumorales impactant par ailleurs les cellules saines en

prolifération. De plus, la faible distribution du médicament aux tissus cibles nécessite l'augmentation des doses de produits nécessaires. De surcroit, les cellules cancéreuses possèdent des systèmes de résistance aux anticancéreux par l'expression des pompes d'efflux ATP-dépendantes.

Par conséquent, il a été nécessaire de développer des systèmes permettant à la fois d'augmenter l'efficacité thérapeutique de molécules cytotoxiques et de diminuer les effets secondaires. Afin de délivrer ces molécules de façon spécifique, au niveau de la tumeur, il est nécessaire d'associer ces principes actifs avec des structures leur permettant d'atteindre la tumeur sans être éliminés de façon précoce et en évitant l'internalisation dans les cellules saines (Peer *et al.* 2007). Le principe de thérapie a donc été adapté à des molécules déjà utilisées lors de traitements cliniques comme l'amphothéricineB, la doxorubicine ou le paclitaxel, afin d'optimiser leur délivrance.

2.1. Couplage d'un anticorps à une molécule pharmacologiquement active.

Une stratégie développée pour augmenter la spécificité d'action d'un agent thérapeutique est la conjugaison entre cette molécule et un anticorps monoclonal. L'émergence des techniques de génomiques et de protéomiques ont permis de mettre en évidence l'expression de marqueurs associés aux cellules cancéreuses. La surexpression de ces marqueurs constitue la base du ciblage de médicaments vers les cellules tumorales.

La conjugaison d'une molécule thérapeutique à un anticorps inactive le potentiel thérapeutique du principe actif. L'internalisation du conjugué par la voie des clathrine puis son routage vers les lysosomes permet de restaurer son activité cytotoxique **(Figure 19)**. Par conséquent, tant que le conjugué n'a pas été internalisé dans la cellule cible, il ne peut exercer son effet limitant ainsi que les effets secondaires (Mellman 1996; Garnett 2001; Maxfield and McGraw 2004).

Le premier anticorps conjugé, ayant reçu l'accord de la FDA, est le Gemtuzumab ozogamicin (Myelotarg®) dans le traitement des leucémies myeloïdes aigües chez des patients ayant une récidive. Il sagit d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la molécule CD33 liée à l'ozogamicine (N-acétyl-γ calicheamicin) un antibiotique cytotoxique.

CD33 est un antigène tumoral surexprimé dans 80% des cas de leucémies myeloïdes aigües qui régule les mécanismes de differenciation et d'apoptose (de Vetten *et al.* 2000).

Les anticorps peuvent également être couplés à des agents radiopharmaceutiques dans une stratégie de radiothérapie interne ciblée comme par exemple pour le ^{131}I-Antitenascine ou le ^{188}Re-nimotuzumab pour le traitement des glioblastomes. Le ^{131}I-Antitenascine est un anticorps monoclona murin qui reconnaît la ténascine, protéine de la matrice extracellulaire surexprimée dans les tissus tumoraux mais pas dans les tissus sains (Reardon *et al.* 2007). Le ^{188}Re-nimotuzumab est un anticorps monoclonal humanisé reconnaissant le recepteur à l'EGF (Casaco *et al.* 2008).

Cependant, un inconvénient de la conjugaison de médicaments à un anticorps est la limitation de la quantité de principe actif pouvant être lié à un anticorps. L'encapsulation de principe actif représente donc la possibilité d'augmenter les doses de principes actifs à libérer au niveau du site d'action.

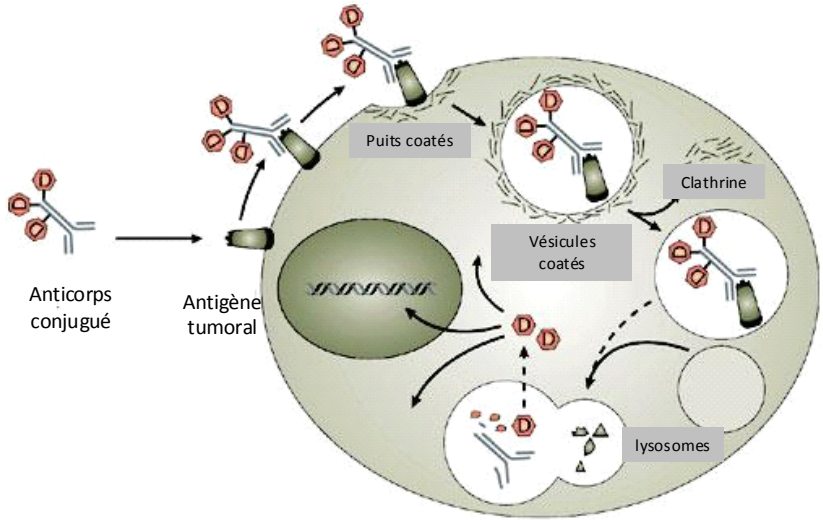


Figure 19: Schéma du mécanisme d'action d'un anticorps conjugué à une molécule chimiothérapeutique d'après (Schrama *et al.* 2006). *L'anticorps conjugué est internalisé préférentiellement par la voie des clathrines puis dirigé vers les lysosomes. Dans les lysosomes la liaison entre l'anticorps et la molécule conjugué est dégradée permettant une libération de l'agent thérapeutique vers le cytoplasme.*

2.2. La vectorisation des principes actifs pour une délivrance spécifique.

Des études récentes démontrent ainsi l'intérêt des nanotechnologies vis-à-vis des glioblastomes et offrent des perspectives intéressantes pour l'administration d'agents pharmacologiques pouvant s'opposer à leur croissance. En ce sens, l'encapsulation de principe actif est soumise à un cahier des charges précis. Différents paramètres sont à prendre en compte lors de la conception d'un vecteur (Shapira *et al.* 2011):

-Le degré de complexité de la synthèse et son coût,

-La capacité qualitative et quantitative de charge du vecteur,

-Leur stabilité lorsqu'ils sont chargés

-La furtivité du vecteur après injection par voie intraveineuse,

-L'accessibilité au tissu cible, la libération du médicament,

-L'effet au site de destination,

-Leur biodégradabilité.

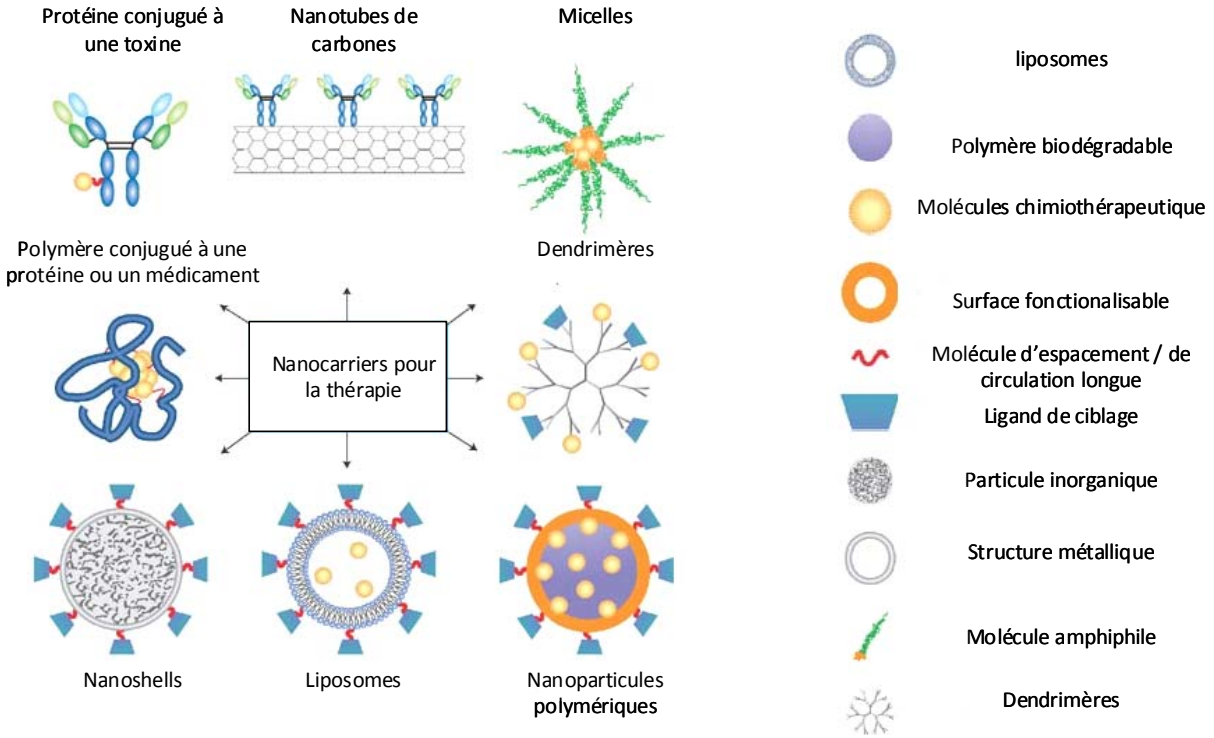


Figure 20: Schéma des différents types de nanoparticules existants et leur modalité de fonctionalisation.

Ainsi la vectorisation a pour objectif de protéger le principe actif de la dégradation et des interactions avec l'environnement avant d'atteindre le site d'action, de favoriser la biodistribution du principe actif au niveau du tissu cible par le franchissement des barrières biologiques et d'y améliorer sa libération ainsi que d'augmenter la distribution intracellulaire de la molécule.

Ces barrières sont d'ordre tissulaire (sang, épithélium, endothélium), cellulaire (matrice extracellulaire, membrane plasmique) et/ou subcellulaire (mitochondrie, noyau, endo-lysosome, réticulum). Les principes actifs peuvent être reconnus par le système immunitaire dans le sang, ce qui conduit à une élimination rapide. Par ailleurs, les membranes plasmiques des cellules, constituant les tissus, peuvent créer des liaisons appelées jonctions serrées ayant pour conséquence la faible perméabilité aux médicaments.

La diminution des effets secondaires, dûs aux traitements, passe donc par une spécialisation des vecteurs afin de délivrer le principe actif de façon préférentielle au site d'action. (Alonso 2004; Couvreur and Vauthier 2006). Les nanovecteurs peuvent être modifiés en surface pour leur conférer des propriétés de ciblages combinés à des capacités de franchissement des barrières tissulaires, cellulaires ou intracellulaires (par exemple accumulation mitochondriale ou nucléaire d'un principe actif).

Ainsi soit le vecteur fonctionnalisé peut s'accumuler par ciblage ciblage actif non seulement au niveau de la tumeur (ciblage au sein de l'organisme) mais également à proximité de la cible moléculaire choisie (ciblage cellulaire et subcellulaire). Les deux pouvant être combinés, non sans difficulté, puisque le produit de fonctionnalisation doit permettre de conférer différentes fonctionnalités. Dans ce sens, des vecteurs comme les polyconjugués dynamiques cumulent par exemple : propriétés de furtivité dans le sang (associées la présence de chaines de polyéthylèneglycol), propriétés de ciblage d'un type cellulaire particulier, l'hépatocyte (conférées par la présence de molécules ligand du récepteur du galactose), capacité d'échappement endo-lysosomal (conférée à la présence d'un agent endosomolytique masqué) et efficacité biologique (associée à la présence d'un principe actif, un siRNA) (Wolff and Rozema 2008). Alternativement, les propriétés du tissu tumoral peuvent permettre un ciblage passif des vecteurs natifs. L'intérêt d'un type de ciblage par rapport à un autre nécessite un savoir, au cas par cas, prenant en compte les proprités du vecteur et celles de la tumeur.

Parmis les nanovecteurs existants **(Figure 20)**, les principaux systèmes particulaires utilisés pour la vectorisation de médicaments vers les glioblastomes, sont les nanoparticules polymériques (Olivier *et al.* 2002; Kreuter 2004; Aktas *et al.* 2005), les micelles polymériques (Kabanov *et al.* 1992), les liposomes (Huwyler *et al.* 1996; Schnyder *et al.* 2004; Schnyder *et al.* 2005), les nanoparticules à cœur lipidique (Lockman *et al.* 2003).

- **Les nanocapsules lipidiques**

L'INSERM U646 a développé un système particulaire nanométrique utilisé pour l'administration de molécules lipophiles : les nanocapsules lipidiques (NCLs) (Heurtault *et al.* 2002). Ces NCLs sont composées d'un coeur huileux liquide constitué de triglycériques (Labrafac) entouré de surfactants non ioniques, des phospholipides (Lipoïd® S75-3) et des polymères amphiphiles (Solutol® HS15) constituant une coque solide. Ces excipients sont biocompatibles, approuvés par la FDA et sont formulés selon un procédé d'inversion de phase ne nécessitant pas de solvants **(Figure 21)**. Ces NCLs présentent de nombreux avantages. Selon la proportion d'excipients utilisés, la taille des NCLs peut varier de 20nm à 100nm, avec une répartition monodisperse. Il a été montré qu'elles peuvent encapsuler différents types de molécules anticancéreuses pour l'optimisation de thérapies anti-tumorales (Lacoeuille *et al.* 2007; Allard *et al.* 2008; Hureaux *et al.* 2009; Roger *et al.* 2009; Weyland *et al.*). Par exemple, il a été établi que les NCLs chargées en paclitaxel sont plus efficaces que le paclitaxel dans sa formulation classiquement disponible en clinique (Taxol®), augmentant la mort des cellules cancéreuses *in vitro* et réduisant l'expansion tumorale des gliomes implantés en sous cutané *in vivo*.

De plus, les composants des NCLs et notamment le Solutol®-HS15 peuvent interagir avec la P-gp, une pompe d'efflux surexprimée dans les cellules cancéreuses, qui résulte en une inhibition de la MDR dans les cellules de gliome en culture et implantées chez l'animal (Garcion *et al.* 2006). Il a été montré *in vitro,* dans des cellules de glioblastomes, que la taille des NCLs influence leur mode d'entrée dans les cellules. De plus, après internalisation, les NCLs peuvent échapper aux lysosomes afin de se retrouver dans le cytoplasme et y libérer le principe actif (Roger *et al.* 2009; Paillard *et al.* 2010; Weyland *et al.*).

L'encapsulation de fluorophores hydrophobes, comme le Nile red ou le DiI (Morille *et al.* 2010; Paillard *et al.* 2010) ou des complexes radioactifs (Allard *et al.* 2008; Paillard *et al.* 2010), permet d'assurer un suivi du devenir des NCLs *in vitro* et *in vivo*.

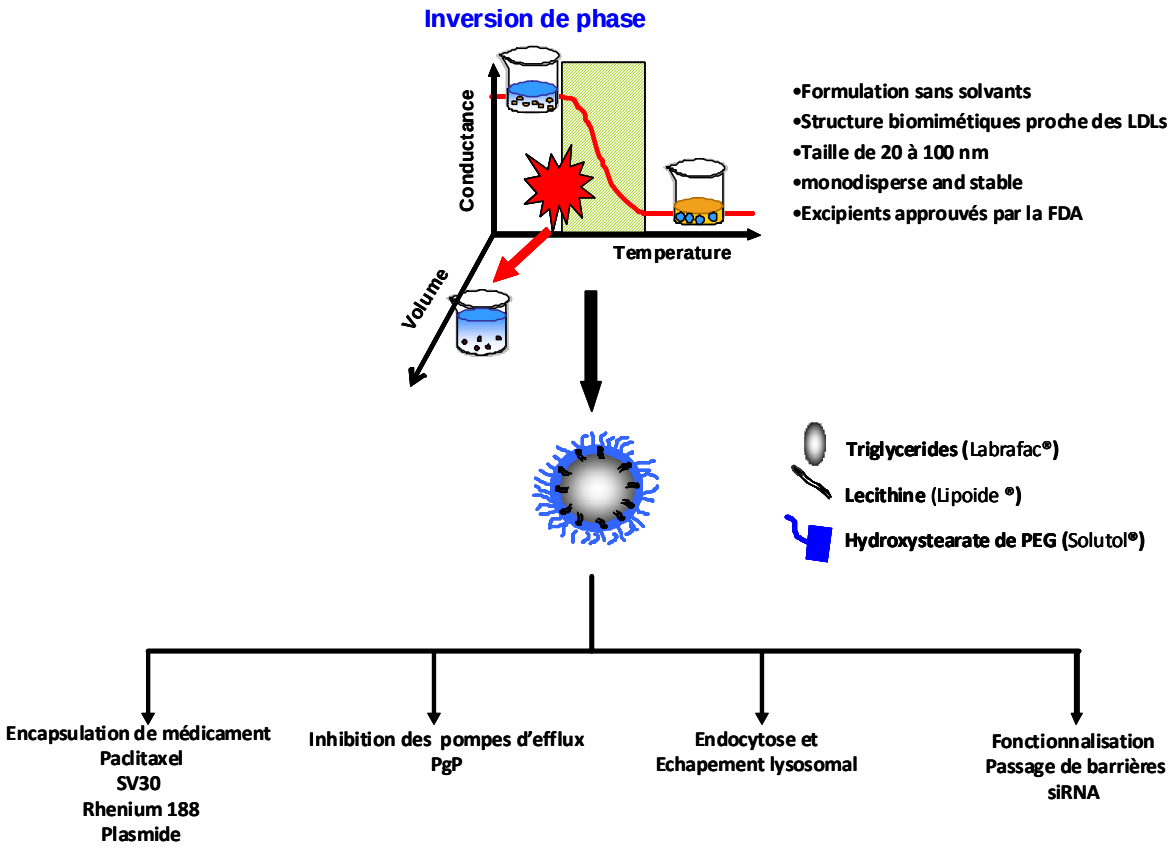


Figure 21 : Schéma présentant la fomulation des NCLs, leur structure et leurs avantages.

- **Le ciblage passif.**

Les molécules chimiothérapeutiques présentent un faible taux de rétention au niveau de la tumeur ayant pour conséquence l'augmentation des doses utilisées pour obtenir une activité au site de la tumeur. La vectorisation de principes actifs dans des systèmes nanométriques permet une accumulation passive des vecteurs dans les tissus tumoraux.

Les tumeurs présentent un taux de néoangiogenèse élevé. Cette création de nouveaux vaisseaux à partir de la vascularisation préexistante, conduit à la formation d'une tubulure sanguine discontinue présentant des fenestrations **(Figure 22A)**. Ces imperfections ont pour conséquence une extravasation préférentielle des nanovecteurs d'une taille inférieure à 400nm

qui conduit à leur accumulation, appelée effet EPR (enhanced retention permeability) (Matsumura and Maeda 1986; Yuan *et al.* 1995). L'effet EPR a été observé dans des tumeurs humaines telles que les tumeurs du cerveau, les cancers du foie du rein et du poumon (Maeda *et al.* 2000). Par ailleurs, la déficience du drainage lymphatique engendre une rétention de ces vecteurs au niveau de la tumeur (Maeda and Matsumura 1989) **(Figure 22A)**.

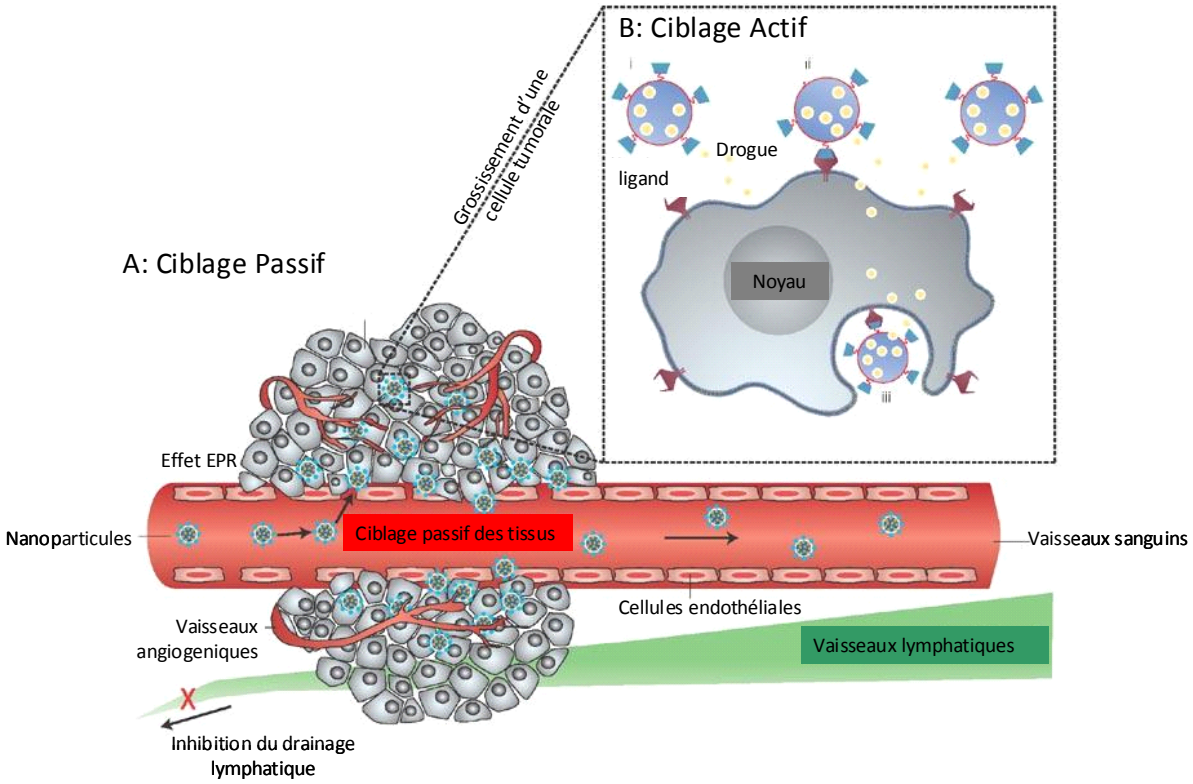


Figure 22 : Représentation schématique du ciblage passif et du ciblage actif par les nanovecteurs d'après (Peer *et al.* 2007).

Le temps de circulation de nanoparticules dans le sang est un paramètre important à prendre en compte dans le cadre du ciblage passif. L'ajout de longues chaines de poly(éthylène glycol) (PEG) de 2000 ou 5000 Da dans la coque des NCLs a permis d'augmenter le temps de demi-vie sanguine des NCLs. Ainsi, après injection des NCLs chez des rats, près de 50% de la dose injectée est retrouvée 8 heures après injection (Hoarau *et al.* 2004). En revanche les liposomes natifs ont une demi-vie pouvant aller de quelques minutes à quelques heures. Après injection dans des souris atteintes de tumeurs, l'augmentation du

temps de circulation sanguine a été corrélée à un accroissement de l'accumulation des liposomes au niveau de la tumeur (Gabizon *et al.* 1994). Si l'effet EPR peut effectivement améliorer l'accumulation passive d'un principe actif sur le site tumoral, il se heurte ensuite au problème de la pression interstitielle augmentée dans le cas des tumeurs solides qui donc cette fois s'oppose à ce que le principe actif atteigne sa cible cellulaire (Goetz *et al.* 2003; Jain *et al.* 2007).

Par ailleurs, une étude sur l'efficacité et l'encapsulation dans des NCLs, d'un analogue de la molécule pro-apoptotic HA14-1, SV30, a démontré le ciblage passif des NCLs vers les mitochondries et une affinité augmentée pour cette organelle grâce au principe actif vectorisé. (Weyland *et al.* 2010). Le sens de ce travail démontre que la simple charge en principe actif du nanovecteur peut modifier précisément sa distribution et ses affinités biologiques et que par conséquent, le comportement d'un vecteur libre ne préjuge pas de celui d'un vecteur chargé. Par ailleurs, l'agent de thérapie peut lui aussi conférer une possibilité de ciblage qui n'est donc plus le fait d'une accumulation passive mais celui d'une reconnaissance ou d'une prise en charge spécifique par les mécanismes biologiques, comme ici un routage subcellulaire orienté de la NCL.

2.3. Le ciblage actif

Le ciblage passif est un mécanisme qui bénéficie des propriétés physiologiques des tumeurs. Au contraire, le ciblage actif implique la liaison de ligand à la surface des vecteurs. Le vecteur fonctionnalisé est capable de s'accrocher à une protéine ou un récepteur membranaire exprimé specifiquement sur les cellules cibles, afin d'être internaliser et de libérer le médicament à l'interieur de la cellule tumorale **(Figure)**. Les nanocapsules lipidiques peuvent être fonctinalisées. Le procédé de post-insertion peut être utilisé pour insérer des chaines de distearoylphosphatidylethanolamine–PEG_{2000}–maleimide (DSPE–PEG_{2000}) bifonctionnel (Perrier *et al.* 2010). La fonction DSPE s'encre dans la coque des NCLs. L'autre extrémité de la chaine de PEG peut contenir une fonction capable de réagir avec un peptide ou une protéine.

Les NCLs ont ainsi pu être utilisées dans une stratégie de passage de la barrière hématoencéphalique pour traiter les tumeurs cérébrales. La BHE isole le système nerveux central du reste de la circulation sanguine. Ainsi, très peu de molécules sont capables de la traverser afin d'atteindre le parenchyme cérébrale. Le ciblage des cellules de la BHE, pour

induire une transcytose des vecteurs vers le cerveau, a donc été envisagé. L'anticorps OX26 reconnaît spécifiquement le récepteur de la transferrine exprimé à la surface de cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Friden *et al.* 1991; Pardridge *et al.* 1991). Après thiolation de l'anticorps OX26 sur les sucres de l'immunoglobuline, une liaison thioester peut être créée entre l'OX26 et le DSPE–PEG_{2000}–maleimide après post-insertion de celui-ci dans les NCLs (Beduneau *et al.* 2006; Beduneau *et al.* 2007). L'injection systémique de ces NCL-OX26 contenant un traceur radioactif, le ^{188}Rhenium, chez des rats sains a permis d'augmenter de 1,5 à 2 fois la quantité de ^{188}Rhenuim accumulée au niveau du cerveau 24 heures après l'injection des NCLs-OX26, comparé aux NCLs natives (Beduneau *et al.* 2008).

3. Ciblage des cellules souches cancéreuses

Peu d'études ont été réalisées sur le développement de molécules ciblant spécifiquement des voies de signalisation des CSCs. Cependant, il a été mis en évidence que les voies de signalisation,Wnt, Notch et Shh toutes les trois impliquées dans la régulation de la différenctiation et la prolifération des cellules souches (Dontu *et al.* 2004; Lowry *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006), sont nécessaires à la survie des CSCs.

Il a été montré que la voie de signalisation Wnt est exprimée de façon sélective dans des CSCs de cancer du colon et favorise leur maintien et leur prolifération (Kanwar *et al.* 2010). De plus, la sur-expression de la voie Wnt favoriserait la tolérance des dommages causés à l'ADN par les radiations ionisantes dans les CSCs issues de tumeurs mammaires conduisant ainsi à leur survie (Eyler and Rich 2008) à une transformation de cellules souches en cellules néoplasiques (Shiras *et al.* 2007). Par ailleurs, l'inhibition des voies Shh et Notch dans des lignées de cellules de glioblastomes U87MG conduit à une sensisibilité accrue des CSCs CD133-positives au témozolimide (Ulasov *et al.*).

Ces trois voies de signalisation sont donc des cibles importantes pour la mise en place d'une thérapie ciblée contre les CSCs. Des molécules, dirigées spécifiquement contre ces voies de signalisation, sont actuellement en court de développement (Morrison *et al.* 2011) **(Figure 23)**.

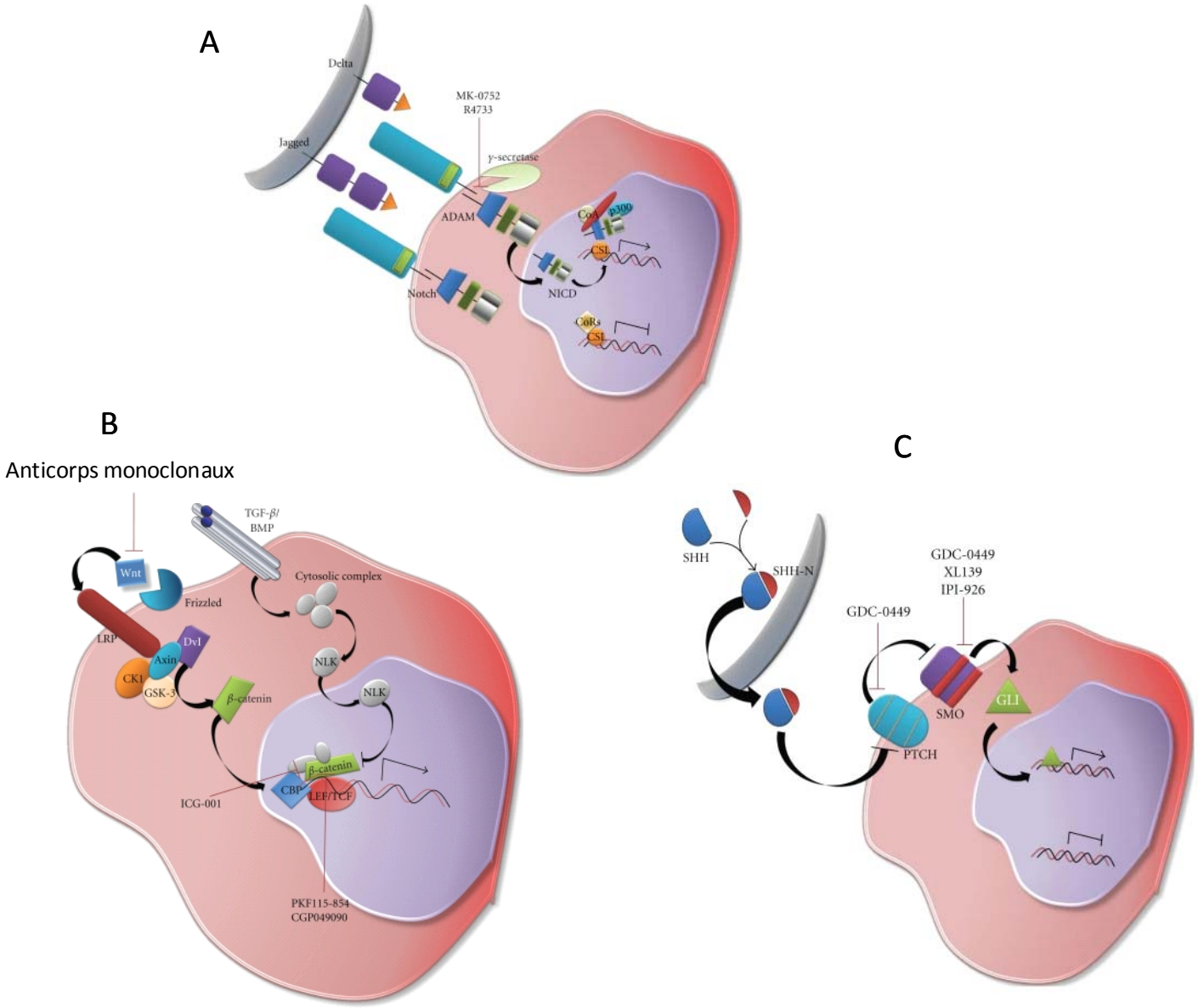


Figure 23: Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la survie des CSCs et les molécules inhibitrices de ces voies en cours de développement d'après (Morrison *et al.* 2011)

Par ailleur, des systèmes de ciblages sont en développement pour cibler les cellules souches cancéreuses CD133-positives.

L'incubation de l'anticorps AC133, couplé à la monométhyl auristatine F (MMAF), un agent antimitotique, par une liaison sensible aux protéases, inhibe la prolifération cellulaire de lignées humaines d'hépatocarcinome et de cancer gastrique et conduit à une activation des caspases (protéines impliquées dans l'initiation des mécanismes de l'apoptose), par rapport à la même molécule couplée à un anticorps irrelevant. Le ciblage d'AC133 dans des modèles de xénogreffes de tumeurs du foie injectées en sous cutané chez la souris immundéprimé, conduit à un ralentissement significatif de la croissance tumorale après traitement par l'Anticorps conjugé à la MMAF injecté en intrapéritonéal (Smith *et al.* 2008).

Un anticorps dirigé contre CD133 a également été utilisé pour fonctionnaliser des nanotubes de carbones afin d'éliminer les CSCs de glioblastome par photothermolyse. Les résultats obtenus montrent une inhibition de la capacité d'autorenouvellement des cellules CD133-positives ainsi qu'une sensibilité accrue à la photothermolyse comparées aux cellules CD133-négative, après traitement avec les nanotubes de carbones fonctionnalisés avec l'anticorps dirigé contre CD133. le traitement local de glioblastomes xenogreffés issus de cellules CD133-positives injectées sous cutané par les nanotubes de carbones fonctionnalisés, couplés une irradiation avec un laser infra-rouge conduit à une inhibition de la croissance tumorale (Wang *et al.* 2010).

Enfin l'équipe de Zhu et al. a utilisé la technique du « phage diplay » pour isoler un anticorps reconnaissant CD133. La technique du Phage display permet de sélectionner des anticorps monoclonaux après avoir transformé des bactériophages avec les séquences codant pour une immunoglobuline ; ces immunoglobulines sont exprimées à la surface des bactériophages et peuvent ensuite être sélectionnées pour leur potentiel de reconnaissance d'un antigène. Ainsi un nouvel anticorps reconnaissant CD133 a pu être isolé. L'étude de cet anticorps sur des CSCs de glioblastome humain a permis de mettre en évidence une activité d'inhibition des propriétés d'autorenouvellement des CSCs (Zhu *et al.* 2010). Cette étude démontre la possibilité de l'utilisation de la méthode du phage display pour développer des anticorps thérapeutiques dirigés contre les CSCs.

RESULTATS

I. L'exposition de cellules de glioblastomes humains à une pression en oxygène non physiologique modifie leur expansion *in vitro* et leur agressivité *in vivo* au regard de l'expression d'AC133.

Les propriétés des CSCs et l'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses AC133 sont régulées par des éléments constitutifs du micro-environnement et notamment à la pO_2. En effet l'hypoxie est un régulateur majeur des CSCs et du marqueur AC133. Il a été montré sur des coupes de glioblastomes issues d'exérèse que l'expression d'AC133 est principalement localisée dans des zones hypoxiques (Pistollato *et al.* 2010). De plus, une faible pression en oxygène est impliqué dans le maintien des propriétés souches des CSCs (Li *et al.* 2009; Bar *et al.* 2010) et le maintien de l'expression d'AC133 *in vitro* (Platet *et al.* 2007).

Nous avons donc étudié la régulation d'AC133 en réponse à la pO_2 afin de comprendre si AC133 est un marqueur de cellules initiatrices de cancer, d'agressivité tumorale ou d'hypoxie. Dans ce but, nous avons cultivé des cellules de glioblastomes primaires issues d'exérèse de tumeurs de patients effectuées aux CHU d'Angers et Grenoble à 3% ou 21% d'O_2.

Les cellules de glioblastomes sont généralement cultivées à 21% d'O_2. Or, dans le cerveau, la pression en oxygène est inférieure à 5% (Csete 2005). Nous avons donc étudié l'effet du maintien des cellules sous une faible pO_2 chronique et évalué l'expression d'AC133 et l'agressivité tumorale. Comme le sérum entraîne une différenciation des CSCs (Lee *et al.* 2006), la pression en oxygène pourrait avoir un impact sur le maintien des cellules AC133-positives en culture et la capacité des cellules de glioblastomes à initier des tumeurs.

Par ailleurs, l'étude de la tumorigénicité de cellules AC133-positives isolées par tri cellulaire, ne tient pas compte des interactions qui pourraient se produire entre cellules AC133-positives et négatives qui pourrait potentialiser leur aggressivité (Garcion *et al.* 2008). C'est pour cela que, dans ce premier article, nous avons analysé l'effet de la pO_2 sur des populations non triées de cellules issues de glioblastomes.

Non-physiological oxygen tension alters subsequent in vitro expansion and in vivo aggressiveness of human glioblastoma cells with regard to AC133 expression.

Erika Bourseau-Guilmain [a], Laurent Lemaire [a], Audrey Griveau [a], Eric Hervouet [d], François Vallette [d], François Berger [b], Philippe Menei [a,c], Jean-Pierre Benoit [a], Didier Wion [b], and Emmanuel Garcion [a, ✉]

[a] Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, Inserm, UMR_S 646, Université d'Angers, Angers (France)

[b] Institut des Neurosciences, Inserm, UMR_S 836, Université Joseph Fourier, Grenoble (France)

[c] **Département de Neurochirurgie, CHU, Angers (France)**

[d] Centre de Recherche en Cancérologie (CRCNA), Inserm, UMR_S 892, Université de Nantes, Nantes (France)

Running title: Oxygen tension and glioblastoma phenotypes

Keywords: Glioblastoma, CD133, Tumor niche, Cancer stem cell culture, HIF-1α.

✉Corresponding author: Emmanuel Garcion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm U646, IBS – CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France. Tel.: +33 2 44 68 85 43; Fax: +33 2 44 68 85 46; E-mail: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

Abstract

Among markers of glioblastoma initiating cells, AC133 was associated with glioblastoma resistance and malignancy. Recently, it was demonstrated that increasing oxygen tension (pO_2) down-regulated AC133 expression in glioblastoma cells *in vitro*. In order to better understand extrinsic factor regulation of AC133, this work aimed to investigate the relationship between cell culture pO_2, AC133 expression, and tumor development and phenotype. Using treatments with $CoCl_2$ and shRNA knockdowns on non-sorted human primary glioblastoma cells cultured at low (3%) versus high (21%) oxygen tension, we established a responsibility for low pO_2 in the maintenance of high levels of AC133 expression, with a major but non-exclusive role for HIF-1alpha. We also demonstrated that human glioblastoma cells previously cultured under high oxygen tension can lose part of their aggressiveness when orthotopically engrafted in SCID mice or lead to tumors with distinct phenotypes and no re-expression of AC133. These observations showed that the specific pO_2 microenvironment irreversibly impacts glioblastoma cell phenotypes, highlighting the pertinence of culture conditions when extrapolating data from xenogenic models to human cells in their source environment. They also raised AC133 as a marker of non-exposure to oxygenated areas rather than a marker of aggressiveness or low pO_2 niches.

196 words

Introduction

Central nervous system glioblastomas are among the most aggressive and treatment-resistant cancers. The recent discovery of self-renewing and uniquely tumorigenic brain tumor stem cells (BTSCs) [1-4], also referred to as brain cancer initiating cells, points to the presumption that this cancer stem cell subpopulation intrinsically resistant to radio and chemotherapeutic treatments might be responsible for the phenotypical derivation of tumors and their recurrence.

Instead of specific markers, makers shared with cancer stem cells [5, 6] and BTSCs, such as AC133 [2], CD15 [7], and CD171 [8], have been documented. Among these, AC133, an epitope of the CD133 protein, which is itself a pentaspan glycoprotein identified firstly on hematopoietic stem cells, is the best known [9-12]. *In vitro*, in the presence of EGF, FGF-2, and heparin, AC133 expressing cells isolated from human glioblastoma regenerate, form neurosphere-like colonies and are capable of generating cells that express markers of differentiated neural cells [2]. In xenograft models using immunodepleted mice, they lead to cancers that are phenotypically similar to the original tumors [2]. AC133-positive cancer cells are also particularly resistant to radiotherapy [13] and TRAIL-mediated apoptosis [14]. In addition, these cells are capable of promoting tumor neovascularization by producing VEGF [15]. Finally, AC133 overexpression in human gliomas is associated with poor clinical outcome [16].

Although these findings are in line with the relevance of developing targeted strategies against BTSCs in glioblastomas through AC133 recognition, other observations argue for a more complex reality. Indeed, while less tumorigenic than their AC133-positive counterparts [3], AC133-negative cells can lead to tumors with a distinct phenotype [17]. Moreover, the occurrence of BTSCs does not exclude the existence of cellular networks in which individually non-tumorigenic CD133- cell populations might cooperate to produce tumors [18].

In addition, the tissue microenvironment might exert pivotal effects for tumor development [18, 19], and extrinsic cell modulators may drive the expression of intrinsic markers.

In line with this, AC133 expression in glioblastoma has been associated either with anatomical while not necessarily functional perivascular niches [20] or hypoxic pseudopalissading necrotic regions [21, 22]. Thus, it is not yet understood whether AC133 incidence in those areas is due to improved survival of AC133-positive cells or positive regulation of AC133 expression. As oxygen is involved in the stem cell behavior [23] and tumor aggressiveness of human glioblastoma [24], it is important to consider its role on AC133 expression and AC133-positive BTSCs' performance. As such, it has recently been demonstrated that exposure to low oxygen tension (pO_2) allows for maintenance of the AC133 phenotype of non-sorted human glioblastoma cells *in vitro* [25]. In addition, sorted AC133-positive human glioblastoma cells preserve their stem cell phenotype under low oxygen tension *in vitro* [26].

Nonetheless, these studies did not address how cell culture pO_2 might affect the AC133 phenotype and the behavior of cancer cells following implantation in animals. In our study, we demonstrate that xenogenic experimental tumors, obtained from human glioblastoma cells cultured either at 3% or 21% O_2, can significantly differ. In this context, we investigate whether AC133 is an indicator of low oxygen tension or of tumor aggressiveness. Finally, we discuss our data regarding the relevance of biopsy-derived models for functional investigations or for therapeutic targeting purposes.

Materials and methods

Patient tissue samples and human glioma cell cultures

Specimens from patients undergoing biopsy for *de novo* glioma were obtained from the Department of Neurosurgery of the Angers CHU (France), and from the Department of Neurosurgery of the Grenoble CHU (France), with institutional review board approvals. Pathologic diagnosis established that GlioA, GlioB, and GlioC tumor samples were Grade IV WHO glioblastomas. Straight after tissue dissociation as previously described [25], cells were plated on uncoated plastic flasks at 2 x 10^4/mL of defined medium and cultured at 37°C under an atmosphere containing 5% CO_2 and either 3% or 21% O_2. GlioA and GlioB were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Biowhittaker, Verviers, Belgium) added with Glutamax, B27 and N2 supplements (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), recombinant human EGF and FGF-2 (30 ng/ mL each, R&D Systems Europe, Lille, France), and heparin (5 µg/ mL, Sigma Aldrich, Lyon, France). GlioC were cultures in Neurobasal A (Invitrogen) added with Glutamax, B27 and N2 supplements, recombinant human EGF and FGF-2 (20 ng/ mL each), and heparin (5 µg/ mL). Growth factors and supplements were added every 3 days for a period of 10 to 15 days, until new dissociations with Versene (Lonza, Levallois-Perret, France) and re-plating following initial culture setting. Under these permanent conditions, cells grew and were maintained as floating neurosphere-like colonies.

AC133 labeling and flow cytometry

Glioma cells exposed to different oxygen tensions were collected and dissociated using Versene (Lonza). A total of 1.5 x 10^5 cells were incubated with 5µg/mL AC133

antibody (Miltenyi Biotech, Paris, France) or IgG1 isotype control (BD-Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 1 hour at 4°C in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Cells were then washed three times in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, and incubated for 30 minutes at 4°C with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG $F(ab')_2$ fragment polyclonal antibody (Dakocytomation, Trappes, France) at 20µg/mL in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Following three more washes in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, cells were re-suspended in PBS containing 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide. A BD FACSCalibur™ fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest™ software (BD-Biosciences) were used in order to proceed to flow cytometry acquisition. Analysis was carried out using WinMDI 2.9 software (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA).

Treatment of human glioma cells with cobalt dichloride ($CoCl_2$)

GlioA, GlioB, and GlioC human glioblastoma cells were dissociated in Versene (Lonza). They were then plated at 37.5 x 10^5 cells per mL in the aforementioned media and incubated in the presence of vehicle alone (PBS) or 100 to 150 µM $CoCl_2$ for 24 h at 37°C under 5% CO_2 and 3% O_2.

shRNA knockdown

Glioblastoma cells were stably transfected using control transduction particles (SHC001V) or shRNA transduction particles expressing siRNA against HIF-1α (IDs: TRCN0000003810, TRCN0000003811 and TRCN0000010819), according to the manufacturer's instructions (MISSION\ pLKO.1-puro lentiviral particles, Sigma-Aldrich). Cells were seeded at 5 x 10^3 in 96-well plates in supplemented Neurobasal medium, and

infected with a multiplicity of infection of 2. Puromycine (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) selected infected cells.

Q-PCR

Q-PCR analyses were carried out using a Chromo 4™ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and SYBR Green detection (iQ-SYBR Supermix, Bio-Rad). Primers were designed using Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/). The ΔCt method was retained for quantification, and multiple genes were used for normalization, as previously described [27].

Orthotopic xenograft assays

GlioA and GlioB human glioblastoma cells, grown at 3% or 21% O_2, were dissociated in Versene, washed, and resuspended at 50 000 cells in 5µl Eagle Minimum Essential Medium (EMEM, Biowhittaker). SCID female mice (Charles River) were anesthetized using xylazine (50 µg/ g) (Rompun®, Bayer, Puteaux, France) and Ketamine (10 µg/ g) (Clorketam®, Vétoquinol, Lure, France). Stereotactic implantation of the 5µl cell suspension was carried out into the right striatum using a Hamilton syringe and a 32-gauge needle at the following coordinates: 0.5mm anterior from Bregma, 2mm lateral from the saggital suture, and 3 mm below dura. Cells were injected progressively over 2.5 minutes, followed by 5 minutes of waiting, and progressive needle removal from brain over 6 minutes. MRI was used to monitor tumor growth. The Kaplan–Meier method was used to plot animal survival. Animal care was carried out in line with relevant European Community regulations (Official Journal of European Community L358 12/18/1986).

Magnetic Resonance Imaging

Experiments were performed with a Bruker Avance DRX 300 (Bruker, Wiessembourg, France), equipped with a vertical super wide bore magnet and shielded gradient insert. The resonant circuit of the nuclear magnetic resonance (NMR) probe was a 38mm diameter birdcage. Rectal temperature was maintained at 37°C by using a feedback-regulated heating pad. Brain lesion evolution was assessed using T2-weighted images obtained using a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) (TR = 2000 ms; effective echo time = 31.7 ms; RARE factor = 8; FOV = 2.5 x 2.5cm; matrix 128 x 128; nine contiguous slices of 1.2mm, four averages). In order to improve tumor detection, FLAIR imaging was performed using a 600ms inversion pulse prior to the RARE pattern, providing enough time to allow for the annulling of the normal parenchyma and therefore tumor detection.

Immunohistochemistry

Brains from xenotransplanted mice were surgically removed, snap frozen in isopentane cooled at -35°C with liquid nitrogen, and stored at -80°C before 10µm transverse sections of anterior brain were made using a Cryocut 3000 (Leica, Rueil-Malmaison, France). After at least 24 hours storage at -20°C and 30 minutes drying at room temperature, slides were fixed in -20°C cold methanol for 10 minutes. Sections were then blocked with 10% normal goat serum in PBS added with 4% bovine serum albumine for 30 minutes at room temperature. Primary antibodies against CD133 (clone AC133 and clone 293C3 both from Miltenyi Biotech) and the corresponding negative isotype controls (mouse IgG1κ and mouse IgG2b, both from BD Biosciences) were diluted in PBS containing 4% BSA and used at 5µg/ml. They were applied overnight at 4°C. After washes in PBS, a secondary biotinylated

goat anti-mouse IgG antibody (Vector laboratories, Burlingame, USA) diluted in PBS containing 4% BSA was applied at 15µg/ml for 45 minutes at room temperature. After additional washes in PBS, Alexa Fluor® 488 streptavidine conjugates (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were applied in the dark at 4µg/ml for 45 minutes. Finally, labeled sections were washed three times with PBS before mounting in fluorescent mounting medium from Dakocytomation. All slides were examined under an Axioskop-2 Zeiss fluorescence microscope (Le Pecq, France). Images were acquired through a Photometrics CoolSNAP ES camera equipped with a QImaging CRI Micro Color 2 RGB Liquid Crystal filter and by using the MetaVue™ imaging system (all from Roper Scientific, Evry, France).

Statistical analysis

XLSTAT 2006 Version 2006.3 (Addinsoft Paris, France) was used for data analysis. Statistical significance for each experiment was determined by a Dunnett's test. Alternatively, the Gehan-Wilcoxon and the Mann and Whitney nonparametric tests were used. The tests were considered as significant with p values of less than 0.05.

Results

Oxygen tension impacts the AC133 phenotype of human glioma cells *in vitro*

To determine the effect of oxygen pressure on AC133 expression in human glioblastoma cell lines, GlioA, GlioB, and GlioC were cultured either at 3% O_2 or 21% O_2. High expression of AC133 was found in all cell types when maintained at low oxygen tension (from initial suspensions to at least passage 30). As such, at matching cell passages flow cytometry analysis revealed that the percentage of AC133-positive cells was improved from the 3% to the 21% O_2 condition **(Figure 1)**. Quantifications of geomean fluorescence intensity further indicated a mean reduction of AC133 expression per cell up to 99% between 21% and 3% O_2 **(Table 1)**.

	GMFI at 3% O_2 (arbitrary units)	GMFI at 21% O_2 (arbitrary units)	Mean variation of AC133 expression per cell
GlioA (passage 21)	77.42 ± 0.15	1.03 ± 0.25	- 98.7%
GlioB (passage 14)	16.70 ± 0.56	2.08 ± 0.15	- 87.6%
GlioC (passage 11)	52.07 ± 1.59	0.65 ± 0.17	- 98.7%

Table 1: Glioblastoma cells cultured at low pO_2 expressed improve levels of AC133 than when cultured at high pO_2. GlioA, GlioB, and GlioC glioblastoma primary cells were cultured at 3% or 21% O_2 and analyzed for AC133 expression using the anti-AC133 monoclonal antibody (AC133) or an IgG1κ isotype control (IgG1κ). FITC fluorescence revealed after application of the corresponding secondary antibody was expressed in geometric mean fluorescence intensity (GMFI) arbitrary units. Mean variation of AC133 expression per cell was calculated according to GMFI obtained at 3% versus 21% O_2.

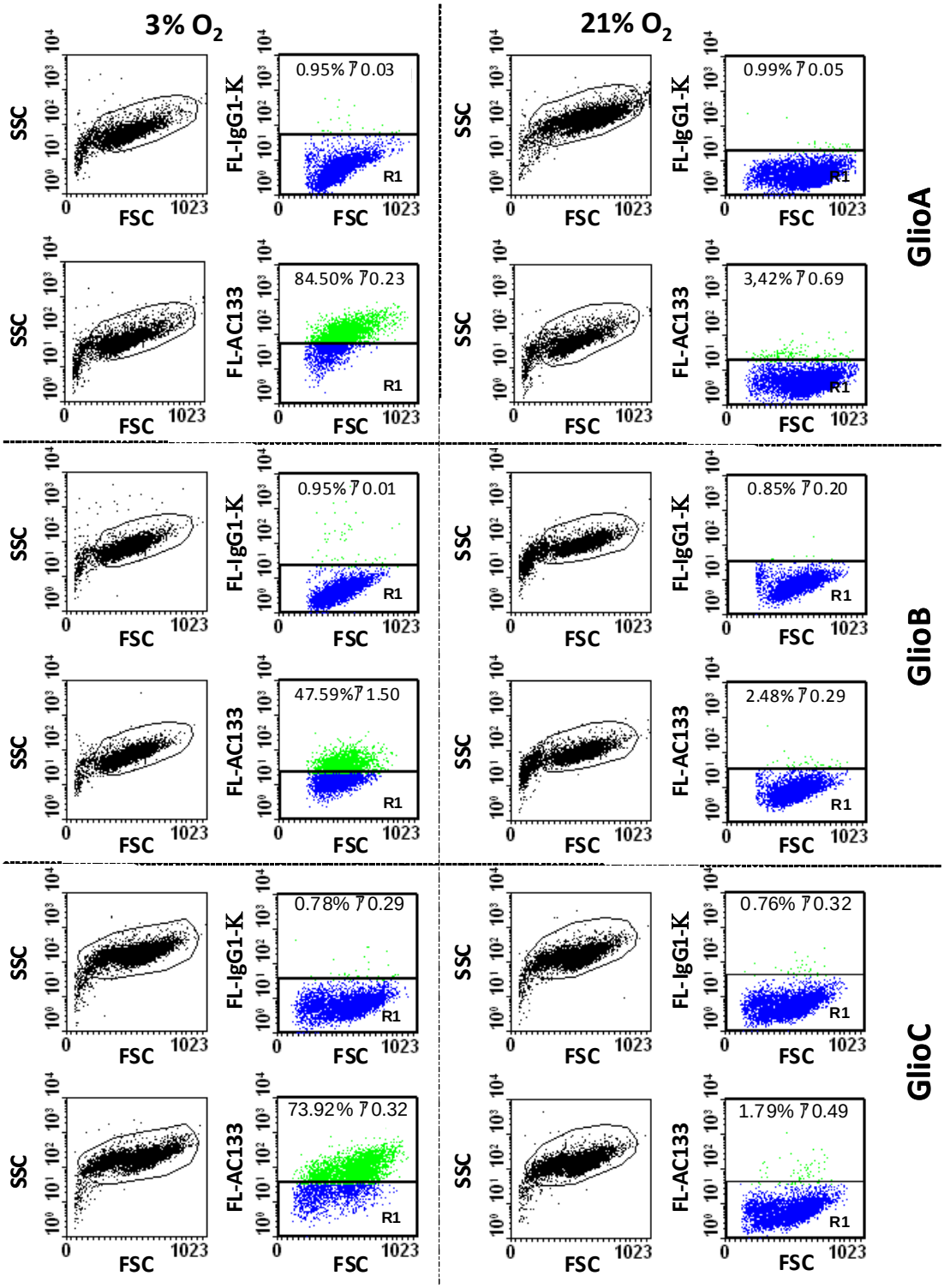


Figure 1: Greater percentage of AC133 positive cells are obtained in glioblastoma cells cultured at low pO_2. GlioA, GlioB, and GlioC glioblastoma primary cells were cultured at 3% or 21% O_2 and analyzed for AC133 expression using the anti-AC133 monoclonal antibody (AC133) or an IgG1κ isotype control (IgG1κ). FITC fluorescence revealed after application of the corresponding secondary antibody was expressed in geometric mean arbitrary units. FSC represented the forward scattering. Indicated percentages represented relative cell numbers that were up to the gated isotype control cells reported on each panel (gate R1). Dot plot profiles illustrated a representative experiment of at least a triplicate, at passage 21 (GlioA), passage 14 (GlioB) and passage 11 (GlioC) at 3 or 21% O_2.

A role for HIF-1α in the regulation of AC133 expression

Having established a role for oxygen tension in the regulation of AC133, we next investigated whether HIF-1α, a major transcription factor regulated by oxygen tension, was involved in this effect. HIF-1α has been described to be over-expressed in various cancers including gliomas [28]. It heterodimerizes with constitutively expressed subunit HIF-1β to form HIF-1, a basic helix-loop-helix structure that regulates the transcription by specifically recognizing a short consensus HRE (Hypoxia Responsive Element) sequence in the promoter of hypoxia responsive genes. HRE sequence is characterized by the presence of a consensus core CGTG found in all known HIF-1α–responsive promoters [29]. A multiple sequence alignment ClustalW2 program revealed that the consensus core was present in all CD133 promoters from P1 to P5. Interestingly, the analysis showed that a sequence of 12 nucleotides present in P5 (known to be functional in stem cells) TA**CGTG**CTCTGG-nucleotides 5416-542 matched perfectly with that present in the [+656/+667] HRE sequence of the human IGFBP-1 gene [30]. Hence, this sequence represents a potential target for the binding of HIF-1 in glioblastoma cells.

To determine the potential influence of HIF on regulating the expression of AC133, cobalt chloride ($CoCl_2$), which inhibits the degradation of HIF [31], and the shRNA knockdown strategy against HIF-1α were used. As HIF-1α stabilization has been shown to increase from moderate to severe hypoxia while not induced under ambient air [32], in order to try getting its level maximal, the hypoxia-mimetic $CoCl_2$ was used already from the 3% O_2 condition. When GlioA cells were incubated for 24 h with 100 or 150μM of $CoCl_2$ in low pO_2 conditions, no significant change was observed in AC133 expression as compared to control culture (Figure 2). In contrast, $CoCl_2$ treatment increased the expression of AC133 in GlioB and GlioC (+36% to 41% for GlioB and +41% to 56% for GlioC) **(Figure 2)**.

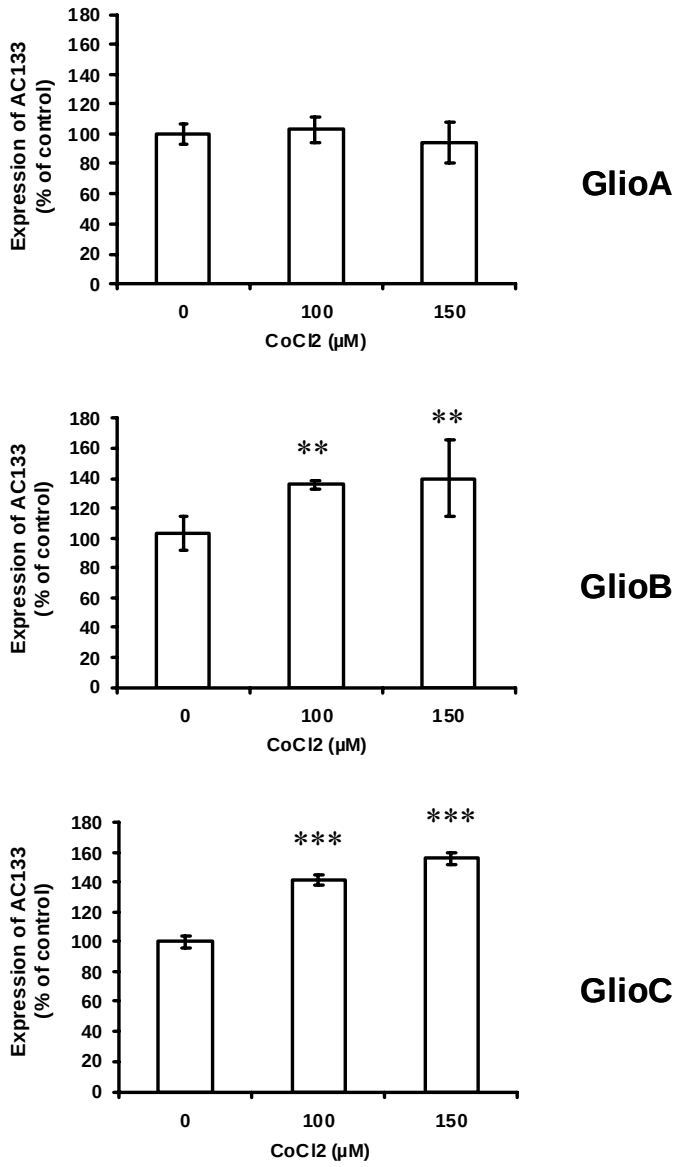


Figure 2: AC133 expression was up-regulated by $CoCl_2$ treatment in glioblastoma cells. GlioA, GlioB, and GlioC primary human glioblastoma cells cultured at 3% O_2 were incubated with 0µM, 100µM, and 150µM $CoCl_2$ for 24 h and then analyzed for AC133 expression by flow cytometry. Results are expressed as percentage of control, representing the geomean fluorescence intensity levels obtained after immunostaining of AC133 for cells treated with vehicle alone. Results represent mean±s.e.m. of three independent experiments. Dunnett's test: $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$

We further address the impact of HIF-1α inhibition on $CoCl_2$ responding glioblastoma cell types. Transcriptional down-regulation of HIF-1α mRNA with a lentiviral shRNA-based system performed on GlioB (knockdown efficency of ~80% **(Figure 3A)** and GlioC (knockdown efficiency of ~ 65% (Figure 3A) was associated with a 80-90% reduction in AC133 expression for GlioB, but had no impact on AC133 expression for GlioC **(Figure 3B)**.

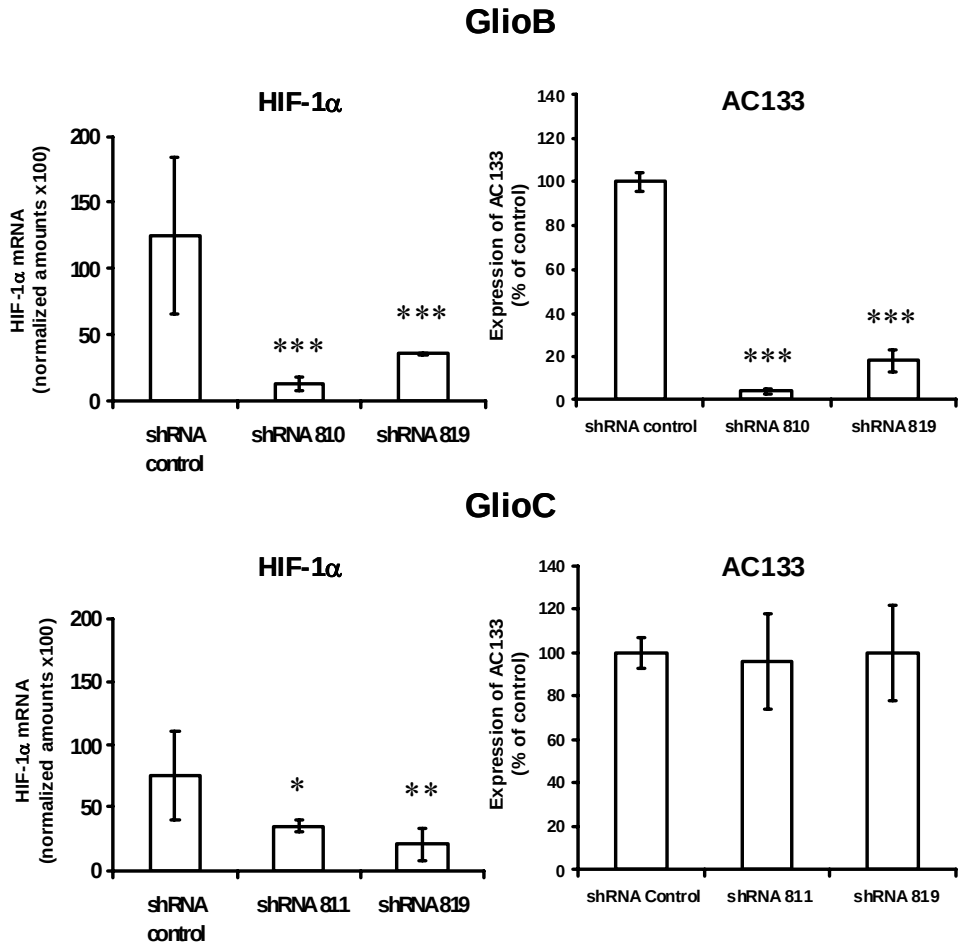


Figure 3: HIF-1α knockdown led to a reduced AC133 expression at 3% O_2 in GlioB cells but not in GlioC. Left panels showed that transfection of GlioB and GlioC cells with specific shRNA against HIF-1α RNA (810, 811 or 819) conducted to a decrease in HIF-1α mRNA levels when compared with irrelevant shRNA control as determined by RT-qPCR. Results are expressed in normalized amounts as indicated in the materials and methods section. Right panels established that while knockdown of HIF-1α resulted in dramatic inhibition of AC133 expression in GlioB as assessed by flow cytometry, no effect was observed in GlioC. Results are expressed as percentage of control, representing the geomean fluorescence intensity levels obtained after immunostaining of AC133 for cells treated with shRNA control. They also represent mean±s.e.m. of three independent experiments. Dunnett's test: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

Human glioma cells exposed to different oxygen tensions *in vitro* do not behave equally following orthotopic transplantation in immunodepleted mice

Having established a role for oxygen tension and HIF-1α in regulating AC133 *in vitro*, we wished to further address whether tumor development and AC133 expression were affected by the expansion of human glioblastoma cells under different oxygen tension culture conditions. For this purpose, we focused on the cell types for which tumors were detected

through MRI monitoring within 3 months after stereotactic injection of glioblastoma cells in the right striatum of immunodepleted mice, namely GlioA and GlioB **(Figure 4)**. Kaplan-Meyer curves shown in Figure 4A revealed that GlioA cell cultures under 3% O_2 were more aggressive than GlioA cells cultured under 21% O_2. In contrast, no significant differences in Kaplan-Meier curves were observed on GlioB. However, tumors caused by the implantation of GlioA cultured under 3% O_2 prior to injection were detected earlier than the tumors arising from GlioA cultured under 21% O_2 **(figure 4 B)**. Indeed, mice injected with the cells cultured at 3% developed a detectable tumor within 3 months post-injection (average tumor size 32 ± 8µl [n=8]), whereas a similar size was observed 5 months post-injection of GlioA cells initially cultured at 21% O_2.

Interestingly, although no differences were observed on Kaplan-Meier curves, GlioB cultured at 21% *vs*. 3% O_2 appeared to differ on MRI images. When GlioB cells were cultured *in vitro* at 21% O_2 prior injection, brain tumor occurred within 2 months (average tumor size 23 ± 13µl [n=8]), whereas injection of cells cultured at 3% O_2 reached such a size after 3 months (average tumor size 34 ± 21µl [n=6]) **(Figure 4B)**. Examined together, this data indicates that culture conditions are likely to exhibit a real impact on tumor aggressiveness *in vivo*, underlying the fact that the choice of culture parameters can modulate cell behavior in *vivo*.

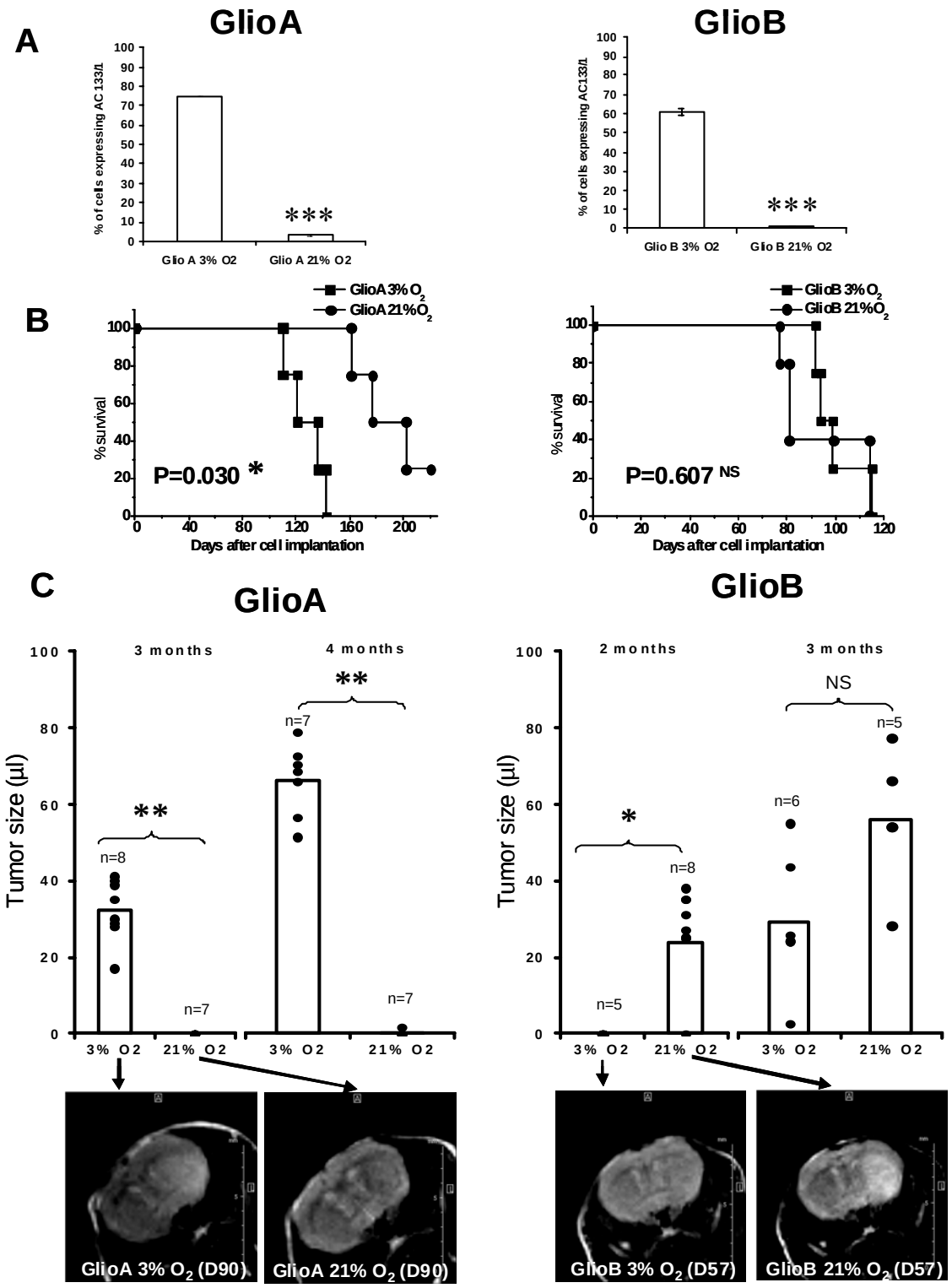


Figure 4: Culturing glioblastoma primary cells at 3% or 21% O_2 resulted in distinct cell behaviors *in vivo*. (A) Flow cytometry analysis of AC133 expression before implantation confirms that GlioA and GlioB cells cultured at 3% O_2 expressed more AC133 than did cells cultured at 21% O_2. (B) Kaplan-Meier survival curves following implantation of 50 000 cells into the right striatum of female SCID mice revealed that cells cultured at 3% O_2 were more aggressive than their 21% O_2 counterparts for GlioA but nor for GlioB. Gehan-Wilcoxon test: NS (non significant), *p<0.05. (C) Measurement of tumor sizes assessed by MRI analysis and corresponding representative MRI images for mice implanted with GlioA or GlioB. Note that although tumors obtained with GlioB grown at 3% O_2 were not detectable at 2 months after brain implantation, they close in on their 21% O_2 counterparts 1 month later, thus revealing distinct growth modalities and density contrast at a given point in time for cells maintained in culture at 3 versus 21% O_2. Mann-Whitney U test: NS (non significant), *p<0.05, **p<0.01.

Extinction of AC133 expression of human glioma cells exposed to low oxygen tension *in vitro* prevents *in vivo* re-expression after orthotopic transplantation in immunodepleted mice

In order to address human AC133 expression in mice with tumor growth, a study was carried out on mice 24 hours post-injection of AC133 positive cells to validate AC133 immunohistochemical detection using the AC133 antibody or 293C3 antibody, both recognizing two different human epitopes of the CD133 protein **(Figure 5A)**.

Applying this technique to brain tumors collected at the end point of the experiment revealed that when the injected cells were initially cultured at 3% O_2, AC133 was still detected, and this for both GlioA and GlioB cells **(Figure 5B)**. However, AC133 was detected in limited clusters within the tumor, suggesting that not all the tumor cells had kept the AC133 phenotype. The same approach on tumors arising from cells cultured at 21% O_2 did not reveal any AC133 expression **(Figure 5B)**, indicating that neither GlioA nor GlioB cells grown in 21% O_2 before injection gave rise to AC133 cells *in vivo*.

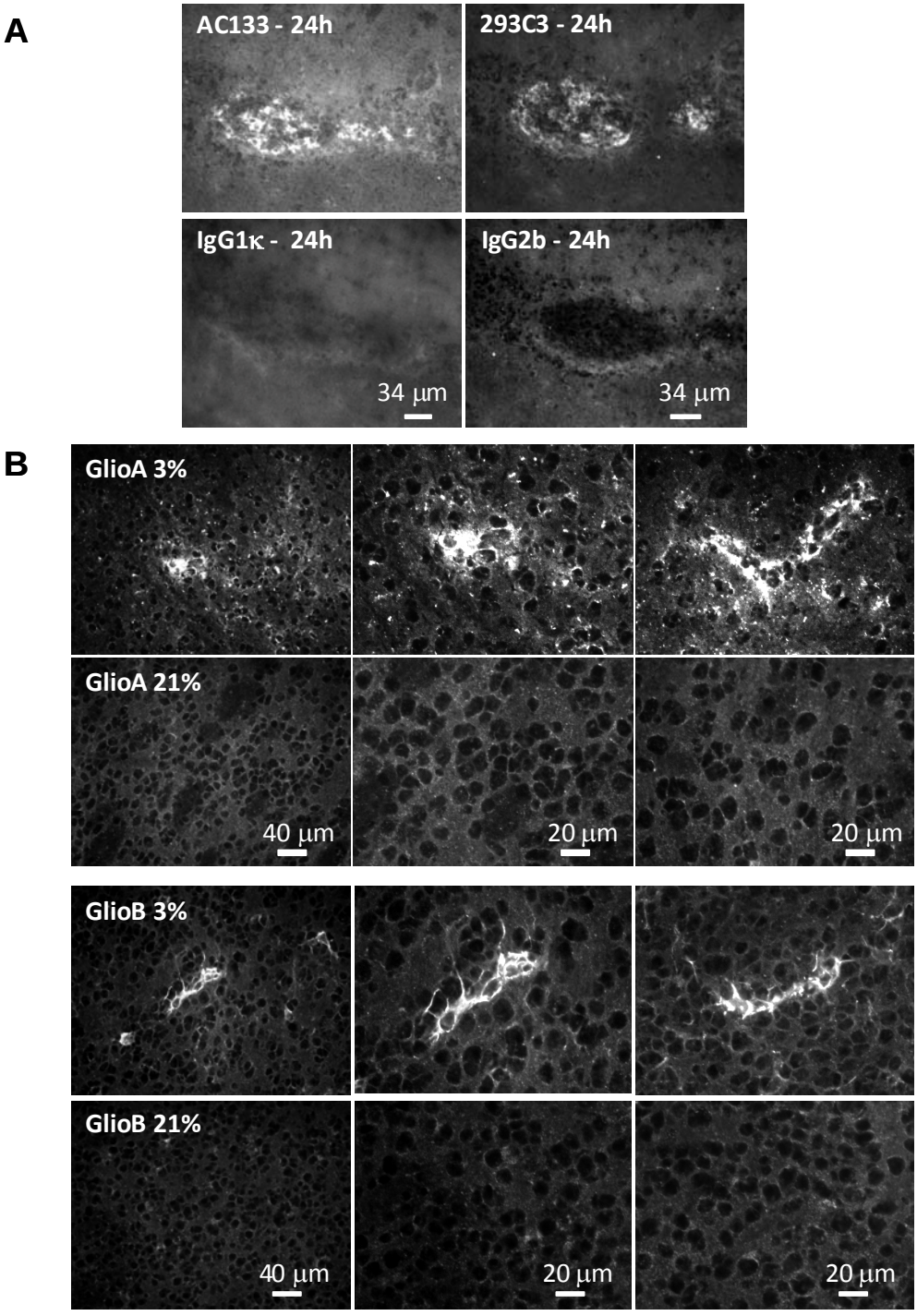


Figure 5: AC133 was not re-expressed *in vivo* in glioblastoma tumors obtained from cells cultured at 21% O_2 while maintained in tumors derived from cells grown at 3% O_2. (A) Validation of the immunohistochemical detection of AC133. Analysis was initially performed using AC133 and 293C3 antibodies as well as respective isotype controls (IgG1k and IgG2b) on mice brain adjacent cryosections 24 h after implantation of 50 000 GlioA glioblastoma cells grown at 3% O_2 known to express AC133 *in vitro*. Note common staining characteristics between AC133 and 293C3. Also note the absence of background when using isotype controls at the same concentrations. (B) Although AC133 was detected in discrete areas of both GlioA and GlioB tumors derived from cells grown at 3% O_2, it was not found on brain tumors derived from cells grown at 21% O_2.

Discussion

Consequences of the 21% standard pO_2 culture condition on glioblastoma phenotypes

To address cancer cell behavior *in vivo* and *in vitro*, cancer cell cultures are generally performed under 5% CO_2 combined to classical atmospheric conditions of about 21% O_2 (160 mm Hg). However, pO_2 values do not exceed 12% O_2 (95 mm Hg) in the blood and vary from 1 to 5% (6 to 34 mm Hg) in normal tissues including the brain [33]. Moreover, a characteristic feature of advanced solid tumors is to display hypoxic tissue areas (pO_2 ≤0.4% or 2.5mmHg) due to insufficient vascularization, oversize tumor mass, and necrosis [34]. Thus, an atmosphere containing 21% O_2 should be physiologically considered hyperoxic. In the present study, although glioblastoma cells were cultured as three-dimension neurospheres, a condition that lowers pO_2 due to the gradient of O_2 diffusion from the external to the inner part of the spheres, our data demonstrated that *in vitro* pO_2 ranges obtained at 3% versus 21% O_2 resulted in distinct cell behavior *in vivo*. Tumor aggressiveness was higher for GlioA when cultured at 3% versus 21% O_2. MRI detection of GlioB grown at 3% was delayed when compared to GlioB grown at 21%, while ultimately giving rise to similar adverse clinical effects. Moreover, AC133, typically found on fresh human glioblastoma biopsy specimens [21] or on short term primary glioblastoma cultures (our study; [13]; [3]) was maintained after expansion *in vitro* at 3% O_2 while lost at 21% O_2 and not re-expressed after cell implantation *in vivo*. These combined findings stressed that pO_2 values obtained at 3% O_2 preserve better the AC133 phenotype of glioblastoma cells than do pO_2 values obtained through the standard O_2 atmospheric tension. Our results confirmed, therefore, that a low pO_2 (≤3% O_2 or 24mm Hg) should be considered a basic condition to study glioblastoma cell behavior in their current microenvironment. As such, the fact that pO_2 irreversibly changes the phenotype of glioblastoma cell populations is also reminiscent of the effects of serum and laminin on gene

expression profiles, expression of stem cell makers, and glioma invasiveness [3, 35, 36]. As variations of pH, the traditional 21% O_2 represents a new environmental stress for glioblastoma cells that inevitably triggers alterations of their differentiation, genetic and epigenetic status, and survival. Considering tumor heterogeneity, selection of glioblastoma cell clones will therefore be different at 3% O_2 and 21% O_2. As such, low oxygen tension is often perceived as an obstacle for chemo- and radiotherapy due to the induction of several resistance genes [13, 36], DNA repair or methylation [22], miRNA expression [37], and maintenance of stemness [38]. Conversely, high oxygen tension represents an oxidative stress that may be associated with the selection of cells that are well-equipped for reactive oxygen species detoxification [39].

Is AC133 a marker of BTSC non-chronic exposure to high oxygen tension?

AC133 has initially been described as a marker of hematopoietic stem cells [9, 11], while then associated with embryonic stem cells [40] and a variety of somatic stem cells [41]. AC133 was also recognized as a putative cancer stem cell marker in blood, brain, colon, prostate, lung, breast, liver, and skin cancers [12, 41]. Although the BTSC hypothesis was strongly supported by recent data [4, 42, 43], the idea of a responsibility of cancer stem cells in glioblastoma development remains to be documented [44] and does not exclude the role of clonal selection [45]. We emphasize that if the hypothesis of brain cancer initiating cells is correct, the loss of AC133 does not preclude their occurrence. We did establish that GlioA and GlioB that do not contain high AC133 expressing cells when cultured at 21% O_2 self-renew *in vitro* and do form tumors *in vivo*. This data gives further significance to the originally established unique ability of immunosorted AC133-positive cells to form brain tumors [2, 3, 13, 46] and corroborates the fact that AC133-negative cells are also capable of doing

so [47, 48]. Thus, high AC133 expression is not a marker of every cancer initiating cells within brain tumors.

Sorted AC133-positive cells have been described as more aggressive than their AC133-negative counterparts [2, 3, 13]. Our data proved that when considering the full cancer cell population, the major reduction in AC133 expression at high versus low pO_2 (87.6%, GlioB, Table 1) as well as in AC133 positive cell numbers (from 47.59% to 2.48%, GlioB, Figure 1) allows for the development of tumors that are similarly aggressive. Thus, AC133 does not appear to be a general marker of tumor aggressiveness.

Low oxygen tension was associated with the stem cell-like properties of AC133-positive glioblastoma cells [26]. As we have confirmed here that this also resulted in high levels of AC133, one might assume that AC133 expression constitutes a witness of low oxygen tension. The presence of putative HRE in Prominin-1 promoters combined with the modulation of AC133 expression by $CoCl_2$ treatment and HIF-1α shRNA knockdown supported this assertion. Previous data obtained with siRNA against HIF-1α [49], or instead with an oxygen stable HIF-1α construct [50], also corroborated this, with a significant role for HIF-1α. However, $CoCl_2$ did not induce AC133 in GlioA O_2, and HIF-1α shRNAs were not able to reduce AC133 expression in GlioC. Although constitutive expression of AC133 might be maximal in GlioA, and HIF-2 is likely to compensate for the loss of HIF-1α in GlioC [21], HIF-independent pathways may be involved in the AC133 regulation by hypoxia. A variety of these recognizable cell signals that translate to environmental O_2 changes have already been described, including: reactive oxygen species [51], thiol-based sensors [51], the transcriptional co-activator PGC-1alpha [52], or mTOR inhibition via the AMPK/TSC2/Rheb pathway [53]. Regardless of the signaling pathway involved in regulating AC133 by pO_2, we have established in our study that the loss of AC133 at 21% O_2 *in vitro* (data not shown) and *in vivo* following glioma cell implantation in mice brains was irreversible. This non-reexpression

of AC133 therefore supported the fact that AC133 is not a genuine marker of hypoxia in glioblastoma. Indeed, low pO_2 commonly involved in glioblastoma growth and aggressiveness [23, 24] should be present within GlioA and GlioB tumors, which was supported by a reduced vascularization observed using CD31 labeling (data not shown). One-way regulation of AC133 by pO_2 might be explained by the acquisition of a new pattern of transcriptional activators or a new DNA methylation status of glioblastoma cells at 21% [54, 55].

As AC133 does not attest to glioma cells' capability of forming tumors or to glioblastoma aggressiveness or low oxygen tension, we propose that it represents a witness of glioblastoma cell non-exposure to high oxygen tension. The presence of AC133 positive glioblastoma cell populations that have also been established at ambient oxygen setting could be explain in this context by creation of hypoxic gradients within the growing glioma spheres [56]. This fact would be attenuated by chronic exposure of cells to high oxygen tension through sequential dissociation and re-plating. Hence, similarly to developmental cues that lead to irreversible maturation of early-to-late neural stem cell differentiation during development such as FGF [57], high oxygen tension may represent a component of the BTSC niche that drives an early-to-late BTSC switch during gliomagenesis. If EGF receptor expression represents the witness of the acquired phenotype for neural stem cell maturation, loss of AC133 would be the witness of BTSC maturation. To support this assertion, the loss of AC133 expression has been associated with cancer stem cells differentiation in glioblastoma [58] and in colon cancer [59]. As well, use of glioma cell differentiation factors such as retinoic acid lead to down regulation of AC133 expression [60]. Two types of tumors could therefore be obtained from non-sorted human glioblastoma cells expanded *in vitro*: type 1 tumors obtained from 3% O_2-expanded cells (expressing AC133) and type 2 tumors obtained from 21% O_2-expanded cells (no AC133 expression) **(Figure 6)**.

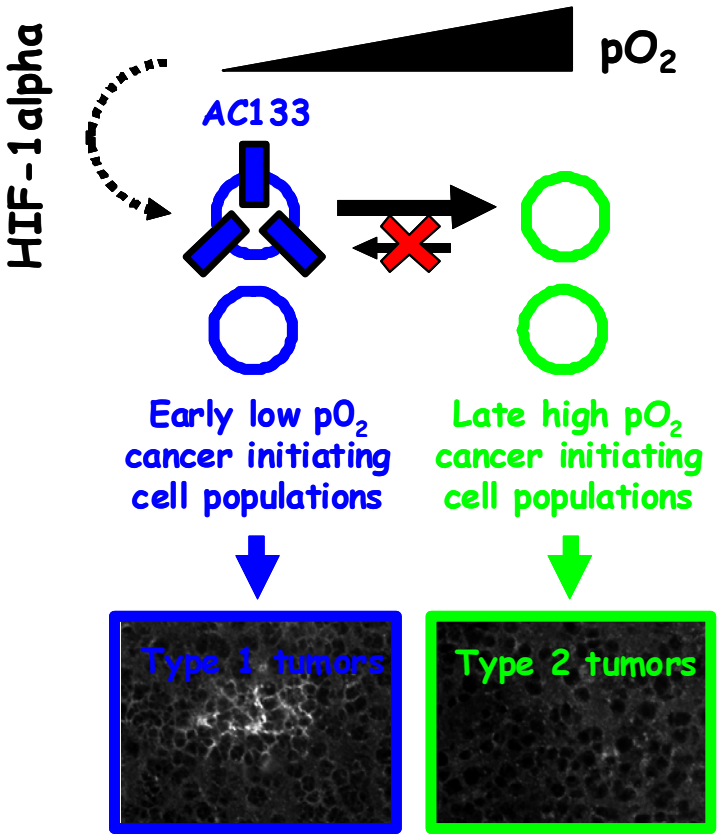


Figure 6: Model defining the relationships between the environmental pO_2 and the AC133 phenotype. During gliomagenesis, high oxygen tension may be a component of the cancer initiating cell niche that drives an early-to-late cancer initiating cell switch. In this situation, the irreversible loss of AC133 expression would be perceived as a witness of glioblastoma cell maturation. Instead of being a marker of tumorigenicity, aggressiveness, or oxygen supply, AC133 notably regulated by HIF-1α therefore represents a hallmark of glioblastoma cell non-exposure to high oxygen tension. Thus, early cancer cell populations that contain AC133-positive cells formed Type 1 tumors that continue to express AC133, while late AC133-negative cancer cell developed Type 2 tumors with a non-reexpression of AC133.

Conclusion

Our present work underlines that non-physiological oxygen tension alters subsequent *in vitro* expansion and *in vivo* development of non-sorted human glioblastoma cells. With the preservation of AC133 expression, which can result from the prevention of AC133-positive cell death or from continuous prominin-1 gene expression, the 3% O_2 expansion condition mirrors much the biological reality. Thus, the timing of environmental pO_2 variations likely reflects a changing pattern of plasma membrane protein expression during glioblastoma growth that is associated with cell heterogeneity and resistances. The fact AC133 was here associated with an early glioblastoma phenotype suggests that identification of downstream cancer initiating cell markers as well as evaluation of relative anticancer drug sensitivity of type I and type II tumors (Figure 6) would also be helpful in the development of anti-glioblastoma strategies.

Aknowledgements

We would like to thank Catherine Guillet, Julien Daligault, and Laurence Preisser (Service Commun de Cytométrie et d'Analyse Nucléotidique, SCCAN, Angers, France) for their skillful technical support. We are also grateful to Pierre Legras and Jérôme Roux from the Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire (SCAHU, Angers, France). *La Ligue Nationale Contre le Cancer* <<Equipe Labellisée 2007>> and *Le Cancéropôle Grand-Ouest* throughout the "*Réseau Gliome Grand-Ouest*" *(REGGO)* and the "*Axe Cellules Souches et Cancer*" supported this work. Erika Bourseau-Guilmain was a fellow from the *Conseil Général de Maine-et-Loire* and the *Ligue Nationale Contre le Cancer*. We also acknowledge the *Comité Départemental de Maine-et-Loire de la Ligue Contre le Cancer*.

References

1. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. Glia 2002;39:193-206.

2. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 2003;63:5821-8.

3. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 2004;432:396-401.

4. Jacques TS, Swales A, Brzozowski MJ, Henriquez NV, Linehan JM, Mirzadeh Z, C OM, Naumann H, Alvarez-Buylla A, Brandner S. Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. EMBO J 2010;29:222-35.

5. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 2008;8:755-68.

6. Mayol JF, Loeuillet C, Herodin F, Wion D. Characterisation of normal and cancer stem cells: one experimental paradigm for two kinds of stem cells. Bioessays 2009;31:993-1001.

7. Mao XG, Zhang X, Xue XY, Guo G, Wang P, Zhang W, Fei Z, Zhen HN, You SW, Yang H. Brain Tumor Stem-Like Cells Identified by Neural Stem Cell Marker CD15. Transl Oncol 2009;2:247-57.

8. Bao S, Wu Q, Li Z, Sathornsumetee S, Wang H, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. Cancer Res 2008;68:6043-8.

9. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood 1997;90:5013-21.

10. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 1997;90:5002-12.

11. Corbeil D, Roper K, Weigmann A, Huttner WB. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? Blood 1998;91:2625-6.

12. Ferrandina G, Petrillo M, Bonanno G, Scambia G. Targeting CD133 antigen in cancer. Expert Opin Ther Targets 2009;13:823-37.

13. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 2006;444:756-60.

14. Zobalova R, McDermott L, Stantic M, Prokopova K, Dong LF, Neuzil J. CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP. Biochem Biophys Res Commun 2008;373:567-71.

15. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. Cancer Res 2006;66:7843-8.

16. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. Clin Cancer Res 2008;14:123-9.

17. Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong DS, Lee JI, Jeon JW, Kim MH, Kang BG, Jung Y, Jin J, Hong SC, et al. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. Lab Invest 2008;88:808-15.

18. Garcion E, Naveilhan P, Berger F, Wion D. Cancer stem cells: Beyond Koch's postulates. Cancer Lett 2008.

19. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature 2006;441:1075-9.

20. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. Cancer Cell 2007;11:69-82.

21. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. Cancer Cell 2009;15:501-13.

22. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Persano L, Della Puppa A, Frasson C, Sarto E, Scienza R, D'Avella D, Basso G. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. Stem Cells 2010;28:851-62.

23. Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. J Cell Physiol 2009;220:562-8.

24. Evans SM, Judy KD, Dunphy I, Jenkins WT, Hwang WT, Nelson PT, Lustig RA, Jenkins K, Magarelli DP, Hahn SM, Collins RA, Grady MS, et al. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. Clin Cancer Res 2004;10:8177-84.

25. Platet N, Liu SY, Atifi ME, Oliver L, Vallette FM, Berger F, Wion D. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. Cancer Lett 2007;258:286-90.

26. McCord AM, Jamal M, Shankavarum UT, Lang FF, Camphausen K, Tofilon PJ. Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. Mol Cancer Res 2009;7:489-97.

27. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002;3:RESEARCH0034.

28. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. Cancer Res 1999;59:5830-5.

29. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. Sci STKE 2005;2005:re12.

30. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, Carland G, Faessen GH, Suen LF, Irwin JC, Powell DR, Giaccia AJ, Giudice LC. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor

binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:10188-93.

31. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. Blood 1998;92:2260-8.

32. Vordermark D, Brown JM. Evaluation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) as an intrinsic marker of tumor hypoxia in U87 MG human glioblastoma: in vitro and xenograft studies. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003;56:1184-93.

33. Csete M. Oxygen in the cultivation of stem cells. Ann N Y Acad Sci 2005;1049:1-8.

34. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. Semin Oncol 2001;28:29-35.

35. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. Cancer Cell 2006;9:391-403.

36. Shervington A, Lu C. Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells. Cancer Invest 2008;26:535-42.

37. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. Trends Mol Med 2010;16:230-7.

38. Pistollato F, Chen HL, Rood BR, Zhang HZ, D'Avella D, Denaro L, Gardiman M, te Kronnie G, Schwartz PH, Favaro E, Indraccolo S, Basso G, et al. Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma. Stem Cells 2009;27:7-17.

39. Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. J Neurosci 1999;19:562-9.

40. King FW, Ritner C, Liszewski W, Kwan HC, Pedersen A, Leavitt AD, Bernstein HS. Subpopulations of human embryonic stem cells with distinct tissue-specific fates can be selected from pluripotent cultures. Stem Cells Dev 2009;18:1441-50.

41. Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. Stem Cells Dev 2009;18:1127-34.

42. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. Cancer Cell 2009;15:45-56.

43. Wang Y, Yang J, Zheng H, Tomasek GJ, Zhang P, McKeever PE, Lee EY, Zhu Y. Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. Cancer Cell 2009;15:514-26.

44. Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. Cancer Res 2006;66:1891-5; discussion 0.

45. Adams JM, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? Cancer Res 2008;68:4018-21.

46. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. Nature 2006;444:761-5.

47. Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, Fusco D, Lopez K, Ellis JA, Kang J, Assanah M, McKhann GM, Sisti MB, McCormick PC, Canoll P, et al. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. Neurosurgery 2008;62:505-14; discussion 14-5.

48. Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Rosland G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. Int J Cancer 2008;122:761-8.

49. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, Pollack IF, Park DM. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. Oncogene 2009;28:3949-59.

50. Bar EE, Lin A, Mahairaki V, Matsui W, Eberhart CG. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. Am J Pathol 2010;177:1491-502.

51. Lopez-Barneo J, Pardal R, Ortega-Saenz P. Cellular mechanism of oxygen sensing. Annu Rev Physiol 2001;63:259-87.

52. Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. Nature 2008;451:1008-12.

53. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. Mol Cell 2006;21:521-31.

54. Tabu K, Sasai K, Kimura T, Wang L, Aoyanagi E, Kohsaka S, Tanino M, Nishihara H, Tanaka S. Promoter hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas. Cell Res 2008;18:1037-46.

55. Yi JM, Tsai HC, Glockner SC, Lin S, Ohm JE, Easwaran H, James CD, Costello JF, Riggins G, Eberhart CG, Laterra J, Vescovi AL, et al. Abnormal DNA methylation of CD133 in colorectal and glioblastoma tumors. Cancer Res 2008;68:8094-103.

56. Wion D, Christen T, Barbier EL, Coles JA. PO(2) matters in stem cell culture. Cell Stem Cell 2009;5:242-3.

57. Lillien L, Raphael H. BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. Development 2000;127:4993-5005.

58. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. Cancer Cell 2010;17:362-75.

59. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, Zeilstra J, Pals ST, Mehmet H, Stassi G, Medema JP. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. Cancer Res 2010;70:719-29.

60. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE, Ahmadi R, Lohr J, Dictus C, Gdynia G, Combs SE, Goidts V, et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. Clin Cancer Res 2010;16:2715-28.

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence l'importance de la sélection des paramètres de cultures pour maintenir les cellules AC133-positives. A l'instar du choix des facteurs de croissance à utiliser par rapport au sérum (Lee *et al.* 2006), la pression en oxygène est un paramètre à prendre en compte, bien qu'il soit possible d'observer une expression d'AC133 dans des cultures à 21% O_2. Les cellules de glioblastomes cultivées pour l'étude des CSCs, sont cultivées dans un milieu complémenté en EGF et bFGF qui favorisent la prolifération des CSCs et sur peu de passages. Ces cellules poussent donc sous forme de sphères à l'intérieur desquelles il peut s'établir un gradient d'O_2. La faible pression en oxygène, plus faible au centre de la sphère, pourrait donc contribuer à maintenir une expression d'AC133 au sein de ces cultures.

En revanche, des cellules maintenues sous une faible pression en oxygène chronique évoluent différemment des cellules cultivées en pO_2 élevée caractérisées par les différences obtenues après injection *in vivo*.

Les résultats obtenus soulignent que la pO_2 constituant le microenvironnement tumoral influe de façon irréversible sur le phénotype de cellules de glioblastomes. L'étude réalisée *in vivo* démontre que la perte d'AC133 observée *in vitro* n'est pas réversible lorsque les cellules se retrouvent dans le tissu cérébral, environnement présentant une faible pression en oxygène. Des travaux non publiés réalisés par l'équipe du Dr. Wion à Grenoble ont permis de montrer également que la perte de l'expression d'AC133 à 21% O_2 n'est que partiellement réversible après une incubation à 3% d'O_2. Certains promoteurs du gène de la promonine-1 sont localisés dans des zones riches en îlots CpG, soumises au méthylation (Shmelkov *et al.* 2004). En effet, il a été montré que l'expression de la prominine-1 est associée à une hypométhylation des promoteurs dans les tumeurs (Tabu *et al.* 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse que la culture des cellules de glioblastomes à 21% d'O_2, pourrait provoquer une méthylation des promoteurs de la prominine-1 et donc inhiber son expression. Cette hypothèse est actuellement en cours d'étude.

Comme les cellules AC133-positives et négatives sont capables d'initier des tumeurs, nous avons émis l'hypothèse qu'il existerait une hiérarchie des cellules souches cancéreuses comme il existe une hiérarchie chez les CSNs. La perte d'AC133 serait donc un témoin de maturation d'un phénotype de CSCs précoce vers un phénotype de CSCs plus tardif pouvant être régulé par la pression en oxygène, ces deux populations étant capables d'initier des tumeurs **(Figure 24)**. Des tests réalisés au laboratoire montrent que les cellules cultivées à 3% d'O_2 produisent plus de VEGF. Ces résultats, associés à la littérature qui indique que les

cellules AC133-positives sécrètent plus de VEGF que les cellules AC133-négatives (Bao *et al.* 2006) suggèrent que les cellules AC133-positives seraient capable d'induire la néoangiogenèse, ce qui aurait pour conséquence la réoxygenation de la tumeur et l'initiation de la différenciation des CSCs ayant pour conséquence une perte de ce marqueur **(Figure 24).** Ces deux types de CSCs donneraient donc naissance *in vivo* à des tumeurs phénotypiquement différentes.

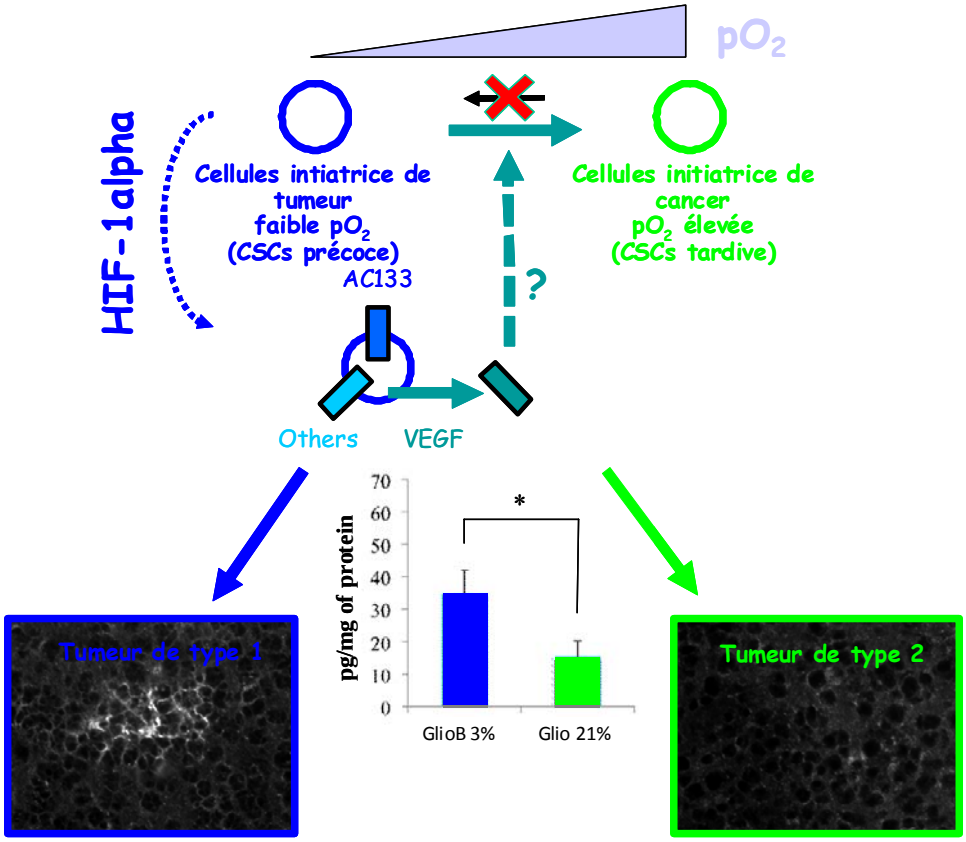


Figure 24 : Schéma représentant l'hypothèse des cellules initiatrices de cancer (CICs) précoces et tardives. *Il existerait une hiérachie au sein de la population des CICs. Les CICs précoces AC133-positives pourraient se différencier sous l'effet de la pO_2, pour donner des CICs tardives capables d'initier des tumeurs ayant des propriétés différentes de CICs obtenues à partir des CICs précoces.*

II. Développement et caractérisation d'immuno-nanocarriers ciblant le marqueur de cellules souches cancéreuses AC133

Dans les glioblastomes, l'expression du marqueur de CSCs AC133 est associée avec un mauvais pronostic clinique (Zeppernick *et al.* 2008). Les cellules AC133 positives dans les glioblastomes présentent des caractéristiques spécifiques de radio et de chiomiorésistance (Bao *et al.* 2006; Shervington and Lu 2008). Par ailleurs, nous avons montré dans le chapitre précédent qu'AC133 est un marqueur de non-exposition à des concentrations élevées en oxygène lié à l'agressivité tumoral. AC133 apparaît donc comme une cible potentielle pour développer une nanomédecine dirigées contre les cellules souches cancéreuses.

Ce deuxième article relate le développement d'immuno-nanocapsules lipidiques à partir du greffage de l'anticorps AC133 à la surface des nanocapsules lipidiques développées à l'INSERM U646.

L'étude réalisée par Beduneau et al. (Beduneau *et al.* 2007) a permis de démontrer la faisabilité d'un greffage d'anticorps à la surface des NCLs par post-insertion de DSPE–PEG_{2000}–maleimide, un polymère bifonctionnel, dans la coque des NCLs, suivie du couplage avec un anticorps préalablement thiolé afin de créer une liaison covalente entre le DSPE–PEG_{2000}–maleimide et l'anticorps. La méthode de thiolation par le PDPH (3-(2-Pyridyldithio) propionyl hydrazide) conduit à ajouter une fonction thiol sur les fonctions hydroxyl libres des sucres localisés sur le fragment Fc des immunoglobulines. Cependant, malgré l'assurance de ne pas affecter le site de reconnaisance de l'anticorps, cette méthode nécessite d'utiliser en excès le DSPE–PEG_{2000}–maleimide, une molécule coûteuse, et comprend plusieurs étapes de purification.

Par conséquent, ce travail a consisté à modifier la méthode de greffage d'un l'anticorps sur les NCLs, par l'utilisation du réactif de Traut, qui réagit avec les amines primaires pour la thiolation des anticorps, tout en diminuant les quantités de DSPE–PEG_{2000}–maleimide utilisées et le nombre d'étapes de synthèse pour obtenir des NCLs-AC133.

Ici, la spécificité des NCLs-AC133 n'a pas été évaluée sur des cultures de glioblastomes. En effet, la culture de ces cellules est complexe. Par conséquent, nous avons testé les immono-NCLs sur des lignées de cellules d'adénocarcinome de colon humain, les cellules Caco-2. Lorsque ces cellules sont indifférenciées, elles expriment de façon constitutive le marqueur AC133.

Development and characterization of immuno-nanocarriers targeting the cancer stem cell marker AC133.

Bourseau-Guilmain E [a,b], Béjaud J [a,b], Griveau A [a,b], Lautram N [a,b], F. Hindré [a,b], Weyland M [a,b], Benoit JP [a,b], Garcion E [a,b]. ✉

[a] INSERM, U646, F-49933 Angers, France.

[b] LUNAM Université, Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, F-49933 Angers, France.

Running title: CD133 and lipid nanocapsules

✉**Corresponding author:**

Emmanuel Garcion

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm U646,

IBS – CHU Angers,

4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France

Tel.: +33 2 44 68 85 43

Fax: +33 2 44 68 85 46

E-mail: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

Abstract.

In the context of targeted therapy, we addressed the possibility of developing a drug delivery nanocarrier capable to specifically reach cancer cells that express the most prominent marker associated with cancer stem cell (CSC) phenotype, AC133. For this purpose, 100 nm lipid nanocapsules (LNCs) were functionalized with a monoclonal antibody (mAb) directed against AC133 according to two distinct methods: firstly, post-insertion within 100 nm LNCs of a lipid poly(ethylene glycol) functionalized with reactive-sulfhydryl maleimide groups (DSPE–PEG_{2000}–maleimide) followed by thiolated mAb coupling, and, secondly, creation of a thiolated lipo-immunoglogulin between DSPE–PEG_{2000}–maleimide and AC133, then post-inserted within LNCs. Due to the reduced number of purification steps, lower amounts of DSPE–PEG_{2000}–maleimide that were necessary as well as lower number of free maleimide functions present onto the surface of immuno-LNC, the second method was found to be more appropriate. Thus, 126 nm AC133-LNC with a zeta potential of -22 mV while keeping a narrow distribution were developed. Use of the IgG1κ isotype control-immunoglobulins produced similar control IgG1-LNCs. Micro-Bradford colorimetic assay indicated a fixation of about 40 immunogloblins per LNC. Use of human Caco-2 cells that constitutively express AC133 (Caco-2-$AC133^{high}$) allowed addressing the behavior of the newly functionalized immuno-LNCs. siRNA knockown strategy permitted to obtain Caco-2-$AC133^{low}$ for comparison. Immunofluorescence-combined flow cytometry analysis demonstrated that the epitope-recognition function of AC133 antibody was preserved when present on immuno-LNCs. Although grafting of immunoglobulins onto the surface of LNCs repressed their internalization within Caco-2 cells as evaluated by flow cytometry, AC133-specific cellular binding was obtained with AC133-LNC as assessed by computer-assisted fluorescence microscopy. In conclusion, interest of AC133-LNCs as niche carriers is discussed toward the development of CSC targeted chemo- or radio-nanomedicines.

Keywords. Nanoparticles, CD133, specific targeting, antibody, lipid nanocapsules, Caco-2, targeted therapies, stem cells.

1) Introduction.

The cancer stem cell (CSC) model propose that cancer initiating cells capable to self-renew *ad infinitum* and to divide asymmetrically, thus expressing markers of differentiation, would be responsible of an evolutionary hierarchy among tumor cells (Visvader and Lindeman, 2008). Consequently, ongoing therapeutic strategies would preferentially target rapid dividing committed tumor cells that contribute to the tumor mass while neglecting rare slowly dividing CSCs capable to generate resistant clones. Therefore, the recognized and characterized CSC gives further hope to tumor treatment.

Among intrinsic indicators that are susceptible to tag CSCs, AC133, a glycosylation-associated epitope of the pentaspan protein CD133/prominin-1, is the best documented (Corbeil et al., 1998; Miraglia et al., 1997). Thus, AC133 monoclonal antibody-based flow cytometry and magnetic cell sorting allowed the enrichment and isolation of CSCs from a large panel of tumor types that includes blood, brain, skin, prostate, lung, breast, liver and colon cancers (Ferrandina et al., 2009; Wu and Wu, 2009). Although the role of CD133 is largely unknown and remains to be elucidated, AC133 has been linked to aggressive phenotype and associated with poor clinical outcome, notably in gliomas (Zeppernick et al., 2008) and colorectal cancers (Horst et al., 2009). In addition, *in vitro* and *in vivo* studies established that AC133-positive CSC populations survive remarkably to beam radiation (Bao et al., 2006) and are particularly resistant to chemotherapy (Angelastro and Lame, 2010; Todaro et al., 2007). For those reasons, AC133-expressing CSCs located within the tumor bulk or, instead, hidden within the macroscopically normal tissue, represent significant targets to focus on.

The idea of targeted therapy, emerging from the concept of “magic bullet” proposed by Paul Ehrlich at the end of the 19th century (Winau et al., 2004), took all its signification from the work of Cesar Milstein and Georges Khöler in early 70’s who developed the technique to

produce monoclonal antibodies (mAbs) (Schrama et al., 2006). Although recognition can be obtained as well by use of various type of ligands, among which peptides or aptamers, mAbs are the most widely tested in the clinic, especially to block or neutralize specific molecular targets involved in cancer (Schrama et al., 2006). For instance, rituximab directed against CD20 is used within the context of lymphoma treatment (Schulz et al., 2007), trastuzumab (Herceptin®) against Her2/neu/ErbB2 within the context of breast cancer treatment (Morris and Carey, 2006), cetuximab/panitumumab against EGFR within the context of colorectal cancer treatment (Morrison et al., 2007) and bevacizumab (Avastin®) against VEGF within the context of glioblastoma treatment (Miletic et al., 2009). mAbs are also combined to radiopharmaceuticals for locoregional internal radiation therapy as exemplified within the context of glioblastoma treatment by use of ^{131}I-tenascin antibodies (Reardon et al., 2008) or ^{188}Re-nimotuzumab directed against the EGFR (Casaco et al., 2008). Alternatively, mAbs are conjugated to drug in order to make them capable to cross physiological barriers such as the blood-brain barrier as demonstrated for BDNF combined to a rat transferrin receptor mAbs (Pardridge et al., 1998) or for GDNF fusion protein combined to a human insulin receptor mAbs (Boado et al., 2008).

Recent advances in nanomedicines gave as well further resonance to targeted therapies (Peer et al., 2007). Anticancer drug combined to new nanocarriers could, indeed, present a better biodistribution profile with improved biological barrier crossing properties, leading to substantial clinical advantages including dose reduction, prevention of side effects and improvement of bioavailability within the targeted tumor cell (Peer et al., 2007). Moreover, nanoparticle combination to well define targeting agent including mAbs can greatly improve drug affinity and selectivity (Peer et al., 2007). In this context, lipid nanocapsules (LNCs) synthesized from FDA approved components through a phase-inversion process represent an alternative (Heurtault et al., 2002). With a size that can be adjusted from 20 to 100 nm with a

narrow distribution, lipoprotein-like LNCs could indeed convey several anticancer drug within cancer cells among which paclitaxel (Garcion et al., 2006; Roger et al., 2009), etoposide (Lacoeuille et al., 2007) and radiopharmaceuticals (Allard et al., 2008). Their structure confer them specific skills such as multidrug resistance inhibition (Garcion et al., 2006; Roger et al., 2010), endo-lysosomal escape (Paillard et al., 2010) and capability to reach the mitochondria membrane (Weyland et al., 2011). In addition, by post-inserting a bifunctional polymer, the distearoylphosphatidylethanolamine–PEG_{2000}–maleimide (DSPE–PEG_{2000}–maleimide) in their shell to allow covalent coupling to protein thanks to creation of a thioether bond, LNCs can be functionalized and combined to thiolated proteins including monoclonal mAbs (Beduneau et al., 2007).

Thus, the objective of the present work was to develop a therapeutic drug delivery nanocarrier capable to recognize AC133-positive cells within tumors. Immuno-LNCs were synthesized by use of two distinct methods: firstly, post-insertion of DSPE–PEG_{2000}–maleimide to LNCs followed by mAb coupling, and, secondly, creation of a lipo-immunoglogulin between DSPE–PEG_{2000}–maleimide and AC133, then post-inserted within LNCs. The binding specificity of immuno-LNCs and their ability to be internalized within AC133-expressing cancer cells were evaluated on human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells.

2) Materials and methods.

a. Cell culture.

MOPC-31C (IgG1κ producing cells) (CCL-130™) and AC133.1 hybridomas (HB-12346™) were obtained from ATCC (American Type Culture Collection) and LGC (Laboratory of the Government Chemist) standard (Molsheim, France). MOPC-31C and AC133.1 hybridomas were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) and DMEM 4.5 g/L glucose (Lonza), respectively, supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS; Lonza) and 1% antibiotics (10 units of penicillin, 10 mg of streptomycin, 25 µg amphotericin B/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Cells were plated in uncoated flask at $2x10^4$ cells/mL and maintained at 37°C and 5% CO_2 until they reach a concentration of 10^6 cells/mL, before replating and purification of immunoglobulins from supernatants.

Human colon carcinoma Caco-2 cells, obtained from ATCC and LGC standard (HTB-37™), were cultured in DMEM (Lonza) containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine. The medium was added with 10% of FBS (Lonza), 1% antibiotics (Sigma-Aldrich) and 1% of non-essential amino acids (Lonza). When cells reached 80% confluence, they were dissociated with 0.5% porcine trypsine and 0.2 g/mL EDTA (Lonza) and re-plated on uncoated plastic flasks at $15x10^3$ cells/cm^2. Medium was renewed every two days.

b. Synthesis of immuno-LNCs.

i. mAb purification and thiolation.

Supernatant harvested from cultures of the AC133.1 and MOPC-31C hybridoma cell lines containing AC133 and IgG1k isotype control mAbs, respectively, was concentrated using Centricon centrifugal filter units (30 000 MWCO) according to manufacturer's instructions (Millipore, Billerica, USA). Immunoglobulins were then purified by passage over a high performance HiTrap Protein G HP column (GE Healthcare, Orsay, France) followed by

elution in acid conditions and immediate neutralization according to the manufacturer's directions. mAbs buffer was changed by dialysis in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Cambrex, Verviers, Belgium) using overnight membrane dialysis (15 000 MWCO; Fisher bioblock scientific, Illkirch, France) and then concentrated with Microcon centrifugal filter units (30 000 MWCO; Millipore). The antibody concentration was determined by micro-Bradford colorimetric assay (PIERCE, Rockford, USA) according to manufacturer's instructions. For thiolation, mAbs in DPBS were incubated with 1 mg/mL of 2-iminothiolane (Traut's reagent, Fisher, Illkirch, France) for one hour in darkness under agitation. Traut's reagent was eliminated by purification of relational medium on Sephadex G25 gel filtration column (Sigma-Aldrich). mAbs were then re-concentrated to 2 mg/mL in DPBS by use of Microcon centrifugal filter units (30 000 MWCO). Thiolation of mAbs was confirmed trough a colorimetric sulfhydryl assay using Ellman's reagent (5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) (Sigma-Aldrich) as previously described (Beduneau et al., 2007; Iznaga Escobar et al., 1996). Briefly, 100 µL of 4 mg/mL Ellman's reagent were dissolved in DPBS and added to 1 mL of about 1 mg/mL thiolated mAb for 20 min incubation at room temperature. Free sulfhydryl levels were determined from the absorbance at 412 nm by referring to a cysteine standard curve.

ii. Synthesis of LNCs.

LNCs were synthesized as described previously (Heurtault et al., 2002) by using a phase inversion-based process that follows the formation of an oil/water microemulsion containing an oily fatty phase (triglycerides : Labrafac®), a non ionic hydrophilic surfactant (polyethylene glycol hydroxystearate : Solutol®) and a lipophilic surfactant (lecithins : Lipoïd®). Briefly, Solutol® HS15, Lipoïd®, Labrafac®, NaCl and deionised water obtained from a Milli-Q plus® system (Millipore, Billerica, USA) were mixed and heated under

magnetic stirring up to 85°C. Three cycles of progressive heating and cooling in between 85°C and 60°C were then realized. They were finally followed by an irreversible shock induced by dilution with 0°C de-ionized water added into the inversion phase zone. Afterwards, slow magnetic stirring was applied to the suspension for 5 min. For fluorescent staining of LNCs, the liposoluble fluorescent probe, Nile red (NR) (Sigma Aldrich) was used as previously described (Garcion et al., 2006; Paillard et al., 2010).

iii. Coupling mAbs to LNCs.

Method 1: DSPE–PEG_{2000}–maleimide (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) was added as a powder to a LNC suspension in order to obtain a 22 mM final concentration (optimized to incorporate a maximum amount of DSPE–PEG_{2000}–maleimide within the LNC shell). LNC and DSPE-PEG_{2000}-maleimide micelles were co-incubated for 2 h at 60°C. A 1.5 x 40 cm Sepharose CL4-B column (Sigma Aldrich) equilibrated with HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) was used to separate functionalized LNCs containing DSPE–PEG_{2000}–maleimide from micelles composed of free DSPE–PEG_{2000}–maleimide (loading volume: 1 to 1.5 mL, elution volume: 70 mL). Thus, 70 fractions of 1 mL each were sequentially collected. PEG concentration within fractions was determined using a colorimetric method based on the formation of a complex between PEG and iodine (Sims and Snape, 1980). Briefly, 5 µL of a KI/I_2 solution was added to 200 µL of sample diluted at 1:10 and the resulting absorbance of the medium was detected at 492 nm using a Multiskan® microplate spectrophotometer (Thermo Electron, Saint-Herblain, France). 10 mg of functionalized LNC containing DSPE–PEG_{2000}–maleimide were then incubated overnight at 4°C under nitrogen atmosphere with 2 mg of thiolated mAbs on a rotating plate set at a low speed. Unbound biomolecules were removed by using a second sepharose CL-4B column as described above. Turbidimetric measurements at 600 nm were performed to evaluate LNC concentrations within the collected

fractions. MicroBCA protein assay (Pierce) was used according to the manufacturer's instructions with DO analysis at 580 to determine corresponding mAbs concentrations. The number of mAbs per LNC was determined as described previously (Beduneau et al., 2007).

Method 2: DSPE–PEG_{2000}–maleimide was solubilized in DPBS through slight magnetic stirring for 30 minutes at room temperature. DSPE–PEG_{2000}–maleimide was then added to a solution of DPBS containing 2 mg of thiolated mAbs to obtain an equimolar concentration of 0.05 mM for the two reactive species (DSPE–PEG_{2000}–maleimide and thiolated mAbs) within a final volume of 400 µL. Overnight incubation was then performed at room temperature under low agitation. 10 mg of LNCs corresponding to 50 µL of initial suspension were then added to the formed "lipo-immunoglobulins" for 4 h incubation at 37°C. To separate the functionalized LNC containing the newly formed lipo-immunoglobulins from micelles composed of free lipo-immunoglobulins, a sepharose CL4-B column was used as described above (method 1). Turbidimetric measurements at 600 nm and microBCA assays were performed to determine LNC and mAbs concentrations within the collected fractions as well as to calculate the number of mAbs per LNC.

c. Characterization of LNCs and immuno-LNCs.

LNCs and immuno-LNCs were characterized for size, polydispersity index and charge distribution by dynamic light scattering using a Zetasizer® Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). LNCs and immuno-LNCs were diluted 1:1000 (v/v) in de-ionized water in order to ensure a convenient scattered intensity on the detector.

d. AC133 immunolabeling.

Caco-2 cells were collected and dissociated using Versene (Lonza). They were then incubated

with 5µg/mL AC133 antibody (Miltenyi Biotech, Paris, France) or IgG1 isotype control (BD-Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 1 hour at 4°C in DPBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. After three washes in DPBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, they were further incubated for 30 minutes at 4°C in DPBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide with 20 µg/mL FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')2 fragment (Dakocytomation, Trappes, France). Following three more washes, cells were re-suspended in DPBS added with 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide before flow cytometry analysis.

e. Flow cytometry.

A BD FACSCalibur™ fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest™ software (BD-Biosciences) were used in order to proceed to flow cytometry acquisition. Analysis was carried out using WinMDI 2.9 software (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA).

f. MTS/PMS surviving cell assay.

2.3 x 10^5 Caco-2 cells were plated in 24-well plates in 400 µL of Caco-2 cell medium. After 24 h incubation at 37°C/5% CO_2, they were treated with 20 µg/mL of AC133 antibody (Miltenyi Biotec) or immuno-LNCs at 1.1 mg/mL, thus corresponding to the same 20 µg/mL mAb concentration. After 1 h incubation at 37°C, non-adherent cells were washed with DPBS and adherent surviving cell levels were evaluated with MTS/PMS assay using a celltiter 96 Aqueous non radioactive cell proliferation assay kit according to the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnieres, France). Briefly, a MTS/PMS reagent diluted in DPBS (1:5) was added to the cells and incubated for 2 h at 37°C. The soluble formazan generated by the live cells was proportional to the number of initially adherent live cells and the resulting absorbance was recorded at 490 nm using a Multiskan Ascent® microplate reader (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

g. siRNA mediated knockdown of CD133.

24 h after initial plating (see below, binding of immuno-LNCs), Caco-2 cell medium was replaced by serum-free medium containing 50% DMEM, 50% Ham's F12 (Biowhittaker) and N1 supplement (Sigma). Caco-2 cells were then transfected with 30 nM of duplex RNA oligonucleotides (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) using N-TER peptide (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) according to manufacturer's instructions. N-TER/siRNA complexes were incubated in Caco-2 cell medium during 48 h at 37°C/5% CO_2. The sequence used to inhibit CD133 was as following: 5'-CCCUUAAUGAUAUACCUGAdTdT-3'; a sequence scramble was used as negative control 5'-GUCCGGAAUUACCAUGAGUdTdT-3'.

h. Binding of immuno-LNCs.

Caco-2 cells were initially plated in eight-well Labtech chambers at $2x10^4$ cells per well in 400 µL of serum containing Caco-2 cell medium. After siRNA treatment (see above), they were treated in serum-free medium with 23 µg/mL NR-LNCs or 23 µg/mL NR-immuno-LNCs, thus equivalent to 0.42 µg/mL of mAb, for 20 minutes at 4°C under gentle agitation. The medium was then removed and cells were washed three times with DPBS. Labtech chamber slides (Fisher bioblock scientific) were finally mounted under coverslips in fluorescent mounting medium (Dakocytomation) mixed with DPBS (1:1). Images were obtained from a fluorescence microscope (Axioscope® 2 optical, Carl-Zeiss, Le Pecq, France) and acquired through a Photometrics CoolSNAP ES camera equipped with a QImaging CRI Micro Color 2 RGB Liquid Crystal filter and by using the MetaVue™ imaging system (all from Roper Scientific, Evry, France). The images were then analysed using the MetaMorph® image analysis Software (Roper Scientific).

i. Cellular uptake of immuno-LNC.

Caco-2 cells were plated in six-well plates with $2.3x10^5$ cells per well in 2 mL of serum containing medium for 24 h. Caco-2 cell medium was then replaced by serum-free medium before Caco-2 cells were treated with 230 µg/mL NR-LNCs or NR-Immuno-LNCs thus corresponding to 4.2 µg/mL of mAb. After 2 h of incubation at 37°C, cells washed 3 times with DPBS and dissociated using Versene (Lonza). To enable determination of the labeled molecule fraction that was effectively internalized within cells, extracellular fluorescence was quenched using 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich) as previously described (Paillard et al., 2010). Cells were re-suspended in DPBS containing 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide before assessing LNC cellular internalization by flow cytometry.

j. Statistical analysis

XLSTAT 2011 Version 2011.1.01 (Addinsoft Paris, France) was used for data analysis. Statistical significance for each experiment was determined by a Dunnett's test. The tests were considered as significant with p values of less than 0.05.

3) Results and Discussion.

a. Design of immuno-LNCs.

i. Thiolation of AC133 mAb and assessment of recognition integrity.

In order to functionalize LNCs with mAbs, the bifunctional polymer DSPE-PEG_{2000}-maleimide was used: the distearoyl function being useful as a LNC shell anchor and maleimide as a chemically reactive group for conjugation with mAbs. As a prerequisite to obtain operational mAbs for conjugation to maleimide, thiol groups were introduced within AC133 mAb and IgG1κ isotype control immunoglobulins by using Traut's reagent. Traut's reagent reacted with primary amine (lysine and N-terminus) thus producing terminal sulfhydryl groups on mAbs. Although, the localization of primary amine on immunoglobulins was not exactly identified, a colorimetric sulfhydryl assay using Ellman's reagent permitted to assess that the thiolation was successful with an average of one to two thiols per immunoglobulin. As this reaction has already been described to cause loss of recognition activity, the capacity of recognition of thiolated versus native AC133 mAb was addressed on non-differentiated human colon cancer adenocarcinoma Caco-2 cells that constitutively over-express the AC133 epitope. Immunocytochemistry combined flow cytometry allowed establishing that Caco-2 cells were specifically recognized by both native and thiolated AC133 mAbs (Figure 1A). Likewise, very similar deviations of geomean fluorescence intensity from matching IgG1κ control were obtained with native and thiolated AC133 mAbs (Figure 1B). Those observations thus established that the thiolation of AC133 mAb by Traut's reagent have not affected the antigen-binding site of the antibody.

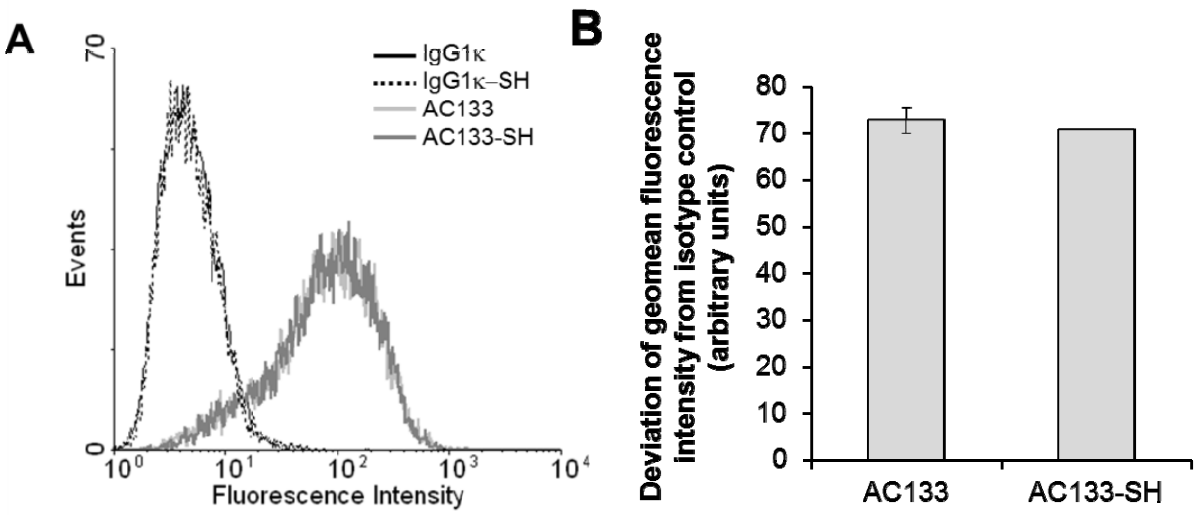


Figure 1: mAbs thiolation does not affect the recognition site of AC133. Caco-2 cells overexpressing AC133 were incubated for 1 hour at 4°C with native and thiolated (-SH) antibodies. FITC-conjugated F(ab')2 fragments were then added to the cell suspension for 30 minutes at 4°C. A) Representative immunofluorescence combined flow cytometry analysis profiles. B) Semi-quantitative analysis representing the deviation of geomean fluorescence intensity from isotype control obtained with native versus thiolated AC133-mAb (AC133-SH). Data represented mean±s.e.m of three independent experiments.

ii. mAbs conjugation to LNCs and assessment of recognition activity.

In order to covalently attach thiolated mAbs to LNCs, two distinct methods based on the incorporation of DSPE-PEG_{2000}-maleimide within the LNC shell were used. Firstly, as initially developed to built immunoliposomes (Huwyler et al., 1996) and utilized on LNCs for conjugation to OX26 antibody (Beduneau et al., 2007), a method of post-insertion of DSPE–PEG_{2000}–maleimide at 60°C within LNCs followed by mAb coupling was applied (Figure 2, method 1). Secondly, a lipo-immunoglogulin between DSPE–PEG_{2000}–maleimide and mAbs was created before being post-inserted at low temperature within the LNC shell. This last method allowed reducing the number of purification steps and the amount of DSPE–PEG_{2000}–maleimide used (Figure 2, method 2). As immunoglobulins are proteins of about 150 kDa, the size of the LNC shell represented an important parameter to permit the coupling to an optimum number of mAbs. As such, immunoliposomes of 100 nm bearing about 30 whole antibodies were previously found optimal for targeting efficacy (Huwyler et al., 1996; Maruyama et al., 1995).

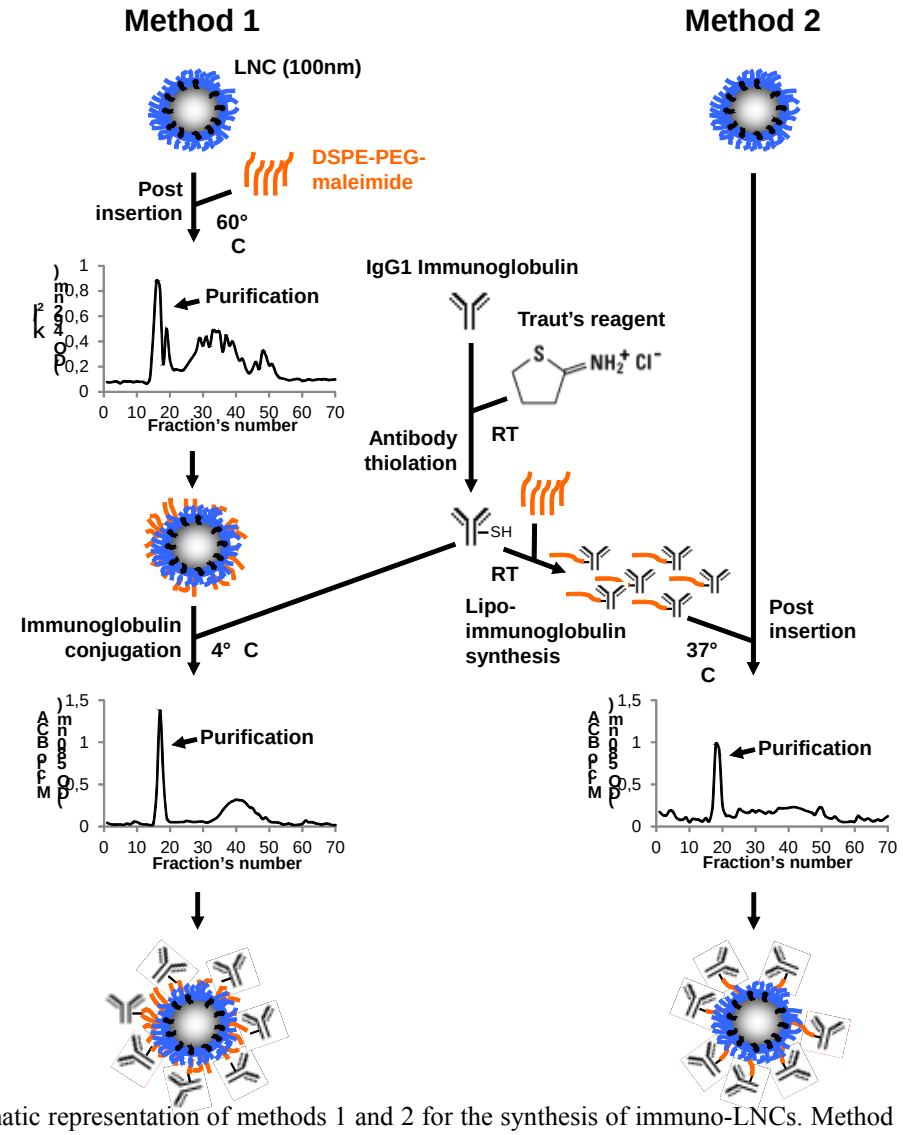


Figure 2: Schematic representation of methods 1 and 2 for the synthesis of immuno-LNCs. Method 1 combined a first step with the insertion of DSPE-PEG$_{2000}$-maleimide within the LNC shell (at 60°C) to a second step consisting in thiolated mAb conjugation to the maleimide extremity (at 4°C). Method 2 included a first step with the creation of a lipo-immunoglobulin monomer after reaction between the thiolated mAb and the DSPE-PEG$_{2000}$-maleimide (at room temperature: RT) and a second step that was the post-insertion of the lipo-immunoglobulin monomer within the LNC shell (at 37°C). Each incubation stage with LNCs was followed by a purification step onto exclusion columns as described in the Materials and Methods section; arrows in front of the peak elution fractions corresponded to LNCs.

		Method 1		Method 2	
	LNC	IgG1-LNC	AC133-LNC	IgG1-LNC	AC133-LNC
Size (nm)	100.1 ± 3.7	190.4 ± 7.7 #	187.9 ± 3 #	145.4 ± 38.4 #,*	126 ± 10.5 #,*
PDI	0.05 ± 0.007	0.181 ± 0.011 #	0.179 ± 0.013 #	0.123 ± 0.008 #	0.138 ± 0.040 #
Zeta potential (mV)	-6.4 ± 3.6	-24.2 ± 0.9 #	-24.4 ± 0.6 #	-20.2 ± 0.6 #	-22.8 ± 4.1 #
mAb/LNC	/	54 ± 6	40 ± 8	28 ± 10	37 ± 13

Table 1: Characteristics of the different LNCs. PDI: polydispersity index. Note the size increase between native- and immuno-LNCs. Note also the size differences between immuno-LNCs obtained with method 1 and those obtained with method 2. Dunnett's test: #p<0.01: differences from native LNCs, *p<0.01 differences between method 1 and 2.

Hence, conjugation of the AC133 mAbs or IgG1κ immunoglobulins was realized on native 100 nm LNCs that presented a narrow distribution and a zeta potential of about -6mV (Table 1). Physicochemical characterization demonstrated a switch between native- and AC133-LNCs from 100 nm to 187 nm with method 1 and to 126 nm with method 2 while keeping a polydispersity index under 0.2 with both methods (Table 1). Use of the IgG1κ isotype control immunoglobulins produced similar control IgG1-LNCs (Table 1). The evolution of LNC size demonstrated the incorporation either of DSPE–PEG_{2000}–maleimide then conjugated to mAbs with method 1 or of lipo-immunoglogulins with method 2. In line with this, incubation of native LNCs for 2 h at 60°C (post-insertion parameters of method 1) or for 4 h at 37°C (post-insertion parameters of method 2) had no impact on their initial physicochemical characteristics (size, zeta potential, polydispersity) (*cf.* Table 1). Thus, reduction in size increase of immuno-LNCs obtained with method 2 when compared with method 1 could be attributed to two parameters: i) the amount of bifunctional polymer molecules that have been effectively incorporated (Tirosh et al., 1998) and ii) the impact of post-insertion temperature on the conformation of incorporated bifunctional polymer that can be ‘‘brush’’ or ‘‘mushroom’’ (Tirosh et al., 1998). In spite of those evident differences, no significant variations of zeta potentials were found between the two methods (Table 1).

Moreover, small micro-Bradford colorimetic assay associated with turbidimetric measurements established a fixation of 40±8 and 37±13 AC133 mAbs per LNC with method 1 and 2, respectively (Table 1). Thus, independently from the method used, immuno-LNCs displayed a conform number of immunoglobulins onto their surface to further support their functionality (Beduneau et al., 2007). However, smaller LNCs obtained when applying method 2 may be more appropriate to keep biological barrier crossing properties of the immuno-nanocarrier (Garcion et al., 2006; Paillard et al., 2010). In addition, the use of DSPE–PEG_{2000}–maleimide in large excess in method 1 (440-fold increase while leading to the

same LNC antibody load as compared with method 2, *cf.* Materials and Methods section) conducted to a higher number of free maleimide functions at the surface of LNCs, already noticed with OX26 decorated-liposomes (Huwyler et al., 1996) and -LNCs (Beduneau et al., 2007). This fact could be ascribed to the steric barrier crated by LNC shell components among which is Solutol® and DSPE–PEG_{2000}–maleimide itself. The presence of free maleimide functions at the surface of LNCs may also represent the basis of undesirable side effects resulting from the interaction with free sulfhydryl functions present on natural biomolecules as exemplified by the important anti-oxidative molecule glutathione (Dringen, 2000; Friedmann, 1952).

To further validate method 2 versus method 1, recognition activity of the AC133 mAb when present on immuno-LNCs was tested on Caco-2 cells. As physicochemical characteristics of newly developed immuno-LNCs (Table 1) were found to be stable from the purification step to at least three weeks at 4°C, immuno-LNCs were used in biological assays during this three-week period. Immunocytochemistry combined flow cytometry established that AC133 mAbs present on AC133-LNCs obtained from method 1 were capable to label Caco-2 cells with a slight increase in geomean fluorescence intensity as compared to free AC133 mAbs (Figure 3A). Experiments developed with IgG1-LNCs demonstrated the specificity of the recognition process (Figure 3A). The augmentation in recognition with immuno-LNCs could likely be attributed to the number of mAbs present at the surface of LNCs, thus amplifying the signal obtained from secondary antibody fixation. This is also indicative of the fact that immuno-LNCs remained stable during the staining procedure and that DSPE-PEG2000-coupling to mAb at the surface of immuno-LNCs had minor impact on the recognition integrity of thiolated AC133 mAb. Interestingly, immunocytochemistry combined flow cytometry with AC133 mAbs present on AC133-LNCs obtained from method 2 led to very similar data (Figure 3B).

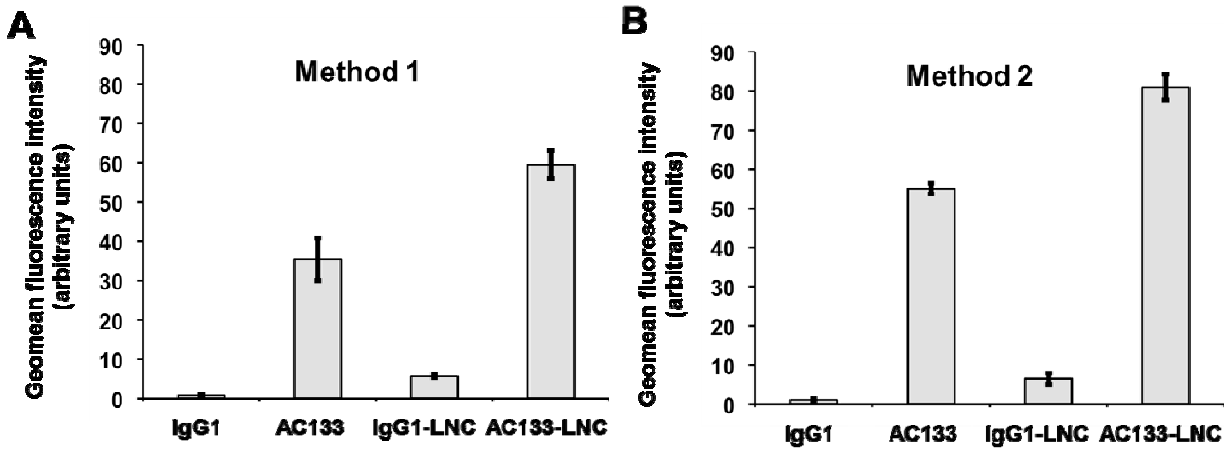


Figure 3: AC133 coupling to LNCs does not affect its recognition site. Immunofluorescence combined flow cytometry analysis of AC133 expression was performed on AC133 expressing Caco-2 cells by using 5 µg/mL of free or LNC-bound AC133 or IgG1κ control mAbs. A) Data obtained with mAbs conjugated to LNCs by method 1. B) Data obtained with mAbs conjugated to LNCs by method 2. Results, expressed as mean fluorescence intensity (MFI; arbitrary units), represented mean±s.e.m of three independent experiments.

Those observations demonstrated therefore the specific activity of AC133-mAbs when present on immuno-LNCs whatever the conjugation method used and conducted to use advantageous method 2 for further biological evaluation.

iii. Biological properties of AC133-LNCs during incubation with Caco-2 cells.

mAbs have already been used as activating- (Hicks et al., 2002) or, instead, as function blocking-immunoglobulins (Garcion et al., 2001). Although the function of the CD133 protein has not been yet elucidated, the impact of increasing concentrations (5, 10 and 20 µg/mL) of AC133 mAb versus IgG1κ control immunoglobulin was investigated on Caco-2 cell integrity (attachment and survival). Interestingly, 1-hour treatment of Caco-2 cells at 37°C with AC133 mAb at 20 µg/mL induced a dramatic cell detachment from plastic dishes that was not observed with IgG1κ control (Figure 4A). Caco-2 cell treatment with AC133 mAb at the dose of 5 and 10 µg/mL was not capable to trigger this effect (data not shown). Since it was previously observed that soluble and attached immunoglobulins could trigger

distinct biological effects (Schwartz et al., 1991), this cell-detachment assay was used to investigate the impact of AC133 recognition on living Caco-2 cells when AC133 mAb was presented from AC133-LNCs. Caco-2 cells were, therefore, treated for 1-hour at 37°C with 20 µg/mL of free mAb (AC133 versus IgG1κ isotype control) or 20 µg/mL mAb present at the surface of functionalized-LNC (thus corresponding to a 1.1 mg/mL concentration of AC133- or IgG1-LNCs).

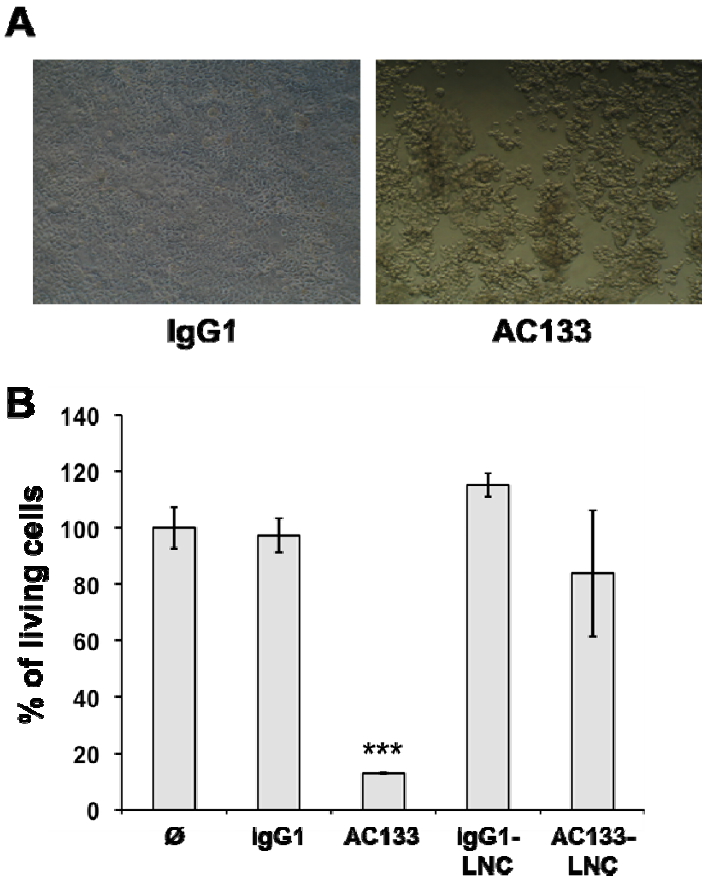


Figure 4: Cell detachment assay corroborated the integrity immuno-LNCs during the recognition step of AC133 expressing cells. A) Photomicrographs demonstrating that treatment of Caco-2 cell monolayers for 1h at 37°C with 20 µg/mL AC133 mAb triggered cell detachment while control IgG1κ immunoglobulins did not. B) Caco-2 cells were treated for 1h at 37°C with IgG1κ immunoglobulins, AC133 mAb, IgG1-LNCs and AC133-LNCs at the equivalent mAb concentration of 20 µg/mL (thus corresponding to 1.1 mg/mL of LNCs). Remaining amount of attached cells was quantified by using the colorimetric MTS/PMS surviving assay. Data represented mean±s.e.m of three independent experiments. Dunnett's test: comparison with control untreated cells (Ø), ***$p < 0.001$.

The percentage of attached living cells was then quantified by use of a MTS/PMS survival assay. Although treatment with free AC133 mAb led to 87.1±0.2% detachment of Caco-2 cells from plastic dishes, treatment with AC133-LNCs did not (Figure 4B). Those results

emphasized, therefore, that AC133 mAb attached to the "LNC matrix" do not trigger similar signals as free AC133 mAb on Caco-2 cells. They also supported that immuno-LNCs do not release fully initially bound mAbs during the 1-hour incubation time with AC133 expressing Caco-2 cells in the reaction medium at 37°C, thus maintaining, at least partially, specific cell recognition capabilities.

b. Evaluation of AC133-specific cellular binding and uptake of AC133-LNCs.

i. Binding of AC133-LNCs onto AC133 expressing Caco-2 cells.

In order to plainly define the interest of AC133-LNCs to target AC133-expressing CSCs, binding of immuno-LNCs at the surface of Caco-2 cells expressing distinct levels of AC133 was investigated. siRNA-mediated knockdown of CD133 was used to down regulate AC133 expression at the surface of Caco-2 cells, thus permitting to obtain high and low AC133 expressing cells, named Caco-2-AC133^{high} and Caco-2-AC133^{low}, respectively. Figure 5A illustrated that use of 30 nM of siRNAs (as described in the Material and Method section) led to more than 50% reduction of AC133 expression at the surface of Caco-2 cells. Binding analysis was then performed by applying 23 µg/mL of NR-stained immuno-LNCs (carrying 0.42 µg/mL of mAbs) onto Caco-2-AC133^{high} and Caco-2-AC133^{low} cell monolayers for 20 minutes at 4°C under gentle agitation. LNC binding at the cell surface was evaluated by semi-quantitative computer assisted fluorescence microscopy image analysis after thresholding. As illustrated on Figure 5B and semi-quantified on Figure 5C, AC133-LNCs attached much better than their IgG1κ counterparts onto Caco-2 cell monolayers. In addition, reduction of AC133 expression by siRNA knockdown also led to a reduction of the binding of AC133-LNCs to Caco-2 cells, (Figure 5B and C). Importantly, whatever the situation analyzed (Caco-2-AC133^{high} with control siRNA or Caco-2-AC133^{low} with CD133 siRNA) the specificity of the AC133-LNC binding was demonstrated and preserved.

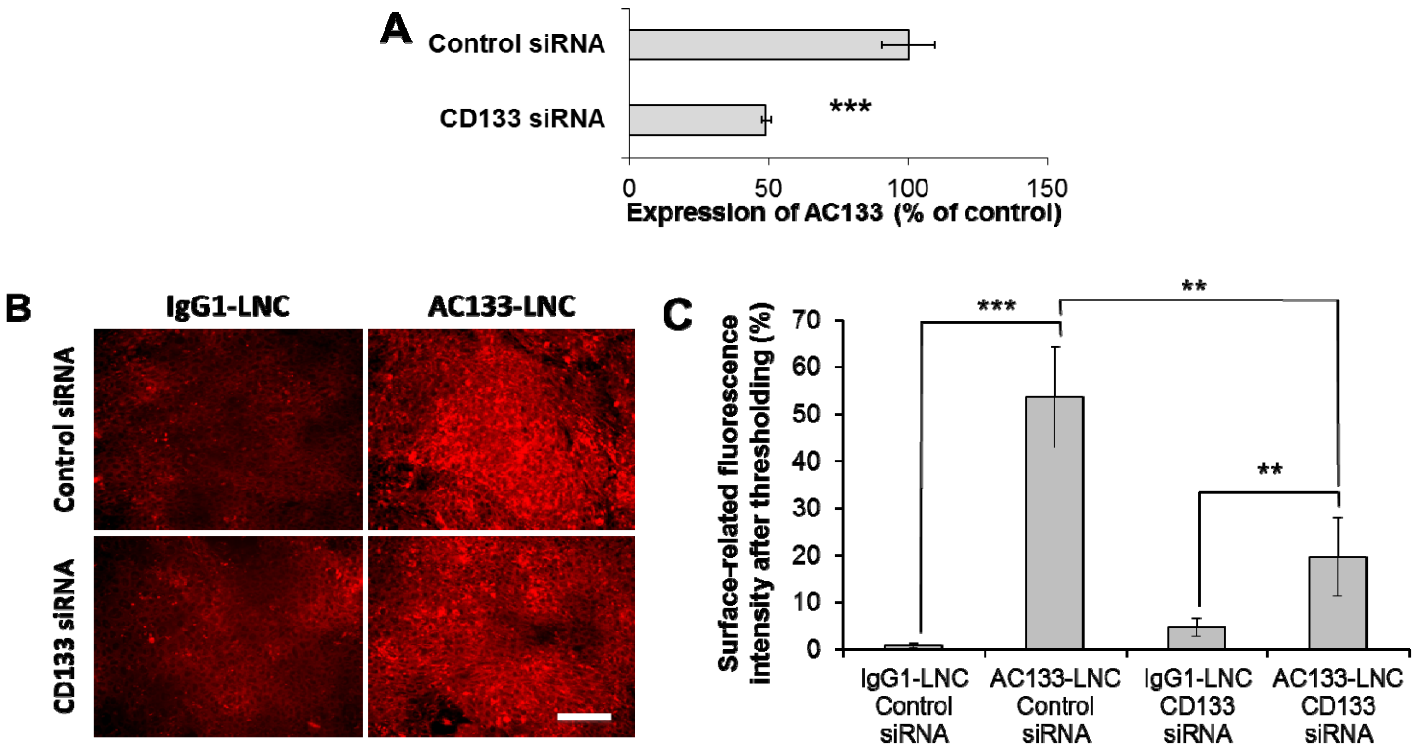


Figure 5: AC133-dependent binding of NR-loaded AC133-LNCs onto the surface of AC133 expressing Caco-2 cells. A) Flow cytometry analysis of AC133 expression assessing the efficiency of siRNA-mediated knockdown within Caco-2 cells. Control siRNA allowed obtaining high AC133 expressing cells (Caco-2-AC133^{high}) while CD133 siRNA allowed obtaining low AC133 expressing cells (Caco-2-AC133^{low}). B) Fluorescent images acquired from Axioscope® 2 optical microscope of the binding of NR-loaded AC133-LNCs onto the surface of Caco-2 cells. 23 µg/mL of NR-stained immuno-LNCs (thus corresponding to 0.42 µg/mL of mAbs) were applied for 20 minutes at 4°C under gentle agitation onto Caco-2 cell monolayers that have been submitted to siRNA knockdown before washing and analysis of cell surface bound fluorescence. Note that AC133-LNCs attached much better to Caco-2 cells than their IgG1κ counterparts. Note also the reduction surface bound fluorescence when expression of AC133 was reduced by use of siRNA knockdown. Bar: 50 µm. C) Semi-quantitative evaluation of LNC binding by computer assisted fluorescence microscopy image analysis after thresholding. Results represented mean±s.e.m of three independent experiments. Dunnett's test: **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

Those data thus established that AC133-LNCs represented a new tool to improve drug distribution and retention in the close vicinity of AC133 expressing CSCs. As such, they represented the third AC133 targeting tool and the second AC133-specific nano-object that has been so far developed with monomethyl auristatin F/AC133-mAb drug conjugates (Smith et al., 2008) and AC133-conjugated carbon nanotubes (Wang et al., 2011) both used to eliminate CSCs.

ii. Uptake of AC133-LNCs by AC133 expressing Caco-2 cells.

Having established that AC133-LNCs were capable to bind specifically to AC133-positive cells, it was further investigated whether AC133-LNCs can be internalized within Caco-2 cells. Thus, 230 µg/mL of NR-stained LNCs or immuno-LNCs (carrying 4.2 µg/mL mAbs) were incubated for 2 hours at 37°C with Caco-2 cells. After quenching of the extracellular fluorescence using trypan blue, intracellular accumulation of NR-stained LNCs was evaluated by flow cytometry. Although native LNCs were, as previously described (Garcion et al., 2006; Paillard et al., 2010; Roger et al., 2009), clearly accumulated within cells, internalization was dramatically reduced when using immuno-LNCs (Figure 6).

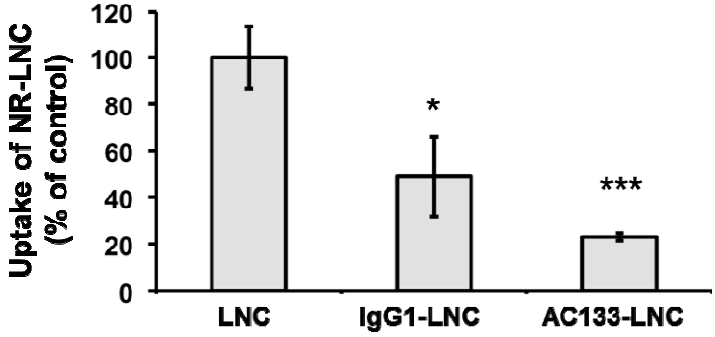


Figure 6: Internalization of native LNCs versus immuno-LNCs within Caco-2 cells. Flow cytometry analysis revealed that treatment of Caco-2 cells for 2h at 37°C with either fluorescently labeled-LNCs, -IgG1-LNCs or -AC133-LNCs at 230 µg/mL (thus corresponding to 4.2 µg/mL of mAbs) led to a strongly reduced intracellular accumulation of IgG1-LNCs and AC133-LNCs as compared to native LNCs. Results represented mean±s.e.m of two independent experiments realized in triplicate. Dunnett's test: *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$.

The inhibition of internalization of immuno-LNCs can be mainly explained by the physical characteristics of those particles, among which their size and negative zeta potential, that may have reduce their non-specific interactions with the negatively charged extracellular surface of the cell plasma membrane. As the presence of AC133 mAbs in place of IgG1κ immunoglobulins onto the surface of LNCs did not improved LNC internalization within Caco-2 cells, it can be concluded that AC133 epitope does not work as a receptor for

endocytosis in contrast to LDL- (Dehouck et al., 1997; Kreuter et al., 2003) or transferrin-receptors (Olivier et al., 2002) widely used for intracellular accumulation of ApoE- or OX26-combined nanoparticles, respectively. However, a reduced cellular uptake would not necessarily preclude drug activity that is also dependent on subcellular bioavailability. As such recent data obtained with monomethyl auristatin F/AC133-mAb drug conjugates on Hep3B hepatocellular carcinoma and Kato III stomach cancer cells suggested that more than intracellular accumulation, routing to the lysosome may have dictated the anticancer drug activity (Smith et al., 2008). Toward the development of CSC targeted therapeutic strategies, this last data emphasized the importance of studying intracellular trafficking behavior of CSC therapeutic ligands that recognized epitopes without well-established biological functions.

4) Conclusion.

In conclusion, by using the bifunctional polymer DSPE-PEG_{2000}-maleimide and synthesizing lipo-immunoglobulins further post-inserted within the LNC shell, a new nanocarrier capable target CSCs through specific recognition of the AC133 epitope was developed. Although internalization and intracellular trafficking properties of the AC133-LNCs need further investigation, specific binding capacities onto AC133 expressing CSCs represented an interesting basis to further apply targeted therapeutic strategies notably within solid tumors. Thus, to revert CSC resistance to chemotherapy or radiotherapy, three major strategies ascribed to AC133 recognition by hydrophobic drug-loaded AC133-LNCs could be further investigated: i) improvement of radionucleide activity-gradients exemplified by lipophilic ^{188}Rhenium complexes for induction of cell death (Allard et al., 2008), ii) deregulation of signaling pathways normally activated, such as inhibition of sonic hedgehog pathways by cyclopamine (Bar et al., 2007), or iii) differentiation toward a phenotype more sensitive to classical treatment by using for instance retinoic acid (Campos et al., 2010; Niu et al., 2010).

Aknowledgments.

We are grateful to the Service Commun de Cytométrie d'Analyses Nucléotidiques, SCCAN, Angers, France, for skilful technical support. This work was supported by the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale", the "Axe Vectorisation Tumorale" from the "Cancéropôle Grand-Ouest" and by "La Ligue Contre le Cancer" throughout an <<Equipe Labellisée 2007>> grant. Erika Bourseau was initially a PhD fellow from the "Conseil Général de Maine-et-Loire" and then a PhD fellow from the "Comité Départemental de Maine-et-Loire de La Ligue Contre le Cancer". Audrey Griveau was a PhD fellow from the "Conseil Général de Maine-et-Loire".

References

Allard, E., Hindre, F., Passirani, C., Lemaire, L., Lepareur, N., Noiret, N., Menei, P., and Benoit, J.P. (2008). 188Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. Eur J Nucl Med Mol Imaging *35*, 1838-1846.

Angelastro, J.M., and Lame, M.W. (2010). Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. Mol Cancer Res *8*, 1105-1115.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature *444*, 756-760.

Bar, E.E., Chaudhry, A., Lin, A., Fan, X., Schreck, K., Matsui, W., Piccirillo, S., Vescovi, A.L., DiMeco, F., Olivi, A., *et al.* (2007). Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. Stem Cells *25*, 2524-2533.

Beduneau, A., Saulnier, P., Hindre, F., Clavreul, A., Leroux, J.C., and Benoit, J.P. (2007). Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. Biomaterials *28*, 4978-4990.

Boado, R.J., Zhang, Y., Wang, Y., and Pardridge, W.M. (2008). GDNF fusion protein for targeted-drug delivery across the human blood-brain barrier. Biotechnol Bioeng *100*, 387-396.

Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K.E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., *et al.* (2010). Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. Clin Cancer Res *16*, 2715-2728.

Casaco, A., Lopez, G., Garcia, I., Rodriguez, J.A., Fernandez, R., Figueredo, J., Torres, L., Perera, A., Batista, J., Leyva, R., *et al.* (2008). Phase I single-dose study of intracavitary-administered Nimotuzumab labeled with 188 Re in adult recurrent high-grade glioma. Cancer Biol Ther *7*, 333-339.

Corbeil, D., Roper, K., Weigmann, A., and Huttner, W.B. (1998). AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? Blood *91*, 2625-2626.

Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M.P., Pierce, A., Torpier, G., and Cecchelli, R. (1997). A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. J Cell Biol *138*, 877-889.

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol *62*, 649-671.

Ferrandina, G., Petrillo, M., Bonanno, G., and Scambia, G. (2009). Targeting CD133 antigen in cancer. Expert Opin Ther Targets *13*, 823-837.

Friedmann, E. (1952). Spectrophotometric investigation of the interaction of glutathione with maleimide and n-ethylmaleimide. Biochim Biophys Acta *9*, 65-75.

Garcion, E., Faissner, A., and ffrench-Constant, C. (2001). Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. Development *128*, 2485-2496.

Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., Menei, P., and Benoit, J.P. (2006). A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. Mol Cancer Ther *5*, 1710-1722.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., and Benoit, J.P. (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. Pharm Res *19*, 875-880.

Hicks, C., Ladi, E., Lindsell, C., Hsieh, J.J., Hayward, S.D., Collazo, A., and Weinmaster, G. (2002). A secreted Delta1-Fc fusion protein functions both as an activator and inhibitor of Notch1 signaling. J Neurosci Res *68*, 655-667.

Horst, D., Scheel, S.K., Liebmann, S., Neumann, J., Maatz, S., Kirchner, T., and Jung, A. (2009). The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. J Pathol *219*, 427-434.

Huwyler, J., Wu, D., and Pardridge, W.M. (1996). Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 14164-14169.

Iznaga Escobar, N., Morales, A., and Nunez, G. (1996). Micromethod for quantification of SH groups generated after reduction of monoclonal antibodies. Nucl Med Biol *23*, 641-644.

Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S.E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen, H., and Begley, D.J. (2003). Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. Pharm Res *20*, 409-416.

Lacoeuille, F., Garcion, E., Benoit, J.P., and Lamprecht, A. (2007). Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. J Nanosci Nanotechno *7*, 4612-4617.

Maruyama, K., Takizawa, T., Yuda, T., Kennel, S.J., Huang, L., and Iwatsuru, M. (1995). Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. Biochim Biophys Acta *1234*, 74-80.

Miletic, H., Niclou, S.P., Johansson, M., and Bjerkvig, R. (2009). Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. Expert Opin Ther Targets *13*, 455-468.

Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., and Buck, D.W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood *90*, 5013-5021.

Morris, S.R., and Carey, L.A. (2006). Trastuzumab and beyond: New possibilities for the treatment of HER2-positive breast cancer. Oncology (Williston Park) *20*, 1763-1771; discussion 1771-1762, 1774-1766.

Morrison, P.F., Lonser, R.R., and Oldfield, E.H. (2007). Convective delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human putamen. J Neurosurg *107*, 74-83.

Niu, C.S., Li, M.W., Ni, Y.F., Chen, J.M., Mei, J.M., Li, J., and Fu, X.M. (2010). Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells. J Exp Clin Cancer Res *29*, 113.

Olivier, J.C., Huertas, R., Lee, H.J., Calon, F., and Pardridge, W.M. (2002). Synthesis of pegylated immunonanoparticles. Pharm Res *19*, 1137-1143.

Paillard, A., Hindre, F., Vignes-Colombeix, C., Benoit, J.P., and Garcion, E. (2010). The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. Biomaterials *31*, 7542-7554.

Pardridge, W.M., Wu, D., and Sakane, T. (1998). Combined use of carboxyl-directed protein pegylation and vector-mediated blood-brain barrier drug delivery system optimizes brain uptake of brain-derived neurotrophic factor following intravenous administration. Pharm Res *15*, 576-582.

Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., and Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nat Nanotechnol *2*, 751-760.

Reardon, D.A., Zalutsky, M.R., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Herndon, J.E., 2nd, McLendon, R.E., Pegram, C.N., Quinn, J.A., Rich, J.N.*, et al.* (2008). A pilot study: 131I-antitenascin monoclonal antibody 81c6 to deliver a 44-Gy resection cavity boost. Neuro Oncol *10*, 182-189.

Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., and Benoit, J.P. (2009). Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. J Control Release *140*, 174-181.

Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., and Benoit, J.P. (2010). Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells. Eur J Pharm Sci *40*, 422-429.

Schrama, D., Reisfeld, R.A., and Becker, J.C. (2006). Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov *5*, 147-159.

Schulz, H., Bohlius, J.F., Trelle, S., Skoetz, N., Reiser, M., Kober, T., Schwarzer, G., Herold, M., Dreyling, M., Hallek, M.*, et al.* (2007). Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. J Natl Cancer Inst *99*, 706-714.

Schwartz, M.A., Lechene, C., and Ingber, D.E. (1991). Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 7849-7853.

Sims, G.E., and Snape, T.J. (1980). A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. Anal Biochem *107*, 60-63.

Smith, L.M., Nesterova, A., Ryan, M.C., Duniho, S., Jonas, M., Anderson, M., Zabinski, R.F., Sutherland, M.K., Gerber, H.P., Van Orden, K.L., *et al.* (2008). CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. Br J Cancer *99*, 100-109.

Tirosh, O., Barenholz, Y., Katzhendler, J., and Priev, A. (1998). Hydration of polyethylene glycol-grafted liposomes. Biophys J *74*, 1371-1379.

Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P., *et al.* (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. Cell Stem Cell *1*, 389-402.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer *8*, 755-768.

Wang, C.H., Chiou, S.H., Chou, C.P., Chen, Y.C., Huang, Y.J., and Peng, C.A. (2011). Photothermolysis of glioblastoma stem-like cells targeted by carbon nanotubes conjugated with CD133 monoclonal antibody. Nanomedicine *7*, 69-79.

Weyland, M., Manero, F., Paillard, A., Gree, D., Viault, G., Jarnet, D., Menei, P., Juin, P., Chourpa, I., Benoit, J.P., *et al.* (2011). Mitochondrial targeting by use of lipid nanocapsules loaded with SV30, an analogue of the small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1. J Control Release.

Winau, F., Westphal, O., and Winau, R. (2004). Paul Ehrlich--in search of the magic bullet. Microbes Infect *6*, 786-789.

Wu, Y., and Wu, P.Y. (2009). CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. Stem Cells Dev *18*, 1127-1134.

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C.C. (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. Clin Cancer Res *14*, 123-129.

Dans ce chapitre, nous avons présenté un nouveau procédé de synthèse d'un vecteur capable de reconnaître spécifiquement des cellules AC133-positives à partir du couplage d'un anticorps monoclonal anti-AC133 avec des NCLs de 100nm. La caractérisation du vecteur a permis de montrer que le vecteur obtenu possède une taille nanométrique monodisperse et un potentiel zeta négatif. Le greffage de l'anticorps est stable lors d'une utilisation dans un milieu de culture in vitro. La méthode de la thiolation par le réactif de Traut n'affecte pas le site de reconnaissance de l'anticorps monoclonal utilisé. Cette méthode permet de diminuer significativement les doses de DSPE–PEG2000–maleimide utilisées pour la synthèse et réduit le nombre d'étape de purification sur colonne limitant ainsi les pertes de matériel.

L'évaluation de la spécificté des NCL-AC133 sur des cellules exprimant ou non AC133 et comparées à des immuno-NCLs contrôles a montré que les NCL-AC133 peuvent reconnaître spécifiquement l'épitope AC133. La comparaison de l'adhérence de NCLs par rapport aux NCL-AC133 et aux immuno-NCLs contrôles (résultats non présentés) ont permis de mettre en évidence une inhibition d'adhérence aux cellules dues au greffage de l'immunoglobuline. En effet, les NCLs ont un potentiel zeta de -6mV alors que les immuno-NCLs ont un potentiel zeta d'environ -20mV. La membrane plasmique étant chargée négativement, le potentiel zeta des immuno-NCLs pourrait conduire à une répuslion de charge avec la membrane et donc une inhibition de l'adhérence par rapport aux NCLs. Ces résultats expliquent l'inhibition d'endocytose des immuno-NCLs comparées aux NCLs natives. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de ces vecteurs pour une implantation loco-régionale favoriserait une meilleur circulation des immuno-NCLs dans les tissus par diminution de la rétention des vecteurs au site d'injection dûs à une rétention non spécifique au niveau des cellules.

Le développement de l'anticorps AC133 conjugué à une molécule cytotoxique par Smith et al. a mis en évidence que cet anticorps conjugué est capable d'être internalisé dans des lignées cellulaires de cancer du foie ou gastrique, mais que la voie d'endocytose empreintée varie en fonction du type cellulaire (Smith *et al.* 2008). Ces études montrent donc que le ciblage de CD133 est complexe. En effet, la stratégie à utiliser pour la délivrance d'un principe actif avec l'aide d'un outil ciblant CD133 peut être à la fois vecteur-dépendante mais aussi cellule-dépendante. Il est donc important de connaître la fonction de la molécule définie comme cible afin d'établir une stratégie de ciblage adaptée.

III. L'importance du marqueur de cellules souches CD133 dans l'internalisation de transferrine et le métabolisme du fer dans les cellules de cancer du colon Caco-2.

L'étude de l'internalisation des nanocapsules lipidiques dans les cellules Caco-2, nous a permis de mettre en évidence un rôle pour la protéine CD133 dans l'internalisation des NCLs par inhibition de CD133 en utilisant des siRNA.

A ce jour, peu d'études ont été réalisées sur la fonction de CD133. La découverte de l'implication de CD133 dans les mécanismes d'endocytose est donc un pas important dans la compréhension de la fonction de cette protéine.

En effet CD133, localisée dans des protrusions membranaires, est capable de lier le cholestérol (Corbeil *et al.* 2000) et possède un site de liaison aux gangliosides au niveau de son segment N-Terminal (Taieb *et al.* 2009). L'implication des protrusions membranaires ,du cholestérol et des gangliosides dans les mécanismes d'endocytose caveolae-dépendantes (Brown and London 2000; Singh *et al.* 2010) ainsi que le rôle de CD133 dans l'internalisation des NCLs, suggère une possible implication de CD133 dans les mécanismes d'endocytose. Nous avons donc utilisé des traceurs fluorescents dont l'internalisation est associée préférenciellement à une des voies d'endocytose pour évaluer l'implication de CD133 dans ces mécanismes.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence l'implication de CD133 dans l'endocytose de la transferrine, un transporteur du fer. Nous avons donc par la suite réalisé des essais pour déterminer s'il exite un lien entre CD133 et le métabolisme du fer.

The importance of the stem cell marker prominin-1/CD133 in the uptake of transferrin and in iron metabolism in human colon cancer Caco-2 cells

Erika Bourseau-Guilmain, Audrey Griveau, Jean-Pierre Benoit and Emmanuel Garcion ✉

Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, Inserm, UMR-S 646, Université d'Angers, Angers (France)

Running title: CD133 and endocytosis

Keywords: CD133, AC133, endocytosis, holo-transferrin, cellular iron metabolism, tumor stem cell

✉Corresponding author:

Inserm U646, IBS – CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France

Tel.: +33 2 44 68 85 43/Fax: +33 2 44 68 85 46

E-mail address: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

Abstract.

As the pentaspan stem cell marker CD133 was shown to bind cholesterol and to localize in plasma membrane protrusions, we investigated a possible function for CD133 in endocytosis. Using the CD133 specific siRNA knockdown strategy and non-differentiated human colon cancer Caco-2 cells that constitutively over-expressed CD133, we provide for the first time direct evidence for a role of CD133 in the intracellular accumulation of fluorescently labeled extracellular compounds. Assessed using AC133 monoclonal antibody, CD133 knockdown was shown to inhibit Alexa488-transferrin (Tf) uptake in Caco-2 cells but had no impact on FITC-dextran or FITC-cholera-toxin. Absence of effect of the CD133 knockdown on Tf recycling supported a role for CD133 in inhibiting Tf endocytosis rather than in stimulating Tf exocytosis. Use of previously identified inhibitors of known endocytic pathways established that Tf uptake within Caco-2 cells was primarily mediated by the clathrin pathway in both $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ situations. Also, cholesterol extraction with methylβcyclodextrine up regulated Tf uptake at greater intensity in the $CD133^{high}$ situation than in the $CD133^{low}$ situation, thus suggesting a role for cholesterol in the inhibitory effect of CD133 on endocytosis. Interestingly, Caco-2 cell treatment with the AC133 antibody, which recognizes a CD133 glycosylation associated epitope, down regulated Tf uptake, thus demonstrating that direct binding to CD133 from the extracellular space could affect Caco-2 cell endocytosis. Finally, as Tf is involved in providing iron to the cell, the potential effect of iron supplementation on CD133 expression was investigated. Fe-NTA (nitrilotriacetic acid - Fe(III)) treatment was shown to dose-dependently down regulate AC133/CD133. Taken together, these data extend our knowledge of the function of CD133 and underline the interest of further exploring the CD133-Tf-iron network.

Keywords

Prominin-1, CD133, endocytosis, transferrin, iron, metabolism, cancer.

Introduction

Following the use of new monoclonal antibodies raised against neuroepithelial and hematopoietic stem cells, CD133, also known in humans and rodents as Prominin-1, was first isolated and cloned in 1997 [1,2,3]. CD133 is a five-domain transmembrane protein, composed of an N-terminal extracellular tail, two small cytoplasmic loops, two large extracellular loops containing seven potential glycosylation sites and a short C-terminal intracellular tail that can be alternatively spliced [4] or phosphorylated [5].

Despite constant research efforts, the biological function of CD133 remains largely unknown. Among notorious phenotypes, it has been shown that a truncated CD133, which is not transported to cell membrane, leads to human retinal degeneration [6]. Underlining this important observation, analysis of a generation of CD133-deficient mice revealed that, while expressed very early during retinal development, CD133 acted as a key regulator of disk morphogenesis and that loss of CD133 caused photoreceptor degeneration and blindness [7]. In addition, AC133, a glycosylated epitope of CD133 protein initially associated with embryonic stem cells [8] and a variety of somatic stem cells, was extensively described as a putative cancer stem cell marker in blood, brain, colon, prostate, lung, breast, liver, and skin cancers [9,10]. Other investigations revealed that CD133 is linked to cell metabolism as a glucose responsive gene in myotubes [11], as well as providing evidence for bioenergetic stress [12] and of non-exposure to high oxygen tension (Bourseau et al., submitted) in gliomas.

At the subcellular level, CD133 is preferentially localized in plasma membrane protrusions and microvilli [13]. From there, CD133 can bind to cholesterol [14] and interact with gangliosides [15]. As membrane protrusions and microvilli enable extension of the membrane surface in order to increase cell exposure to the extracellular space, these observations provide important clues to identifying the molecular role of CD133, notably by considering cellular exchanges with the microenvironment. Indeed, CD133 was found in membrane vesicles distinct from exosomes that were released from epithelial cells during differentiation [16].

In parallel to these outside-in signals, cholesterol and sphingolipids segregate in lipid raft membrane microdomains implicated in inside-out signaling and endocytosis [17,18]. Considering the tight relation between CD133 and cholesterol, plus its possible link to sphingolipids and exposure to the extracellular space, we hypothesized that CD133 is

involved in endocytosis: a fundamental process by which extracellular compounds are internalized and distributed to intracellular compartments.

In the present study, using the RNA-interference strategy and undifferentiated human colon cancer Caco-2 cells that constitutively over-expressed CD133/AC133, we provide for the first time evidence for a role of CD133 in the intracellular accumulation of extracellular compounds, exemplified by transferrin (Tf). In addition to data that establish a role for CD133 in endocytosis, we also demonstrate that CD133 itself is regulated by iron, thus supporting the existence of a Tf-CD133-iron network. These new observations are discussed in the light of the CD133 pattern of expression and current knowledge in the field.

Materials and methods

Cell culture

Undifferentiated human colon carcinoma Caco-2 cells (American type culture collection : HTB-37™) were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza, Levallois-Perret, France) containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine. The medium was added with 10% of fetal bovine serum (FBS; Lonza, Verviers, Belgium), 1% antibiotics (10 units/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 25 µg/mL amphotericin B; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and 1% of non-essential amino acids (NEAA; Lonza, Verviers, Belgium). When cells reached 80% confluence, they were dissociated in 0.5% porcine trypsin and 0.2 g/mL EDTA (Lonza, Verviers, Belgium) before re-plating on uncoated plastic flasks at 15 x 10^3 cells/cm^2. Half the medium was replaced by fresh medium every two days.

siRNA knockdown of CD133

Caco-2 cells were plated in six-well plates with 2.3 x 10^5 cells per well in 2 mL of the aforementioned medium for 24 h. Medium was removed and cells were transfected with 30 nM of RNA oligonucleotide duplexes (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) using the N-TER reagent according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). N-TER/siRNA complexes were then incubated in Caco-2 medium for 48 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO_2. siRNAs were then removed and replaced by fresh medium for 24 h. A sequence scramble was used as negative control: 5'-GUCCGGAAUUACCAUGAGUdTdT-3'. The sequence used to perform targeted RNA interference inhibition of CD133 was 5'-CCCUUAAUGAUAUACCUGAdTdT-3'.

AC133 immunolabeling

Caco-2 cells exposed to siRNAs were collected and dissociated using Versene (Lonza). Cells were incubated with 5 µg/mL AC133 antibody (Miltenyi Biotech, Paris, France) or IgG1κ isotype control (BD-Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 1 hour at 4 °C in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Cells were then washed three times in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, and incubated for 30 minutes at 4 °C

with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')2 fragment polyclonal antibody (Dakocytomation, Trappes, France) at 20 µg/mL in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Following three more washes in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, cells were re-suspended in PBS containing 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide.

Flow cytometry

A BD FACSCalibur™ fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest™ software (BD-Biosciences) were used for flow cytometry acquisition. Analysis was carried out using WinMDI 2.9 software (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA).

Internalization of transferrin (Tf), dextran (Dx) and cholera toxin subunit B (CTB)

The medium of transfected cells was removed and replaced by DMEM supplemented with 1% of serum-free N1 medium (Sigma Aldrich) for 1 h. The three following components were then added to the medium for 1 h: Tf-Alexa 488 at 0.5 and 5 µg/mL (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), Dx-FITC at 0.5 and 5 mg/mL (Sigma Aldrich) and CTB-FITC at 1 and 10 µg/mL (Invitrogen). Cells were then dissociated using Versene (Lonza). To enable determination of the fraction of labeled molecule that was effectively internalized within cells, extracellular fluorescence was quenched using 0.4% trypan blue (Sigma Aldrich). Cells were then washed in PBS and re-suspended in PBS containing 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide. Internalization of fluorescently labeled Tf, Dx and CTB was monitored by flow cytometry.

Cell treatment with chemical inhibitors of endocytosis and cellular uptake of Tf

Previously identified chemical inhibitors of known endocytic pathways were used as previously described [19,20,21]. Briefly, transfected Caco-2 cells were pre-treated with inhibitors for 1 hour at 37 °C in N1 medium. Chlorpromazine (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) was used to inhibit clathrin-mediated transport [22], while filipin (1 µg/L; Sigma-Aldrich) and dimethylamiloride (DMA, 10 µmol/L; Sigma-Aldrich) were used to inhibit caveolae-dependent endocytosis [23] and macropinocytosis [24], respectively. Cholesterol depletion was obtained by a 2-hour pretreatment with methyl-β-cyclodextrin (MβCD, 10 mM; Sigma-

Aldrich) in the presence of lovastatin (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) [25,26]. Subsequently, cellular uptake of 5 µg/mL Tf-Alexa 488 was monitored by flow cytometry analysis as described above. For cholesterol inhibition, 1 µg/mL lovastatin was also maintained in the medium during the treatment with Tf-Alexa 488.

Analysis of the release of Tf from Caco-2 cells after internalization

Control and CD133-specific siRNA were used to generate $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ transfected Caco-2 cells, respectively. Cells were then incubated with Tf-Alexa 488 for 2 h at 37 °C/5% CO_2 before the extracellular media was removed, washed and replaced by fresh medium free from Tf-Alexa 488. After further incubation at 37 °C/5% CO_2 for 1 h, 2 h and 3 h, the remaining intracellular Tf-Alexa 488 fluorescence, representing the amount of Tf-Alexa 488 that was not recycled to the extracellular compartment, was measured by semi-quantitative flow cytometry as described above.

Analysis of Tf uptake by Caco-2 cells after treatment with the AC133 antibody

Caco-2 cells were plated at 2.3 x 10^5 in 24-well plates in 400 µL of serum containing medium. After a 24-h initial incubation at 37 °C/5% CO_2 the initial medium was replaced by N1 serum free medium before incubation with either 0, 5, or 10 µg/mL of the AC133 antibody or of isotype control IgG1κ. Tf-Alexa 488 was then added at 5 µg/mL and incubated at 37 °C/5% CO_2 for 1 h to study the impact of the immunoglobulin treatment on Tf-Alexa 488 uptake. Tf-Alexa 488 uptake was quantified by flow cytometry as described above.

Iron treatments

One day before iron treatment started, FBS containing medium was replaced by serum free N1 medium. Cells were then treated with various concentrations (50-800 µmol/L) of ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTA) for 72 h at 37 °C/5% CO_2, as indicated. Fe-NTA (molar ratio 1:4) was extemporaneously prepared as a 20-mM stock from NTA and ferric chloride hexahydrate (Sigma-Aldrich).

Database, bioinformatics

To search for putative iron responsive element (IRE) sequences within the 3' and 5' untranslated region (UTR) of human CD133 mRNA, the sequences used in this study (among which *Homo sapiens* prominin 1 transcript variant 2, NM_001145847.1) were obtained from NCBI GenBank. All sequence alignments were done using the ClustalW computer program from the EMBL European Bioinformatics Institute (Heidelberg, Germany). The SIREs (searching for IREs) web server (http://ccbg.imppc.org/sires/) was also used for prediction of iron responsive elements in RNA [27].

Statistical analysis

XLSTAT 2006 Version 2006.3 (Addinsoft Paris, France) was used for data analysis. The statistical significance of each experiment was determined by a Dunnett's test. The tests were considered as significant with p values < 0.05.

Results

Impact of specific siRNA-mediated knockdown of CD133 on the intracellular accumulation of Tf, Dx and CTB in non-differentiated Caco-2 cells

To determine the potential influence of CD133 on the intracellular accumulation of extracellular compounds, non-differentiated human colon carcinoma Caco-2 cells, which naturally express high levels of CD133, were used. Using either siRNA that does not lead to transcriptional down-regulation (control siRNA) or siRNA that does down regulate targeted CD133 mRNA and protein expression (CD133 siRNA), two situations were analyzed: Caco-2 cells expressing high levels of CD133, and Caco-2 cells expressing low levels of CD133. **Figure 1A** shows that treatment of Caco-2 cells with 30 nM of CD133 siRNA effectively led to a reduction of 52 ± 11% in CD133 protein expression, analyzed by flow cytometry immunofluorescence (AC133 antibody) compared to the control siRNA. To analyze Caco-2 cell pinocytic ability in the $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ situations, the intracellular accumulation of exogenous markers of pinocytic pathways was then monitored. Although alternative internalization pathways have been described depending on cell types and differentiation status (for review see [28]), Tf-Alexa 488, Dx-FITC and CTB-FITC were used as prototype markers of receptor mediated endocytosis [29], fluid phase endocytosis [24,30] and caveolae dependent endocytosis [23,31], respectively. Flow cytometry measurement of intracellular fluorescence after 1 h exposure of $CD133^{high}$-Caco-2 cells to either 0.5 or 5 mg/mL Dx-FITC, 1 or 10 μg/mL CTB-FITC and 0.5 or 5 μg/mL Tf-Alexa 488 enabled 100% uptake to be measured compared to the basal geomean fluorescent intensity of vehicle alone treated cells representing 0% uptake. Although CD133 knockdown had no impact on intracellular accumulation of Dx-FITC **(Figure 1B)** or on CTB-FITC **(Figure 1C)**, cellular uptake of Tf-Alexa 488 was significantly amplified in $CD133^{low}$-Caco-2 cells whatever the concentration tested **(Figure 1D)**. These data thus established for the first time that CD133 act as a modulator of intracellular accumulation of exogenous compounds.

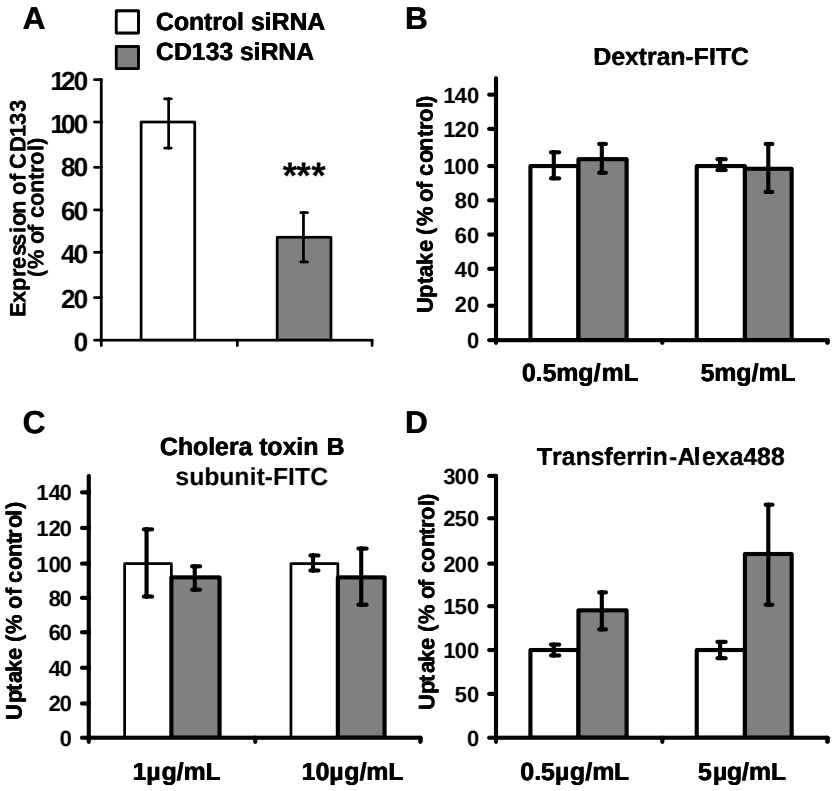


Figure 1: Specific siRNA mediated knockdown of CD133 within non-differentiated Caco-2 cells led to an increase in Tf intracellular accumulation but had no impact on Dx and CTB uptake. A) Immunofluorescence associated flow cytometric analysis of CD133 expression on non-differentiated Caco-2 cells treated with 30 nM of control or CD133-specific siRNA. Results are expressed as a percentage of the control treatment, representing the geomean fluorescence intensity levels obtained after AC133 immunostaining of cells treated with irrelevant siRNA ($CD133^{high}$ Caco-2 cells); note the effective down regulation of CD133 when CD133-specific siRNA ($CD133^{low}$ Caco-2 cells) was used. B-D) Flow cytometric analysis of intracellular uptake of Dx-FITC (B), CTB-FITC (C) and Tf-Alexa 488 (D) within $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ Caco-2 cells after 1 hour of incubation at 37 °C/5%CO_2. Results are expressed as percentage of control, thus representing the geomean fluorescence intensity levels obtained for cells treated with vehicle alone. Data represented mean ± s.e.m. obtained from three independent experiments. Dunnett's test: **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

Effect of siRNA mediated knockdown of CD133 on Tf exocytosis

In view of the fact that CD133 appeared to be an inhibitor of cellular uptake of Tf while having no impact on Dx and CTB, we further focused on the relation between CD133 expression and Tf accumulation. The potential effect of siRNA mediated knockdown of CD133 on Tf-Alexa 488 exocytosis was therefore investigated. For this purpose, $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ non-differentiated Caco-2 cells were incubated with Tf-Alexa 488 for 2 h at 37°C/5% CO_2 before the extracellular medium was removed, washed and replaced by fresh medium free from Tf-Alexa 488. After further incubation for 1, 2 and 3 h at 37 °C/5% CO_2 the amount of Tf-Alexa 488 that was not recycled to the extracellular compartment was measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. Data presented in **Figure**

2 established that intracellular levels of Tf-Alexa 488 decreased with incubation time. After 1 h of incubation more than 80% of the internalized Tf-Alexa 488 remained within cells in both $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ expressing cells while after a 3 h of incubation, 54 ± 9% and 43 ± 4% of the internalized Tf-Alexa 488 remained within $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ expressing cells, respectively. However at all times studied, no significant difference was observed depending on CD133 expression levels **(Figure 2)**. These observations emphasized that although Tf recycling occurred in both $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ non-differentiated Caco-2 cells, short term differences in intracellular Tf accumulation are due essentially to the impact of CD133 on endocytosis mechanisms rather than exocytosis.

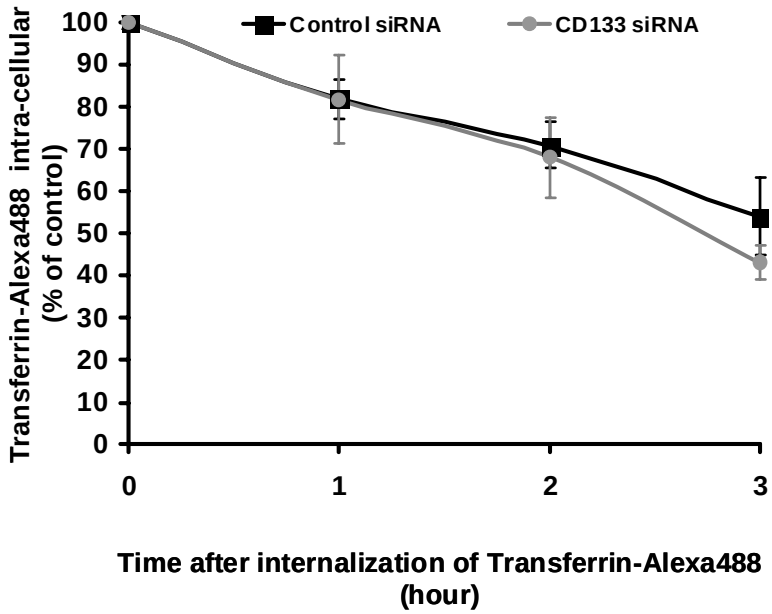


Figure 2: Specific siRNA mediated knockdown of CD133 within non-differentiated Caco-2 cells did not affect short-term Tf exocytosis. $CD133^{high}$ (control siRNA) and $CD133^{low}$ (CD133 siRNA) non-differentiated Caco-2 cells were exposed to Tf-Alexa 488 for 2 h at 37 °C/5% CO_2 before the extracellular medium was removed, washed and replaced by fresh medium free from Tf-Alexa 488. Amounts of Tf-Alexa 488 that were not recycled to the extracellular compartment were measured by flow cytometric analysis after further cell incubation at 37 °C/5% CO_2 for 1 to 3 hours. Data are expressed as a % of Tf-Alexa 488 initially internalized. They represent mean ± s.e.m. obtained from three independent experiments.

Effect of chemical inhibitors of known endocytic pathways on the uptake of Tf by non-differentiated Caco-2 cells depending on the level of CD133 expression

Having established that the level of expression of CD133 had an impact on Tf uptake within non-differentiated Caco-2 cells but did not modulate Tf recycling, we then addressed the question whether CD133 is involved in specific pinocytic pathways [28]. For this purpose, uptake of Tf-Alexa 488 within $CD133^{high}$ and $CD133^{low}$ expressing cells was monitored after

treatment with previously identified chemical inhibitors of known endocytic pathways. Chlorpromazine was used to inhibit clathrin mediated transport [22], filipin to inhibit caveolae dependent endocytosis [23] and DMA to inhibit macropinocytosis [24]. Flow cytometry established that pretreatment of control $CD133^{high}$ Caco-2 cells with filipin, chlorpromazine and DMA before exposure to 5 µg/mL Tf-Alexa 488, led to a 30%, 90% and non-significant reduction in Tf uptake, respectively **(Figure 3)**. The major impact of chlorpromazine combined with the slighter effect of filipin thus emphasized that Tf accumulation within non-differentiated Caco-2 cells was mainly due to clathrin-mediated transport [32]. The filipin effect could be explained by the fact endocytosis of protopic substrates for receptor-mediated endocytosis, such as LDL or Tf, which usually route to the intracellular compartment through the clathrin pathway, could alternatively use the caveolae pathway [33,34]. Moreover, as cholesterol has been shown to be involved in the formation of clathrin coated endocytic vesicles [26], filipin, which sequestrates cholesterol, may also have an indirect impact on clathrin endocytosis. Interestingly, when considering CD133 knockdown and $CD133^{low}$ Caco-2 cells, very similar data were obtained with filipin, chlorpromazine and DMA, leading to 18%, 85% and non-significant reduction in Tf uptake, respectively (Figure 3). Thus, the quantitative effects of CD133 on Tf endocytosis appear to be mainly related to the clathrin-dependent pathway. Surprisingly, cholesterol depletion, achieved by using MβCD combined with lovastatin [25,26], which has been said to affect clathrin independent pathways and to some extent clathrin dependent pathways [26,35,36], resulted in a major improvement in Tf-Alexa 488 accumulation within $CD133^{high}$ Caco-2 cells (+49%, **Figure 3**). Interestingly, the impact of cholesterol depletion on Tf-Alexa 488 uptake within $CD133^{low}$ Caco-2 cells was less marked (+21%, **Figure 3**). These last data supported the hypothesis that CD133 interaction with intracellular cholesterol also has an impact on Tf endocytosis.

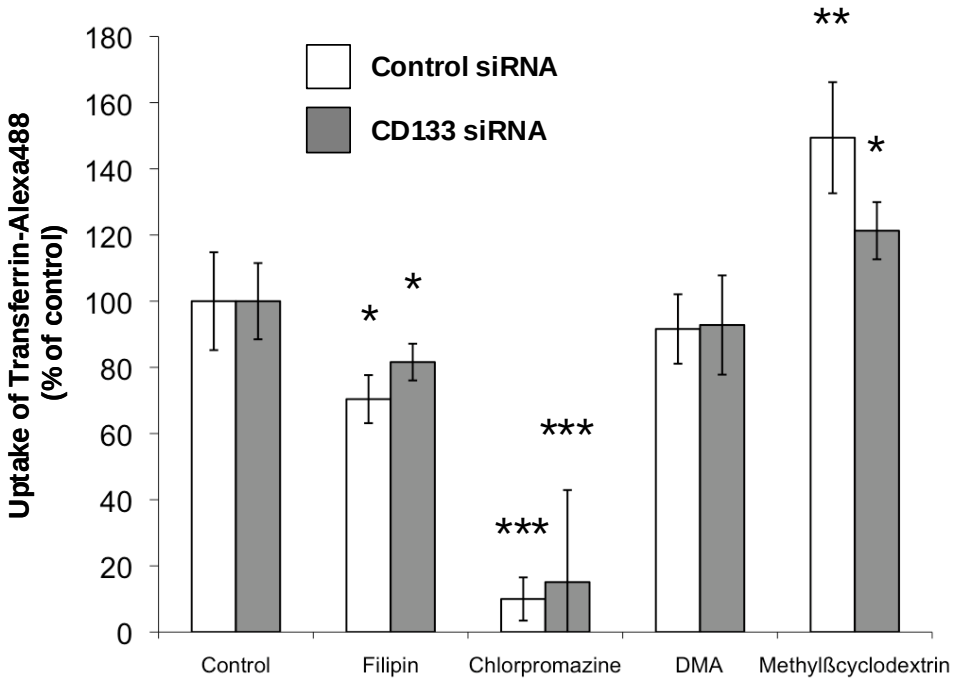


Figure 3: Consequences of CD133-specific siRNA knockdown for the effectiveness of chemical modulators of known endocytic pathways in modulating Tf uptake by non-differentiated Caco-2 cells. After treatment with either vehicle alone (control), filipin, chlorpromazine, DMA or methyl-β- cyclodextrin added with lovastatin (MβCD), $CD133^{high}$ (control siRNA) and $CD133^{low}$ (CD133 siRNA) non-differentiated Caco-2 cells were exposed to 5 µg/mL Tf-Alexa 488. Cellular internalization of Tf-Alexa 488 was then monitored by flow cytometry. Results are expressed as a % of Tf-Alexa 488 amounts that were internalized in the vehicle treated control. Note the absence of effect of CD133-siRNA knockdown on the major inhibition of Tf-uptake caused by chlorpromazine. Note also the reduced up regulatory effect of cholesterol extraction in the CD133 low situation (MβCD). Data represented mean ± s.e.m. of a triplicate obtained from one representative experiment that was reproduced twice. Comparisons with control: Dunnett's test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; comparison between control siRNA and CD133 siRNA: Dunnett's test: $°p < 0.05$.

Treatment of non-differentiated Caco-2 cells with the AC133 antibody recognizing the extracellular domain of CD133 resulted in a reduction in Tf uptake

Having established that CD133 expression quantitatively affected Tf endocytosis, we then considered that a direct interaction between the CD133 protein and the Tf endocytic machinery would have been affected by extracellular ligand binding to CD133. As extracellular ligand of CD133 had not yet been identified and since monoclonal antibodies have already been used as activating or as function blocking immunoglobulins, for instance in interactions between integrins and extracellular matrix [37], the AC133 antibody, which recognizes an extracellular glycosylation associated epitope of CD133 [38], was then tested as CD133 ligand on living Caco-2 cells. Interestingly, while treatment of non-differentiated Caco-2 cells with an IgG1κ isotype control immunoglobulin had no effect on the intracellular

accumulation of Tf-Alexa 488 evaluated by flow cytometry **(Figure 4)**, treatment with the AC133 antibody resulted in a major reduction in Tf uptake of 38 ± 8% and 75 ± 1% at 5 and 10 µg/mL, respectively **(Figure 4)**. These data firstly established that AC133 can effectively exert functional effects on living cells and secondly supported a physical interaction between the Tf endocytic machinery and CD133 itself in non-differentiated Caco-2 cells.

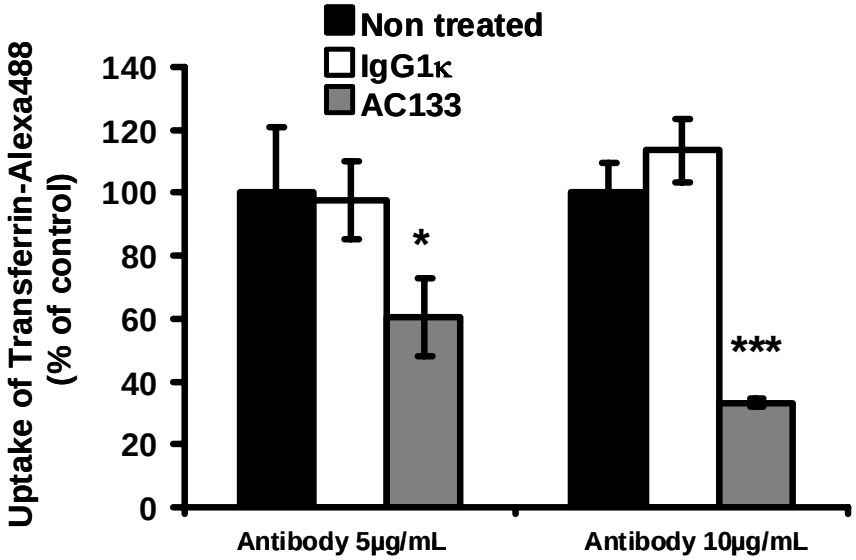


Figure 4: AC133 antibody treatment inhibited Tf uptake in Caco-2 cells. Constitutively CD133-expressing undifferentiated Caco-2 cells were exposed to Tf-Alexa 488 for 1 h at 37 °C/5%CO_2 in the presence of 5 or 10 µg/ml of AC133 or IgG1κ immunoglobulin control. Tf-Alexa 488 that was effectively internalized within cells was then monitored by flow cytometry. Results are expressed as a % of Tf-Alexa 488 amounts that were internalized in the untreated control. Data represented mean ± s.e.m. from a triplicate obtained from one representative experiment. Dunnett's test: *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$

Relation between iron supplementation and AC133/CD133 expression

Although Tf-independent iron transport can occur in mammalian cells [39], the majority of extracellular iron is bound to Tf [40] and uptake of iron occurs from iron loaded Tf through Tf-receptor (TfR) dependent endocytosis [28]. Interestingly, most of the proteins involved in iron metabolism are regulated by iron itself notably through iron regulatory proteins (IRP-1, IRP-2) that, in iron starved cells, bind to cis-acting elements called iron responsive elements (IREs) located in the 5' or 3'UTR of transcripts [41,42,43]. Thus, binding of IRPs to IREs located in the 5'UTR of targeted messengers leads to inhibition of translation, as exemplified by ferritin, which is up regulated in response to high iron concentrations [44]. In contrast, recognition of IREs located in the 3'UTR of transcripts lead

to their stabilization, as exemplified by Tf, which is down regulated in response to high iron concentrations [45]. Since the present work established that AC133/CD133 regulated endocytosis of holo-Tf in Caco-2 cells, we further addressed the question whether AC133/CD133 was in turn regulated by iron. For this reason, non-differentiated Caco-2 cells, previously placed in serum free medium, were treated with extemporaneously prepared Fe-NTA (1:4) for 72 hours at 37 °C/5% CO_2 as described by others [39,46,47], thus allowing cells to improve their iron contents. The impact of Fe-NTA treatment on CD133/AC133 expression was then assessed by flow cytometry **(Figure 5)**. As exposure to extracellular iron has previously been shown to be toxic for cells [48], we checked that Fe-NTA concentrations ranging from 50 to 800 µmol/L had no impact on cell shape and attachment (data not shown) or on cell death **(Figure 5A)**. Interestingly, while low concentrations of Fe-NTA did not alter CD133/AC133 expression, 200 to 800 µmol/L Fe-NTA induced dose dependent down regulation of cancer stem cell marker expression **(Figure 5B-C)**. To get more information on the direct or indirect effect of iron on AC133/CD133 expression, a search for putative IRE-like stem loops within the 5'UTR and 3'UTR of human CD133 mRNA was carried out using computer based sequence alignments as described in Materials and Methods. Although previously published IRE sequences [27,42,43,49,50,51,52,53] were not recognized, and the SIREs Web research [27] failed to detect any classical stem loop sequence within the 5'UTR and 3'UTR of human CD133 mRNA, a hairpin loop presenting the non-canonical CAGAGU sequence as observed in the first IRE identified in the human TfR mRNA was identified in the 3'UTR. This selected sequence, which still requires investigation, is presented among validated IREs in **Figure 6**.

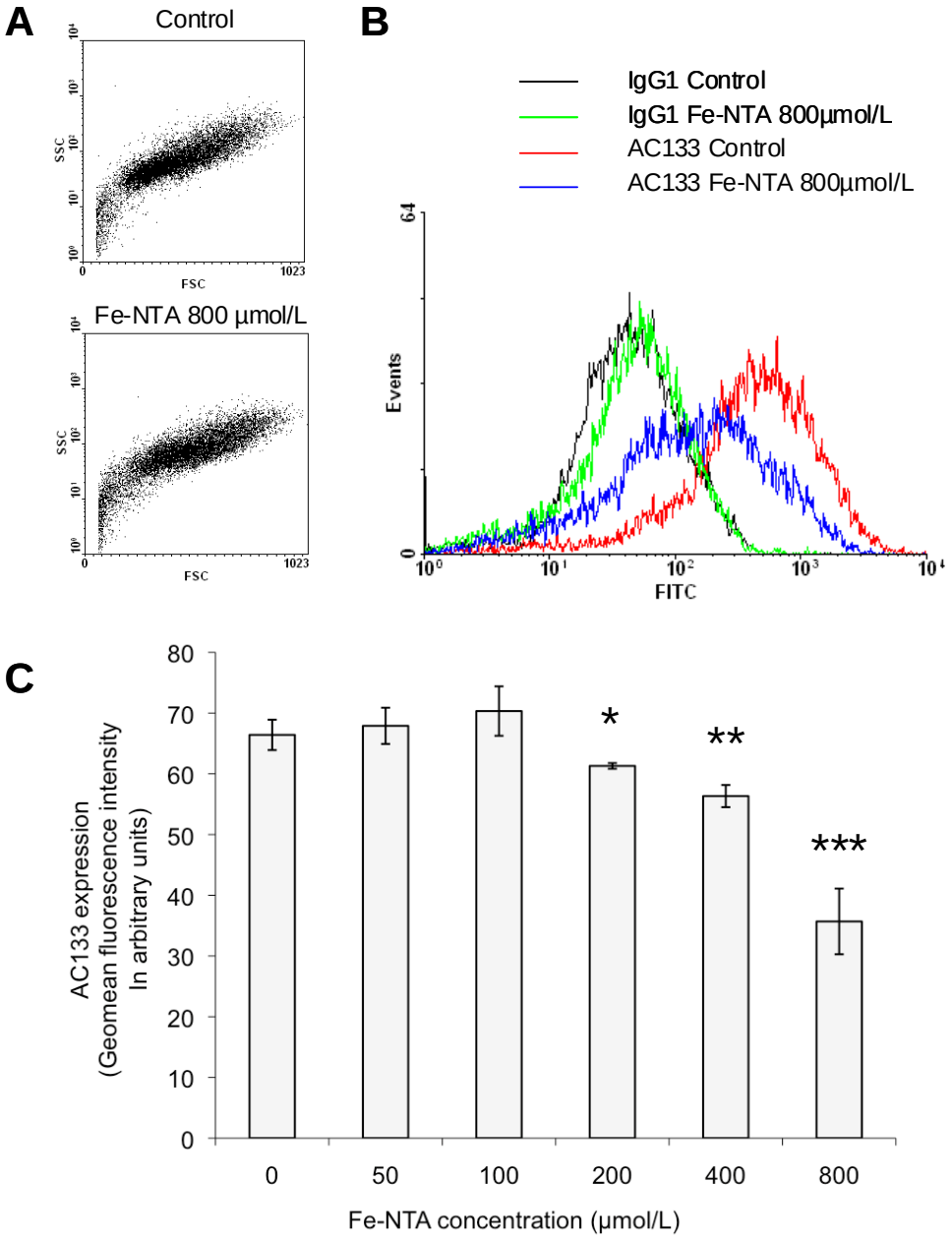


Figure 5: Iron supplementation down regulated AC133/CD133 expression in Caco-2 cells in a dose-dependent fashion. Combined immunofluorescence and flow cytometry was used to assess the impact of Fe-NTA treatment on AC133/CD133 expression in Caco-2 cells. A) Forward scatter (FSC, approximate cell size) and side scatter (SSC, cell complexity or granularity) profiles of vehicle only treated cells (control) versus Fe-NTA (800 µmol/L) treated cells. B) Cell number distribution versus FITC-fluorescence (arbitrary units) in control and Fe-NTA (800 µmol/L) treatments after IgG1 control or AC133 immunostaining. C) Dose-response histograms representing AC133/CD133 expression as a function of Fe-NTA treatment at different concentrations as indicated. Data represent mean ± s.e.m. of a triplicate obtained from one representative experiment. Dunnett's test: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

Discussion

Our results provide evidence for an important role of the 5-domain trans-membrane molecule CD133 in the regulation of cellular cross-talk with the extracellular microenvironment, revealed firstly by inhibition of Tf endocytosis in non-differentiated Caco-2 cells and secondly by the ability of the CD133-specific AC133 antibody to also inhibit Tf endocytosis. Since Tf is the main iron carrier entry to the mammalian cell, the identification of a role of CD133 in endocytosis must be related to the regulation of CD133 itself by iron, thus supporting a possible Tf-CD133-iron network in cell metabolism.

CD133 as an endocytosis modulator

The unique localization of the cholesterol binding protein CD133 in plasma membrane protrusions and microvilli, as well as in association with specific lipid raft microdomains that are sensitive to Triton X100 but resistant to Lubrol WX supported the hypothesis that CD133 has a significant function in plasma membrane organization [14,54,55]. The role of CD133 was suggested by the generation of apical membrane protrusions from epithelial cells and notably in the release of extracellular membrane particles, which themselves carry CD133 [16,56,57]. By further establishing, to our knowledge for the first time, a role for CD133 in endocytosis, importantly the present study extends the functionality of CD133 at the plasma membrane interface. Thus, the quantitative effects of CD133 on Tf endocytosis can be mainly ascribed to the clathrin pathway, which is the main Tf-internalization pathway within Caco-2 cells [28]. This assertion was also corroborated by the absence of effect of CD133 knockdown on the uptake of Dx and CTB that are usually internalized through fluid phase and caveolae dependent endocytosis, respectively [28]. Hence, CD133-dependent up regulation of Tf uptake after cholesterol extraction (MβCD treatment) supported the hypothesis that CD133, at least partially, inhibits Tf endocytosis via a cholesterol dependent mechanism. Accordingly, cholesterol extraction either up regulates Tf uptake via an unknown compensatory mechanism or alternatively, reduces constitutive extracellular Tf recycling. It has previously been established that acute cholesterol extraction can increase the number of TfR on the cell surface [36,58], thus explaining relatively higher Tf entry to the cell, notably in the inhibitory $CD133^{high}$ situation. Also, absence of a differential effect of filipin treatment depending on CD133 expression emphasized the fact that cholesterol extraction (MβCD treatment) has different effects than cholesterol sequestration (filipin treatment) on pinocytic pathways.

However, since the influence of CD133 on Tf endocytosis involved the clathrin pathway and cellular cholesterol, an interaction of the CD133 molecule with the TfR, whatever the endocytic pathway involved, cannot be excluded. Hence, the effect of the AC133 antibody on Tf endocytosis may either support steric shielding affecting the binding of Tf to its receptor or, instead, signaling through the CD133 molecule that affects Tf-TfR uptake. Indeed, a previous work demonstrated CD133 phosphorylation of the cytoplasmic domain by Src and Fyn tyrosine kinases [5]. Whether the presence of the AC133 epitope in the CD133 extracellular domain and binding to an as yet unidentified ligand influences CD133 phosphorylation and resulting signaling remains a major question. CD133 may thus modulate Tf uptake through direct inhibitory effects on TfR or on the structure of TfR microdomains. Alternatively, alteration of ongoing mechanisms that promote Tf-TfR turnover may be involved: for instance, insulin stimulated redistribution of TfR to the plasma membrane [59], hemochromatosis protein co-trafficked with the TfR to the cell surface [60] and PI3kinase-mTOR regulated the number of TfR per endocytic vesicle [61].

CD133 as an integrator of cell metabolism

Supporting the aerobic glycolysis of cancer cells first reported by Otto Warburg in the 1950s [62], it was recently established that CD133 expression is associated with high cellular glucose metabolism: CD133 was found to be a glucose responsive gene in L6 myotubes [11] and CD133 expression to be concomitant to high glucose cellular uptake in U251 glioma cells [12]. Since co-localization of glucose transporters with the TfR in intracellular vesicles has previously been observed [63,64,65], whether CD133 can regulate iron uptake together with glucose transport by modulation of endocytosis remains an important question. The combined sequestration of TfR and glucose transporter at the plasma membrane would be expected to result in low iron levls combined with high glucose intracellular levels. As iron-sulfur cluster assembly [66] is an important process for mitochondria activity, inhibition of a respiratory phenotype may well fit with the appearance of a glycolytic one [67]. Having established here that CD133 up regulated holo-transferrin uptake and that iron down regulated CD133 expression, a role for CD133 as an integrator of iron metabolism, with CD133 and TfR being jointly modulated [43], is suspected.

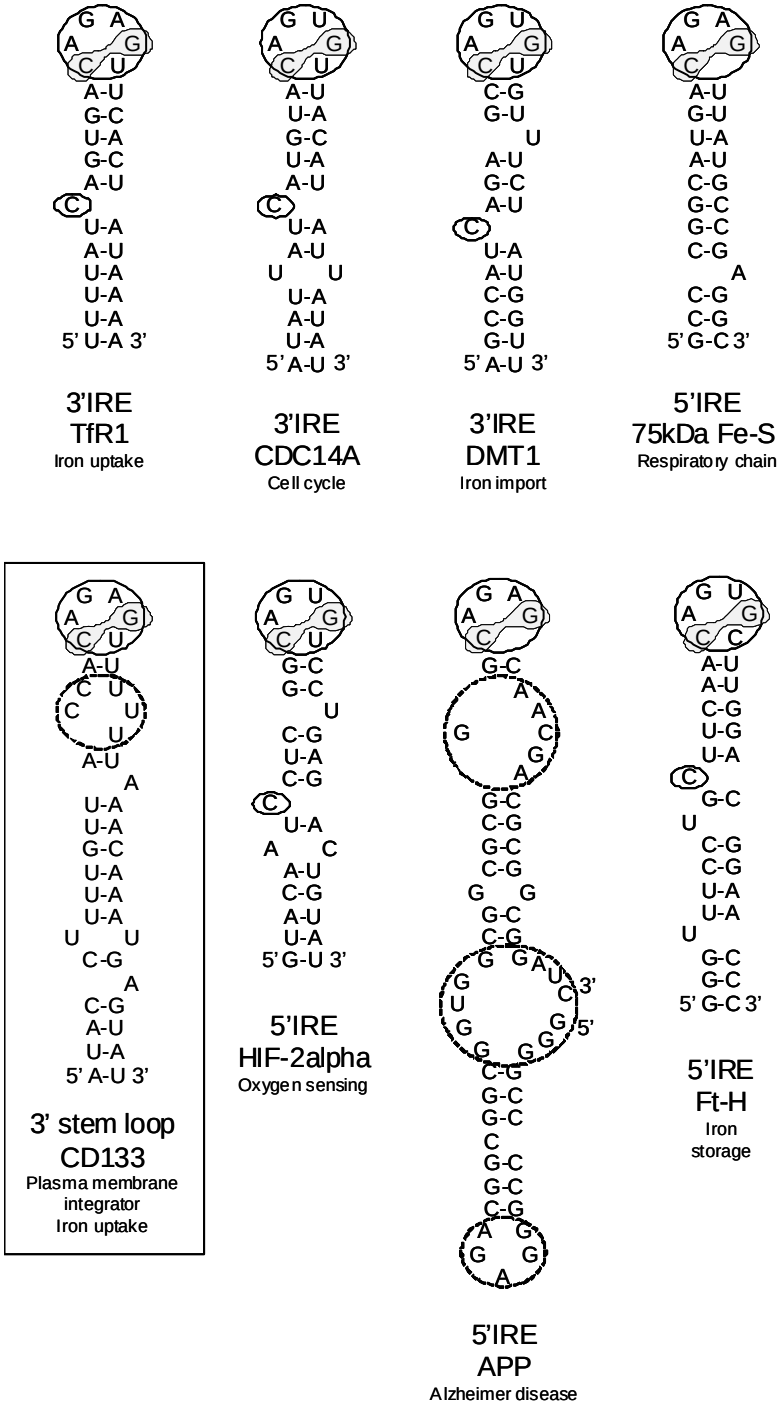


Figure 6: Schematic representation of known IREs and nearest related stem loop sequence located in the 3'UTR of the CD133 mRNA (NCBI GenBank accession number NM_001145847.1, nucleotide sequence: from +3544 to +3574). Note the perfect match between the 5'-A**CAGAGU**U-3' loop sequence of the CD133 mRNA and the one present in the TfR1 3'IRE. Note also the high discrepancy between hairpin structures, notably with the presence of secondary loops (dashed line) in the APP 5'IRE. A secondary loop is also present in the CD133 hairpin selected here. CDC14A: dual specificity protein tyrosine phosphatase. DMT1: divalent metal transporter 1. 75kDa Fe-S: NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1. APP: Alzheimer amyloid precursor protein. Ft-H: ferritin heavy chain.

In line with this hypothesis, direct effects on putative IREs may be involved in the regulation of CD133 expression by iron. Considering homology but also a degree of variability among IREs, as for instance between TfR 3'IRE [43] and APP 5'IRE [53] **(Figure 6)**, the stem loop sequence we selected for possible CD133 3'IRE **(Figure 6)** remained to be either validated or rejected. Alternatively, indirect regulation of CD133 expression may be implicated. As an illustration of the latter, oxygen sensing [68,69] and mTOR [70] have been shown to regulate CD133 expression via activation of the HIF-1α transcription factor. Since iron treatment can in turn modulate HIF-1α activity [71,72,73], iron induced destabilization of HIF-1α may also explain down regulation of CD133 expression in non-hypoxic conditions [74].

Consequences for cancer cell behavior and for detoxification status

It has previously been established that the AC133 epitope is lost during Caco-2 cell differentiation but not the CD133 protein [55]. In addition, differentiation of Caco-2 cells up regulates genes implicated in iron transport and metabolism, including ferroportin, Tf and TfR [75]. Thus, whether causative or not, improved iron metabolism appears to be correlated with the differentiation status of Caco-2 cells. Whether iron regulation of AC133 expression is a basic signal for differentiation or/and for cancer cell recruitment to a secondary phenotype is of pivotal interest. Also, several protein and non-protein signals have already been linked to the loss of expression of AC133 associated with differentiation, notably in brain tumor stem cells with BMP-4 [76], retinoic acid [77] or oxygen tension [68,69]. Our identification of a role for CD133/AC133 in inhibiting endocytosis points to another consequence of cellular cross-talk between cancer cells and their microenvironment, or of cancer stem cells and the stem cell niche, that is a finest control of extrinsic signals. Indeed, corruption of the niche as well as the exclusion of toxic metabolites and xenobiotics appears to be an important mechanism to define the status of cancer stem cells, with the occurrence of side population cells that express specific efflux transporters [78]. Hence, a fine control of iron accumulation might prevent the generation of deleterious reactive oxygen species via iron catalyzed Fenton chemistry [41], with a possibly impact on iron-induced carcinogenesis [79] and on degenerative diseases [80,81]. Since a major phenotype for CD133 loss was disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration [7] and since iron toxicity can trigger retinal degeneration [82], the present work emphasized the need for further exploration of the newly revealed CD133-Tf-iron network.

Acknowledgments.

We are grateful to the *Service Commun de Cytométrie d'Analyses Nucléotidiques*, SCCAN, Angers, France. We also thank Clovis Bondu and Marion Hingant for skilful technical support and Laetitia Fouasson (LEGTA, Le Fresne, Angers, France) and Didier Wion (Inserm U836, Grenoble, France) for insightful discussion during the course of this study. This work was supported by the "*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*", the "*Axe Cellules Souches et Cancer*" at the "*Cancéropôle Grand-Ouest*" and by "*La Ligue Contre le Cancer*" through an <<Equipe Labellisée 2007>> grant. Erika Bourseau was initially a PhD fellow with the "*Conseil Général de Maine-et-Loire*" and then a PhD fellow with the "*Comité Départemental de Maine-et-Loire de La Ligue Contre le Cancer*". Audrey Griveau was a PhD fellow with the "*Conseil Général de Maine-et-Loire*".

References

1. Corbeil D, Roper K, Weigmann A, Huttner WB (1998) AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? Blood 91: 2625-2626.

2. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, et al. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood 90: 5013-5021.

3. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB (1997) Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 12425-12430.

4. Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, et al. (2004) Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. Blood 103: 2055-2061.

5. Boivin D, Labbe D, Fontaine N, Lamy S, Beaulieu E, et al. (2009) The stem cell marker CD133 (prominin-1) is phosphorylated on cytoplasmic tyrosine-828 and tyrosine-852 by Src and Fyn tyrosine kinases. Biochemistry 48: 3998-4007.

6. Maw MA, Corbeil D, Koch J, Hellwig A, Wilson-Wheeler JC, et al. (2000) A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. Hum Mol Genet 9: 27-34.

7. Zacchigna S, Oh H, Wilsch-Brauninger M, Missol-Kolka E, Jaszai J, et al. (2009) Loss of the cholesterol-binding protein prominin-1/CD133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration. J Neurosci 29: 2297-2308.

8. King FW, Ritner C, Liszewski W, Kwan HC, Pedersen A, et al. (2009) Subpopulations of human embryonic stem cells with distinct tissue-specific fates can be selected from pluripotent cultures. Stem Cells Dev 18: 1441-1450.

9. Ferrandina G, Petrillo M, Bonanno G, Scambia G (2009) Targeting CD133 antigen in cancer. Expert Opin Ther Targets 13: 823-837.

10. Wu Y, Wu PY (2009) CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. Stem Cells Dev 18: 1127-1134.

11. Yang C, Yang Y, Gupta N, Liu X, He A, et al. (2007) Pentaspan membrane glycoprotein, prominin-1, is involved in glucose metabolism and cytoskeleton alteration. Biochemistry (Mosc) 72: 854-862.

12. Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcorelles P, Benos DJ, et al. (2008) CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. PLoS ONE 3: e3655.

13. Corbeil D, Roper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB (2001) Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. Traffic 2: 82-91.

14. Roper K, Corbeil D, Huttner WB (2000) Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. Nat Cell Biol 2: 582-592.

15. Taieb N, Maresca M, Guo XJ, Garmy N, Fantini J, et al. (2009) The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. Cancer Lett 278: 164-173.

16. Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, et al. (2005) Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. J Cell Sci 118: 2849-2858.

17. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, et al. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell 68: 673-682.

18. Singh RD, Marks DL, Holicky EL, Wheatley CL, Kaptzan T, et al. (2010) Gangliosides and beta1-integrin are required for caveolae and membrane domains. Traffic 11: 348-360.

19. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, et al. (2006) A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. Mol Cancer Ther 5: 1710-1722.

20. Paillard A, Hindre F, Vignes-Colombeix C, Benoit JP, Garcion E (2010) The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. Biomaterials 31: 7542-7554.

21. Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit JP (2009) Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. J Control Release 140: 174-181.

22. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG (1993) Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. J Cell Biol 123: 1107-1117.

23. Orlandi PA, Fishman PH (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. J Cell Biol 141: 905-915.

24. Liu NQ, Lossinsky AS, Popik W, Li X, Gujuluva C, et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. J Virol 76: 6689-6700.

25. Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J (1989) Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. Eur J Biochem 186: 17-22.

26. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, et al. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. Mol Biol Cell 10: 961-974.

27. Campillos M, Cases I, Hentze MW, Sanchez M (2010) SIREs: searching for iron-responsive elements. Nucleic Acids Res 38: W360-367.

28. Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. Nature 422: 37-44.

29. Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K (2002) Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. Pharmacol Rev 54: 561-587.

30. Yang Z, Vadlamudi RK, Kumar R (2005) Dynein light chain 1 phosphorylation controls macropinocytosis. J Biol Chem 280: 654-659.

31. Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K (2001) Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. J Cell Sci 114: 3737-3747.

32. Liu AP, Aguet F, Danuser G, Schmid SL (2010) Local clustering of transferrin receptors promotes clathrin-coated pit initiation. J Cell Biol 191: 1381-1393.

33. Chang J, Jallouli Y, Kroubi M, Yuan XB, Feng W, et al. (2009) Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier. Int J Pharm 379: 285-292.

34. Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, et al. (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. J Cell Biol 138: 877-889.

35. Nabi IR, Le PU (2003) Caveolae/raft-dependent endocytosis. J Cell Biol 161: 673-677.

36. Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, et al. (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 6775-6780.

37. Garcion E, Faissner A, ffrench-Constant C (2001) Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. Development 128: 2485-2496.

38. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, et al. (2010) The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. Cancer Res 70: 719-729.

39. Inman RS, Wessling-Resnick M (1993) Characterization of transferrin-independent iron transport in K562 cells. Unique properties provide evidence for multiple pathways of iron uptake. J Biol Chem 268: 8521-8528.

40. Richardson DR, Ponka P (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. Biochim Biophys Acta 1331: 1-40.

41. Hentze MW, Kuhn LC (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 8175-8182.

42. Piccinelli P, Samuelsson T (2007) Evolution of the iron-responsive element. RNA 13: 952-966.

43. Theil EC (1994) Iron regulatory elements (IREs): a family of mRNA non-coding sequences. Biochem J 304 (Pt 1): 1-11.

44. Hentze MW, Rouault TA, Caughman SW, Dancis A, Harford JB, et al. (1987) A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 6730-6734.

45. Erlitzki R, Long JC, Theil EC (2002) Multiple, conserved iron-responsive elements in the 3'-untranslated region of transferrin receptor mRNA enhance binding of iron regulatory protein 2. J Biol Chem 277: 42579-42587.

46. Jacolot S, Ferec C, Mura C (2008) Iron responses in hepatic, intestinal and macrophage/monocyte cell lines under different culture conditions. Blood Cells Mol Dis 41: 100-108.

47. Teichmann R, Stremmel W (1990) Iron uptake by human upper small intestine microvillous membrane vesicles. Indication for a facilitated transport mechanism mediated by a membrane iron-binding protein. J Clin Invest 86: 2145-2153.

48. He WL, Feng Y, Li XL, Wei YY, Yang XE (2008) Availability and toxicity of Fe(II) and Fe(III) in Caco-2 cells. J Zhejiang Univ Sci B 9: 707-712.

49. Cmejla R, Petrak J, Cmejlova J (2006) A novel iron responsive element in the 3'UTR of human MRCKalpha. Biochem Biophys Res Commun 341: 158-166.

50. Martini LA, Tchack L, Wood RJ (2002) Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. J Nutr 132: 693-696.

51. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW (2007) Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. Nat Struct Mol Biol 14: 420-426.

52. Lin E, Graziano JH, Freyer GA (2001) Regulation of the 75-kDa subunit of mitochondrial complex I by iron. J Biol Chem 276: 27685-27692.

53. Cho HH, Cahill CM, Vanderburg CR, Scherzer CR, Wang B, et al. (2010) Selective translational control of the Alzheimer amyloid precursor protein transcript by iron regulatory protein-1. J Biol Chem 285: 31217-31232.

54. Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, Hohn J, Freund D, et al. (2004) Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 104: 2332-2338.

55. Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, et al. (2000) The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. J Biol Chem 275: 5512-5520.

56. Corbeil D, Marzesco AM, Wilsch-Brauninger M, Huttner WB (2010) The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. FEBS Lett 584: 1659-1664.

57. Huttner HB, Janich P, Kohrmann M, Jaszai J, Siebzehnrubl F, et al. (2008) The stem cell marker prominin-1/CD133 on membrane particles in human cerebrospinal fluid offers novel approaches for studying central nervous system disease. Stem Cells 26: 698-705.

58. Nunez MT, Glass J (1982) Reconstitution of the transferrin receptor in lipid vesicles. Effect of cholesterol on the binding of transferrin. Biochemistry 21: 4139-4143.

59. Davis RJ, Corvera S, Czech MP (1986) Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. J Biol Chem 261: 8708-8711.

60. Enns CA (2001) Pumping iron: the strange partnership of the hemochromatosis protein, a class I MHC homolog, with the transferrin receptor. Traffic 2: 167-174.

61. Galvez T, Teruel MN, Heo WD, Jones JT, Kim ML, et al. (2007) siRNA screen of the human signaling proteome identifies the PtdIns(3,4,5)P3-mTOR signaling pathway as a primary regulator of transferrin uptake. Genome Biol 8: R142.

62. Warburg O (1956) On respiratory impairment in cancer cells. Science 124: 269-270.

63. Antonescu CN, Diaz M, Femia G, Planas JV, Klip A (2008) Clathrin-dependent and independent endocytosis of glucose transporter 4 (GLUT4) in myoblasts: regulation by mitochondrial uncoupling. Traffic 9: 1173-1190.

64. Tanner LI, Lienhard GE (1989) Localization of transferrin receptors and insulin-like growth factor II receptors in vesicles from 3T3-L1 adipocytes that contain intracellular glucose transporters. J Cell Biol 108: 1537-1545.

65. Livingstone C, James DE, Rice JE, Hanpeter D, Gould GW (1996) Compartment ablation analysis of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes. Biochem J 315 (Pt 2): 487-495.

66. Stehling O, Sheftel AD, Lill R (2009) Chapter 12 Controlled expression of iron-sulfur cluster assembly components for respiratory chain complexes in mammalian cells. Methods Enzymol 456: 209-231.

67. Alirol E, Martinou JC (2006) Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? Oncogene 25: 4706-4716.

68. Platet N, Liu SY, Atifi ME, Oliver L, Vallette FM, et al. (2007) Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. Cancer Lett 258: 286-290.

69. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, et al. (2009) Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. Oncogene 28: 3949-3959.

70. Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Kudo K, et al. (2009) mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. Cancer Res 69: 7160-7164.

71. Eckard J, Dai J, Wu J, Jian J, Yang Q, et al. Effects of cellular iron deficiency on the formation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Iron deficiency and angiogenesis. Cancer Cell Int 10: 28.

72. Knowles HJ, Mole DR, Ratcliffe PJ, Harris AL (2006) Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulation of the labile iron pool in differentiating U937 macrophages: effect of natural resistance-associated macrophage protein 1. Cancer Res 66: 2600-2607.

73. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, et al. (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. Cell Metab 1: 401-408.

74. Dery MA, Michaud MD, Richard DE (2005) Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. Int J Biochem Cell Biol 37: 535-540.

75. Bedrine-Ferran H, Le Meur N, Gicquel I, Le Cunff M, Soriano N, et al. (2004) Transcriptome variations in human CaCo-2 cells: a model for enterocyte differentiation and its link to iron absorption. Genomics 83: 772-789.

76. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, et al. (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. Nature 444: 761-765.

77. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, et al. (2010) Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. Clin Cancer Res 16: 2715-2728.

78. Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 781-786.

79. Toyokuni S (1996) Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. Free Radic Biol Med 20: 553-566.

80. Mastroberardino PG, Hoffman EK, Horowitz MP, Betarbet R, Taylor G, et al. (2009) A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. Neurobiol Dis 34: 417-431.

81. Jiang D, Li X, Williams R, Patel S, Men L, et al. (2009) Ternary complexes of iron, amyloid-beta, and nitrilotriacetic acid: binding affinities, redox properties, and relevance to iron-induced oxidative stress in Alzheimer's disease. Biochemistry 48: 7939-7947.

82. He X, Hahn P, Iacovelli J, Wong R, King C, et al. (2007) Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. Prog Retin Eye Res 26: 649-673.

Les résultats de cette étude mettent en évidence, pour la première fois, le rôle de CD133 dans l'endocytose de l'holo-transferrine (molécule de transferrine chargée en fer) et le métabolisme du fer **(Figure 25)**.

La transferrine est une beta globuline transporteur de fer. L'holo-transferrine est internalisée par les cellules via un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant implicant majoritairement la voie des clathrines (Conner and Schmid 2003)**.** Après routage dans les endosomes, le fer est libéré des endolysosomes par le transporteur DMT1 (divalent metal transporter 1) puis les vésicules sont recyclées vers la membrane plasmique permettant la libération de l'apo-transferrine (transferrine seule).

De par son fort potentiel redox, Le fer est utilisé dans de nombreuses cellules comme co-facteur dans des mécansimes tels que le transport d'oxygène, le métabolisme énergénique ou la synthèse d'ADN. Il joue également un rôle dans la propagation des espèces oxygenées réactives et la génération des radicaux hautements réactifs comme le radical hydroxyl lorsque la concentration en fer intra cellulaire est élevée (Wang and Pantopoulos 2011). Les protéines impliquées dans l'homéostase du fer sont régulées par la présence d'une séquence consensus IRE (iron responsive element) dans l'ARNm sur laquelle viennent se fixer des IRP (iron responsive protein) contrôlant l'activation ou l'inhibition de la traduction.

L'incubation des cellules Caco-2 avec des doses croissantes de Fe-NTA (ferric nitrilotriacetic acid), un complexe permettant le transport du fer, a permis de mettre en évidence la régulation de CD133 par le fer. L'identification par bioinformatique de séquences proches des séquences IRE dans l'ARNm de CD133 suggère une régulation directe de CD133 par les IRP. Cependant, il a été mis en évidence dans les cellules Caco-2 que l'expression de HIF-1 conduit à une perte d'expression de CD133, (Matsumoto *et al.* 2009). Le fer est impliqué dans l'induction de la dégradation de HIF-1α (Carroll and Ashcroft 2005). Par conséquent, la concentration en fer pourrait également réguler de façon indirecte l'expression de CD133 par l'intermédiaire de HIF-1α .

Les premières études menées sur la fonction de la protéine CD133 ont démontré l'implication de cette protéine dans les dégénérescences rétiniennes congénitales (Maw *et al.* 2000; Zacchigna *et al.* 2009). Des expérimentations récentes ont montré une augmentation du taux de fer dans la rétine chez des patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge entrainant des dégradations de protéines, de lipides et de l'ADN par la création de ROS

(Blasiak *et al.* 2009). L'implication de CD133 dans l'internalisation de l'holo-transferrine et par extension du fer, pourrait ainsi être liée aux dégénérescences rétiniennes. CD133 étant un inhibiteur de l'endocytose de transferrine, son absence pourrait conduire à une augmentation de l'internalisation et donc à l'accumulation de fer dans les cellules. Entrainant l'altération de la rétine.

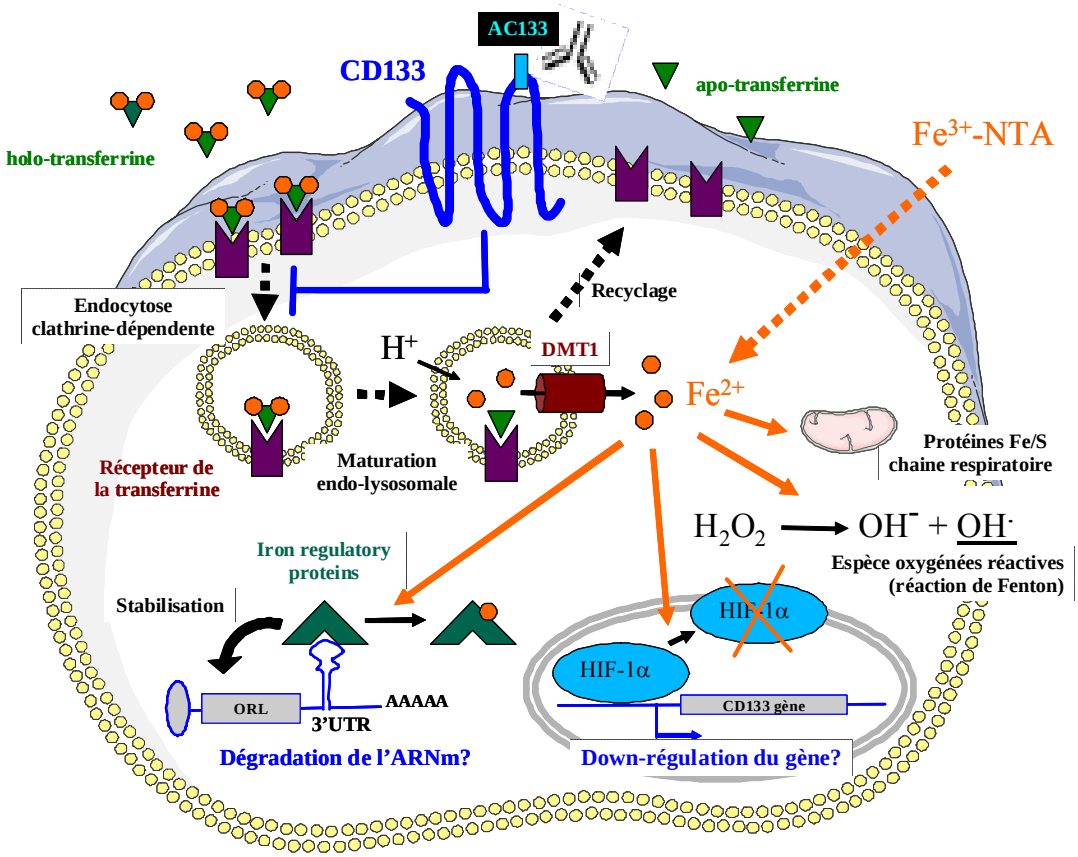


Figure 25 : Schéma représentant la relation entre le métabolisme du fer et le rôle de CD133 dans l'internalisation d'holo-transferrine.

DISCUSSION GENERALE

L'élaboration d'une thérapie ciblée anti-cancer comprend plusieurs étapes. Tout d'abord, il est nécessaire d'identifier une cible, définie par son implication dans les mécanismes d'oncogenèse et le développement d'une stratégie permettant de contrecarrer l'action de cette cible pour inhiber la croissance tumorale.

Depuis la mise en évidence de cellules souches cancéreuses, capables d'initier des tumeurs et résistantes aux thérapies utilisées actuellement en clinique, il apparaît évident que ces CSCs peuvent être définies comme une cible importante à prendre en compte dans le développement de thérapies innovantes pour traiter le glioblastome.

Dans cette optique, les travaux menés sur les CSCs ont contribué à l'identification de marqueurs de surface associés à ces cellules et de voies de signalisation impliquées dans le maintien de leurs propriétés. Ainsi, il est possible d'envisager de mettre au point une stratégie permettant de cibler les cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur soit par l'administration d'une molécule agissant spécifiquement sur une voie de signalisation impliquée dans le maintien de ces CSCs, soit par la délivrance d'un principe actif.

Cette thèse a contribué à l'étude du marqueur de CSCs, AC133 au regard de l'établissement d'une méthode de ciblage des CSCs en vue de leur élimination.

I. Glioblastomes et thérapies ciblées.

L'émergence des techniques de génomique et de protéomique ont permis de mettre en évidence différentes voies impliquées dans les mécanismes d'oncogenèse, conduisant au développement de thérapies ciblant spécifiquement les régulateurs des mécanismes liés à la tumorigénicité. Plusieurs molécules prometteuses en essais précliniques ont été évaluées en essais cliniques pour le traitement du glioblastome mais n'ont pas montré de véritable efficacité chez les patients :

-Le Cétuximab un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'EGF (Combs *et al.* 2007; Hasselbalch *et al.* 2010).

-L'imatinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du PDFR, de c-kit et de la kinase bcr-abl (Reardon *et al.* 2005).

-Le gefitinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (Reardon *et al.* 2005).

-La perifosine qui inhibe la fixation de Akt au PIP3 (Sathornsumetee *et al.* 2008).

-Le tipifarnib, un inhibiteur de la Farnesyl transférase (Cloughesy *et al.* 2006).

L'angiogenèse est un processus important dans le développement des glioblastomes. De ce fait, cibler les molécules induisant l'angiogénèse apparait comme une stratégie intéressante pour soigner les glioblastomes. Le VEGF est reconnu comme un puissant stimulateur de l'angiogénèse tumorale (Carmeliet and Jain 2000) . Par conséquent la fixation et l'inactivation du VEGF par un anticorps, le bevacizumab, inhibe les mécanismes d'angiogenèse en bloquant l'activation du récepteur au VEGF : VEGFR-2. L'action anti-tumorale du bevacizumab est en partie liée à l'hypoxie qu'il génère dans la tumeur mais apparait surtout lié rétablissement d'une vascularisation « normalisée » favorisant la diffusion et la délivrance des agents chimio-thérapeutiques aux cellules tumorales. De ce fait, le Bevacizumab (Avastin®), déjà utilisé pour le traitement de différentes tumeurs (Jubb and Harris 2010), est le premier anticorps monoclonal ayant reçu un accord de la FDA pour traiter le glioblastome, seul ou en association avec l'irinotécan ou le témozolomide *(Vredenburgh et al.* 2007; Kreisl *et al*. 2009; Lai *et al.* 2011). L'espoir que représente l'Avastin™, dans le traitement des cancers apparait néanmoins tempéré par l'apparition de rechutes liées à des phénomènes de résistance et d'échappement des cellules cancéreuses. Il a été mis en évidence, dans un modèle infiltrant de glioblastomes de rat, que le traitement avec le bevacizumab était efficace en provoquant la nécrose par hypoxie des tumeurs. Néanmoins, l'hypoxie induit aussi un phénomène d'échappement des cellules cancéreuses et l'invasion du parenchyme cérébral profond (Keunen *et al*. 2011). Ce phénomène a été aussi décrit *in vivo* chez des lignées murines de glioblastomes où il a été mis en évidence que la présence de la protéine HIF-1α induite par l'hypoxie, favorisait la migration et l'infiltration des cellules tumorales (Mendez *et al.* 2010).

Les cellules souches cancéreuses pourraient jouer un rôle important dans l'angiogénèse tumorale et la résistance aux traitements anti-angiogéniques. Nous avons montré que la culture de cellules de glioblastomes humaines sous une faible pression en oxygène favorise le maintien des cellules AC133-positives après injection dans le cerveau de souris imunodéprimées. De plus, il a été montré que ces cellules étaient localisées dans les zones hypoxiques (Pistollato *et al.* 2010) de la tumeur où elles trouveraient les conditions

environnementales nécessaires à leur maintien. Les traitements anti-angiogéniques en provoquant une hypoxie pourrait conduire à favoriser le maintien des CSCs.

Les cellules souches ont par ailleurs été localisées à proximité des cellules endothéliales (Calabrese *et al.* 2007). Cette proximité pourrait s'expliquer par le pouvoir pro-angiogénique que possède les CSCs. En effet, elles sont capables de sécréter du VEGF, fortement pro-angiogénique (Bao *et al.* 2006). D'autre part, les CSCs et plus particulièrement les cellules CD133+ / CD144+ pourraient se différencier en cellules endothéliales et contribuer directement à la formation de vaisseaux tumoraux (Ricci-Vitiani *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010). Les CSCs apparaissent donc alimenter la croissance tumorale en favorisant l'angiogénèse, qui contribue à la croissance tumorale. L'augmentation du diamètre tumoral conduit à créer des zones d'hypoxie favorisant les CSCs qui pourront ensuite contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et à l'expansion de la tumeur.

Dans ce modèle, on comprend la difficulté à laquelle doivent faire face les traitements anti-angiogéniques générant dans un premier temps une hypoxie contrant la croissance tumorale mais favorisant dans un deuxième temps une hypoxie favorable à la croissance et au maintien des CSCs AC133-positives pro-angiogéniques et pro-tumorales. Le développement de nouveaux traitements ciblant ces CSCs pourrait donc favoriser l'efficacité des médicaments anti-angiogéniques.

II. Une fonction pour la protéine CD133

Une étude réalisée sur une lignée de glioblastomes humains a permis de montrer que l'inhibition de CD133 par des oligonucléotides antisens conduit à l'inhibition de la prolifération de ces cellules. Cependant, le rôle physiologique du marqueur AC133 dans le maintien de CSCs et leur propriété souche n'a pas été identifié. Nos travaux réalisés sur des cellules primaires de glioblastomes humains et sur des cellules d'adénocarcinomes de colon non différenciées Caco-2, exprimant constitutivement AC133 ont contribué à accroitre les connaissances concernant la régulation et la fonction de AC133 / CD133. Les expériences menées sur les cellules de glioblastomes humains cultivées à 3% ou 21% O_2 ont mis en évidence que la culture, sous une faible pression en oxygène chronique favorise le maintien de l'expression AC133 et que la perte d'expression d'AC133 à 21% O2 au sein de ces cellules

associée à une diminution de l'agressivité tumorale. Notre étude a démontré que d'une part, dans les cellules Caco-2, CD133 est un inhibiteur de l'internalisation de la transferrine un transporteur du fer et que d'autre part, le fer régule négativement l'expression d'AC133 indiquant un rôle d'AC133 dans le métabolisme du fer.

AC133 est donc une molécule sensible au microenvironnement cellulaire. En plus d'être régulée par l'hypoxie, l'expression d'AC133 peut être modulée par le glucose, le fer ou la protéine BMP-4 un régulateur de la différenciation des cellules souches. **(Figure 26).** Nos travaux ont contribué à accroitre les connaissances concernant la régulation et la fonction de AC133 / CD133. Ces résultats ont permis d'initier des essais en cours actuellement afin d'évaluer l'effet de pO_2 sur le métabolisme du glucose dans des cultures de glioblastomes humains. Dans les glioblastomes, un environnement pauvre en oxygène contribue au maintien des cellules C133-positives de par l'activation de HIF-1α et de ces cibles, parmi lesquelles les molécules impliquées dans l'activation de la glycolyse (Wenger *et al.* 2005). En effet en absence d'oxygène, la chaine respiratoire est inhibée au profit de la glycolyse pour la production d'ATPs source d'énergie pour la cellule. Dans ce cas le besoin en fer nécessaire pour la chaîne respiratoire est plus faible qu'en cas de haute concentration en oxygène. Nous avons mis ici en évidence que AC133/CD133 est un inhibiteur de l'internalisation de transferrine, un transporteur du fer. De plus, il a été mis en évidence que CD133 était également impliqué dans le métabolisme du glucose chez le rat (Yang *et al.* 2007) et qu'une inhibition du fonctionnement des mitochondries par déplétion de l'ADN mitochondrial dans des lignées de glioblastomes humaines entraine une augmentation de l'expression d'AC133 (Griguer *et al.* 2008). Ainsi l'expression d'AC133 dans les CSCs pourrait contribuer à inhiber l'internalisation de fer au profit du glucose dans les CSCs et favoriser la mise en place de la glycolyse et donc le maintien de ces cellules dans un environnement hypoxique. La diminution de prolifération observée dans des lignées de glioblastomes humains, lors de l'inhibition de CD133 (Yao *et al.* 2009) pourrait donc être expliquée par une modification de l'apport de nutriments nécessaires à la production d'énergie pour les cellules. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans les différences de croissance tumorales observées entre les cellules cultivées à 3% et 21% O_2, le devenir du glucose intra cellulaire va être étudié ainsi que les potentielles interactions entre les transporteurs de glucose et les récepteurs à la transferrine avec la protéine CD133.

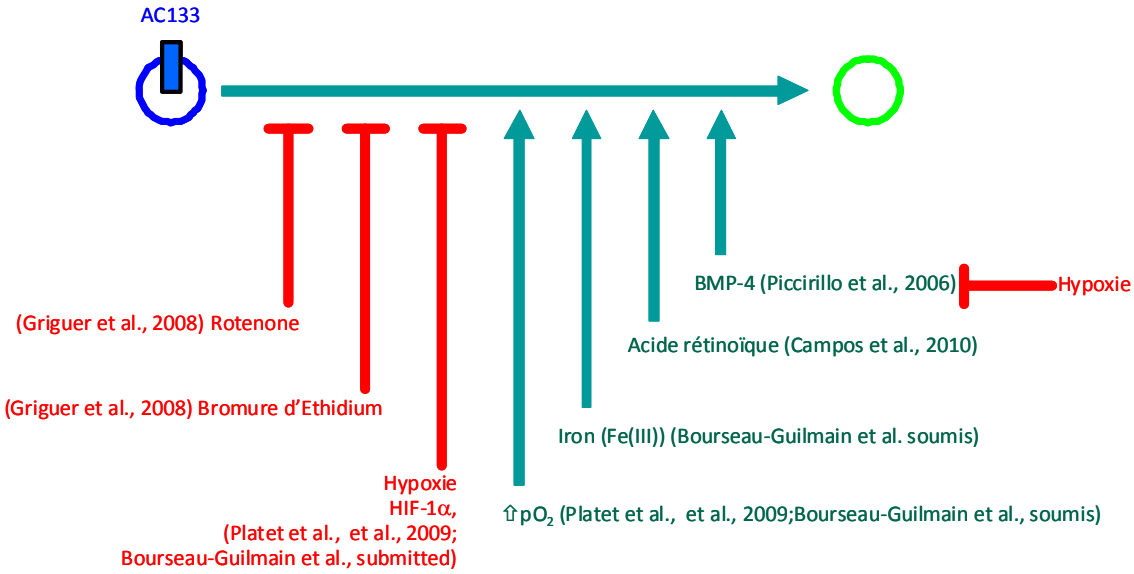


Figure 26 : Modulateurs extrinsèques de l'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses AC133.

L'analyse du rôle de CD133 dans deux études différentes nous a également permis de démontrer que CD133 ne régule pas seulement l'entrée de la transferrine dans les cellules Caco-2, mais affecte également l'internalisation des NCLs **(Figure 27)**. Par conséquent, CD133 n'est pas un inhibiteur spécifique de l'internalisation de la transferrine mais est inclus dans un mécanisme plus large. Il a été montré que les NCLs de 100nm n'empruntent pas de voie d'endocytose préférentielle. Toutefois, les NCLs sont également endocytées par la voie des clathrines (Paillard *et al.* 2010). CD133 pourrait ainsi être impliquée dans la régulation de cette voie d'endocytose. La protéine CD133 est localisée dans les protrusions membranaires liant le cholestérol (Corbeil *et al.* 2000). Cependant, ces protrusions solubles dans le Triton X100 sont différentes de celles impliquées dans la pinocytose cavéole-dépendante insoluble dans ce détergent (Roper *et al.* 2000). CD133 pourrait ainsi être contenu dans des protrusions membranaires impliquées dans les mécanismes d'endocytose clathrine-dépendant.

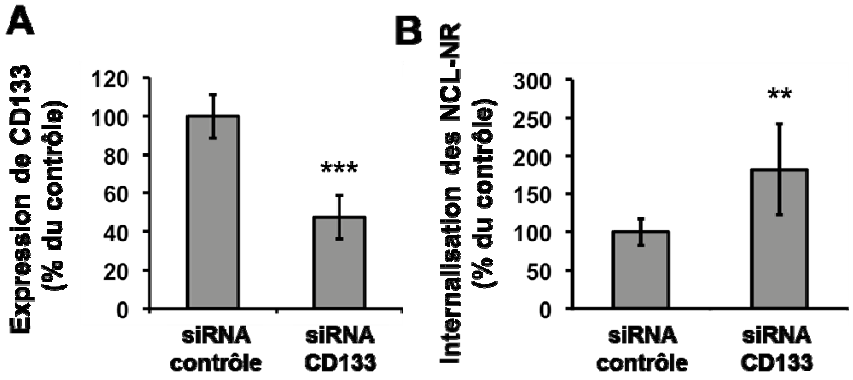


Figure 27: Effet de l'expression d'AC133 sur l'internalisation des NCLs contenant le fluorochrome Nile Red (NCL-NR) *A : Analyse par cytometrie en flux de l'expression d'AC133 validant l'efficacité des siRNA anti-CD133 dans les cellules caco-2 conduisant à l'obtention de cellules Caco-2-AC133^{high} avec le siRNA contrôle ou de cellules Caco-2-AC133^{low} avec des siRNA anti-CD133. B: les cellules Caco-2-AC133^{high} versus Caco-2-AC133^{low} ont été traitées pendant 2h à 37°C avec 230 µg/mL of NCL-NR. L'analyse pare cytometrie en flux montre que l'inhibition de l'expression de CD133/AC133 par les siRNA entraîne l'augmentation de l'accumulation intracellulaire des NCLs. Résultats exprimés comme la pourcentage du contrôle (moyenne ± écart-type of de trois expériences indépendantes). Test Dunnett: **p < 0.01, ***p < 0.001*

Par ailleurs, ces deux études nous ont permis d'identifier des effets de l'anticorps AC133 lors de sa liaison avec l'épitope AC133. L'anticorps AC133 utilisé à une dose de 5 ou 10 µg/ml entraine une inhibition de l'internalisation de la transferrine dans les cellules Caco-2. Aussi, utilisé à une concentration de 20µg/ml, il entraine un décollement des cellules Caco-2 de leur support de culture. La liaison de l'anticorps AC133 à son antigène entraine donc une activité biologique. Aucun ligand de la protéine n'a été mis en évidence. Mais la présence de sites de phosphorylation sur le segment C-Terminal intra cytoplasmique de CD133 (Boivin *et al.* 2009) indique que la liaison de l'anticorps à la protéine pourrait engendrer l'activation d'un signal régulant l'entrée de la transferrine et l'adhérence des cellules.

La présence de l'anticorps AC133 pourrait également engendrer un encombrement stérique qui conduirait au masquage de CD133 et inhiberait la liaison à ses potentiels partenaires. En effet, CD133 possède également un segment N-Terminal qui est reconnu par des gangliosides (Taieb *et al.* 2009). Or, il a été montré que ces gangliosides forment des glycosynapses impliquant des glycoprotéines, permettant l'établissement de liaisons entre cellules (Hakomori and Handa 2002). Ainsi, CD133 pourrait être un composant de ces glycosynapses. La présence de l'anticorps AC133 en excès pourrait entrer en compétition avec ces synapses et entrainer une perte d'adhérence cellules-cellules. Des travaux ont été

réalisés concernant les capacités migratoires des cellules CD133-positives issues de lignées de cancer du pancréas. En effet, la co-culture de cellules CD133-positives avec des cellules stromales pancréatiques favorise la migration des cellules CD133-positives comparée à une mono culture de cellules CD133-positives. Ainsi, ces cellules nécessitent un ligand particulier conduisant à l'activation de leur migration (Moriyama *et al.* 2010). Il serait donc possible que les cellules stromales pancréatiques expriment une protéine ligand de CD133 et induisent un signal lié aux phénomènes de migration et favorisent ainsi l'infiltration des cellules CD133-positives.

III. Pertinence d'utilisation d'AC133 comme marqueur pour cibler les CSCs.

Nous avons développé un outil capable de cibler les cellules AC133-positives. Cependant, AC133 n'est pas un marqueur exclusif des CSCs. Le ciblage des CSCs via le marqueur AC133 pourrait donc entraîner une élimination de ces autres cellules. AC133 est exprimé à la surface d'autres types de cellules souches et de progéniteurs épithéliaux. Il est donc important de déterminer s'il existe des possibilités d'éliminer les CSCs sans affecter les autres cellules AC133-positives. A ce jour, les thérapies ciblées mises en place permettent de diminuer les effets secondaires d'une thérapie mais pas de les abolir complètement. Par exemple, l'anticorps BR96 conjugué à la doxorubicine a été développé en vue du traitement du cancer du sein qui surexprime l'antigène Lewis Y reconnu par cet anticorps. Ce conjugué a été abandonné après des essais cliniques en phase II, à cause d'une toxicité gastro-intestinale due à l'expression de l'antigène Lewis Y à la surface des cellules épithéliales de l'intestin (Peer *et al.* 2007). Ainsi, il est nécessaire d'intégrer le risque de reconnaissance non spécifique à notre choix de cible. Différentes voies peuvent être envisagées pour diminuer le risque d'effets secondaires.

Des études de biodistributions de NCLs chargées en ^{188}Re, réalisés chez le rat, ont montré qu'après injection des NCLs dans le cerveau, les NCLs sont majoritairement retenues dans le parenchyme cérébral. Ainsi, l'injection locorégionale de NCLs pour le traitement du glioblastome permet d'éviter l'accumulation des NCLs dans des tissus non ciblés par le traitement (Vanpouille-Box *et al*, soumis).

AC133 est également exprimé à la surface des cellules souches neurales dans le cerveau. L'étude des cellules souches hématopoïétiques comparées aux CSCs de leucémie a montré que la survie des CSH est dépendante de l'expression de PTEN alors que l'inhibition de PTEN dans les CSCs de leucémie n'affecte pas leur prolifération (Yilmaz *et al.* 2006). Par conséquent, si les NCL-AC133 ne sont pas capables d'être discriminantes entre les cellules CSCs et les cellules souches classiques, il peut être envisagé d'encapsuler des facteurs agissant sur une voie de signalisation spécifique des CSCs. En effet, l'étude comparée de cellules progénitrices neurales et de CSCs de glioblastome a permis de mettre en évidence que la protéine HIF-2α est préférentiellement exprimée dans les CSCs mais pas dans les cellules progénitrices (Li *et al.* 2009). Ainsi, cette étude démontre l'existence d'expression différentielle de protéines entre les CSCs et les CSNs.

Par ailleurs, il existe plusieurs isoformes de la protéine CD133 dues à la présence de plusieurs promoteurs dans le gène de CD133 et à une maturation des ARNm par épissage alternatif (Shmelkov *et al.* 2005). Des études réalisées chez la souris ont démontré que l'expression de certains de ces isoformes est tissu spécifique. (Fargeas *et al.* 2007; Corbeil *et al.* 2009; Kemper *et al.* 2010). L'étude de l'expression CD133 a été réalisée par PCR au laboratoire, en comparant des cellules issues de glioblastomes et des CSNs. La détection de CD133 a révélé la présence de transcrits de tailles différentes dans les deux types cellulaires suggérant donc l'expression d'isoformes différentes entre ces deux types cellulaires **(Figure 28)**.

Il serait donc intéressant d'identifier et d'isoler les isoformes de CD133 exprimés dans les glioblastomes afin de générer des anticorps dirigés spécifiquement contre ces isoformes, réduisant ainsi les risques d'effets secondaires au niveau des CSNs.

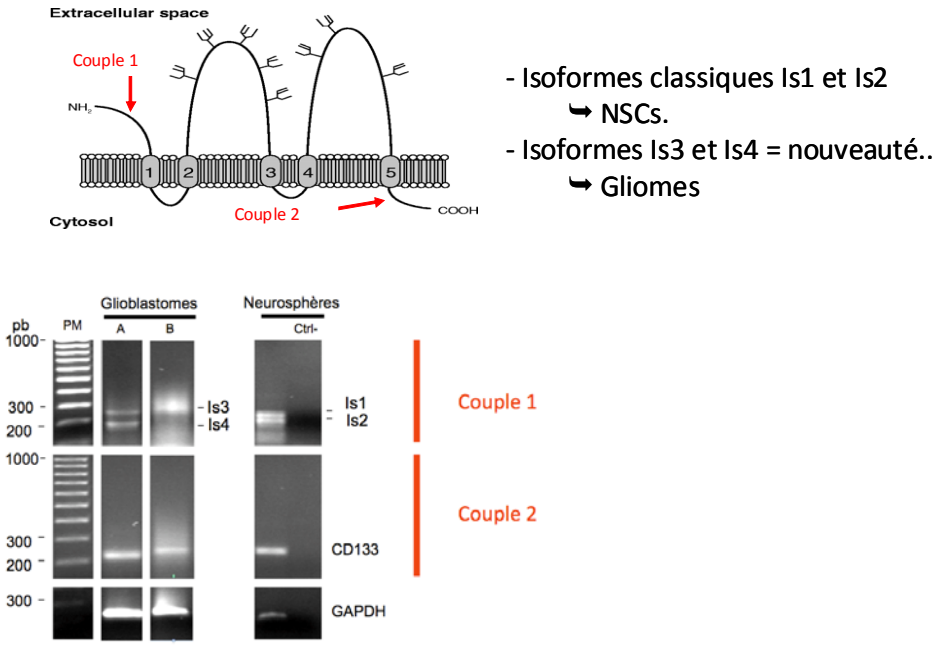


Figure 28 : PCR réalisée sur les CSNs humaines et des cellules issues de glioblastomes humains. *Les images présentent la migration des séquences amplifiées par PCR par deux couples d'amorces. On peut observer au niveau du couple 1, que les bandes obtenues dans les cellules de glioblastomes présentes des tailles différentes que celles obtenues dans les CSNs.*

IV. Perspectives : Encapsuler un agent sensibilisant ou mortel pour les CSCs.

L'analyse de la régulation d'AC133 par la pression en oxygène, un facteur du microenvironnement tumoral impliqué dans le maintien des propriétés des CSCs, a permis d'établir des conditions de cultures des cellules primaires issues de glioblastomes humains favorables à l'obtention d'un modèle de xénogreffe orthotopique de cellules de glioblastomes exprimant AC133. Les cellules AC133-positives présentent des propriétés de résistance aux thérapies supérieures aux cellules AC133-négatives. Ce modèle tumoral, ainsi établi, permettra de tester des molécules thérapeutiques anti-glioblastomes en intégrant le paramètre CSCs à la réponse tumorale.

Le choix de la cible est important et détermine le type de vecteur à utiliser pour atteindre et traiter la cible. Ici, nous avons développé des NCLs-AC133 capables de reconnaître spécifiquement les cellules AC133-positives, sans pour autant pouvoir être internalisé. Il faut donc envisager que les molécules encapsulées dans les NCLs ne pourront pas pénétrer dans la cellule par l'endocytose du vecteur.

Les CSCs sont, en général, résistantes aux thérapies. Le vecteur NCL-AC133 pourrait être utilisé pour créer un gradient de dose à proximité des CSCs. En effet, les cellules AC133-positives ont un seuil de tolérance aux thérapies actuelles supérieur aux cellules AC133-négatives. Il est donc nécessaire d'augmenter la dose de médicaments délivrée au niveau des CSCs. Les principes actifs à l'étude présentent trois modes d'action différents.

La radiothérapie interne a été développée à l'INSERM U646, par l'encapsulation d'un complexe lipophile de ^{188}Rhénium dans les NCLs (Allard *et al.* 2008). Cette stratégie, testée sur des modèles de glioblastomes syngéniques chez le rat, a démontré son efficacité dans le ralentissement de la croissance tumorale et l'augmentation du nombre de rats longs survivants. L'utilisation des NCLs pourrait ainsi être couplée à une injection intra cérébrale stéréotaxique par CED (convection enhanced delivery). Au contraire de l'injection classique par bolus où les particules diffusent dans le parenchyme cérébrale, la CED permet, grâce à l'utilisation d'une pompe, de créer un gradient de pression pendant l'injection et d'augmenter le volume couvert par les particules (Allard *et al.* 2009). L'utilisation de la CED combinée à une injection simple par bolus a permis d'optimiser le protocole (Vanpouille-Box soumis). En effet le couplage de ces deux injections crée un gradient de dose avec l'injection en bolus grâce à laquelle la diffusion dans la tumeur est limitée mais entraine donc de forte dose de ^{188}Re au site d'injection et l'injection par CED qui permet de couvrir un volume tumoral plus large mais diminue la dose de radioactivité en un point fixe.

Les cellules AC133-négatives, résistantes aux traitements, sont capables de se différencier pour donner des cellules AC133-négatives dont la sensibilité est plus élevée. Il serait donc intéressant de véhiculer une molécule capable d'entrainer une différenciation des CSCs. Il a été démontré que la protéine BMP-4, un agent différenciant de la niche des CSNs inhibe la croissance tumorale de cellules de glioblastomes injectées chez la souris (Piccirillo *et al.* 2006). Cependant, cet effet est réprimé par l'hypoxie par l'intermédiaire de la protéine

HIF-1α (Pistollato *et al.* 2009). Or, les cellules AC133-positives semblent être localisées dans des zones où HIF-1α est activée dans des glioblastomes humains (Pistollato *et al.* 2010).

L'acide rétinoïque, un autre agent différenciant (Breitman *et al.* 1980; Breitman *et al.* 1981), entraine une réduction de la croissance tumorale chez des souris immunodéprimées xénogreffées avec des cellules de glioblastomes humaines, lorsqu'il est associé au paclitaxel (Karmakar *et al.* 2008) ou à l'interféron-γ (Haque *et al.* 2007). De plus, des études menées sur l'effet de l'acide rétinoïque sur les CSCs, ont montré que l'acide rétinoïque peut engendrer une différenciation des cellules de glioblastomes AC133-positives vers un phénotype AC133-négatif (Campos *et al.* 2010). L'acide rétinoïque étant une molécule hydrophobe, une étude préliminaire d'encapsulation a été réalisée au laboratoire. Les premiers essais réalisés sur des cellules U87MG ont montré que l'acide rétinoïque libre ou encapsulé inhibe les propriétés de clonogénicité de ces cellules lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu sans sérum, en présence de bFGF et d'EGF. Sur une culture en monocouche, l'acide rétinoïque sensibilise les cellules U87MG à une radiothérapie externe. Par conséquent, l'encapsulation de l'acide rétinoïque n'altère pas ses propriétés chimiques. L'acide rétinoïque est une molécule capable de diffuser naturellement au travers de la membrane plasmique. L'utilisation de NCL-AC133, dans ce cas peut être intéressante afin de créer des réservoirs d'acide rétinoïque aux abords de CSCs. L'acide rétinoïque libéré des NCLs pourrait ainsi diffuser aisément au travers de la membrane, tout en limitant la diffusion dans le parenchyme cérébral.

La voie de signalisation SHH, impliquée dans le développement des CSNs, joue aussi un rôle important dans le maintien des cellules AC133-positives (Ulasov *et al.* 2010) issues de glioblastomes. Cependant cette voie de signalisation n'est pas spécifique des CSCs, et est également sur-exprimée dans les cellules cancéreuses (Ulasov *et al.* 2010). La cyclopamine un inhibiteur spécifique de la voie SHH est actuellement en cours d'essai pour l'encapsulation.

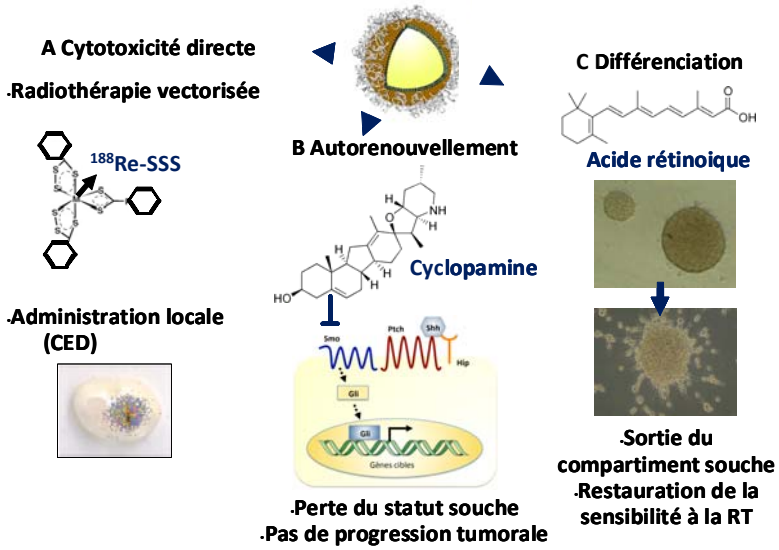


Figure 29 : Encapsulation de principes actifs dans les NCL-AC133

En conclusion, cette thèse est un travail réalisé sur différents aspects du développement d'une nanomédecine dans le cadre du traitement du glioblastome : un aspect technologique par le développement d'un vecteur capable de reconnaître spécifiquement les cellules AC133-positives et un aspect plus fondamental par l'étude de la fonction et de la régulation d'AC133. La liaison de ces deux pans de la recherche, au sein d'une même étude, a permis de mettre en évidence les potentielles limites de cette stratégie de par une expression d'AC133 qui n'est pas restreinte aux seules CSCs et par l'incapacité de ce vecteur à être internalisé dans les cellules cibles. Cependant, l'identification précoce des difficultés qui peuvent être rencontrées va permettre d'identifier rapidement des adaptations afin d'évaluer l'effet du vecteur chargé en principe actif *in vitro* et *in vivo*.

REFERENCES

Aktas, Y., M. Yemisci, K. Andrieux, R. N. Gursoy, M. J. Alonso, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quinoa, R. Riguera, M. F. Sargon, H. H. Celik, A. S. Demir, A. A. Hincal, T. Dalkara, Y. Capan and P. Couvreur (2005). "Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26." Bioconjug Chem **16**(6): 1503-11.

Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-8.

Allard, E., F. Hindre, C. Passirani, L. Lemaire, N. Lepareur, N. Noiret, P. Menei and J. P. Benoit (2008). "188Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas." Eur J Nucl Med Mol Imaging **35**(10): 1838-46.

Allard, E., C. Passirani and J. P. Benoit (2009). "Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors." Biomaterials **30**(12): 2302-18.

Alonso, M. J. (2004). "Nanomedicines for overcoming biological barriers." Biomed Pharmacother **58**(3): 168-72.

Alvero, A. B., R. Chen, H. H. Fu, M. Montagna, P. E. Schwartz, T. Rutherford, D. A. Silasi, K. D. Steffensen, M. Waldstrom, I. Visintin and G. Mor (2009). "Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance." Cell Cycle **8**(1): 158-66.

Arany, Z., S. Y. Foo, Y. Ma, J. L. Ruas, A. Bommi-Reddy, G. Girnun, M. Cooper, D. Laznik, J. Chinsomboon, S. M. Rangwala, K. H. Baek, A. Rosenzweig and B. M. Spiegelman (2008). "HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha." Nature **451**(7181): 1008-12.

Ashby, L. S. and T. C. Ryken (2006). "Management of malignant glioma: steady progress with multimodal approaches." Neurosurg Focus **20**(4): E3.

Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner and J. N. Rich (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature **444**(7120): 756-60.

Bao, S., Q. Wu, S. Sathornsumetee, Y. Hao, Z. Li, A. B. Hjelmeland, Q. Shi, R. E. McLendon, D. D. Bigner and J. N. Rich (2006). "Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor." Cancer Res **66**(16): 7843-8.

Bapat, S. A., A. M. Mali, C. B. Koppikar and N. K. Kurrey (2005). "Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer." Cancer Res **65**(8): 3025-9.

Bar, E. E., A. Lin, V. Mahairaki, W. Matsui and C. G. Eberhart (2010). "Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres." Am J Pathol **177**(3): 1491-502.

Beduneau, A., F. Hindre, A. Clavreul, J. C. Leroux, P. Saulnier and J. P. Benoit (2008). "Brain targeting using novel lipid nanovectors." J Control Release **126**(1): 44-9.

Beduneau, A., P. Saulnier, N. Anton, F. Hindre, C. Passirani, H. Rajerison, N. Noiret and J. P. Benoit (2006). "Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties." Pharm Res **23**(9): 2190-9.

Beduneau, A., P. Saulnier, F. Hindre, A. Clavreul, J. C. Leroux and J. P. Benoit (2007). "Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments." Biomaterials **28**(33): 4978-90.

Beier, D., P. Hau, M. Proescholdt, A. Lohmeier, J. Wischhusen, P. J. Oefner, L. Aigner, A. Brawanski, U. Bogdahn and C. P. Beier (2007). "CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles." Cancer Res **67**(9): 4010-5.

Blazek, E. R., J. L. Foutch and G. Maki (2007). "Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia." Int J Radiat Oncol Biol Phys **67**(1): 1-5.

Bleau, A. M., D. Hambardzumyan, T. Ozawa, E. I. Fomchenko, J. T. Huse, C. W. Brennan and E. C. Holland (2009). "PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells." Cell Stem Cell **4**(3): 226-35.

Boivin, D., D. Labbe, N. Fontaine, S. Lamy, E. Beaulieu, D. Gingras and R. Beliveau (2009). "The stem cell marker CD133 (prominin-1) is phosphorylated on cytoplasmic tyrosine-828 and tyrosine-852 by Src and Fyn tyrosine kinases." Biochemistry **48**(18): 3998-4007.

Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-7.

Borovski, T., J. J. Verhoeff, R. ten Cate, K. Cameron, N. A. de Vries, O. van Tellingen, D. J. Richel, W. R. van Furth, J. P. Medema and M. R. Sprick (2009). "Tumor microvasculature supports proliferation and expansion of glioma-propagating cells." Int J Cancer **125**(5): 1222-30.

Bredel, M. (2001). "Anticancer drug resistance in primary human brain tumors." Brain Res Brain Res Rev **35**(2): 161-204.

Breitman, T. R., S. J. Collins and B. R. Keene (1981). "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid." Blood **57**(6): 1000-4.

Breitman, T. R., S. E. Selonick and S. J. Collins (1980). "Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 2936-40.

Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." J Biol Chem **275**(23): 17221-4.

Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." Cell **68**(3): 533-44.

Calabrese, C., H. Poppleton, M. Kocak, T. L. Hogg, C. Fuller, B. Hamner, E. Y. Oh, M. W. Gaber, D. Finklestein, M. Allen, A. Frank, I. T. Bayazitov, S. S. Zakharenko, A. Gajjar, A. Davidoff and R. J. Gilbertson (2007). "A perivascular niche for brain tumor stem cells." Cancer Cell **11**(1): 69-82.

Campos, B., F. Wan, M. Farhadi, A. Ernst, F. Zeppernick, K. E. Tagscherer, R. Ahmadi, J. Lohr, C. Dictus, G. Gdynia, S. E. Combs, V. Goidts, B. M. Helmke, V. Eckstein, W. Roth, P. Beckhove, P. Lichter, A. Unterberg, B. Radlwimmer and C. Herold-Mende (2010). "Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells." Clin Cancer Res **16**(10): 2715-28.

Capela, A. and S. Temple (2002). "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal." Neuron **35**(5): 865-75.

Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.

Carroll, V. A. and M. Ashcroft (2005). "Targeting the molecular basis for tumour hypoxia." Expert Rev Mol Med **7**(6): 1-16.

Casaco, A., G. Lopez, I. Garcia, J. A. Rodriguez, R. Fernandez, J. Figueredo, L. Torres, A. Perera, J. Batista, R. Leyva, Y. Pena, Z. Amador, A. Gonzalez, B. Estupinan, M. Coca, A. Hernandez, M. Puig, M. Iglesias, M. Ramos, L. Rodriquez and N. Suarez (2008). "Phase I single-dose study of intracavitary-administered Nimotuzumab labeled with 188 Re in adult recurrent high-grade glioma." Cancer Biol Ther **7**(3): 333-9.

Chakravarti, A., G. Zhai, Y. Suzuki, S. Sarkesh, P. M. Black, A. Muzikansky and J. S. Loeffler (2004). "The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas." J Clin Oncol **22**(10): 1926-33.

Chang, Y. S., J. Zuo, X. F. Zhang, M. Zhang and F. D. Fang (2001). "[Fudenine, relative to blood glucose-control, is a novel membrane protein]." Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao **23**(1): 63-4.

Chatel, M., M. Frenay, C. Lebrun, V. Bourg and F. Fauchon (2005). "High grade gliomas: anaplastic astrocytomas and glioblastomas." EMC-Neurologie **2**: 257-278.

Cloughesy, T. F., P. Y. Wen, H. I. Robins, S. M. Chang, M. D. Groves, K. L. Fink, L. Junck, D. Schiff, L. Abrey, M. R. Gilbert, F. Lieberman, J. Kuhn, L. M. DeAngelis, M. Mehta, J. J. Raizer, W. K. Yung, K. Aldape, J. Wright, K. R. Lamborn and M. D. Prados (2006). "Phase II trial of tipifarnib in patients with recurrent malignant glioma either receiving or not receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs: a North American Brain Tumor Consortium Study." J Clin Oncol **24**(22): 3651-6.

Combs, S. E., D. Schulz-Ertner, W. Roth, C. Herold-Mende, J. Debus and K. J. Weber (2007). "In vitro responsiveness of glioma cell lines to multimodality treatment with radiotherapy, temozolomide, and epidermal growth factor receptor inhibition with cetuximab." Int J Radiat Oncol Biol Phys **68**(3): 873-82.

Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.

Corbeil, D., A. Joester, C. A. Fargeas, J. Jaszai, J. Garwood, A. Hellwig, H. B. Werner and W. B. Huttner (2009). "Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (CD133) in glial cells." Glia **57**(8): 860-74.

Corbeil, D., K. Roper, C. A. Fargeas, A. Joester and W. B. Huttner (2001). "Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology." Traffic **2**(2): 82-91.

Corbeil, D., K. Roper, A. Hellwig, M. Tavian, S. Miraglia, S. M. Watt, P. J. Simmons, B. Peault, D. W. Buck and W. B. Huttner (2000). "The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions." J Biol Chem **275**(8): 5512-20.

Corbeil, D., K. Roper, A. Weigmann and W. B. Huttner (1998). "AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?" Blood **91**(7): 2625-6.

Couvreur, P. and C. Vauthier (2006). "Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease." Pharm Res **23**(7): 1417-50.

Cully, M., H. You, A. J. Levine and T. W. Mak (2006). "Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis." Nat Rev Cancer **6**(3): 184-92.

Dai, C., J. C. Celestino, Y. Okada, D. N. Louis, G. N. Fuller and E. C. Holland (2001). "PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo." Genes Dev **15**(15): 1913-25.

de Vetten, M. P., J. H. Jansen, B. A. van der Reijden, M. S. Berger, J. M. Zijlmans and B. Lowenberg (2000). "Molecular remission of Philadelphia/bcr-abl-positive acute myeloid leukaemia after treatment with anti-CD33 calicheamicin conjugate (gemtuzumab ozogamicin, CMA-676)." Br J Haematol **111**(1): 277-9.

Delmas, C., C. Heliez, E. Cohen-Jonathan, D. End, J. Bonnet, G. Favre and C. Toulas (2002). "Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation." Int J Cancer **100**(1): 43-8.

Doetsch, F. (2003). "A niche for adult neural stem cells." Curr Opin Genet Dev **13**(5): 543-50.

Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem **78**: 857-902.

Dontu, G., K. W. Jackson, E. McNicholas, M. J. Kawamura, W. M. Abdallah and M. S. Wicha (2004). "Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells." Breast Cancer Res **6**(6): R605-15.

Dubreuil, V., A. M. Marzesco, D. Corbeil, W. B. Huttner and M. Wilsch-Brauninger (2007). "Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1." J Cell Biol **176**(4): 483-95.

Eller, J. L., S. L. Longo, M. M. Kyle, D. Bassano, D. J. Hicklin and G. W. Canute (2005). "Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme in vitro and in vivo." Neurosurgery **56**(1): 155-62; discussion 162.

Eramo, A., F. Lotti, G. Sette, E. Pilozzi, M. Biffoni, A. Di Virgilio, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle and R. De Maria (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ **15**(3): 504-14.

Evans, S. M., K. D. Judy, I. Dunphy, W. T. Jenkins, W. T. Hwang, P. T. Nelson, R. A. Lustig, K. Jenkins, D. P. Magarelli, S. M. Hahn, R. A. Collins, M. S. Grady and C. J. Koch (2004). "Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors." Clin Cancer Res **10**(24): 8177-84.

Eyler, C. E. and J. N. Rich (2008). "Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis." J Clin Oncol **26**(17): 2839-45.

Facchino, S., M. Abdouh, W. Chatoo and G. Bernier (2010). "BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery." J Neurosci **30**(30): 10096-111.

Fargeas, C. A., M. Florek, W. B. Huttner and D. Corbeil (2003). "Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins." J Biol Chem **278**(10): 8586-96.

Fargeas, C. A., W. B. Huttner and D. Corbeil (2007). "Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update." Tissue Antigens **69**(6): 602-6.

Figarella-Branger, D., C. Colin, A. Tchoghandjian, N. Baeza and C. Bouvier (2010). "[Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]." Neurochirurgie **56**(6): 441-8.

Florek, M., M. Haase, A. M. Marzesco, D. Freund, G. Ehninger, W. B. Huttner and D. Corbeil (2005). "Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer." Cell Tissue Res **319**(1): 15-26.

Friden, P. M., L. R. Walus, G. F. Musso, M. A. Taylor, B. Malfroy and R. M. Starzyk (1991). "Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4771-5.

Friedman, H. S., T. Kerby and H. Calvert (2000). "Temozolomide and treatment of malignant glioma." Clin Cancer Res **6**(7): 2585-97.

Friel, A. M., L. Zhang, M. D. Curley, V. A. Therrien, P. A. Sergent, S. E. Belden, D. R. Borger, G. Mohapatra, L. R. Zukerberg, R. Foster and B. R. Rueda (2010). "Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells." Reprod Biol Endocrinol **8**: 147.

Fujiwara, S., K. Nakagawa, H. Harada, S. Nagato, K. Furukawa, M. Teraoka, T. Seno, K. Oka, S. Iwata and T. Ohnishi (2007). "Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas." Int J Oncol **30**(4): 793-802.

Fukuda, K., Y. Saikawa, M. Ohashi, K. Kumagai, M. Kitajima, H. Okano, Y. Matsuzaki and Y. Kitagawa (2009). "Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer." Int J Oncol **34**(5): 1201-7.

Gabizon, A., R. Catane, B. Uziely, B. Kaufman, T. Safra, R. Cohen, F. Martin, A. Huang and Y. Barenholz (1994). "Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes." Cancer Res **54**(4): 987-92.

Gal, H., A. Makovitzki, N. Amariglio, G. Rechavi, Z. Ram and D. Givol (2007). "A rapid assay for drug sensitivity of glioblastoma stem cells." Biochem Biophys Res Commun **358**(3): 908-13.

Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco and A. Vescovi (2004). "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." Cancer Res **64**(19): 7011-21.

Garcion, E., A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei and J. P. Benoit (2006). "A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats." Mol Cancer Ther **5**(7): 1710-22.

Garcion, E., P. Naveilhan, F. Berger and D. Wion (2009). "Cancer stem cells: beyond Koch's postulates." Cancer Lett **278**(1): 3-8.

Garnett, M. C. (2001). "Targeted drug conjugates: principles and progress." Adv Drug Deliv Rev **53**(2): 171-216.

Geng, L., E. T. Shinohara, D. Kim, J. Tan, K. Osusky, Y. Shyr and D. E. Hallahan (2006). "STI571 (Gleevec) improves tumor growth delay and survival in irradiated mouse models of glioblastoma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **64**(1): 263-71.

Giebel, B., D. Corbeil, J. Beckmann, J. Hohn, D. Freund, K. Giesen, J. Fischer, G. Kogler and P. Wernet (2004). "Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **104**(8): 2332-8.

Gillespie, D. L., K. Whang, B. T. Ragel, J. R. Flynn, D. A. Kelly and R. L. Jensen (2007). "Silencing of hypoxia inducible factor-1alpha by RNA interference attenuates human glioma cell growth in vivo." Clin Cancer Res **13**(8): 2441-8.

Goetz, C., W. Rachinger, G. Poepperl, M. Decker, F. J. Gildehaus, S. Stocker, G. Jung, K. Tatsch, J. C. Tonn and H. J. Reulen (2003). "Intralesional radioimmunotherapy in the treatment of malignant glioma: clinical and experimental findings." Acta Neurochir Suppl **88**: 69-75.

Gonzaga, P. E., P. M. Potter, T. Q. Niu, D. Yu, D. B. Ludlum, J. A. Rafferty, G. P. Margison and T. P. Brent (1992). "Identification of the cross-link between human O6-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea-treated DNA." Cancer Res **52**(21): 6052-8.

Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner and R. C. Mulligan (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-806.

Griguer, C. E., C. R. Oliva, E. Gobin, P. Marcorelles, D. J. Benos, J. R. Lancaster, Jr. and G. Y. Gillespie (2008). "CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma." PLoS ONE **3**(11): e3655.

Grossman, S. A. and J. F. Batara (2004). "Current management of glioblastoma multiforme." Semin Oncol **31**(5): 635-44.

Hakomori, S. and K. Handa (2002). "Glycosphingolipid-dependent cross-talk between glycosynapses interfacing tumor cells with their host cells: essential basis to define tumor malignancy." FEBS Lett **531**(1): 88-92.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Haque, A., N. L. Banik and S. K. Ray (2007). "Emerging role of combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma as chemoimmunotherapy in the management of human glioblastoma." Neurochem Res **32**(12): 2203-9.

Hasselbalch, B., U. Lassen, H. S. Poulsen and M. T. Stockhausen (2010). "Cetuximab insufficiently inhibits glioma cell growth due to persistent EGFR downstream signaling." Cancer Invest **28**(8): 775-87.

Hayward, S. W., Y. Wang, M. Cao, Y. K. Hom, B. Zhang, G. D. Grossfeld, D. Sudilovsky and G. R. Cunha (2001). "Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line." Cancer Res **61**(22): 8135-42.

Hemmati, H. D., I. Nakano, J. A. Lazareff, M. Masterman-Smith, D. H. Geschwind, M. Bronner-Fraser and H. I. Kornblum (2003). "Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15178-83.

Hermann, A., M. Maisel and A. Storch (2006). "Epigenetic conversion of human adult bone mesodermal stromal cells into neuroectodermal cell types for replacement therapy of neurodegenerative disorders." Expert Opin Biol Ther **6**(7): 653-70.

Hermann, P. C., S. L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J. W. Ellwart, M. Guba, C. J. Bruns and C. Heeschen (2007). "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." Cell Stem Cell **1**(3): 313-23.

Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust and J. P. Benoit (2002). "A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers." Pharm Res **19**(6): 875-80.

Ho, M. M., A. V. Ng, S. Lam and J. Y. Hung (2007). "Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells." Cancer Res **67**(10): 4827-33.

Hoarau, D., P. Delmas, S. David, E. Roux and J. C. Leroux (2004). "Novel long-circulating lipid nanocapsules." Pharm Res **21**(10): 1783-9.

Huang, L. E., J. Gu, M. Schau and H. F. Bunn (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7987-92.

Hureaux, J., F. Lagarce, F. Gagnadoux, L. Vecellio, A. Clavreul, E. Roger, M. Kempf, J. L. Racineux, P. Diot, J. P. Benoit and T. Urban (2009). "Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel." Eur J Pharm Biopharm **73**(2): 239-46.

Huwyler, J., D. Wu and W. M. Pardridge (1996). "Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14164-9.

Inglehearn, C. F. (1998). "Molecular genetics of human retinal dystrophies." Eye (Lond) **12 (Pt 3b)**: 571-9.

Ivan, M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane and W. G. Kaelin, Jr. (2001). "HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing." Science **292**(5516): 464-8.

Jacques, T. S., A. Swales, M. J. Brzozowski, N. V. Henriquez, J. M. Linehan, Z. Mirzadeh, O. M. C, H. Naumann, A. Alvarez-Buylla and S. Brandner (2010). "Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes." Embo J **29**(1): 222-35.

Jain, R. K., E. di Tomaso, D. G. Duda, J. S. Loeffler, A. G. Sorensen and T. T. Batchelor (2007). "Angiogenesis in brain tumours." Nat Rev Neurosci **8**(8): 610-22.

Janich, P. and D. Corbeil (2007). "GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells." FEBS Lett **581**(9): 1783-7.

Jensen, R. L., B. T. Ragel, K. Whang and D. Gillespie (2006). "Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas." J Neurooncol **78**(3): 233-47.

Jubb, A. M. and A. L. Harris (2010). "Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer." Lancet Oncol **11**(12): 1172-83.

Kabanov, A. V., V. I. Slepnev, L. E. Kuznetsova, E. V. Batrakova, V. Alakhov, N. S. Melik-Nubarov, P. G. Sveshnikov and V. A. Kabanov (1992). "Pluronic micelles as a tool for low-molecular compound vector delivery into a cell: effect of Staphylococcus aureus

enterotoxin B on cell loading with micelle incorporated fluorescent dye." Biochem Int **26**(6): 1035-42.

Kanwar, S. S., Y. Yu, J. Nautiyal, B. B. Patel and A. P. Majumdar (2010). "The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres." Mol Cancer **9**: 212.

Karayan-Tapon, L., V. Quillien, J. Guilhot, M. Wager, G. Fromont, S. Saikali, A. Etcheverry, A. Hamlat, D. Loussouarn, L. Campion, M. Campone, F. M. Vallette and C. Gratas-Rabbia-Re (2010). "Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods." J Neurooncol **97**(3): 311-22.

Karmakar, S., N. L. Banik and S. K. Ray (2008). "Combination of all-trans retinoic acid and paclitaxel-induced differentiation and apoptosis in human glioblastoma U87MG xenografts in nude mice." Cancer **112**(3): 596-607.

Kee, N. J., E. Preston and J. M. Wojtowicz (2001). "Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat." Exp Brain Res **136**(3): 313-20.

Kemper, K., M. R. Sprick, M. de Bree, A. Scopelliti, L. Vermeulen, M. Hoek, J. Zeilstra, S. T. Pals, H. Mehmet, G. Stassi and J. P. Medema (2010). "The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation." Cancer Res **70**(2): 719-29.

Kemper, K., M. J. Tol and J. P. Medema (2010). "Mouse tissues express multiple splice variants of prominin-1." PLoS One **5**(8): e12325.

Kerjaschki, D., L. Noronha-Blob, B. Sacktor and M. G. Farquhar (1984). "Microdomains of distinctive glycoprotein composition in the kidney proximal tubule brush border." J Cell Biol **98**(4): 1505-13.

Kolenda, J., S. S. Jensen, C. Aaberg-Jessen, K. Christensen, C. Andersen, N. Brunner and B. W. Kristensen (2010). "Effects of hypoxia on expression of a panel of stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma-derived spheroids." J Neurooncol.

Kondapaka, S. B., S. S. Singh, G. P. Dasmahapatra, E. A. Sausville and K. K. Roy (2003). "Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation." Mol Cancer Ther **2**(11): 1093-103.

Kondo, T., T. Setoguchi and T. Taga (2004). "Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 781-6.

Kreisl, T. N., L. Kim, K. Moore, P. Duic, C. Royce, I. Stroud, N. Garren, M. Mackey, J. A. Butman, K. Camphausen, J. Park, P. S. Albert and H. A. Fine (2009). "Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma." J Clin Oncol **27**(5): 740-5.

Kreuter, J. (2004). "Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain." J Nanosci Nanotechnol **4**(5): 484-8.

Lacoeuille, F., F. Hindre, F. Moal, J. Roux, C. Passirani, O. Couturier, P. Cales, J. J. Le Jeune, A. Lamprecht and J. P. Benoit (2007). "In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel." Int J Pharm **344**(1-2): 143-9.

Lai, A., A. Tran, P. L. Nghiemphu, W. B. Pope, O. E. Solis, M. Selch, E. Filka, W. H. Yong, P. S. Mischel, L. M. Liau, S. Phuphanich, K. Black, S. Peak, R. M. Green, C. E. Spier, T. Kolevska, J. Polikoff, L. Fehrenbacher, R. Elashoff and T. Cloughesy (2011).

"Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme." J Clin Oncol **29**(2): 142-8.

Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri and J. E. Dick (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-8.

Lerner, L. J., F. J. Holthaus, Jr. and C. R. Thompson (1958). "A non-steroidal estrogen antiagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl ethanol." Endocrinology **63**(3): 295-318.

Li, Z., S. Bao, Q. Wu, H. Wang, C. Eyler, S. Sathornsumetee, Q. Shi, Y. Cao, J. Lathia, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland and J. N. Rich (2009). "Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells." Cancer Cell **15**(6): 501-13.

Lippman, M., G. Bolan and K. Huff (1976). "The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture." Cancer Res **36**(12): 4595-601.

Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black and J. S. Yu (2006). "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." Mol Cancer **5**: 67.

Liu, S., G. Dontu, I. D. Mantle, S. Patel, N. S. Ahn, K. W. Jackson, P. Suri and M. S. Wicha (2006). "Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells." Cancer Res **66**(12): 6063-71.

Lockman, P. R., M. O. Oyewumi, J. M. Koziara, K. E. Roder, R. J. Mumper and D. D. Allen (2003). "Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles." J Control Release **93**(3): 271-82.

Lopez-Barneo, J., R. Pardal and P. Ortega-Saenz (2001). "Cellular mechanism of oxygen sensing." Annu Rev Physiol **63**: 259-87.

Louissaint, A., Jr., S. Rao, C. Leventhal and S. A. Goldman (2002). "Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain." Neuron **34**(6): 945-60.

Lowry, W. E., C. Blanpain, J. A. Nowak, G. Guasch, L. Lewis and E. Fuchs (2005). "Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells." Genes Dev **19**(13): 1596-611.

Ma, S., K. W. Chan, L. Hu, T. K. Lee, J. Y. Wo, I. O. Ng, B. J. Zheng and X. Y. Guan (2007). "Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells." Gastroenterology **132**(7): 2542-56.

Maeda, H. and Y. Matsumura (1989). "Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **6**(3): 193-210.

Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review." J Control Release **65**(1-2): 271-84.

Mao, X. G., X. Zhang, X. Y. Xue, G. Guo, P. Wang, W. Zhang, Z. Fei, H. N. Zhen, S. W. You and H. Yang (2009). "Brain Tumor Stem-Like Cells Identified by Neural Stem Cell Marker CD15." Transl Oncol **2**(4): 247-57.

Marzesco, A. M., P. Janich, M. Wilsch-Brauninger, V. Dubreuil, K. Langenfeld, D. Corbeil and W. B. Huttner (2005). "Release of extracellular membrane particles carrying the

stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells." J Cell Sci **118**(Pt 13): 2849-58.

Marzesco, A. M., M. Wilsch-Brauninger, V. Dubreuil, P. Janich, K. Langenfeld, C. Thiele, W. B. Huttner and D. Corbeil (2009). "Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol." FEBS Lett **583**(5): 897-902.

Matsumura, Y. and H. Maeda (1986). "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs." Cancer Res **46**(12 Pt 1): 6387-92.

Maw, M. A., D. Corbeil, J. Koch, A. Hellwig, J. C. Wilson-Wheeler, R. J. Bridges, G. Kumaramanickavel, S. John, D. Nancarrow, K. Roper, A. Weigmann, W. B. Huttner and M. J. Denton (2000). "A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration." Hum Mol Genet **9**(1): 27-34.

Maxfield, F. R. and T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 121-32.

Maxwell, P. H., G. U. Dachs, J. M. Gleadle, L. G. Nicholls, A. L. Harris, I. J. Stratford, O. Hankinson, C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe (1997). "Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 8104-9.

McCord, A. M., M. Jamal, U. T. Shankavarum, F. F. Lang, K. Camphausen and P. J. Tofilon (2009). "Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro." Mol Cancer Res **7**(4): 489-97.

Mellman, I. (1996). "Endocytosis and molecular sorting." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 575-625.

Mendez, O., J. Zavadil, M. Esencay, Y. Lukyanov, D. Santovasi, S. C. Wang, E. W. Newcomb and D. Zagzag (2010). "Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres." Mol Cancer **9**: 133.

Menei, P., P. Metellus, E. Parot-Schinkel, H. Loiseau, L. Capelle, G. Jacquet and J. Guyotat (2010). "Biodegradable carmustine wafers (Gliadel) alone or in combination with chemoradiotherapy: the French experience." Ann Surg Oncol **17**(7): 1740-6.

Miraglia, S., W. Godfrey and D. Buck (1998). "A response to AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?" Blood **91**(11): 4390-1.

Miraglia, S., W. Godfrey, A. H. Yin, K. Atkins, R. Warnke, J. T. Holden, R. A. Bray, E. K. Waller and D. W. Buck (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." Blood **90**(12): 5013-21.

Mizrak, D., M. Brittan and M. R. Alison (2008). "CD133: molecule of the moment." J Pathol **214**(1): 3-9.

Momota, H., E. Nerio and E. C. Holland (2005). "Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo." Cancer Res **65**(16): 7429-35.

Morille, M., T. Montier, P. Legras, N. Carmoy, P. Brodin, B. Pitard, J. P. Benoit and C. Passirani (2010). "Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting." Biomaterials **31**(2): 321-9.

Moriyama, T., K. Ohuchida, K. Mizumoto, L. Cui, N. Ikenaga, N. Sato and M. Tanaka (2010). "Enhanced cell migration and invasion of CD133+ pancreatic cancer cells cocultured with pancreatic stromal cells." Cancer **116**(14): 3357-68.

Morrison, R., S. M. Schleicher, Y. Sun, K. J. Niermann, S. Kim, D. E. Spratt, C. H. Chung and B. Lu (2011). "Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis." J Oncol **2011**: 941876.

Morrison, S. J., M. Csete, A. K. Groves, W. Melega, B. Wold and D. J. Anderson (2000). "Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells." J Neurosci **20**(19): 7370-6.

Niu, C. S., M. W. Li, Y. F. Ni, J. M. Chen, J. M. Mei, J. Li and X. M. Fu (2010). "Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells." J Exp Clin Cancer Res **29**: 113.

O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger and J. E. Dick (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-10.

Oka, N., A. Soeda, A. Inagaki, M. Onodera, H. Maruyama, A. Hara, T. Kunisada, H. Mori and T. Iwama (2007). "VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells." Biochem Biophys Res Commun **360**(3): 553-9.

Olivier, J. C., R. Huertas, H. J. Lee, F. Calon and W. M. Pardridge (2002). "Synthesis of pegylated immunonanoparticles." Pharm Res **19**(8): 1137-43.

Olumi, A. F., G. D. Grossfeld, S. W. Hayward, P. R. Carroll, T. D. Tlsty and G. R. Cunha (1999). "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." Cancer Res **59**(19): 5002-11.

Owens, D. M., M. R. Romero, C. Gardner and F. M. Watt (2003). "Suprabasal alpha6beta4 integrin expression in epidermis results in enhanced tumourigenesis and disruption of TGFbeta signalling." J Cell Sci **116**(Pt 18): 3783-91.

Paillard, A., F. Hindre, C. Vignes-Colombeix, J. P. Benoit and E. Garcion (2010). "The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability." Biomaterials **31**(29): 7542-54.

Palmer, T. D., A. R. Willhoite and F. H. Gage (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." J Comp Neurol **425**(4): 479-94.

Panchision, D. M. (2009). "The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease." J Cell Physiol **220**(3): 562-568.

Pardridge, W. M., J. L. Buciak and P. M. Friden (1991). "Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo." J Pharmacol Exp Ther **259**(1): 66-70.

Peer, D., J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer (2007). "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy." Nat Nanotechnol **2**(12): 751-60.

Perrier, T., P. Saulnier, F. Fouchet, N. Lautram and J. P. Benoit (2010). "Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms." Int J Pharm **396**(1-2): 204-9.

Piccirillo, S. G., B. A. Reynolds, N. Zanetti, G. Lamorte, E. Binda, G. Broggi, H. Brem, A. Olivi, F. Dimeco and A. L. Vescovi (2006). "Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells." Nature **444**(7120): 761-5.

Pistollato, F., S. Abbadi, E. Rampazzo, L. Persano, A. Della Puppa, C. Frasson, E. Sarto, R. Scienza, D. D'Avella and G. Basso (2010). "Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma." Stem Cells **28**(5): 851-62.

Pistollato, F., H. L. Chen, B. R. Rood, H. Z. Zhang, D. D'Avella, L. Denaro, M. Gardiman, G. te Kronnie, P. H. Schwartz, E. Favaro, S. Indraccolo, G. Basso and D. M. Panchision (2009). "Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma." Stem Cells **27**(1): 7-17.

Pistollato, F., H. L. Chen, P. H. Schwartz, G. Basso and D. M. Panchision (2007). "Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes." Mol Cell Neurosci **35**(3): 424-35.

Platet, N., S. Y. Liu, M. E. Atifi, L. Oliver, F. M. Vallette, F. Berger and D. Wion (2007). "Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures." Cancer Lett **258**(2): 286-90.

Potten, C. S. and M. Loeffler (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." Development **110**(4): 1001-20.

Reardon, D. A., M. J. Egorin, J. A. Quinn, J. N. Rich, S. Gururangan, J. J. Vredenburgh, A. Desjardins, S. Sathornsumetee, J. M. Provenzale, J. E. Herndon, 2nd, J. M. Dowell, M. A. Badruddoja, R. E. McLendon, T. F. Lagattuta, K. P. Kicielinski, G. Dresemann, J. H. Sampson, A. H. Friedman, A. J. Salvado and H. S. Friedman (2005). "Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme." J Clin Oncol **23**(36): 9359-68.

Reardon, D. A., M. R. Zalutsky and D. D. Bigner (2007). "Antitenascin-C monoclonal antibody radioimmunotherapy for malignant glioma patients." Expert Rev Anticancer Ther **7**(5): 675-87.

Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-11.

Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-10.

Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle and R. De Maria (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-5.

Ricci-Vitiani, L., R. Pallini, M. Biffoni, M. Todaro, G. Invernici, T. Cenci, G. Maira, E. A. Parati, G. Stassi, L. M. Larocca and R. De Maria (2010). "Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells." Nature **468**(7325): 824-8.

Roger, E., F. Lagarce, E. Garcion and J. P. Benoit (2009). "Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis." J Control Release **140**(2): 174-81.

Roper, K., D. Corbeil and W. B. Huttner (2000). "Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane." Nat Cell Biol **2**(9): 582-92.

Sathornsumetee, S., Y. Cao, J. E. Marcello, J. E. Herndon, 2nd, R. E. McLendon, A. Desjardins, H. S. Friedman, M. W. Dewhirst, J. J. Vredenburgh and J. N. Rich (2008). "Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan." J Clin Oncol **26**(2): 271-8.

Sathornsumetee, S. and J. N. Rich (2008). "Designer therapies for glioblastoma multiforme." Ann N Y Acad Sci **1142**: 108-32.

Scadden, D. T. (2006). "The stem-cell niche as an entity of action." Nature **441**(7097): 1075-9.

Schnyder, A., S. Krahenbuhl, J. Drewe and J. Huwyler (2005). "Targeting of daunomycin using biotinylated immunoliposomes: pharmacokinetics, tissue distribution and in vitro pharmacological effects." J Drug Target **13**(5): 325-35.

Schnyder, A., S. Krahenbuhl, M. Torok, J. Drewe and J. Huwyler (2004). "Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes." Biochem J **377**(Pt 1): 61-7.

Schrama, D., R. A. Reisfeld and J. C. Becker (2006). "Antibody targeted drugs as cancer therapeutics." Nat Rev Drug Discov **5**(2): 147-59.

Shapira, A., Y. D. Livney, H. J. Broxterman and Y. G. Assaraf (2011). "Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance." Drug Resist Updat.

Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature **441**(7092): 424-30.

Shen, Q., Y. Wang, E. Kokovay, G. Lin, S. M. Chuang, S. K. Goderie, B. Roysam and S. Temple (2008). "Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions." Cell Stem Cell **3**(3): 289-300.

Shervington, A. and C. Lu (2008). "Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells." Cancer Invest **26**(5): 535-42.

Shiras, A., S. T. Chettiar, V. Shepal, G. Rajendran, G. R. Prasad and P. Shastry (2007). "Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma." Stem Cells **25**(6): 1478-89.

Shmelkov, S. V., L. Jun, R. St Clair, D. McGarrigle, C. A. Derderian, J. K. Usenko, C. Costa, F. Zhang, X. Guo and S. Rafii (2004). "Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133." Blood **103**(6): 2055-61.

Shmelkov, S. V., R. St Clair, D. Lyden and S. Rafii (2005). "AC133/CD133/Prominin-1." Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 715-9.

Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-9.

Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire and P. B. Dirks (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-8.

Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano and P. B. Dirks (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.

Smith, L. M., A. Nesterova, M. C. Ryan, S. Duniho, M. Jonas, M. Anderson, R. F. Zabinski, M. K. Sutherland, H. P. Gerber, K. L. Van Orden, P. A. Moore, S. M. Ruben and P. J. Carter (2008). "CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers." Br J Cancer **99**(1): 100-9.

Soeda, A., M. Park, D. Lee, A. Mintz, A. Androutsellis-Theotokis, R. D. McKay, J. Engh, T. Iwama, T. Kunisada, A. B. Kassam, I. F. Pollack and D. M. Park (2009). "Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha." Oncogene **28**(45): 3949-59.

Sonnino, S., L. Mauri, V. Chigorno and A. Prinetti (2007). "Gangliosides as components of lipid membrane domains." Glycobiology **17**(1): 1R-13R.

Studer, L., M. Csete, S. H. Lee, N. Kabbani, J. Walikonis, B. Wold and R. McKay (2000). "Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen." J Neurosci **20**(19): 7377-83.

Stupp, R. and M. E. Hegi (2007). "Targeting brain-tumor stem cells." Nat Biotechnol **25**(2): 193-4.

Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross and R. O. Mirimanoff (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncol **10**(5): 459-66.

Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer and R. O. Mirimanoff (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-96.

Tabu, K., K. Sasai, T. Kimura, L. Wang, E. Aoyanagi, S. Kohsaka, M. Tanino, H. Nishihara and S. Tanaka (2008). "Promoter hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas." Cell Res.

Taieb, N., M. Maresca, X. J. Guo, N. Garmy, J. Fantini and N. Yahi (2009). "The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif." Cancer Lett **278**(2): 164-73.

Takaishi, S., T. Okumura, S. Tu, S. S. Wang, W. Shibata, R. Vigneshwaran, S. A. Gordon, Y. Shimada and T. C. Wang (2009). "Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44." Stem Cells **27**(5): 1006-20.

Tavazoie, M., L. Van der Veken, V. Silva-Vargas, M. Louissaint, L. Colonna, B. Zaidi, J. M. Garcia-Verdugo and F. Doetsch (2008). "A specialized vascular niche for adult neural stem cells." Cell Stem Cell **3**(3): 279-88.

Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." Nature **414**(6859): 112-7.

Uchida, N., D. W. Buck, D. He, M. J. Reitsma, M. Masek, T. V. Phan, A. S. Tsukamoto, F. H. Gage and I. L. Weissman (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14720-5.

Ulasov, I. V., S. Nandi, M. Dey, A. M. Sonabend and M. S. Lesniak (2010). "Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy." Mol Med **17**(1-2): 103-12.

Valtonen, S., U. Timonen, P. Toivanen, H. Kalimo, L. Kivipelto, O. Heiskanen, G. Unsgaard and T. Kuurne (1997). "Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study." Neurosurgery **41**(1): 44-8; discussion 48-9.

Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, J. E. Herndon, 2nd, J. M. Dowell, D. A. Reardon, J. A. Quinn, J. N. Rich, S. Sathornsumetee, S. Gururangan, M. Wagner, D. D. Bigner, A. H. Friedman and H. S. Friedman (2007). "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma." Clin Cancer Res **13**(4): 1253-9.

Wang, C. H., S. H. Chiou, C. P. Chou, Y. C. Chen, Y. J. Huang and C. A. Peng (2010). "Photothermolysis of glioblastoma stem-like cells targeted by carbon nanotubes conjugated with CD133 monoclonal antibody." Nanomedicine **7**(1): 69-79.

Wang, P. P., J. Frazier and H. Brem (2002). "Local drug delivery to the brain." Adv Drug Deliv Rev **54**(7): 987-1013.

Wang, R., K. Chadalavada, J. Wilshire, U. Kowalik, K. E. Hovinga, A. Geber, B. Fligelman, M. Leversha, C. Brennan and V. Tabar (2010). "Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium." Nature **468**(7325): 829-33.

Watts, C. (1997). "Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules." Annu Rev Immunol **15**: 821-50.

Weigmann, A., D. Corbeil, A. Hellwig and W. B. Huttner (1997). "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12425-30.

Wenger, R. H., D. P. Stiehl and G. Camenisch (2005). "Integration of oxygen signaling at the consensus HRE." Sci STKE **2005**(306): re12.

Weyland, M., F. Manero, A. Paillard, D. Gree, G. Viault, D. Jarnet, P. Menei, P. Juin, I. Chourpa, J. P. Benoit, R. Gree and E. Garcion (2010). "Mitochondrial targeting by use of lipid nanocapsules loaded with SV30, an analogue of the small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1." J Control Release.

Winau, F., O. Westphal and R. Winau (2004). "Paul Ehrlich--in search of the magic bullet." Microbes Infect **6**(8): 786-9.

Wolff, J. A. and D. B. Rozema (2008). "Breaking the bonds: non-viral vectors become chemically dynamic." Mol Ther **16**(1): 8-15.

Wouters, B. G. and M. Koritzinsky (2008). "Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer." Nat Rev Cancer **8**(11): 851-64.

Yagita, Y., K. Kitagawa, T. Ohtsuki, K. Takasawa, T. Miyata, H. Okano, M. Hori and M. Matsumoto (2001). "Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus." Stroke **32**(8): 1890-6.

Yang, C., Y. Yang, N. Gupta, X. Liu, A. He, L. Liu, J. Zuo, Y. Chang and F. Fang (2007). "Pentaspan membrane glycoprotein, prominin-1, is involved in glucose metabolism and cytoskeleton alteration." Biochemistry (Mosc) **72**(8): 854-62.

Yang, Z., Y. Chen, C. Lillo, J. Chien, Z. Yu, M. Michaelides, M. Klein, K. A. Howes, Y. Li, Y. Kaminoh, H. Chen, C. Zhao, Y. T. Al-Sheikh, G. Karan, D. Corbeil, P. Escher, S. Kamaya, C. Li, S. Johnson, J. M. Frederick, Y. Zhao, C. Wang, D. J. Cameron, W. B. Huttner, D. F. Schorderet, F. L. Munier, A. T. Moore, D. G. Birch, W. Baehr, D. M. Hunt, D. S. Williams and K. Zhang (2008). "Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice." J Clin Invest **118**(8): 2908-16.

Yao, J., T. Zhang, J. Ren, M. Yu and G. Wu (2009). "Effect of CD133/prominin-1 antisense oligodeoxynucleotide on in vitro growth characteristics of Huh-7 human hepatocarcinoma cells and U251 human glioma cells." Oncol Rep **22**(4): 781-7.

Yilmaz, O. H., R. Valdez, B. K. Theisen, W. Guo, D. O. Ferguson, H. Wu and S. J. Morrison (2006). "Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells." Nature **441**(7092): 475-82.

Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney and D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-12.

You, H., W. Ding and C. B. Rountree (2010). "Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor-beta." Hepatology **51**(5): 1635-44.

Yuan, F., M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin and R. K. Jain (1995). "Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size." Cancer Res **55**(17): 3752-6.

Yuan, X., J. Curtin, Y. Xiong, G. Liu, S. Waschsmann-Hogiu, D. L. Farkas, K. L. Black and J. S. Yu (2004). "Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme." Oncogene **23**(58): 9392-400.

Zacchigna, S., H. Oh, M. Wilsch-Brauninger, E. Missol-Kolka, J. Jaszai, S. Jansen, N. Tanimoto, F. Tonagel, M. Seeliger, W. B. Huttner, D. Corbeil, M. Dewerchin, S. Vinckier, L. Moons and P. Carmeliet (2009). "Loss of the cholesterol-binding protein prominin-1/CD133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration." J Neurosci **29**(7): 2297-308.

Zagzag, D., H. Zhong, J. M. Scalzitti, E. Laughner, J. W. Simons and G. L. Semenza (2000). "Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression." Cancer **88**(11): 2606-18.

Zhang, Q., R. Haleem, X. Cai and Z. Wang (2002). "Identification and characterization of a novel testosterone-regulated prominin-like gene in the rat ventral prostate." Endocrinology **143**(12): 4788-96.

Zhang, Q., F. Zulfiqar, X. Xiao, S. A. Riazuddin, Z. Ahmad, R. Caruso, I. MacDonald, P. Sieving, S. Riazuddin and J. F. Hejtmancik (2007). "Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the PROM1 gene." Hum Genet **122**(3-4): 293-9.

Zhong, H., A. M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D. A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W. B. Isaacs, G. L. Semenza and J. W. Simons (1999). "Overexpression of hypoxia-

inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases." Cancer Res **59**(22): 5830-5.

Zhu, X., S. Bidlingmaier, R. Hashizume, C. D. James, M. S. Berger and B. Liu (2010). "Identification of internalizing human single-chain antibodies targeting brain tumor sphere cells." Mol Cancer Ther **9**(7): 2131-41.

Zobalova, R., L. McDermott, M. Stantic, K. Prokopova, L. F. Dong and J. Neuzil (2008). "CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP." Biochem Biophys Res Commun **373**(4): 567-71.

Résumé

La mise en évidence de cellules initiatrices de cancer dans les glioblastomes et l'existence de cellules souches cancéreuses (CSCs) étayent la présomption que l'échec des stratégies anti-tumorales classiques puisse être attribué à un problème de cible cellulaire. Dans le contexte des thérapies ciblées, l'émergence des nanomédecines offre des perspectives pour la délivrance de principes actifs vers les CSCs ou leur microenvironnement (ou niche) en vue d'une meilleure efficacité, spécificité et sécurité biologique. Douées d'autorenouvellement et capables de générer des clones néoplasiques radio et chimiorésistants, les CSCs n'ont toutefois pas de marqueur exclusifs connus sinon des marqueurs associés permettant d'enrichir ces populations et de potentiellement établir un ciblage notamment locorégional au sein de ces tumeurs. En nous focalisant sur l'épitope AC133, marqueur de CSCs associé à des glycosylations de la protéine CD133 ou prominine-1, l'objectif de cette thèse a été: i) de comprendre la situation biologique traduite par l'expression d'AC133 (témoin d'initiation de tumeurs, d'agressivité tumorale ou d'hypoxie) ii) de développer une nanomédecine reconnaissant l'épitope AC133, iii) de déterminer, au regard de sa distribution au niveau de protrusions membranaires, le rôle fonctionnel de CD133/AC133. A partir de modèles *in vitro* et *in vivo* de glioblatomes humains implantés dans le cerveau de souris immunodéprimées (SCID), nos résultats établissent qu'AC133 est un témoin de non exposition chronique à une pression partielle élevée en oxygène (21% O_2 versus 3% O_2). Dans ce contexte la stratégie shRNA knockdown démontre que HIF-1α est un des régulateurs de l'expression d'AC133. L'absence d'AC133 à 21% O_2 au sein de populations non triées de cellules de glioblastomes n'est pas reliée à l'initiation de tumeur mais en revanche associée à une perte d'agressivité tumorale. La cible AC133 a donc été choisie pour développer des nanocapsules lipidiques (NCLs) capables de reconnaitre des CSCs. A l'aide d'un polymère bifonctionnel, le DSPE–PEG_{2000}–maleimide et de l'anticorps monoclonal AC133, une lipo-immunoglobuline (DSPE–PEG_{2000}–maleimide-AC133), a été synthétisée puis post-insérée dans des NCLs permettant l'obtention d'immuno-NCLs. Ces nano-objets ont démontré leur fonctionnalité par leur spécificité de liaison à des cellules Caco-2 exprimant constitutivement AC133. Enfin, dans une dernière étude focalisée sur le rôle de AC133/CD133 dans l'endocytose, nous démontrons par siRNA knockdown sur des cellules Caco-2 que AC133/CD133 inhibe l'internalisation cellulaire de transferrine et de NCLs. De manière intéressante, l'augmentation de la concentration extracellulaire en fer, connue pour diminuer l'expression du récepteur de la transferrine, régule également négativement celle d'AC133, indiquant un rôle d'AC133/CD133 dans l'endocytose et dans le métaboslime du fer. L'ensemble de ce travail de thèse a donc permis de développer de nouveaux nano-outils et de mieux appréhender leur utilité pour l'application de nanomédicines visant à éliminer et/ou modifier leur comportement de CSCs AC133 positives.

Mots clés : cancer du cerveau, cellules souches, prominine-1, CD133, thérapies ciblées, nanomédecines, nanoparticules, hypoxie, endocytose, transferrine, métabolisme du fer.

Abstract

The discovery of cancer initiating cells in glioblastomas and the existence of cancer stem cells (CSCs) suggest that failure of current anti-tumor strategies could be attributed to a problem of target cell. In the context of targeted therapies, the emergence of nanomedicines offer new perspectives for drug delivery to CSCs or their microenvironment (or niche) thus getting more efficacy, specificity and biological safeness. Capable to self-renew and to generate radio and chemo-resistant neoplastic clones, CSCs do not have, however, specific markers but instead associated markers allowing their enrichment and potentially their targeting notably for loco-regional therapies. By focusing on the AC133 epitope, that is a CSC marker associated to glycosylation on the protein CD133 or prominin-1, the aim of this PhD thesis was to contribute understanding on: i) What the expression of AC133 is accounting for (tumor initiation, tumor aggressiveness or hypoxia) ii) If it is possible to recognize AC133 by nanocarriers iii) What is, regarding its distribution among membrane protrusions, the functional role of CD133/AC133. From *in vitro* and *in vivo* models of human glioblastomas implanted in the brain of immunodeprived mice (SCID), our data established that AC133 is a witness of non-chronic exposure to high oxygen tension (21% O_2 versus 3% O_2). In this context, the shRNA knockdown strategy allowed demonstrating that HIF-1α regulates AC133 expression. The lack of AC133 expression at 21% O_2 within non sorted glioma cell populations is not related to the tumor initiation but instead associated to a loss of tumor aggressiveness. The AC133 target was therefore chosen to develop lipid nanocapsules (LNCs), capable of recognizing CSCs. By mean of a bifunctionnal a polymer (DSPE–PEG_{2000}–maleimide) and the monoclonal antibody AC133, a lipo-immunoglobulin (DSPE–PEG_{2000}–maleimide-AC133) was synthesized and post-inserted within LNCs, thus allowing the obtention of immuno-LNCs. Those nano-objects demonstrated their functionalities by their specificity of binding to Caco-2 cells, which constitutively express AC133. Finally, by giving attention to the role of AC133/CD133 in endocytosis, we demonstrated by siRNA knockdown on Caco-2 cells that AC133/CD133 inhibits the cell internalization of transferrin and NCLs. Interestingly, increase of extracellular iron concentration, known to disminish the expression of the tranferrin receptor, equally regulated negatively those of AC133, thus supporting a role for AC133/CD133 in endocytosis and in iron metabolism. Taken together, those PhD data allowed to develop a new nano-tool and to better apprehend its usefulness for the application of naomedicines aiming to eradicate and/or to modify the behaviour of CSCs expressing AC133.

Key words : brain cancer, stem cells, prominin-1, CD133, targeted therapy, nanomedicines, nanoparticles, hypoxia, endocytosis, transferrin, iron metabolism.