



HAL
open science

Nouveaux marqueurs des glioblastomes : valeur pronostique, profil d'expression, implication dans la vascularisation et la résistance aux antiangiogéniques

Virginie Godard

► To cite this version:

Virginie Godard. Nouveaux marqueurs des glioblastomes : valeur pronostique, profil d'expression, implication dans la vascularisation et la résistance aux antiangiogéniques. Sciences agricoles. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR14982 . tel-01124160

HAL Id: tel-01124160

<https://theses.hal.science/tel-01124160>

Submitted on 6 Mar 2015

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.

THÈSE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Mention : Génétique

Par **Virginie Godard**

Née le 26/01/1986 à Paris IV (75)

Nouveaux marqueurs des glioblastomes : valeur pronostique, profil d'expression, implication dans la vascularisation et la résistance aux anti-angiogéniques.

Travail réalisé au sein du laboratoire d'Angiogenèse et du microenvironnement des cancers, INSERM U1029.

Soutenue publiquement le : 18 Décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

Dr Anne-Catherine Prats – Université Paul Sabatier, Toulouse
Pr Véronique Quillien – Université Rennes 1
Dr Sandrine Dabernat – Université Bordeaux Segalen
Pr Sophie Javerzat – Université Bordeaux 1

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse

Remerciements :

Tout d'abord je remercie Véronique Quillien, Anne-Catherine Prats et Sandrine Dabernat d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie également Véronique Quillien qui nous a permis de bénéficier des lignées de NS qui nous ont permis de mener à bien la deuxième partie de ce travail sur la résistance du GBM aux anti-angiogéniques.

Je remercie Sophie Javerzat de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse passionnant et très enrichissant et de m'avoir fait confiance afin de le mener à bien. Je la remercie aussi de la patience dont elle a fait preuve ainsi que de son aide précieuse dans la préparation de ma thèse. Je remercie aussi Martin Hagedorn pour ses conseils ainsi que pour m'avoir permis de participer au travail sur Eg5. Je tiens à remercier Andreas Bikfalvi de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire qui ont permis la bonne ambiance dans laquelle j'ai effectué ma thèse. Je remercie Fabienne, Cathy, Maylis, Céline, Jess pour votre gentillesse et votre aide pour les manips. Vos parties de belotte le midi vont me manquer même si je n'ai jamais réellement compris les règles ! Je remercie Nadège, Prisca, Arnaud, Sylvaine, Oui-oui et Babou avec qui nous avons partagé de nombreuses soirées pizzas-ciné (sans oublier Yann évidemment) ! Merci à Nadou et Pika de m'avoir pris sous votre aile à mon arrivée et d'avoir pris soin des NS quand je ne pouvais pas le faire. Pika je te dois énormément, ta joie de vivre et ton esprit vif et toujours en ébullition m'ont manqué lors de cette dernière année ! Sylvaine, j'ai apprécié nos discussions, surtout lors de nos allers/retours vers les Deux-Sèvres et la Vendée. Notre passage par Blouc était mémorable !! Et encore merci d'avoir relu ma première ébauche de thèse. Arnaud ton expertise et tes discussions scientifiques sur le GBM m'auront été précieuses ! Babou tes discussions ont égaillé le bureau et me manqueront. Je te souhaite de finir ton post-doc en beauté et de trouver un prochain poste qui conviendra à ce que tu cherches. Oui-oui merci pour les logiciels qui m'ont permis de rédiger ma thèse depuis chez moi. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse, même si je ne me fait aucun soucis pour toi, avec Patrick vous allez tout déchirer !! A Lin, Thomas et Kévin, j'ai été ravie de vous rencontrer et je vous souhaite de réussir pleinement dans vos projets respectifs.

Je remercie également Michel, Clotilde, Patrick et Sophie pour leur gentillesse. Patrick, tes discussions en fin de journée étaient passionnantes ! Merci aussi à Marie-Claude pour votre bienveillance, ainsi qu'à Fred et Karine pour les commandes, même passées à la dernière minute. Je dis un grand merci à Raphael pour son aide dans mes manips souris, même pendant la période des fêtes de fin d'années, ainsi qu'à Marie-Paule pour les traitements de ces souris.

Pour faire un peu original, je remercie ma famille sans qui rien n'aurait été possible. Sans leur soutien je n'en serais pas là aujourd'hui ! Merci Maman pour tes nombreuses relectures et pour m'avoir aidée quand je n'y voyais plus clair. Bien sûr merci à Manon de m'avoir supportée, même si je pense que je n'ai pas été si casse pied que ça (enfin il reste encore un mois, on ne sait jamais...). Merci Frédéric, même si je n'ai peut être pas assez fait appel à toi quand j'étais bloquée, notre discussion m'a beaucoup aidé pour écrire ma discussion. Et merci à mon petit frère pour son soutien, même quand tu m'as traité de folle parce que je faisais une thèse !

Je remercie également mes amis qui m'ont permis de me changer les idées lors de ma rédaction et qui ont été un soutien précieux. Merci à mes amis de master : Romain, Hélène, Asen, Simon, Raj, Delphine. Merci aussi à Marie (eh oui ça y est moi aussi j'y passe), Julien (qui prenait de mes nouvelles et les partageaient ensuite avec les autres qui n'osaient pas me déranger) et à MiKa !

Liste des figures et tableaux	4
Liste des abréviations	5
I. Introduction	7
A. Glioblastome multiforme	9
1. Présentation.....	9
a) Description / généralités	9
b) Caractéristiques cliniques.....	10
c) Anomalies génétiques	10
2. Vascolarisation des GBM	13
a) L'angiogenèse tumorale	13
b) La co-option vasculaire.....	16
c) La vasculogenèse.....	18
d) Le mimétisme vasculaire et la transdifférenciation	19
3. Adaptation aux traitements anti-angiogéniques et récurrence	20
a) Traitement du Glioblastome	20
b) Mécanismes de résistance aux anti-angiogéniques	21
4. Rôle des cellules souches cancéreuses.....	23
5. De la recherche de nouveaux facteurs, impliqués dans l'angiogenèse développementale, à l'étude de leur implication dans le glioblastome.....	26
B. Nouvelles cibles thérapeutiques: gènes candidats	30
1. KIF20A/MKlp2 : Rabkinesin6, RAB6KIFL, RB6K.....	30
a) Présentation de la famille des kinésines.....	30
b) Description de KIF20A/MKlp2.....	32
c) Rôle MKlp2 dans la mitose: la cytokinèse.....	33
(1) Les kinésines et la mitose	33
(2) La cytokinèse	34
(3) MKlp2 et la cytokinèse.	35
d) Autres fonctions de MKlp2	37
e) KIF20A et cancers.....	37
(1) Les kinésines et le cancer	37
(2) MKlp2 et cancers.....	39
2. DPY19L1.....	40
a) Description du gène	40
b) Fonction connue	40
c) Dpy19l1 et cancers.....	41
C. Projet de thèse	42
II. Matériels et méthodes.....	45
A. Obtention des échantillons tumoraux humains	47
B. Histologie	47
1. Coloration Hématoxyline-Eosine.....	47
2. Hybridation <i>in situ</i>	47
3. Immunohistologie	48
C. Culture cellulaire	49

1. Lignées cellulaires.....	49
a) Cellules adhérentes.....	49
b) Neurosphères.....	49
2. Transfection siRNA.....	50
3. Test de prolifération.....	50
4. Test de migration/invasion.....	50
a) Par chimiotaxie en chambre de Boyden.....	50
b) Par haptotaxie à l'IncuCyte.....	51
5. Immunocytologie.....	52
D. Xénogreffe de cellules tumorales chez la souris.....	53
1. Implantation intracérébrale de NS.....	53
2. Traitement des animaux.....	54
3. Sacrifice des animaux et récupération des cerveaux.....	55
E. Biologie moléculaire.....	55
1. Extraction d'ARN.....	55
2. Reverse transcription (RT).....	55
3. PCR quantitative relative.....	55
4. Western Blot.....	56
a) Extraction de protéines.....	56
b) Western blot.....	56
F. Analyses statistiques.....	57
III. Résultats et Discussion.....	59
A. Mise en évidence de nouveaux marqueurs vasculaires du GBM.....	61
1. Sélection de gènes potentiellement impliqués dans l'angiogenèse tumorale.....	61
a) Introduction.....	61
b) Données transcriptomiques.....	62
c) Corrélations de survie.....	64
d) Etude des gènes candidats chez les patients atteints de GBM.....	67
(1) Quantification de l'expression de KIF20A, DPY19L1 et FSTL1.....	68
(2) Corrélations de survie.....	69
2. Profils d'expression des gènes d'intérêt.....	72
a) Exploration des bases de données.....	72
(1) Profil d'expression au cours du développement embryonnaire.....	72
(2) Profil d'expression tumoral.....	74
b) Profil d'expression de KIF20A et DPY19L1 chez les patients.....	75
(1) Mise au point de la technique d'hybridation in situ.....	75
(2) Localisation de KIF20A et DPY19L1.....	77
c) Caractérisation dpy19l1et MKlp2 chez les patients GBM.....	79
(1) Dpy19l1.....	79
(a) Profil d'expression.....	79
(b) Discussion : DPY19L1, un nouveau marqueur diagnostique du glioblastome.....	82
(2) MKlp2.....	85
(a) Profil d'expression.....	85
(b) Discussion : Implication de KIF20A/MKlp2 dans la récurrence du GBM ?.....	92

B. Mise au point d'un nouveau modèle d'étude du GBM et observation de sa résistance aux traitements anti-angiogéniques	94
1. Le modèle U87 xénotransplanté chez la souris et son utilisation en essai préclinique.....	94
2. Le modèle NS : caractérisation de la cinétique de croissance et du phénotype vasculaire, effet des traitements	97
a) Introduction.....	97
b) Caractérisation du développement tumoral in vivo.....	99
c) Imagerie de la vasculature tumorale par tomographie aux rayons X.....	103
d) Tests in vitro	105
e) Expression et localisation de DPY19L1 et KIF20A dans le modèle NS	107
(1) DPY19L1.....	107
(2) MKlp2.....	109
3. Discussion	110
IV. Conclusion & Perspectives	115
Références	123
Annexes	137
Annexe 1 : Impaired angiogenesis and tumor development by inhibition of the mitotic kinesin Eg5.	138
Annexe 2 : Combining Tocilizumab (Actemra) with Bevacizumab (Avastin) does not prevent cooption-dependent tumor growth in mouse models of glioblastoma.	139
Annexe 3 : Balancing risks and benefits of antiangiogenic drugs for malignant glioma	140

Liste des figures et tableaux

FIGURE 1 : STRUCTURE DU CERVEAU HUMAIN.....	9
FIGURE 2 : SCHEMATISATION DES ANOMALIES GENETIQUES DE LA VOIE RTK/RAS/PI3K.....	10
FIGURE 3 : LES BASES GENETIQUES DU DEVELOPPEMENT DES GBM PRIMAIRES ET SECONDAIRES.....	12
FIGURE 4 : MECANISMES DE L'ANGIOGENESE TUMORALE DANS LE GBM.....	14
FIGURE 5 : SYNTHESE DES DIFFERENTS MODES DE VASCULARISATION DU GBM.....	16
FIGURE 6 : SCHEMATISATION DE LA CO-OPTION VASCULAIRE EXPERIMENTALE.....	17
FIGURE 7 : REPRESENTATION DE LA VASCULOGENESE.....	19
FIGURE 8 : MIMETISME VASCULAIRE ET TRANSDIFFERENCIATION DES CELLULES TUMORALES EN CELLULES ENDOTHELIALES.....	20
FIGURE 9 : REPONSES ADAPTATIVES DU GBM SUITE AU TRAITEMENT PAR ANTI-ANGIOGENIQUE.....	22
FIGURE 10 : LES CELLULES SOUCHES TUMORALES DANS LE GBM.....	24
FIGURE 11 : MODELE DE LA DIFFERENCIATION ET DE LA TRANSDIFFERENCIATION DES GSC.....	25
FIGURE 12 : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE (CAM) DE POULET ET ANGIOGENESE ..	27
FIGURE 13 : EXEMPLE DE PROFIL D'EXPRESSION VASCULAIRE DES GENES IDENTIFIES LORS DE L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE, PAR HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	28
FIGURE 14 : STRUCTURES DES DIFFERENTS MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DES KINESINES ET DE LEUR DOMAINE CATALYTIQUE.....	31
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE MKLP2.....	32
FIGURE 16 : LES KINESINES ET LA MITOSE.....	34
FIGURE 17 : SCHEMA DE LA CYTOKINESE DANS LES CELLULES ANIMALES.....	34
FIGURE 18 : EXPRESSION DE MKLP2 DANS LES CELLULES AU COURS DE LA MITOSE.....	35
FIGURE 19 : SCHEMATISATION DE LA REGULATION DE MKLP2 LORS DE LA MITOSE.....	36
FIGURE 20 : INHIBITION D'EG5 DANS LES HUVEC.....	39
FIGURE 21 : METHODE D'HYBRIDATION <i>IN SITU</i> QUANTI-GENE® VIEWRNA SUR COUPES FFPE.....	47
FIGURE 22 : SCHEMA DE LA MIGRATION/INVASION EN CHAMBRE DE BOYDEN.....	51
FIGURE 23 : METHODE DE MIGRATION/INVASION PAR CICATRICE A L'AIDE DU WOUND MAKER POUR UNE EXPERIENCE A L'INCUCYTE.....	52
FIGURE 24 : INJECTION DE CELLULES TUMORALE EN INTRACEREBRALE CHEZ LA SOURIS RAG2/ γ C.....	54
FIGURE 25 : COURBE STANDARD DE VALIDATION DES AMORCES POUR LA PCR QUANTITATIVE.....	56
FIGURE 26 : SUREXPRESSION SIGNIFICATIVE DE NOS GENES D'INTERET DANS LE GBM.....	63
FIGURE 27 : ANALYSES KAPLAN-MEIER DE L'EXPRESSION DE DPY19L1 ET KIF20A DANS LES TUMEURS GBM.....	65
FIGURE 28 : ANALYSE KAPLAN-MEIER DE LA CO-EXPRESSION DE DPY19L1 ET FSTL1 DANS LES TUMEURS GBM.....	67
FIGURE 29 : QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE NOS FACTEURS D'INTERET CHEZ UNE COHORTE DE 50 PATIENTS GBM LOCAUX ..	68
FIGURE 30 : ANALYSES KAPLAN-MEIER DE NOTRE COHORTE DE 50 PATIENTS EN FONCTION DE L'EXPRESSION DE KIF20A (A), DPY19L1 (B), FSTL1 (C) ET DE FSTL1 ET DPY19L1 (D).....	70
FIGURE 31 : EXPRESSION DE KIF20A DANS LES VAISSEAUX INTERSOMITIQUES ET LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ L'EMBRYON DE SOURIS AU STADE E14.5.....	73
FIGURE 32 : EXPRESSION VASCULAIRE DE MKLP2 DANS LES GLIOMES.....	75
FIGURE 33 : MISE AU POINT DE L'HYBRIDATION <i>IN SITU</i> . COUPES FFPE DE GBM HUMAINS HYBRIDES AVEC LA SONDRE CD31.....	77
FIGURE 34 : LOCALISATION VASCULAIRE DE DPY19L1 ET KIF20A.....	78
FIGURE 35 : EXPRESSION DE DPY19L1 ET KIF20A DANS LES CELLULES TUMORALES ET ENDOTHELIALES DES GBM.....	78
FIGURE 36 : EXPRESSION DE DPY19L1 AU NIVEAU PERIVASCULAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE GBM.....	80
FIGURE 37 : EXPRESSION DE DPY19L1 DANS LES CELLULES EN CULTURE.....	81
FIGURE 38 : ORGANISATION D'UN CAPILLAIRE SANGUIN.....	83
FIGURE 39 : EXPRESSION DE MKLP2 CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE GLIOMES DE BAS GRADE : EXEMPLE D'UN OLIGO-ASTROCYTOME MIXTE.....	85
FIGURE 40 : EXPRESSION DE MKLP2 CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE GBM.....	86
FIGURE 41 : EXPRESSION DE MKLP2 DANS LES CELLULES SOUCHES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE GBM.....	87

FIGURE 42 : EXPRESSION DE KIF20A/MKLP2 DANS LES CELLULES EN CULTURE.....	88
FIGURE 43 : CARACTERISATION DE L'EXPRESSION SUBCELLULAIRE DE MKLP2.....	89
FIGURE 44 : TESTS FONCTIONNELS SUITE A L'EXTINCTION DE MKLP2 DANS LES U87..	90
FIGURE 45 : CARACTERISATION DES TUMEURS U87 CHEZ LA SOURIS SUITE AU TRAITEMENT PAR L'AVASTIN® ..	95
FIGURE 46 : LE TRAITEMENT DES TUMEURS U87 A L'AVASTIN® ENTRAINE L'EXPRESSION DU MARQUEUR ENDOTHELIAL CD31 PAR LES CELLULES TUMORALES.	97
FIGURE 47 : CARACTERISATION DES NS EN CULTURE.	98
FIGURE 48 : DEVELOPPEMENT TUMORAL SUITE A L'IMPLANTATION DE CELLULES NS142 DANS L'HEMISPHERE GAUCHE DE SOURIS IMMUNODEFICIENTES.	100
FIGURE 49 : MISE EN EVIDENCE DES VAISSEAUX SANGUINS DANS LA TUMEUR NS CHEZ LA SOURIS.	101
FIGURE 50 : LES VAISSEAUX NE SONT PAS AFFECTES PAR LES DIFFERENTS TRAITEMENTS UTILISES CHEZ LA SOURIS.....	103
FIGURE 51 : MICROTOMOGRAPHIE A HAUTE RESOLUTION D'UNE TUMEUR U87 APRES 5 JOURS DE CROISSANCE..	104
FIGURE 52 : MICROTOMOGRAPHIE COMPARATIVE A HAUTE RESOLUTION DE LA VASCULATURE DE TUMEURS U87 ET NS142.....	105
FIGURE 53 : EFFET DE L'AVASTIN® ET DE L'ACTEMRA SUR LES CAPACITES INVASIVES DES NS142..	106
FIGURE 54 : EXPRESSION DE DPY19L1 ET KIF20A/MKLP2 DANS LES NEUROSPHERES.	107
FIGURE 55 : EXPRESSION DE DPY19L1 DANS LES NS142.	107
FIGURE 56 : EXPRESSION DE DPY19L1 DANS LE GBM EXPERIMENTAL CHEZ LA SOURIS..	108
FIGURE 57 : EXPRESSION DE DPY19L1 PAR DES CELLULES TUMORALES EXPRIMANT L'ASMA DANS LES TUMEURS NS..	109
FIGURE 58 : EXPRESSION DE MKLP2 DANS LES NEUROSPHERES.....	109
FIGURE 59 : EXPRESSION DE MKLP2 DANS LES NEUROSPHERES ADHERENTES.....	110
FIGURE 60 : RECRUTEMENT ET TRANSDIFFERENCIATION DES GSC EN PERICYTES DANS LE GBM.....	112
TABLEAU 1 : LISTE DES GENES, DONT L'EXPRESSION SEMBLE ENRICHIÉ DANS L'ENDOTHELIUM, ET ETANT SUREXPRIMÉS DANS AU MOINS DEUX CANCERS RICHEMENT VASCULARISÉS..	29
TABLEAU 2 : LES KINESINES HUMAINES DONT LA DEREGULATION EST IMPLIQUÉE DANS LE CANCER.	38
TABLEAU 3 : ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES DE L'EXPRESSION DE DPY19L1 DANS LE CANCER.....	42
TABLEAU 4 : LISTE DES ANTICORPS UTILISÉS EN IMMUNOHISTO-CYTOLOCHIMIE ET WESTERN BLOT	49
TABLEAU 5 : TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFÉRENTES AMORCES UTILISÉES	56
TABLEAU 6 : CONDITIONS DE MISE AU POINT DE L'HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	76

Liste des abréviations

(b)FGF:	(basic) Fibroblast Growth Factor
Ang-2:	Angiopoïétine-2
ARNm:	Acide Ribonucléique messenger
CAM :	Membrane chorio-allantoïdienne
CENP-E:	Centrosome-associated protein E
CPC:	Chromosome Passenger Complex
CSC/GSC:	Cellule Souche Cancéreuse/Glioma Stem Cell
DLG5:	Discs, large homolog 5
DPY19L1:	Dumpy 19 Like protein 1
EGF:	Epidermal Growth Factor
EPC:	Endothelial precursor cell
FSTL1:	Follistatine-like 1
GBM:	Glioblastome Multiforme

GFP:	Green fluorescent protein
hCMEC:	human Cardiac Microvascular Endothelial Cell
HIF-1 (ou 2):	Hypoxia-inducible factor 1 (ou 2)
HUAEC:	Human Umbilical Artery Endothelial Cell
HUVEC:	Human Umbilical Vascular Endothelial Cell
IDH1:	isocitrate déshydrogénase 1
INCENP:	Inner centromere protein antigens
LOH :	Loss of heterozigosity
MCAK:	Mitotic centromere-associated kinesin
miRNA :	micro RNA
MKlp2:	Mitotic Kinesin like protein 2
MMP:	matrix metalloproteinase
NF1:	Neurofibromine
NFκB:	Nuclear factor-kappa B
PDGF:	platelet-derived growth factor
PI3K:	Phosphoinositide 3-kinase
Plk1:	Polo-like kinase 1
PTEN:	Phosphatase and TENsin homolog
qPCR:	quantitative Polymerase Chain Reaction
RHGP:	Random Homozygous Gene Perturbation
RTK :	Récepteur tyrosine kinase
SDF1:	Stromal cell-derived factor 1
siRNA:	small-interfering RNA
SMC:	Smooth Muscle Cell
SSP :	Survie sans progression
SVF:	Sérum de Veau Foetal
TAM:	Tumor associated macrophage
TEM:	Tie2-expressing monocyte
TGFβ:	Transforming Growth Factor β
TMA :	Tissue Microarray
TMZ :	Temozolomide
TSP1:	Thrombospondine 1
VEGF:	Vascular endothelium growth facto
vWF :	Facteur von Willebrand
αSMA:	α Smooth Muscle Actin (actine α des muscles lisses)

I. Introduction

A. Glioblastome multiforme

1. Présentation

a) Description / généralités

Les glioblastomes multiformes (GBM) sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes avec le pronostic le plus défavorable. Le cerveau est constitué de deux types cellulaires principaux : les neurones et les cellules gliales qui leur servent de soutien. Le plus souvent, les tumeurs cérébrales se développent à partir des cellules gliales : les gliomes, dont les astrocytomes qui se forment à partir des cellules astrocytaires. L'OMS (organisation mondiale de la santé) classe les tumeurs cérébrales en quatre grades (I à IV) selon la densité cellulaire, l'atypie nucléaire, l'activité mitotique, la prolifération vasculaire et la nécrose (1). Ainsi les tumeurs de grade I sont souvent bénignes et curables par exérèse, les tumeurs de grade II sont des tumeurs de bas grade très infiltrantes. Les tumeurs de grades III et IV sont des tumeurs malignes de haut grade avec un pronostic défavorable. Les tumeurs de grade III sont caractérisées par une forte prolifération et une survie diminuée par rapport au grade II. Le GBM, ou astrocytome de grade IV, présente une croissance agressive et une composante angiogénique importante. Il est caractérisé par une forte invasion du cerveau, une atypie et un pléiomorphisme cellulaire, une forte activité mitotique, une thrombose et une prolifération vasculaire importante, la présence de nécrose tumorale (jusqu'à 80% de la masse tumorale) et une récurrence sous traitement (1, 2). Il représente 12 à 15% des tumeurs cérébrales et 60 à 75% des tumeurs astrocytaires (1). Chaque année, 2000 nouveaux cas sont diagnostiqués en France (GFME : Glioblastoma Fondation Michèle Esnault, 2013) avec un médiane de survie des patients traités de 12 à 15 mois. On note une légère prévalence masculine avec une tranche d'âge sensible entre 45 et 75 ans, des cas de glioblastomes pédiatriques et du jeune adulte sont également diagnostiqués. Le GBM se développe dans la matière blanche subcorticale au niveau des hémisphères cérébraux (Figure 1B). Il affecte principalement le lobe temporal, pariétal, frontal et plus rarement le lobe occipital (Figure 1A). La localisation fronto-temporale est particulièrement typique de ce type de tumeur. Les GBM sont des tumeurs qui se développent de façon unilatérale, mais étant très infiltrants, ils envahissent souvent l'hémisphère controlatéral via le corps calleux.

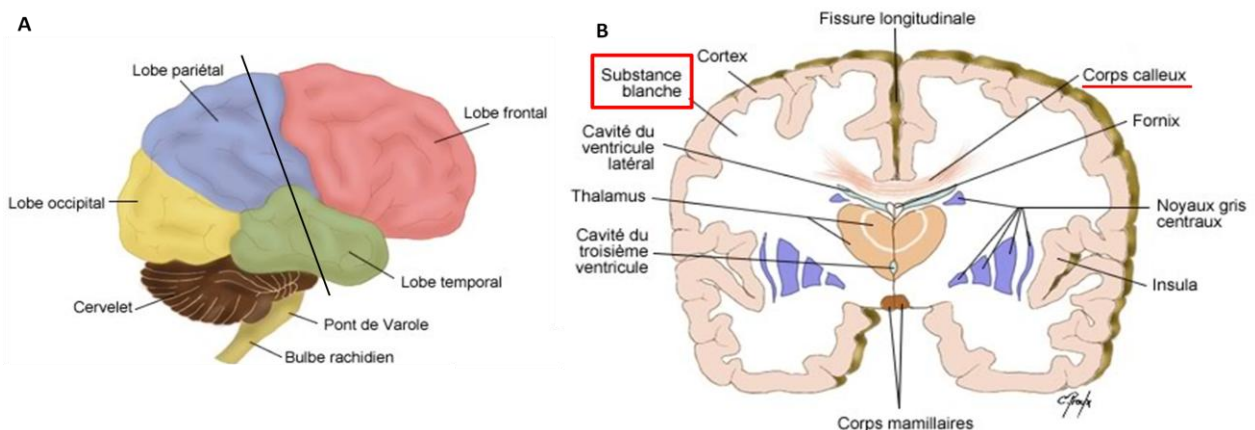


Figure 1 : Structure du cerveau humain (Production Chantal PROULX). A. Représentation des lobes du cerveau, le GBM peut se développer dans l'un des quatre lobes du cerveau et de façon très rare dans le cervelet. La ligne noire représente la coupe sagittale permettant d'obtenir la représentation de la structure interne du cerveau en B. La substance blanche (encadrée en rouge) est le lieu de développement principal des GBM. La tumeur peut envahir l'hémisphère controlatéral par le corps calleux (souligné en rouge).

b) Caractéristiques cliniques

Les symptômes présentés par les patients atteints de GBM sont très variables, ils dépendent notamment du siège de la tumeur et de son évolution. Les signes neurologiques sont généralement des maux de tête, des nausées, des vomissements qui traduisent une hyperpression intracrânienne. Des troubles visuels, des changements dans le comportement, des incohérences, une fatigue et un tempérament dépressif sont également constatés (GFME : Glioblastoma Fondation Michèle Esnault, 2013).

En cas de suspicion de pathologie cérébrale, une Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) cérébrale est réalisée et permet de localiser l'emplacement de la tumeur. L'aspect radiologique est évocateur, avec une lésion infiltrant le parenchyme cérébral associée à une prise de contraste hétérogène et des zones de nécrose. Les images obtenues par IRM permettent d'apporter des preuves au diagnostic mais il ne peut être clairement établi que par une biopsie permettant l'examen des tissus de la tumeur.

c) Anomalies génétiques

La plupart des GBM se développent *de novo*, sans qu'aucune lésion maligne ne soit détectée au préalable. On considère qu'au moment du diagnostic, basé sur des symptômes fonctionnels puis une imagerie et une anatomopathologie sur biopsie, la tumeur est âgée de 3 mois en moyenne. Ces tumeurs sont appelées GBM primaires et présentent de multiples anomalies génétiques comme l'amplification/surexpression du gène de l'EGFR ou la délétion du suppresseur de tumeur, PTEN (Figure 2 et Figure 3). Certains GBM, dits secondaires, sont issus de l'évolution d'astrocytomes de grades inférieurs (grade II ou III) et se développent de façon plus lente que les GBM primaires (5 à 10 ans). Histologiquement les GBM primaires et secondaires ne peuvent être distingués, mais ils diffèrent au niveau des anomalies génétiques et épigénétiques (Figure 3). Le GBM secondaire est notamment caractérisé par la mutation du gène IDH1 (isocitrate déshydrogénase 1) détectée d'abord dans les astrocytomes de bas grade (3) suivie de la perte d'hétérozygotie (LOH, loss of heterozygosity) du gène TP53.

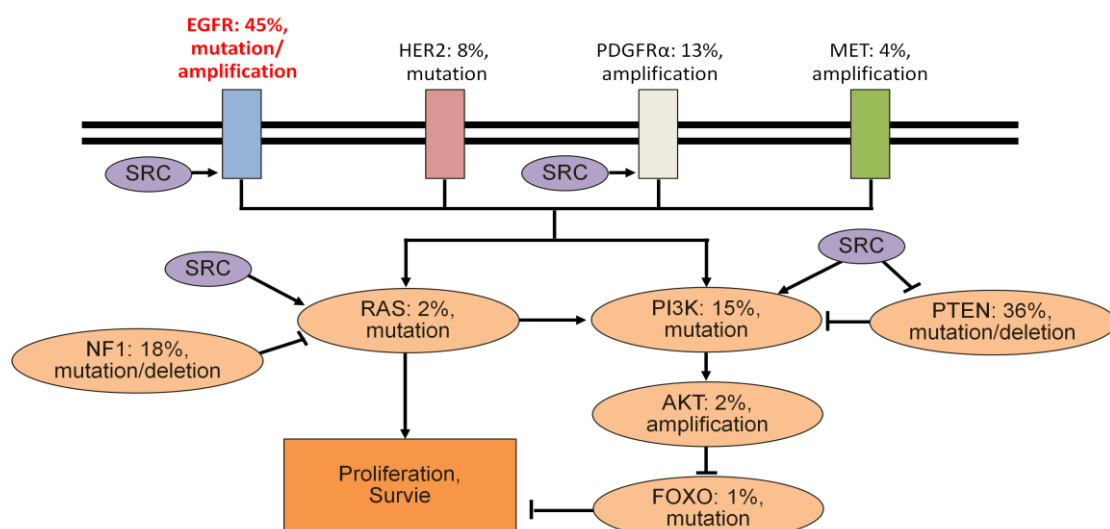


Figure 2 : Schématisation des anomalies génétiques de la voie RTK/RAS/PI3K. Les anomalies génétiques touchant les RTK et la voie de signalisation PI3K sont présentes chez 88% des patients. Les fréquences et le type d'altération sont indiqués en dessous de chaque gène.

De nombreuses anomalies moléculaires ont été recensées dans le GBM (4-6). Elles sont impliquées dans le cycle cellulaire, la prolifération, la résistance à l'apoptose, l'invasion et l'angiogenèse. Les voies de signalisation majoritairement affectées ont été identifiées et sont étudiées comme cibles thérapeutiques potentielles. Ainsi l'anomalie la plus courante est l'amplification/mutation du gène de l'EGFR (45% des GBM), souvent couplée à la délétion/inactivation de PTEN, ce qui conduit notamment à une dérégulation de la voie PI3K entraînant une augmentation de la prolifération, de l'invasion et de la résistance à l'apoptose des cellules tumorales (Figure 2)(1, 2, 7). Le suppresseur de tumeur TP53 régule le cycle cellulaire, la machinerie de réparation de l'ADN suite à des dommages, la différenciation et la mort cellulaire ainsi que la néovascularisation (8). Sa délétion entraîne la dérégulation de ces voies et est associée à la tumorigenèse de nombreux types de cancers.

Ces anomalies génétiques multiples, caractéristiques des GBM, ont permis de différencier des sous-types de tumeurs, présentant une histologie, un pronostic et une réponse aux traitements différents, par analyses transcriptomiques (9). Ainsi on distingue les sous-types proneuraux, neuraux, mésenchymateux et classiques (Figure 3). Les GBM classiques présentent une amplification du chromosome 7, des délétions du chromosome 10 et sont caractérisés par la forte expression des marqueurs des cellules souches et des précurseurs neuronaux. Les autres classes se différencient par l'expression des marqueurs mésenchymateux, neuraux ou proneuraux. Les GBM mésenchymateux présentent des mutations au niveau des gènes NF1 et PTEN et expriment fortement les gènes de la voie NFκB. Le groupe des GBM proneuraux est caractérisé par la mutation des gènes TP53 et IDH1 et comprend principalement des GBM secondaires. Les GBM neuraux, quant à eux, ne possèdent aucune altération génétique caractéristique permettant de les différencier des autres classes. Les GBM proneuraux ont un meilleur pronostic que les autres types, probablement parce qu'ils présentent moins de dérégulation de l'expression des gènes pro-prolifératifs que les autres classes. Les tumeurs exprimant les marqueurs mésenchymateux sont les plus agressives, présentant un phénotype très invasif et très angiogénique, et ont le plus mauvais pronostic en terme de survie (10). Le GBM représente un ensemble de tumeurs hétérogènes tant sur le plan génétique que cellulaire et cette hétérogénéité est aussi présente au sein d'une même tumeur (11). Ainsi une tumeur peut présenter les caractéristiques génétiques de différents sous-groupes, rendant le pronostic et le traitement plus délicats à mettre en place.

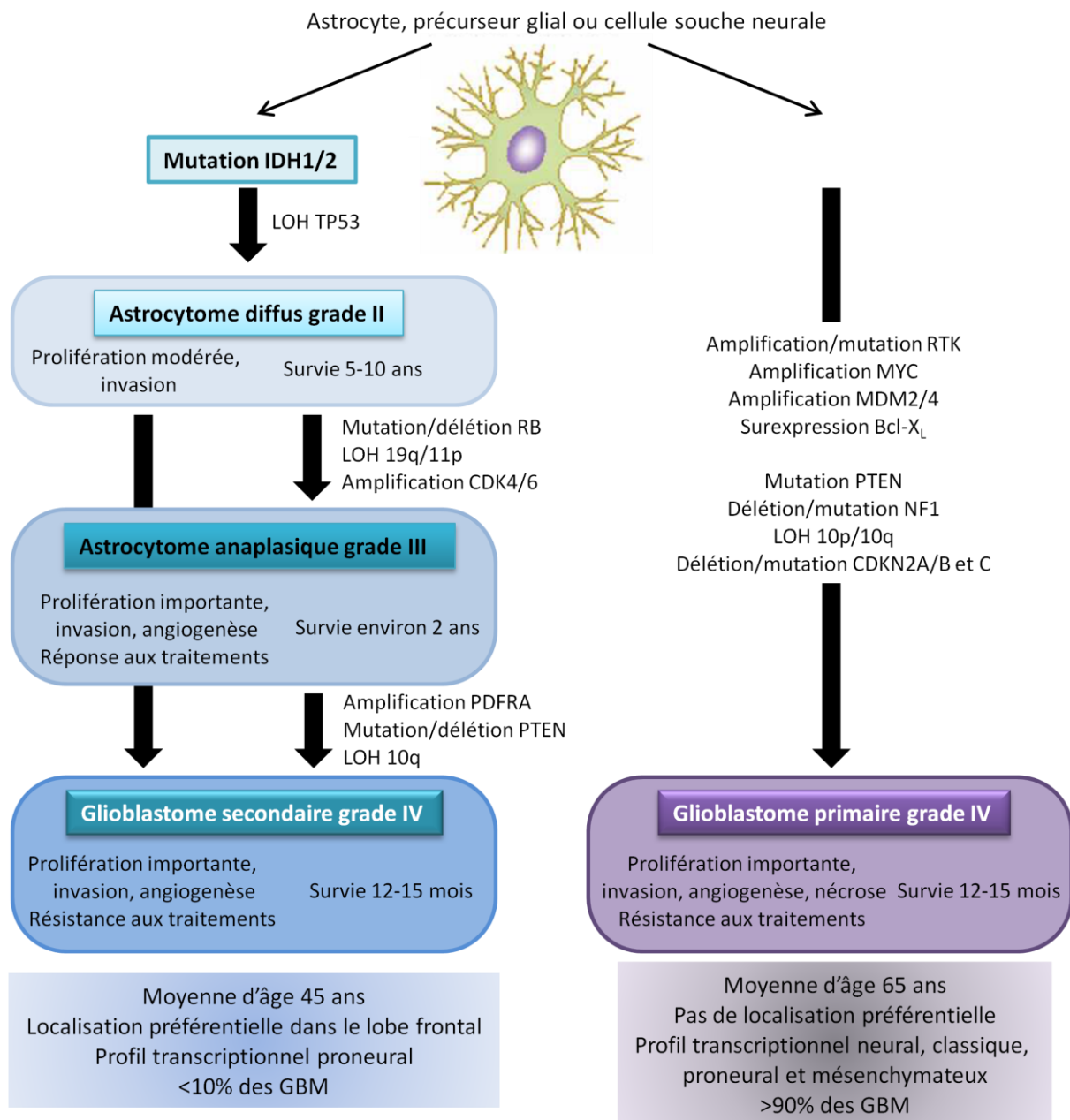


Figure 3 : Les bases génétiques du développement des GBM primaires et secondaires. Les GBM primaires se développent *de novo*, sans aucun signe clinique de lésion précédente. Ces GBM représentent la majorité des GBM totaux et se développent chez des patients plus âgés que les GBM secondaires. Les GBM secondaires se développent à partir d'un gliome de bas grade présentant généralement une mutation du gène IDH1. La progression vers le GBM secondaire est relativement lente, 5-10 ans en moyenne. Ces GBM sont peu fréquents (<10%) comparé aux GBM totaux. Les patients présentant un GBM ont une médiane de survie de 12 à 15 mois, que le GBM soit primaire ou secondaire. Les mécanismes génétiques mis en place dans le développement des GBM primaires et secondaires sont relativement différents, les secondaires présentent une mutation d'IDH1 suivie d'une inactivation de la voie p53 et d'une amplification de PDGFR, alors que la plupart des GBM primaires ont une activation d'EGFR. Ces deux types de tumeurs partagent néanmoins quelques lésions génétiques, telles que la délétion du chromosome 10 conduisant à l'inactivation de PTEN. RTK = récepteur tyrosine kinase comprenant EGFR/PDGFR/c-MET, LOH = perte d'hétérozygotie.

2. Vascularisation des GBM

Le GBM est l'une des tumeurs solides humaines les plus vascularisées, il est caractérisé par une vascularisation non seulement surabondante, associée à la présence de nombreuses micro-proliférations capillaires, mais également anormale en terme de structure, organisation et perméabilité des vaisseaux. La néo-vascularisation des tumeurs cérébrales est directement corrélée avec leur agressivité, leur degré de malignité et la récurrence suite à l'exérèse de la tumeur (1). Les cellules tumorales ont besoin des vaisseaux afin de leur apporter les nutriments et l'oxygène nécessaire à leur croissance. La vascularisation est donc une composante clé du développement tumoral. Longtemps, l'angiogenèse a été considérée comme le seul mécanisme permettant la vascularisation des tumeurs solides. En effet, les tumeurs implantées dans des organes isolés et perfusés, sans vaisseaux sanguins, ont une croissance ralentie et ne font pas plus de quelques millimètres de diamètre (12, 13). Ces mêmes tumeurs réimplantées chez la souris ou dans un organe vascularisé se développent rapidement en devenant richement vascularisées. Le concept de la « dépendance angiogénique des tumeurs solides » a conduit au développement de nombreux traitements anti-angiogéniques dans la lutte contre le cancer. Mais les mécanismes d'adaptation et de récurrence mis en place par la tumeur, notamment le GBM, ont mis en lumière d'autres mécanismes de vascularisation participant au développement tumoral. Chacun de ces mécanismes va être détaillé, en commençant par l'angiogenèse qui est le mode principal de vascularisation des GBM avant leur prise en charge thérapeutique.

a) L'angiogenèse tumorale

C'est le processus majeur de vascularisation du GBM (Figure 5A), c'est pourquoi il est très étudié et est la cible de nombreuses thérapies anti-tumorales. L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus physiologique qui accompagne le développement embryonnaire (et fœtal). Il est induit par l'hypoxie tissulaire et permet le remaniement du réseau de capillaires préexistant par bourgeonnement de néovaisseaux. Chez l'adulte la majorité du réseau vasculaire est quiescent et l'angiogenèse est restreinte à la cicatrisation, à la métamorphose cyclique de l'utérus et des ovaires et au développement placentaire chez les mammifères. L'angiogenèse est un processus très contrôlé par une régulation fine de l'expression des gènes impliqués, assurant la formation d'un réseau vasculaire optimal pour assumer l'irrigation de l'ensemble des organes en cours de développement. Chez l'adulte, la quiescence angiogénique est contrôlée par une balance favorable entre signaux pro- et anti-angiogéniques. Un déséquilibre entre ces facteurs à la suite d'altérations environnementales (hypoxie, inflammation) et/ou génétiques (mutations dans les cellules tumorales) peut déclencher l'angiogenèse : c'est le switch angiogénique (Figure 4A). Dans le contexte tumoral comme au cours du développement, le modulateur principal de l'angiogenèse est le VEGF-A (vascular endothelial growth factor désigné comme VEGF dans cette étude).

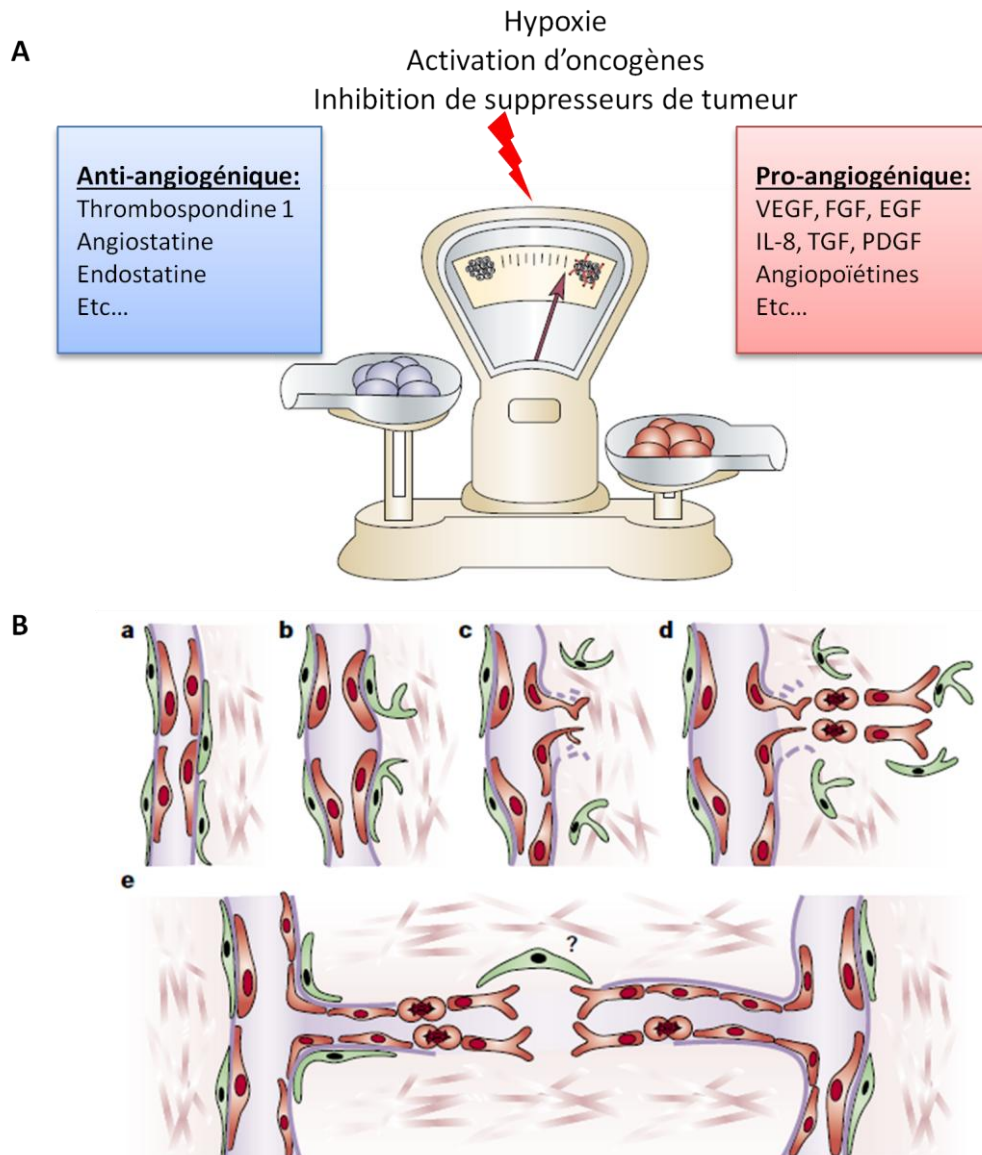


Figure 4 : Mécanismes de l'angiogenèse tumorale dans le GBM (modifié d'après (14)). A. Switch angiogénique déclenché par la rupture de l'équilibre entre les signaux anti-angiogéniques et pro-angiogéniques. La rupture de l'équilibre peut être induite par des modifications dans l'environnement tumoral, comme l'hypoxie, ou par des anomalies génétiques comme l'activation d'oncogènes ou l'inactivation des suppresseurs de tumeurs. B. Les vaisseaux sanguins se développent à partir de vaisseaux préexistants (a), les péricytes (en vert) se détachent (b) et la membrane basale (en violet) est dégradée (c) ce qui permet aux cellules endothéliales (en rouge) de migrer dans l'espace périvasculaire vers le stimulus angiogénique. Elles prolifèrent (d) et migrent sous forme de corde, sans doute guidées par les péricytes. Dans la colonne de migration (e) les cellules endothéliales forment des jonctions intercellulaires permettant la création du lumen du néo-vaisseau ainsi que la reformation de la membrane basale et de la couverture péricytaire dans le cadre de l'angiogenèse physiologique. Dans le cadre de l'angiogenèse tumorale, la couverture péricytaire n'est que partielle car la maturation est incomplète du fait des signaux pro-angiogéniques constants.

Ainsi, la voie majeure d'induction de l'angiogenèse physiologique peut être activée par les cellules tumorales, instables génétiquement et sécrétant du VEGF, en réponse à une hypoxie locale (Figure 4A)(14). L'acteur principal de l'hypoxie est le facteur de transcription HIF-1 dont la sous-unité HIF-1 α n'est plus dégradée en condition hypoxique. En réponse à l'hypoxie, HIF-1 induit la transcription de nombreux facteurs, dont le VEGF, par les cellules tumorales qui vont stimuler l'angiogenèse de façon comparable aux cellules embryonnaires (15). Le VEGF se fixe sur son récepteur exprimé par les cellules endothéliales (VEGFR1/2) induisant ainsi le bourgeonnement

(sprouting) à partir des vaisseaux préexistants (Figure 4Ba-c)(14-16). L'Angiopoïétine-2 entraîne la déstabilisation des vaisseaux en supprimant les liaisons entre les cellules endothéliales et les cellules murales ainsi qu'entre les cellules endothéliales elles-mêmes (16, 17). Le VEGF induit la vasodilatation des vaisseaux ainsi que leur perméabilisation permettant ainsi l'extravasation de protéines plasmatiques qui vont créer un environnement favorable pour la migration des cellules endothéliales (Figure 4Bd). Les cellules activées prolifèrent et migrent le long du gradient de VEGF vers la zone hypoxique et forment de nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 4Be). Le VEGF est aussi responsable de la micro-prolifération vasculaire formant les structures gloméruloïdes typiques du GBM (15). Lors de l'angiogenèse physiologique les vaisseaux néoformés sont stabilisés par le recrutement de cellules murales qui vont les stabiliser et stopper leur prolifération en rétablissant l'équilibre entre les signaux pro et anti-angiogéniques (Figure 4Be). Dans l'angiogenèse tumorale, les cellules endothéliales sont constamment activées par la surexpression des facteurs pro-angiogéniques empêchant ainsi la stabilisation du réseau vasculaire (14, 18-20). C'est la raison pour laquelle le GBM est constitué de vaisseaux anormaux : tortueux, irréguliers, avec une perméabilité accrue. Les cellules endothéliales expriment plus fortement les protéines de surface qui stimulent leur adhésion à la matrice extracellulaire et leur migration, comme les intégrines, et expriment plus faiblement les molécules impliquées dans les jonctions cellulaires, comme la VE-cadhérine. Les jonctions inter-endothéliales sont déstructurées et la membrane basale discontinue ou absente conduisant à des hémorragies locales et à une augmentation de la perméabilité vasculaire (21, 22). Les cellules endothéliales anormales peuvent se détacher de la membrane basale et se chevaucher. D'autres meurent, laissant un vide dans le mur vasculaire et créant ainsi des fenestrations endothéliales permettant aux cellules tumorales de s'intercaler et de former des vaisseaux « mosaïques ». L'activation des cellules murales, associée à l'altération fonctionnelle des cellules endothéliales, induite par l'environnement pro-angiogénique de la tumeur, entraîne leur perte d'adhésion avec les cellules endothéliales et donc une couverture péricytaire incomplète (23). Cette organisation structurale est caractéristique d'un réseau vasculaire anarchique, composé d'embranchements aléatoires de capillaires et de gros vaisseaux perméables et hémorragiques, présentant des malformations (24). L'écoulement du flux sanguin est donc chaotique et discontinu et rend la vascularisation des tumeurs très hétérogène créant des zones hypoxiques responsables de la surexpression de facteurs pro-angiogéniques.

Récemment, il a été montré que les cellules de GBM ont le potentiel d'assurer leur développement indépendamment de l'angiogenèse par quatre modes alternatifs : co-option vasculaire, vasculogenèse, mimétisme vasculaire et transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales et/ou murale (Figure 5)(16). Ces différents modes de vascularisation peuvent coexister dans différents micro-domaines d'une même tumeur ou être mis en place successivement au cours du développement tumoral. L'hypoxie, créée par le développement rapide du GBM, joue un rôle important dans la vascularisation tumorale et pourrait induire le déclenchement d'un ou plusieurs des cinq mécanismes en exerçant une pression de sélection sur les cellules tumorales dont l'expression génique est favorable à ces processus.

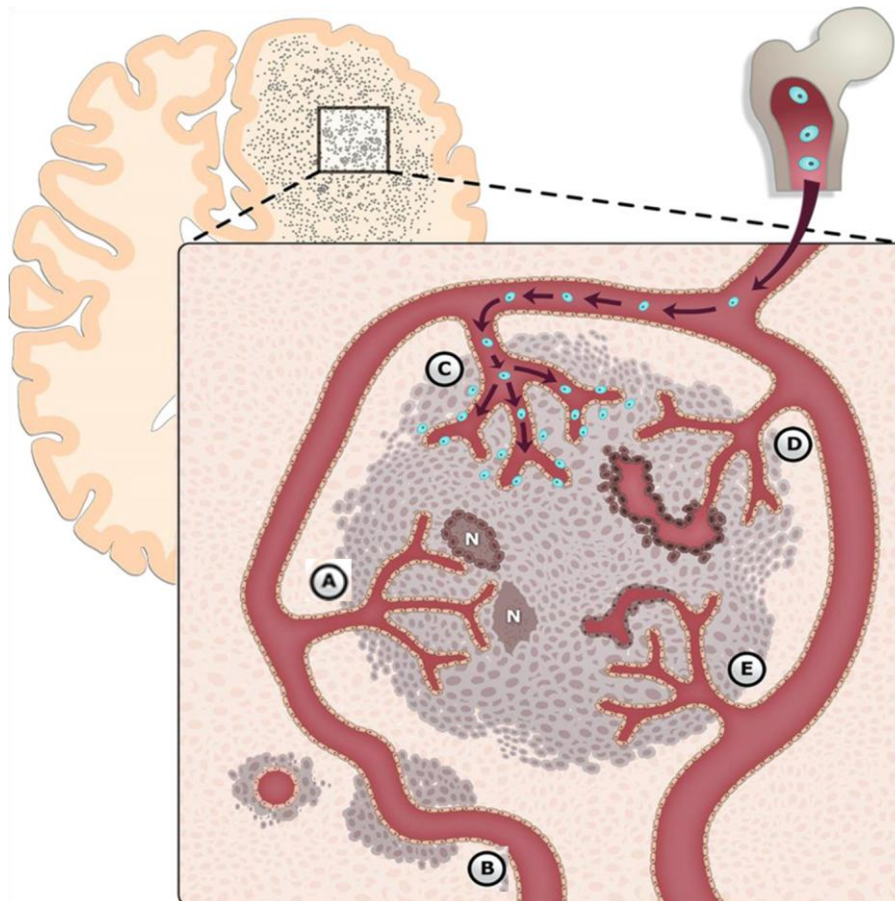


Figure 5 : Synthèse des différents modes de vascularisation du GBM (modifié d'après (16)). La vascularisation du GBM est un processus très contrôlé dirigé par 5 mécanismes différents. **A.** L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants par sprouting (bourgeonnement). **B.** La co-option vasculaire qui correspond à la formation de cuffs (manchons) de cellules tumorales autour des vaisseaux préexistants. **C.** La vasculogenèse est le recrutement des cellules dérivées de la moelle osseuse (en bleu) afin de les incorporer dans l'endothélium où elles se différencieront en cellules endothéliales. **D.** Le mimétisme vasculaire est la capacité des cellules tumorales à s'organiser en structure vasculaire fonctionnelle. **E.** La transdifférenciation de cellules tumorales en cellules endothéliales. Tous ces mécanismes sont interconnectés et sont activés par l'hypoxie. La perturbation d'une de ces voies altère le réseau vasculaire dans son ensemble. N = nécrose.

b) La co-option vasculaire

Lorsqu'elles sont capables de migrer le long des capillaires sanguins, les cellules tumorales peuvent proliférer et envahir le tissu sain, formant une masse dont le réseau vasculaire est par conséquent celui du tissu envahi, sans recours à l'angiogenèse : c'est la co-option vasculaire (Figure 5B). L'équipe de Nagano a observé que des cellules d'astrocytomes (cellules C6), implantées en intracérébral chez le rat, ont la capacité de migrer à travers le tissu sain vers les vaisseaux et d'interagir avec le mur vasculaire (25). Ce processus a également été observé par l'équipe de Zagzag et Holash qui a montré que, dans les modèles de gliome murin (GL261) et de rat (C6), la première étape d'expansion tumorale est de type co-optif (17, 26). Les auteurs ont en effet observé que les petites tumeurs (<1mm de diamètre) sont parfaitement vascularisées mais ne montrent aucun signe d'angiogenèse. Les vaisseaux tumoraux sont identiques aux vaisseaux cérébraux, en terme de taille et de diamètre, et ne présentent aucun bourgeonnement vasculaire, caractéristique du processus angiogénique (26). Suite à leur implantation chez l'animal, les cellules tumorales se regroupent autour des vaisseaux cérébraux préexistants et prolifèrent pour former des « cuffs » (Figure 6, les trois premières images). Les vaisseaux cooptés expriment un fort taux d'Angiopoïétine-2 (Ang-2) qui,

en se fixant sur son récepteur Tie2, entraîne le détachement des cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses vasculaires ou vSMC) et déstabilise les jonctions entre les cellules endothéliales assurant le maintien de la structure vasculaire. La déstabilisation des vaisseaux entraîne leur régression, par apoptose des cellules endothéliales, ainsi que la nécrose des cellules tumorales adjacentes, par manque de nutriments (Figure 6, avant dernière image) (17, 26). L'hypoxie ainsi induite dans la masse tumorale entraîne l'expression de facteurs pro-angiogéniques, dont le VEGF, et déclenche ainsi l'angiogenèse en bordure de tumeur (Figure 6, image de droite) (16, 17). L'expression d'Ang-2 est détectée très précocement lors du développement tumoral, uniquement dans les vaisseaux co-optés, et perdue lors de l'expansion tumorale dans les vaisseaux restant dans le cœur de la tumeur et aussi dans ceux en périphérie qui sont angiogéniques. Ainsi l'action déstabilisatrice de l'Ang-2 sur les vaisseaux faciliterait l'angiogenèse sur le bord de la tumeur en présence de VEGF.

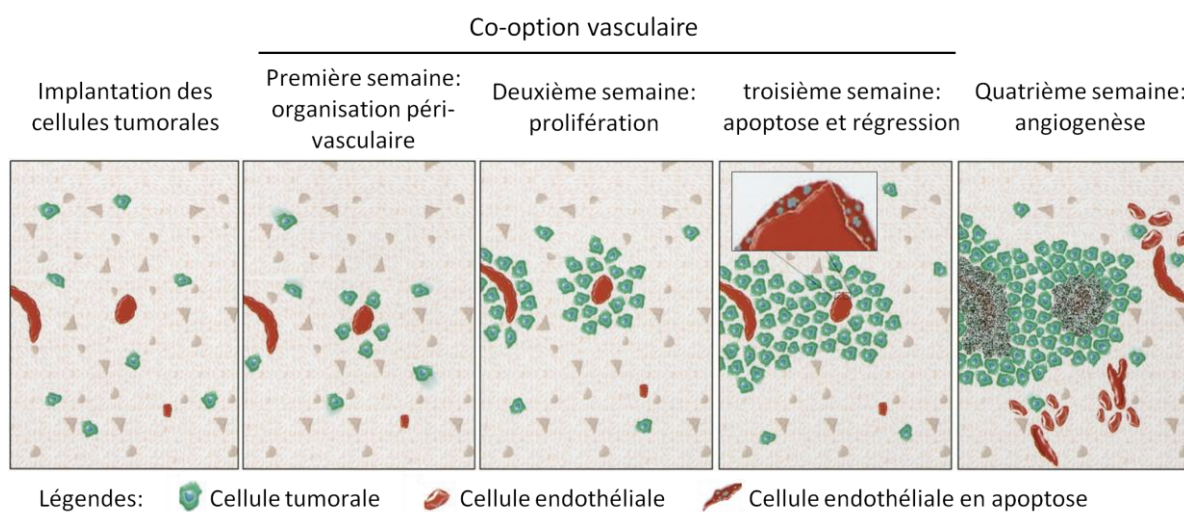


Figure 6 : Schématisation de la co-option vasculaire expérimentale (modifié d'après (17)). Les cellules tumorales (GL261, gliome murin) ont été implantées en intracérébral chez la souris. Lors de la première semaine suivant l'implantation, les cellules tumorales se regroupent autour des vaisseaux sanguins préexistants afin d'obtenir les nutriments nécessaires à leur prolifération, observée la semaine suivante. Les cellules tumorales co-optent les vaisseaux afin de permettre la croissance tumorale. Lors de la troisième semaine suivant l'implantation, les cellules tumorales induisent la régression des vaisseaux co-optés en induisant l'apoptose des cellules endothéliales. La régression des vaisseaux entraîne la nécrose des cellules tumorales dans le cœur de la tumeur (ici en gris), créant une zone hypoxique qui va induire la production de VEGF et stimuler l'angiogenèse en bord de tumeur.

La co-option vasculaire est également observée dans d'autres modèles tumoraux. Par exemple, l'implantation de cellules de carcinome en intracérébral chez le rat, ou encore l'injection de cellules de carcinome pulmonaire de Lewis en intraveineux chez la souris, induit respectivement le développement de tumeurs cérébrales ou de métastases dans le poumon, fortement associées aux vaisseaux du tissu envahi. Ces vaisseaux expriment tous un fort taux d'Ang-2, qui est absente des vaisseaux non tumoraux, signifiant que le développement tumoral et métastatique se fait de manière co-optive (26). Une étude réalisée sur le poisson zèbre montre que l'injection de 20-30 cellules tumorales dans une zone peu vascularisée, à la surface de la membrane péricardique, induit la migration vers l'aorte ventrale et sa co-option (27). Cette étude montre aussi que l'induction de l'angiogenèse et de la co-option par la tumeur dépend du nombre de cellules, car l'implantation de 200-300 cellules dans une zone peu vascularisée induit le processus angiogénique et non la co-option, mais aussi de l'environnement. En effet, si les cellules sont implantées dans le sac vitellin,

très vascularisé, les cellules tumorales forment une petite tumeur avasculaire qui induira l'angiogenèse après 3 jours de développement (27).

L'équipe de Zagzag a réalisé des hybridations in situ sur des coupes de GBM de patients et a observé que l'ARNm Ang-2 est exprimé par les vaisseaux sanguins dans la tumeur mais pas dans le cerveau sain (28). L'expression d'Ang-2 est observée dans les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux mais aussi des vaisseaux n'ayant subi aucun changement hyperplasique, suggérant un rôle très précoce dans l'initiation de l'angiogenèse. Ang-2 est également détecté dans des vaisseaux cérébraux entourés de cellules tumorales, au niveau du front invasif et dans des vaisseaux partiellement sclérosés. Ce profil d'expression suggère que ces vaisseaux sont des vaisseaux co-optés comme ceux observés dans les modèles animaux, C6 et GL261 (17, 25, 26). Ainsi, chez les patients, la co-option pourrait coexister avec des zones très angiogéniques au sein d'une même tumeur, participant ainsi à l'hétérogénéité intra-tumorale caractéristique du GBM (28).

c) La vasculogenèse

La vasculogenèse est le recrutement et la différenciation de cellules circulantes issues de la moelle osseuse en cellules endothéliales (Figure 5C, Figure 7). Elle a été mise en évidence par l'équipe de Lyden suite à l'implantation de cellules tumorales chez des souris mutées incapables de faire de la néoangiogenèse (29). Les auteurs ont montré que le recrutement des cellules de la moelle osseuse permet la néovascolarisation précoce des tumeurs et restaure la néoangiogenèse chez les souris mutées. L'équipe de Zagzag a montré que des cellules isolées de la moelle osseuse et exprimant la GFP, ayant été injectées chez la souris implantée avec les cellules de gliome U87, constituent environ 18% de l'ensemble des vaisseaux tumoraux (16). Parmi les cellules circulantes se trouvent des précurseurs de cellules endothéliales (EPC) et des macrophages (TAM : tumor associated macrophage et TEM : Tie2-expressing monocyte). Les macrophages vont soit se différencier en cellules endothéliales, soit entrer dans la tumeur et stimuler l'angiogenèse. La vasculogenèse est dépendante des voies de signalisation du VEGF et d'Ang-2/Tie2, ainsi que de la voie SDF1/CXCR4 (16). SDF1 et ANG-2 permettent le recrutement des EPC et des macrophages qui expriment leur récepteur : CXCR4 (EPC et TAM) et Tie2 (EPC et TEM) respectivement. Le VEGF participe à la migration et la différenciation des EPC qui expriment à la fois des marqueurs de cellules souches (CD133) et des marqueurs de cellules endothéliales comme le VEGFR2 et CD31. L'hypoxie et les cellules souches tumorales ont un rôle important dans ce processus. L'hypoxie permet l'expression du VEGF et la surexpression de Tie2 ainsi que la régulation de la voie SDF1/CXCR4. Les cellules souches tumorales expriment un fort taux de VEGF et de SDF1 permettant l'augmentation de l'activation des cellules endothéliales et le recrutement des EPC.

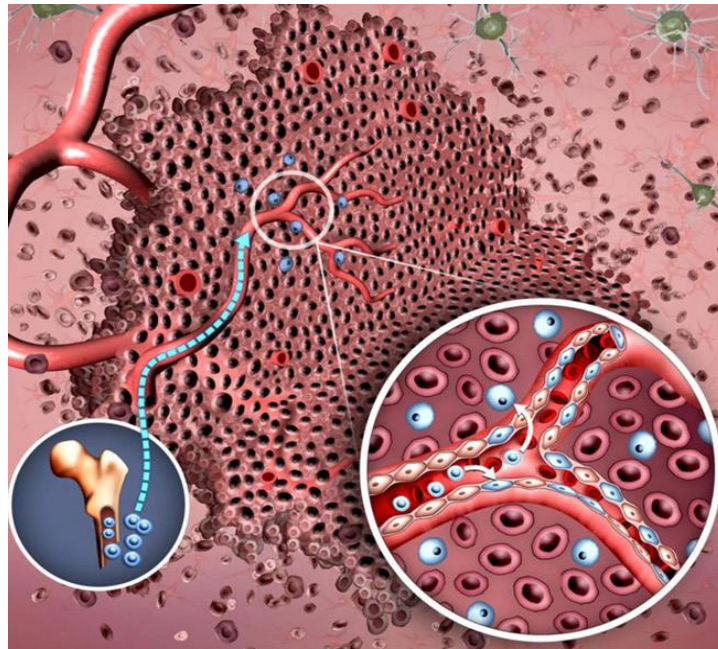


Figure 7 : Représentation de la vasculogénèse (16). C'est la mobilisation, la différenciation et le recrutement des cellules circulantes issues de la moelle osseuse (en bleu) dans le mur vasculaire. Ce processus est induit par l'hypoxie dans le GBM et dépend du VEGF, d'Ang-2/Tie-2 et de SDF1/CXCR4. Certaines cellules de la moelle ne sont pas incluses dans le mur vasculaire mais peuvent entrer dans la tumeur et se différencier en TAM qui vont stimuler l'angiogénèse (agrandissement à droite).

Le rôle de la vasculogénèse dans la vascularisation des GBM est controversé, certaines études montrent qu'elle n'a qu'un rôle mineur lors du développement tumoral (30) mais qu'elle participe plutôt à la récurrence de la tumeur suite aux traitements (31, 32).

d) Le mimétisme vasculaire et la transdifférenciation

Le mimétisme vasculaire et la transdifférenciation sont des processus de vascularisation récemment décrits (33-38) et encore controversés dans le GBM (39) (Figure 5D et E). L'hypothèse de ces deux mécanismes provient du mélanome dans lequel des vaisseaux composés de cellules tumorales ont été observés (16). Le mimétisme vasculaire est la création de structures vasculaires fonctionnelles par les cellules tumorales (Figure 8A). La transdifférenciation des cellules tumorales en cellules type endothélial est la capacité des cellules tumorales à exprimer des marqueurs endothéliaux suite à leur incorporation dans le mur vasculaire (Figure 8B). Lors de ma première année de thèse, plusieurs études démontrant la participation de ce mécanisme dans la vascularisation des GBM ont été publiées (33-36). L'équipe de Wang a mis en évidence, par analyses quantitatives (FACS) et immunohistochimiques sur des biopsies de patients, que certaines cellules expriment à la fois des anomalies typiques des cellules tumorales (amplification de l'EGFR) et des marqueurs endothéliaux (CD31, vWF) chez les patients (35). L'équipe de Soda a réalisé des expériences d'implantation de cellules tumorales (GBM) murines ou humaines exprimant la GFP chez la souris afin d'étudier la transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales. Ils ont observé la présence de vaisseaux fonctionnels composés de cellules exprimant à la fois la GFP et le marqueur cd31 (36) signe que certaines cellules tumorales se sont transdifférenciées en cellules endothéliales. Ils ont également observé des cellules exprimant à la fois une anomalie du gène EGFR et le facteur vWF (facteur von-Willebrand), signe de transdifférenciation endothéliale chez les

patients corroborant le fait que les cellules tumorales peuvent participer à la vascularisation tumorale.

Il a également été montré que les cellules souches de GBM (GSC) isolées à partir des biopsies de patients sont capables d'exprimer des marqueurs endothéliaux quand elles sont cultivées en présence de VEGF(35, 40). Ainsi les GSC semblent avoir un rôle important dans le mimétisme vasculaire et la transdifférenciation en cellules endothéliales/murales. La mise en évidence de la participation des GSC à la vascularisation du GBM sera détaillée plus loin, dans un chapitre consacré aux cellules souches (I.A.4).

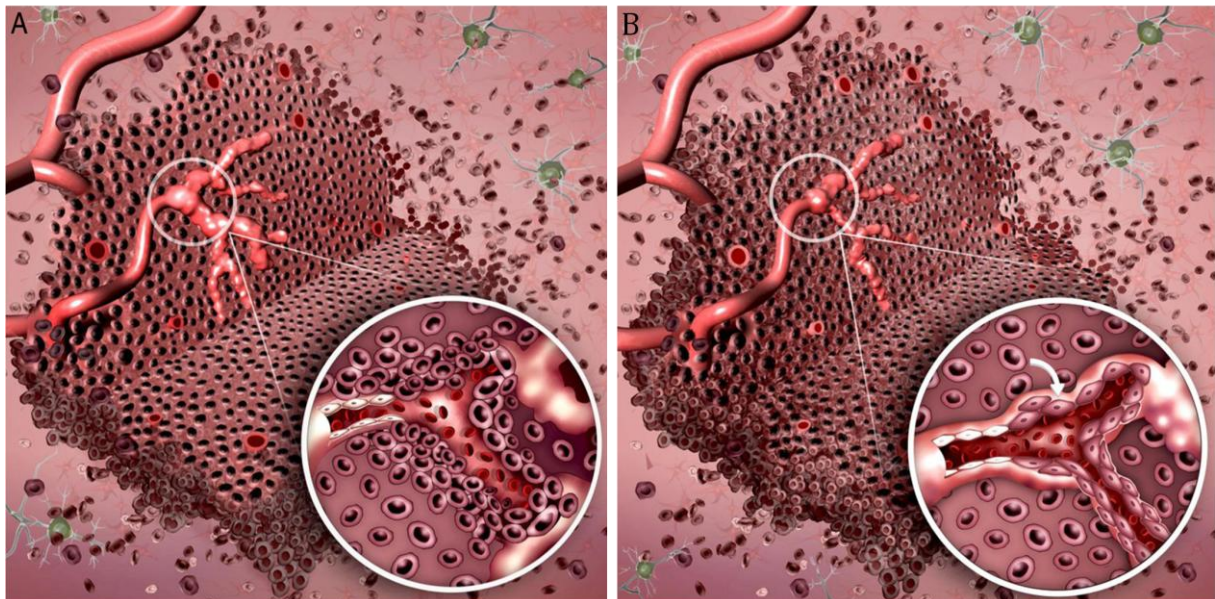


Figure 8 : Mimétisme vasculaire et transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales (16). A. Mimétisme vasculaire impliquant la formation de structures vasculaires fonctionnelles (emplies d'hématies). B. La transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales correspond à l'incorporation de cellules tumorales dans le mur vasculaire et à leur capacité à exprimer des marqueurs endothéliaux.

L'hypoxie augmente de façon importante les vaisseaux formés à partir de cellules tumorales et serait donc l'un des facteurs induisant la transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales (36). Les anti-angiogéniques induisant une hypoxie intratumorale, l'hypothèse émise par ces études, et que nous avons étudiée, est que ces deux mécanismes de vascularisation pourraient être impliqués dans la résistance/récurrence du GBM.

3. Adaptation aux traitements anti-angiogéniques et récurrence

a) Traitement du Glioblastome

Le GBM est l'une des tumeurs solides les plus vascularisées, avec une composante néoangiogénique importante et une forte expression de VEGF par les cellules tumorales. La vascularisation étant liée à la malignité de la tumeur, à son agressivité et à son pronostic, de nombreuses thérapies anti-angiogéniques ont été développées, la principale étant le Bevacizumab ou Avastin® (anticorps humanisé anti VEGF, Roche/Genentech). Malgré le manque de résultats clairs concernant un effet anti-tumoral réel sur le GBM et les effets secondaires dont il est responsable (Annexe 3, (41)), l'Avastin® a bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché accélérée aux USA dans le traitement du GBM récidivant (42). En France, il est également utilisé en 2^{ème} ligne lorsque les

paramètres cliniques sont compatibles avec ce traitement. Au Japon, en juin 2013, l'Avastin® a été homologué pour le traitement du GBM de diagnostic récent en combinaison avec la radio et la chimiothérapie ainsi qu'en monothérapie suite à la récurrence du GBM et pour certains gliomes de haut grade (<http://www.roche.com/med-cor-2013-06-17-f.pdf>).

Actuellement le traitement des GBM se fait par exérèse de la tumeur, quand c'est possible, suivi de radiothérapie et de chimiothérapie concomitante, ou en tant qu'adjuvant, au Temozolomide (agent alkylant de l'ADN, TMZ): c'est le protocole de Stupp (43). Malgré ce traitement, la tumeur récidive systématiquement et les patients qui peuvent le supporter reçoivent des cures d'Avastin® en monothérapie ou couplées à de la chimiothérapie conventionnelle (42). L'Avastin® permet une amélioration de la qualité de vie des patients en diminuant l'œdème péri-tumoral, réduisant ainsi la pression intra-tumorale, sans toutefois amener un réel bénéfice sur la médiane de survie (42, 44-50). En effet, l'inhibition du VEGF entraîne la diminution de la perméabilité vasculaire ainsi qu'une diminution de la densité vasculaire et du flux sanguin (51), ce qui ralentit la croissance tumorale. Mais la tumeur s'adapte et devient résistante à tous les traitements, entraînant une issue fatale pour les patients (52). Les effets anti-tumoraux de l'Avastin® sur la tumeur récurrente ont conduit à l'étude de son action sur la tumeur dès son diagnostic initial en combinaison avec la radiothérapie et le Temozolomide (50). Une étude clinique de phase II a montré que la combinaison de ces deux molécules n'était pas plus toxique que le traitement radiothérapie/TMZ seul sur la tumeur primaire (49). Deux études cliniques de phase III à grande échelle ont été menées afin de déterminer si l'ajout de l'Avastin® au protocole standard permettait d'améliorer la survie globale des patients nouvellement diagnostiqués pour un GBM : études AVAaglio (Roche (48)) et RTOG0825. Les premiers résultats publiés par l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) en juin 2013 montrent que l'addition de l'Avastin® en première ligne du traitement du GBM permettent une augmentation de la PFS ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie des malades mais ne procure aucun avantage à la survie globale des patients (<http://ecancer.org/news/4119-asco-2013--no-survival-benefit-to-adding-bevacizumab-to-standard-first-line-chemoradiation-for-glioblastoma.php>). De plus, les patients ayant reçu ce traitement présentent plus d'effets secondaires, accompagnés d'une augmentation des symptômes et d'un déclin cognitif, que ceux traités avec le placebo combiné au TMZ. Les profils moléculaires et les images IRM sont actuellement analysés afin de déterminer si un sous-groupe de patients était susceptible de bénéficier d'un effet bénéfique du traitement Avastin® en première ligne.

b) Mécanismes de résistance aux anti-angiogéniques

La résistance aux anti-angiogéniques se traduit par deux mécanismes principaux : la résistance intrinsèque de la tumeur, qui d'emblée ne répond pas aux traitements, et la résistance adaptative qui se traduit par l'évolution du phénotype de la tumeur et/ou des voies de signalisation mises en place pour la vascularisation de la tumeur (Figure 9) (53-56). La résistance intrinsèque de la tumeur face aux traitements par Avastin® peut s'expliquer par l'expression de facteurs pro-angiogéniques autre que le VEGF (IL6, IL8, FGF, Ephrines, Ang1, SDF1α...) rendant inefficace la diminution du taux de VEGF. Celle-ci entraîne la maturation de certains vaisseaux nouvellement formés, en permettant le recrutement de la couverture péricytaire, ce phénomène est décrit comme étant la normalisation vasculaire. Cependant la normalisation ne diminue que faiblement la croissance tumorale, parfois même elle l'accélère et rend la tumeur totalement insensible aux

stratégies anti-angiogéniques. En effet, ces traitements ciblent les néovaisseaux, non matures, et sont inefficaces sur les vaisseaux matures n'étant plus influencés par les facteurs pro-angiogéniques.

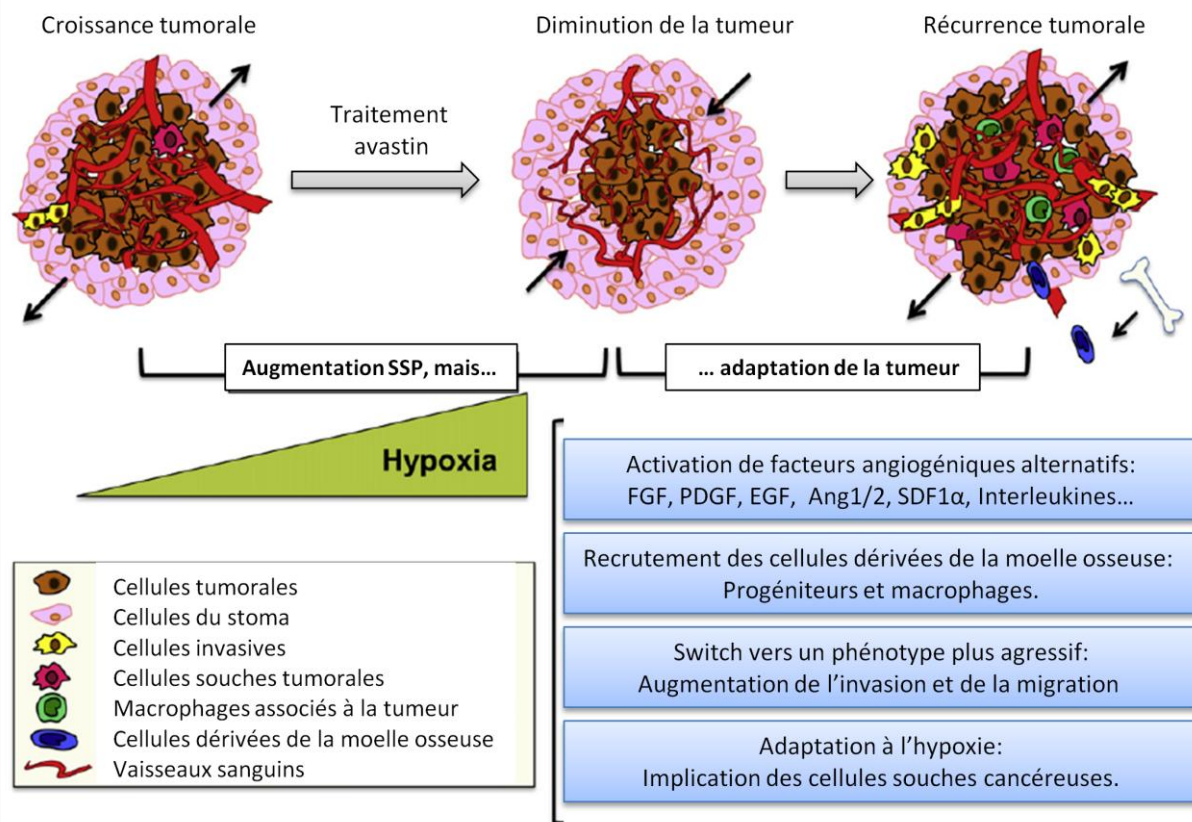


Figure 9 : Réponses adaptatives du GBM suite au traitement par anti-angiogénique (modifié d'après (56)). Suite au traitement par Avastin® la tumeur ralentit sa croissance mais rapidement la tumeur s'adapte et récidive. Cette adaptation implique différents mécanismes comme la stimulation de facteurs pro-angiogéniques alternatifs tels que le FGF, l'EGF, SDF1α... dont l'expression est augmentée par l'hypoxie induite par la régression des vaisseaux sous l'action de l'Avastin®. Ces facteurs induisent le recrutement de précurseurs dérivés de la moelle osseuse (précurseurs endothéliaux et péricytes) qui vont participer à la formation de nouveaux vaisseaux et stimuler l'angiogenèse indépendamment du VEGF. Les anti-angiogéniques induisent aussi l'augmentation de l'invasion des cellules tumorales qui vont s'infiltrer dans le cerveau sain en longeant les vaisseaux préexistants (co-option). L'hypoxie entraîne la sélection de cellules résistantes et augmente le pool de cellules souches tumorales. Tous ces mécanismes vont permettre la revascularisation tumorale de manière dépendante et indépendante de l'angiogenèse, et ainsi l'échappement du GBM aux traitements. SSP = survie sans progression.

L'adaptation du GBM aux traitements anti-angiogéniques peut mettre en jeu différents mécanismes dont la stimulation des autres modes de vascularisation comme la co-option (57) (Figure 6) ou la vasculogenèse (Figure 7) mais aussi par la stimulation de l'angiogenèse de façon indépendante du VEGF (41, 53-55, 58) (Figure 9). Dans les modèles animaux utilisés pour l'étude de différents cancers (pancréas (59), foie, poumon, colon, rein...), les traitements aux anti-angiogéniques induisent l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le FGF, PDGF, PIGF, SDF1α, IL-6 et IL-8, mais actuellement aucun de ces marqueurs n'a été validé en tant que cible thérapeutique (54). Différentes études ont montré que l'activation des voies alternatives permet la revascularisation du GBM suite aux traitements par l'Avastin®, notamment la voie Notch/Dll4 (60). Une étude réalisée sur le modèle des cellules U87 implantées chez la souris montre que la surexpression de la signalisation Notch/Dll4 induit une résistance des tumeurs aux traitements Avastin®. En effet, la surexpression de Dll4 par les cellules U87 implantées chez la souris entraîne une résistance intrinsèque de la tumeur aux traitements Avastin®. Les auteurs ont aussi observé que l'inhibition de Notch, par inhibition

chimique à l'aide du DBZ (dibenzazepine, inhibiteur des γ -sécrétases), dans ces tumeurs restaure leur sensibilité à l'Avastin[®] et augmente même son effet sur l'inhibition de la croissance tumorale, suggérant une action synergique de l'Avastin[®] et du DBZ. La surexpression de Dll4 induit la formation de gros vaisseaux exprimant peu de VEGFR2 qui sont, de ce fait, moins dépendant de la signalisation du VEGF et insensibles à l'Avastin[®]. Dll4 étant surexprimé dans certaines tumeurs, dont le GBM, la suractivation de la voie Dll4/Notch pourrait être à l'origine de la résistance aux anti-angiogéniques observée chez certains patients (60). Les auteurs ont étudié l'expression de Dll4 chez les patients et ont observé que ceux qui l'exprimaient à un faible taux survivent plus longtemps et répondent mieux aux traitements Avastin[®] que ceux qui le surexprime, confirmant ainsi leurs observations sur le modèle murin.

L'inhibition du VEGF entraîne la régression des néovaisseaux et ainsi diminue le taux d'oxygène disponible dans le cœur de la tumeur (51). L'hypothèse qui émerge de ces observations est que l'Avastin[®] augmenterait l'hypoxie intra-tumorale qui stimulerait l'activation d'autres voies de signalisation, indépendantes ou en aval du VEGF, qui conduirait à la revascularisation de la tumeur. L'hypoxie, via le facteur de transcription HIF-1, pourrait donc être l'un des facteurs majeurs de la récurrence tumorale suite aux traitements anti-angiogéniques. HIF-1 induit l'expression du VEGF ainsi que d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le FGF, PDGF, CXCR4, SDF1 (16). L'hypoxie induit également le développement d'un phénotype invasif de la tumeur (51, 61-64). L'inhibition du VEGF entraîne la surexpression de gènes liés à l'invasion comme l'EGF, MMP2, MMP9, MMP12 (58, 65-67). La transition vers un phénotype invasif s'accompagne d'une augmentation de la co-option vasculaire. En effet, les cellules tumorales migrent le long des vaisseaux sanguins pour envahir le cerveau vers des zones oxygénées (57, 61). L'Avastin[®] semble induire une transition mésenchymateuse du phénotype des cellules tumorales qui serait régulée par la voie de c-MET/HGF (62, 67, 68) entraînant l'invasion des tissus sains par les cellules tumorales. L'équipe de de Groot a notamment montré que le traitement des tumeurs U87 et GSC par l'Avastin[®] induit le changement de phénotype proneural vers un phénotype mésenchymateux ayant le pire des pronostics parmi les sous-groupes de GBM (67). L'émergence d'un processus invasif a également été observée en clinique chez des patients atteints de glioblastome et traités au bevacizumab (61). La compréhension de la participation des voies de signalisation angiogéniques alternatives dans le phénomène de récurrence reste néanmoins incomplète.

Les traitements mis en place dans le cadre du GBM entraînent aussi la sélection de cellules résistantes aux radiations, à la chimiothérapie et à l'hypoxie (67, 69-72), et qui sont capables de ré-initier la croissance tumorale suite à l'exérèse: les cellules souches cancéreuses (CSC). Les CSC sont préférentiellement localisées dans les niches périvasculaires qui permettent le maintien de leurs capacités souches. Les niches vasculaires seraient donc le centre de la résistance aux traitements anticancéreux. En effet, les cellules endothéliales protègent les CSC lors des radiations permettant ainsi à la tumeur de récidiver après l'arrêt des traitements (73).

4. Rôle des cellules souches cancéreuses

Les CSC ont été très étudiées ces dernières années car elles sont fortement soupçonnées d'être médiateurs dans la résistance/récurrence aux traitements (73-75). Ces cellules sont présentes dans de nombreux cancers solides où elles sont souvent désignées comme « cellules initiatrices de tumeur »(76). Les GSC (cellules souches de gliome) partagent certaines des propriétés propres des

cellules souches neuronales (77) telles que l'auto-renouvellement, la capacité de se différencier en cellules neuronales mais aussi mésenchymateuses comme les péricytes (78), et expriment les marqueurs de cellules souches adultes : nestine et CD133. Dans le GBM, les GSC ont un phénotype invasif très agressif et sont résistantes aux différents traitements (79). En effet, suite à la radiothérapie et la chimiothérapie, elles activent le système de réparation de l'ADN qui leur permet de continuer à proliférer (80-82). Ces cellules sont localisées dans deux types d'environnements distincts (Figure 10) : les niches périvasculaires qui les protègent des thérapies, et les zones hypoxiques. Ces deux niches expriment des facteurs qui permettent aux GSC de maintenir leur capacité d'auto-renouvellement (83).

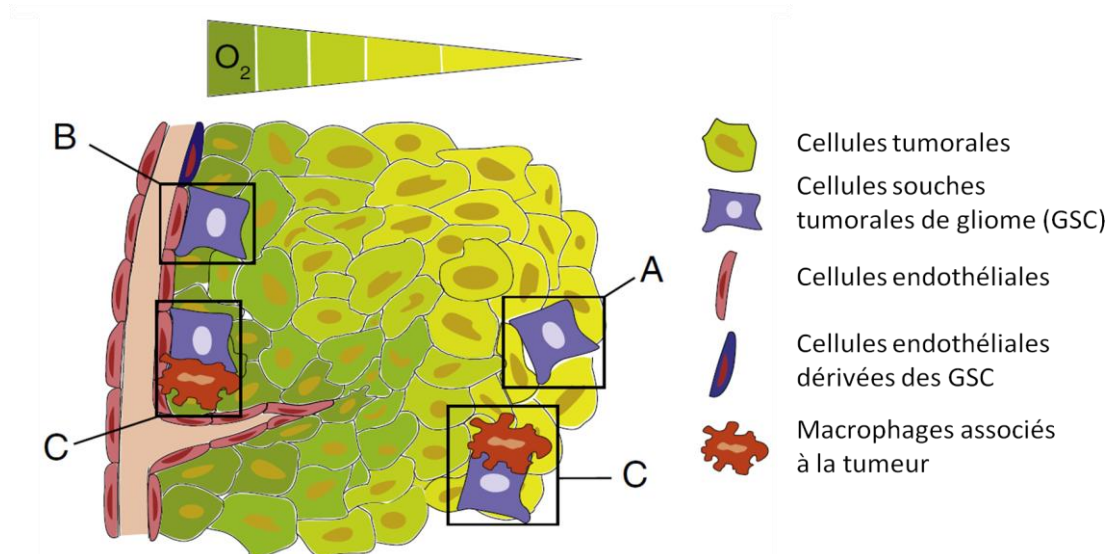


Figure 10 : Les cellules souches tumorales dans le GBM. Les GSC sont localisées dans les zones hypoxiques (A) et dans les niches périvasculaires (B). Ces deux environnements permettent aux GSC de maintenir leur capacité souche et leur survie, et en retour elles sécrètent des facteurs induisant la formation des vaisseaux sanguins. Les GSC participent aussi à la vascularisation de la tumeur en se différenciant en cellules de type vasculaire (ici en cellules endothéliales). Les macrophages interagissent aussi avec les GSC dans leurs deux types d'environnements (C). Modifié d'après (83).

L'hypoxie augmente l'expression des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α qui permettent l'expression de différents gènes dont la fonction est de s'adapter à cet état qui entraîne la mort cellulaire et la nécrose des tissus. Dans un contexte tumoral l'hypoxie induit l'angiogenèse, l'invasion tumorale et la résistance aux traitements anticancéreux (79). Dans le cas de niches de cellules souches (Figure 10A) ces facteurs entraînent l'expression de gènes impliqués dans le phénotype souche, inhibent les gènes de différenciation et induisent des voies de signalisation nécessaires au maintien des GSC (84-87).

Dans le GBM, les GSC sont localisées à proximité des capillaires sanguins (Figure 10B) et de façon plus importante dans les zones de micro-proliférations vasculaires (88). Dans ces niches périvasculaires, les GSC interagissent fortement avec les cellules endothéliales. Elles sécrètent des facteurs pro-angiogénique comme le VEGF (Figure 4). Elles peuvent aussi induire la vasculogenèse (Figure 7) en sécrétant SDF1 permettant le recrutement de progéniteurs de cellules endothéliales et murales à partir de la moelle osseuse (83). En réciproque, les facteurs sécrétés par les cellules endothéliales contribuent au maintien des capacités souches des GSC.

Récemment, un nouveau phénomène a été décrit dans la littérature, la différenciation des GSC en cellules vasculaires (Figure 8): cellules endothéliales (34-36, 89) ou cellules murales (37, 38,

78) (Figure 11). L'équipe de Ricci-Vitiani ainsi que celles de Wang et de Soda ont montré que chez certains patients, les vaisseaux sont parfois composés de cellules exprimant à la fois les marqueurs endothéliaux (cd31, vWF) et les anomalies chromosomiques présentes dans les cellules tumorales (amplification du chromosome 7, délétion du chromosome 10...) (34-36). Ces cellules sont des cellules tumorales qui se sont transdifférenciées en cellules de type endothéliale et ne sont pas issues de la fusion entre une cellule endothéliale et une cellule tumorale (36). Afin de connaître la nature exacte de ces cellules endothéliales dérivées de la tumeur, des cellules issues de patients atteints de GBM ont été isolées et cultivées sous forme de sphères en milieu sans sérum. Ces conditions de culture permettent de maintenir une forte population de cellules souches et récapitulent parfaitement le phénotype de la tumeur primaire originelle (90). La culture de ces cellules dans un milieu pour cellules endothéliales (milieu HUVEC contenant du VEGF et du sérum), ou en hypoxie, induit l'expression de cd31, vWF et cd34 (Figure 11) ainsi que la formation de tubes sur du matrigel, similaires à ceux obtenus avec des HUVEC (40). Ces études montrent que les GSC sont capables de se différencier en cellules endothéliales dans le GBM et que les vaisseaux composés par ces cellules sont insensibles aux traitements anti-angiogéniques (91). Ces vaisseaux constitués de cellules tumorales sont plus fréquents dans les zones en hypoxie, suggérant que ce mécanisme est impliqué dans l'adaptation et la récurrence du GBM aux anti-angiogéniques.

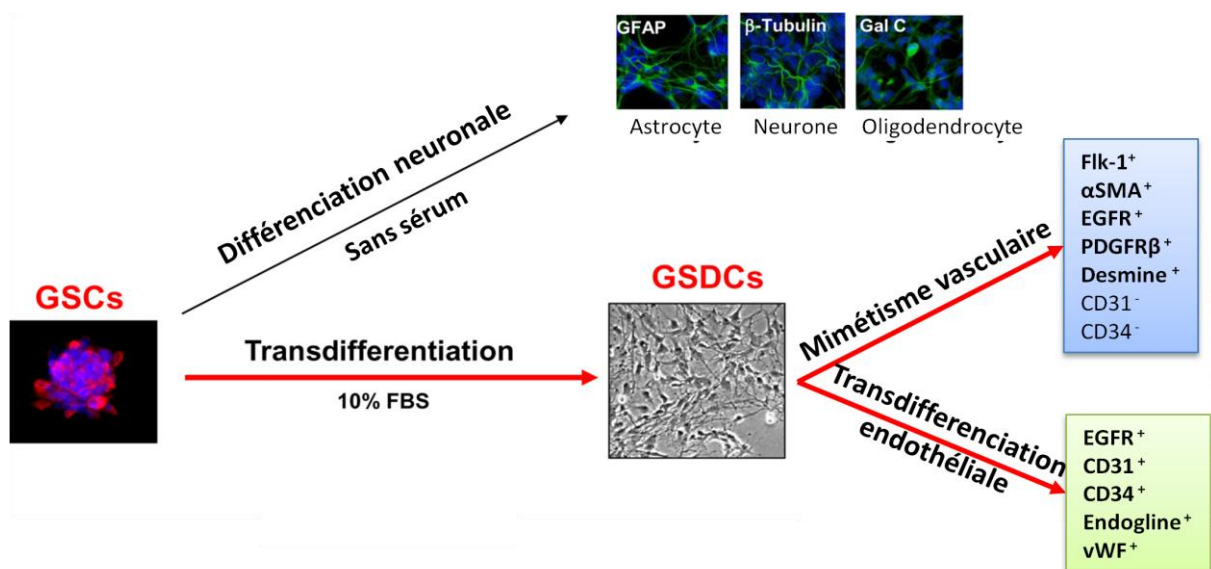


Figure 11 : Modèle de la différenciation et de la transdifférenciation des GSC (modifié d'après (38)). Les GSC cultivées dans un milieu sans sérum sont capables de se différencier en cellules de la lignée neuronale : astrocytes, neurones et oligodendrocytes. En présence de sérum elles acquièrent la capacité de se transdifférencier et d'exprimer des gènes d'autres lignées comme des marqueurs de cellules murales (desmine, α SMA, PDGFR β) ou des cellules endothéliales (cd31, vWF, cd34). Cette transdifférenciation est à la base de deux mécanismes récemment décrits : le mimétisme vasculaire et la transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales, participant tous les deux à la vascularisation du GBM et sans doute à sa récurrence suite aux traitements.

D'autres études ont montré que les GSC ne se différenciaient pas en cellules endothéliales mais en cellules murales, cellules musculaires lisses/péricytes, et participeraient à la stabilisation du réseau vasculaire rendant le traitement par l'Avastin® inefficace (78). Ce phénomène est décrit comme étant le mimétisme vasculaire (Figure 8A) (33, 37, 38, 78). C'est la formation de structures type vasculaires fonctionnelles formées par les cellules tumorales n'exprimant aucun des marqueurs endothéliaux classiques comme cd31 ou vWF (33). À la place, ces cellules expriment des gènes comme la desmine et l' α SMA qui sont des marqueurs des cellules murales, et même Flk-1 (VEGFR2)

(37, 38) qui semble être important pour le mimétisme vasculaire ([Figure 11](#)). L'équipe de Francescone a montré que la transdifférenciation des GSC en cellules murales dépendait de l'activation du récepteur Flk-1 de façon indépendante du VEGF afin de permettre le mimétisme vasculaire (37). Ce mécanisme est donc insensible à l'inhibition du VEGF par l'Avastin® et pourrait participer à la résistance du GBM aux anti-angiogéniques.

Ces dernières années, de nombreuses études ont permis une meilleure compréhension des voies de signalisation mises en jeu lors du développement du GBM qui reste malgré tout l'un des cancers ayant le plus mauvais pronostic. Il récidive suite aux différents traitements par la mise en place de mécanismes d'adaptation. Notre laboratoire s'est engagé dans l'étude de ces mécanismes d'adaptation et en particulier dans la recherche de facteurs impliqués dans les modes de croissance des GBM indépendants du VEGF.

5. De la recherche de nouveaux facteurs, impliqués dans l'angiogenèse développementale, à l'étude de leur implication dans le glioblastome

La thématique du laboratoire est l'étude de l'angiogenèse dans un contexte physiologique mais aussi tumoral. En effet l'angiogenèse physiologique est un mécanisme complexe qui met en œuvre plus d'une centaine de gènes et qui est très finement contrôlé au cours du développement embryonnaire. Comme l'embryon, la tumeur en croissance est sensible à l'hypoxie, nécessite un apport en oxygène et nutriments pour continuer son développement et induit l'angiogenèse. L'angiogenèse tumorale sollicite l'expression de la plupart des gènes impliqués lors du développement vasculaire, mais de façon peu contrôlé sur le plan quantitatif, ce qui aboutit à un réseau anormal, très tortueux, hémorragique et dont le flux sanguin n'est pas constant. La caractérisation de l'ensemble des gènes susceptibles de jouer un rôle dans le développement et la maturation vasculaire est indispensable à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'espérer pouvoir proposer un traitement curatif pour le glioblastome.

En 2009, le groupe de Sophie Javerzat et Martin Hagedorn a réalisé un criblage de gènes potentiellement impliqués dans l'angiogenèse développementale en établissant le profil transcriptomique différentiel de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet (CAM) au cours de l'angiogenèse (92). La CAM est un tissu richement vascularisé, facilement accessible, et dont la cinétique et le mode de développement sont bien caractérisés ([Figure 12](#)). Lors du développement, le réseau vasculaire de la CAM subit trois phases de croissance distinctes. La première se caractérise par l'angiogenèse bourgeonnante, entre les jours 5 et 7. Dans la seconde phase, du jour 8 au jour 12, le réseau vasculaire croît par intussusception (formation de deux nouveaux vaisseaux à partir de la division d'un unique gros vaisseau en deux lumières distinctes). Enfin, la dernière phase est caractérisée par une expansion du réseau vasculaire sans relative augmentation de sa complexité (92). Pour réaliser cette étude, les échantillons ont été prélevés à quatre stades différents permettant d'étudier l'expression des gènes lors des trois phases du développement vasculaire de la CAM ([Figure 12C](#)). L'étude des gènes régulés lors de ce processus a été réalisée à l'aide d'une puce pan génomique de poulet (Affimetrix chicken GeneChips). Ceux-ci ont ensuite été regroupés en cluster selon leur niveau d'expression au cours du développement et les orthologues humains des modulateurs de l'angiogenèse de poulet ont été identifiés. Ceux dont l'expression était significativement plus forte dans les cellules endothéliales par rapport aux autres types cellulaires ont ensuite été sélectionnés permettant de dresser une liste de 205 gènes.

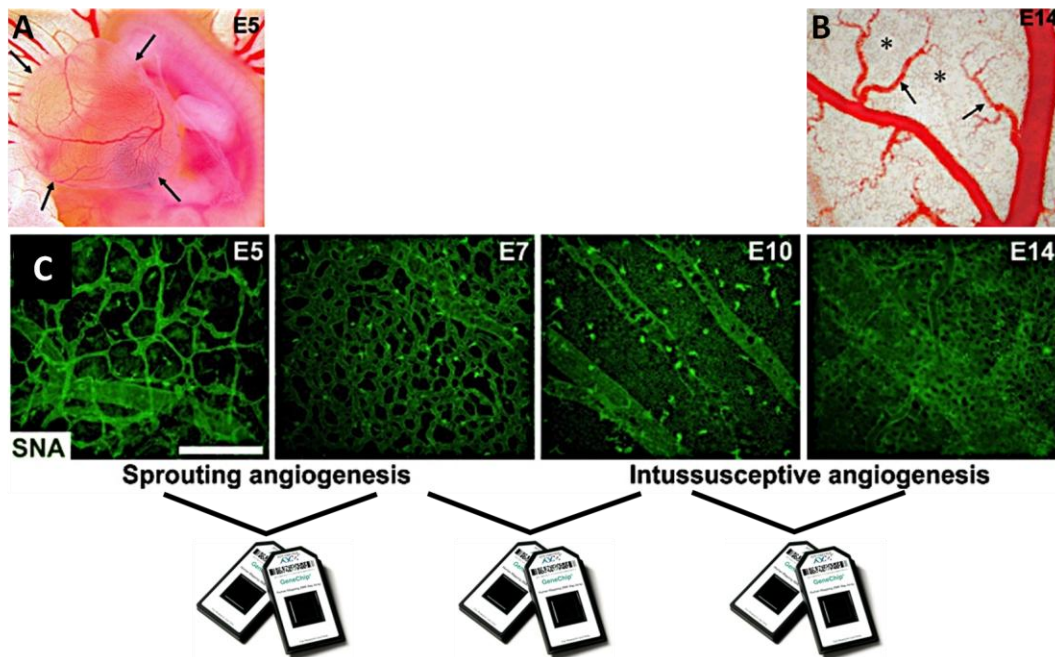


Figure 12 : Développement embryonnaire de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de poulet et angiogenèse (92). A. Dès 5 jours de développement, la vésicule allantoïdienne est vascularisée, le réseau apparaît dense mais non structuré. B. A 14 jours, la vascularisation est hiérarchisée, l'arbre vasculaire est totalement formé et le réseau mature avec une couverture péricytaire dense. C. Evolution du réseau vasculaire entre le stade E5 et E14, le développement de la vascularisation se fait d'abord par angiogenèse bourgeonnante (sprouting) puis par intussusception. Représentation des jours où ont été prélevés les échantillons afin de réaliser l'étude transcriptomique. Les vaisseaux sont marqués par la SNA lectine. Barre de calibration = 200µm.

L'expression vasculaire a été confirmée pour certains de ces gènes, non seulement dans la CAM mais aussi lors du développement embryonnaire chez la souris (Figure 13) et dans les tissus humains fortement vascularisés tels que le placenta et le poumon. Cette étude a notamment permis de démontrer que les gènes CYR61, RAMP2, EPAS1 et SOX7 étaient exprimés dans les vaisseaux de la CAM et chez l'embryon de poulet de quatre jours (Figure 13A-F). Elle a également montré que certains gènes étaient exprimés lors du développement embryonnaire chez la souris. Parmi eux se trouvent FSTL1, PARVB, LIMS1, PRCP et PTRF qui sont exprimés dans les capillaires sanguins du parenchyme cérébral (Figure 13L, M, O-Q), avec un profil similaire à celui du marqueur endothélial CDH5 (Figure 13I). Ces résultats confirment les données bioinformatiques et suggèrent que ces gènes ont un rôle dans l'angiogenèse physiologique développementale.

Afin de valider cette hypothèse, des analyses fonctionnelles ont été réalisées avec le gène PARVB codant pour la β -parvine. Son inhibition dans les HUVEC, par siRNA, entraîne un réarrangement du cytosquelette d'actine perturbant leur adhésion, une diminution de la migration et de l'invasion en chambre de Boyden vers un gradient de sérum ainsi qu'une diminution de leur capacité à former des tubes, mimant l'angiogenèse *in vitro*. Ces résultats sont en faveur d'un rôle modulateur de l'angiogenèse pour le gène de la β -parvine, confirmant les données transcriptomiques.

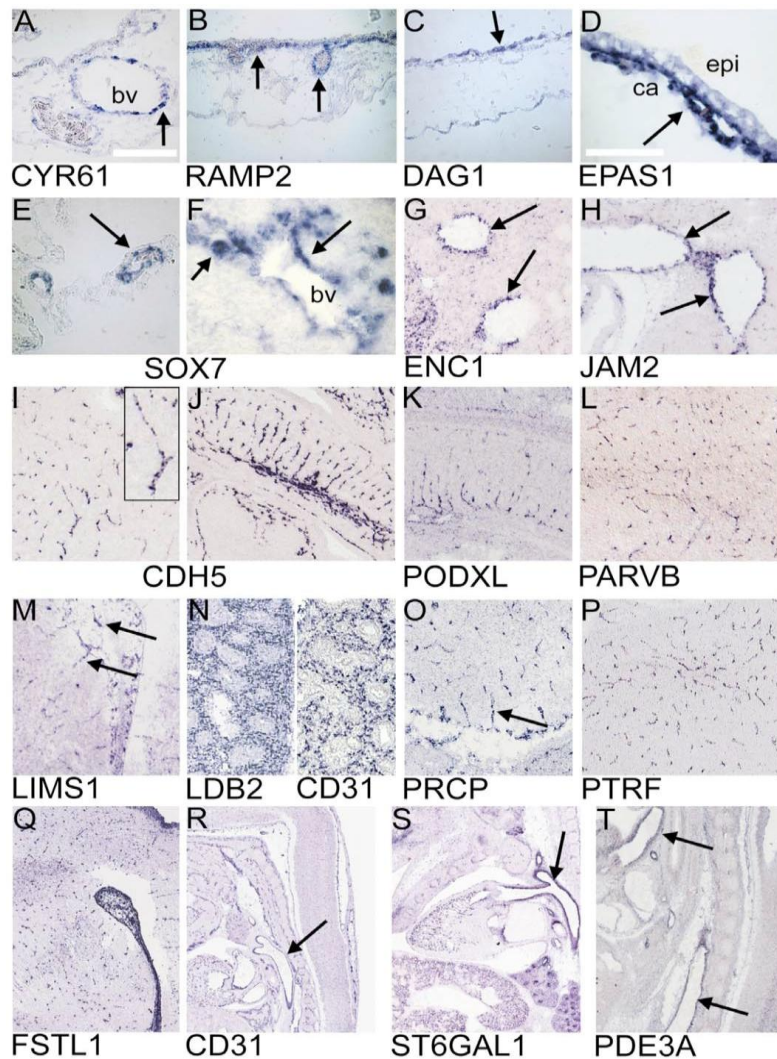


Figure 13 : Exemple de profil d'expression vasculaire des gènes identifiés lors de l'analyse transcriptomique, par hybridation *in situ* (92). A-F. Expression des gènes dans la CAM (A-E) ou chez l'embryon de poulet de quatre jours (F). A-B, D-F. CYR61, RAMP2, EPAS1 et SOX7 sont exprimés spécifiquement par les cellules endothéliales chez l'embryon de poulet. C. DAG1 est exprimé par les cellules épithéliales accolées aux vaisseaux de la CAM (flèches). Epi = épithélium, ca = capillaire, bv = vaisseaux sanguins. ; Barres de calibration =100µm (A-C) et 50µm (D-F). G-T. Expression vasculaire des gènes chez l'embryon de souris E14.5 (source www.genepaint.org). I-J, N, R. Les gènes CDH5 et CD31 ont été utilisés comme contrôles positifs permettant de définir la morphologie des structures vasculaires. L, M, O-Q. PARVB, LIMS1, PRCP, PTRF et FSTL1 sont exprimés par les capillaires cérébraux. G. ENC1 marque les vaisseaux dans le foie ; H. JAM2 est localisé au niveau de la veine cave inférieure; K. PODXL est exprimé dans les capillaires de la langue ; N. LDB2 possède un profil d'expression similaire à celui de CD31 dans les poumons ; S-T. ST6GAL1 et PDE3A sont fortement exprimés par les gros vaisseaux comme l'aorte.

Comme nous l'avons vu lors du développement tumoral, de nombreux gènes contribuant à l'angiogenèse développementale sont réactivés, permettant la formation de nouveaux vaisseaux et la croissance de la tumeur. Afin de savoir si les gènes identifiés dans le crible ci-dessus pouvaient participer à la vascularisation des tumeurs solides, le groupe de Sophie Javerzat a, dans un premier temps, interrogé les bases de données (par exemple Oncomine <https://www.oncomine.org/resource/login.html>) pour l'expression des 205 gènes dans quatre types de cancers fortement vascularisés que sont le glioblastome, les adénocarcinomes pulmonaire et colique ainsi que le cancer du rein à cellules claires (Tableau 1). Cette étude a montré que 42 de ces gènes étaient fortement dérégulés au niveau transcriptionnel dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain, la plupart étant induits, dans au moins deux types de cancer, suggérant une participation à la vascularisation tumorale.

Parmi ces gènes se trouvent KIF20A et DPY19L1, qui ont fait l'objet de mes travaux et vont être présentés dans le chapitre suivant. La méthode de sélection sera détaillée dans le chapitre III.A.1

Tableau 1 : Liste des gènes, dont l'expression semble enrichie dans l'endothélium, et étant surexprimés dans au moins deux cancers richement vascularisés. Les gènes sélectionnés dans cette étude sont surlignés en jaune. Up = surexpression dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain, down = sous-expression, no = niveau d'expression équivalent, amb = ambigu.

Gene	GBM	Adénome pulmonaire	Cancer du colon	carcinome rénal à cellules claires	Protéine humaine
SF3B3	Up	Up	Up	Up	Splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa
TTK	Up	Up	Up	No	MPS1 (Monopolar Spindle 1-Like 1)
KIF2C	Up	Up	Up	No	Kinesin family member 2C
HEATR2	Up	Up	Up	No	HEAT repeat containing 2
GTF2IRD1	Up	Up	Up	No	GTF2I repeat domain containing 1
HSPD1	Up	Up	Up	Down	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
KIF20A	Up	Up	No	Up	Kinesin family member 20A
HS2ST1	Up	Up	No	Up	Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1
COL5A2	Up	Up	No	Up	Collagen, type V, alpha 2
PROCR	Up	No	Up	Up	EPCR (Protein C receptor endothelial)
PTRF	Up	Down	Up	Up	Polymerase I and transcript release factor
ENC1	Down	Up	Up	Up	Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
TMEM106B	Up	Up	No	No	Transmembrane protein 106B
PPM1G	Up	Up	No	No	Protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform
ORC6L	Up	Up	No	No	Origin recognition complex, subunit 6 like (yeast)
KIF15	Up	Up	No	No	Kinesin family member 15
MYC	Up	Up	AMB	No	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
WDSOF1	Up	No	Up	No	WD repeats and SOF1 domain containing
WDR77	Up	No	Up	No	WD repeat domain 77
S100A11	Up	No	Up	No	S100 calcium binding protein A11
NUDT5	Up	No	Up	No	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5
EXOSC3	Up	No	Up	No	Exosome component 3
CTSK	Up	No	Up	No	Cathepsin K
C8orf4	Up	No	Up	No	Chromosome 8 open reading frame 4
PODXL	Up	Down	Up	No	Podocalyxin-like
ITGA6	Up	Down	Up	No	Integrin, alpha 6
CYR61	Up	Down	Up	No	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
UGCG	Up	No	No	Up	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
SHC1	Up	No	No	Up	SHC (Src homology containing) transforming protein 1
RPL36	Up	No	No	Up	Ribosomal protein L36
PXDN	Up	No	No	Up	Peroxidasin homolog (Drosophila)
MBD2	Up	No	No	Up	Methyl-CpG binding domain protein 2
LIMS1	Up	No	No	Up	LIM and senescent cell antigen-like domains 1
HSPG2	Up	No	No	Up	Heparan sulfate proteoglycan 2
HEY1	Up	No	No	Up	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
FNBP4	Up	No	No	Up	Formin binding protein 4
DPY19L1	Up	No	No	Up	Dpy-19-like 1 (C. elegans)
PROS1	Up	Down	No	Up	Drostein S (alpha)
PECAM1	Up	Down	No	Up	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
DTL	Up	Down	Down	Up	Denticleless homolog (Drosophila)
TFPI2	No	No	Up	Up	Tissue factor pathway inhibitor 2
CUL1	No	No	Up	Up	Cullin 1

B. Nouvelles cibles thérapeutiques: gènes candidats

1. KIF20A/MKlp2 : Rabkinesin6, RAB6KIFL, RB6K

a) *Présentation de la famille des kinésines*

MKlp2 est une protéine motrice de type kinésine. Les protéines motrices sont essentielles à la dynamique du cytosquelette et des fuseaux de division mitotique et méiotique, au transport intracellulaire de vésicules, d'organites ou de macromolécules ainsi qu'au transport lysosomal. Les protéines motrices sont divisées en trois grandes familles : les kinésines, les dynéines et les myosines. Ces dernières sont impliquées dans la contraction musculaire alors que les kinésines et les dynéines se déplacent le long des microtubules et participent, par exemple, à la formation du fuseau mitotique (93).

La famille des kinésines a été décrite la première fois il y a une trentaine d'années (94) et est composée, chez l'Homme, de 45 membres dont 38 sont exprimés dans le cerveau chez la souris (95). Cette activité importante des kinésines dans le cerveau est attribuable au fait qu'il comprend de nombreux types cellulaires polarisés comme les neurones ou les cellules gliales dont les fonctions nécessitent les systèmes de transport intracellulaire les plus complexes afin d'effectuer leurs fonctions.

Les kinésines sont constituées d'un domaine globulaire d'hydrolyse de l'ATP et d'interaction avec les microtubules qui leur permet d'être mobiles le long de ces derniers. Le domaine d'interaction est très conservé chez les différentes espèces, avec 90% d'homologie entre l'Homme et la souris, et est à la base du classement des protéines de cette famille (Figure 14). La majorité des kinésines possèdent leur domaine catalytique en amino-terminal (comme la plupart des kinésines) ou au centre de leur séquence (comme Kif14 ou Kif26a) et se déplacent vers l'extrémité positive des microtubules alors que les kinésines chez lesquelles il est en carboxy-terminal (comme les Kinésines-14) se déplacent vers l'extrémité négative (96). La tige et la queue représentent la partie variable des kinésines et permettent la liaison des protéines cargos ou des microtubules selon leur fonction. Eg5, MCAK, MKlp1/2, CENP-E, par exemple, sont liées au contrôle de la dynamique du fuseau mitotique (Figure 16) (97) alors que les Kinesin-1, Kinesin-2, par exemple, sont liées au transport d'organites en intracellulaire (98).



Figure 14 : Structures des différents membres de la superfamille des Kinésines et de leur domaine catalytique. Les kinésines sont classées selon l'homologie de séquence en acides aminés. Le domaine catalytique est représenté en jaune. La famille des kinésines 6 (cercle bleu) possède l'insertion d'une longue séquence dans la 6^{ème} boucle du domaine catalytique (rectangle rose). Modifié d'après (98).

b) Description de KIF20A/MKlp2

Chez l'Homme, le gène KIF20A est localisé en 5q31, il est composé de 19 exons et code pour la protéine MKlp2 de 100kDa (99). Elle appartient aux kinésines de la famille 6 avec KIF20B et KIF23. Ces protéines sont les seuls membres de cette superfamille à posséder une insertion de 8 à 10 acides aminés dans le domaine catalytique (Figure 14). Le rôle de cette insertion n'est pas totalement élucidé, elle forme un épitope en surface de la protéine. Elle pourrait donc être impliquée dans la régulation des kinésines en permettant la liaison avec des protéines régulatrices ou en subissant des modifications (glycosylation...). Au niveau de sa structure (Figure 15), la kinésine MKlp2 possède un domaine moteur situé à son extrémité N-Terminale (la tête), une région « tige » en hélices alpha (domaine coiled-coil) et le domaine de la queue, qui permet l'interaction avec les microtubules, à son extrémité carboxyle. Elle possède un site de liaison à la tubuline à ses deux extrémités. L'ARNm humain est identique à celui de souris à 85% et les protéines présentent une identité de séquence de 87% et une similarité de 93%.

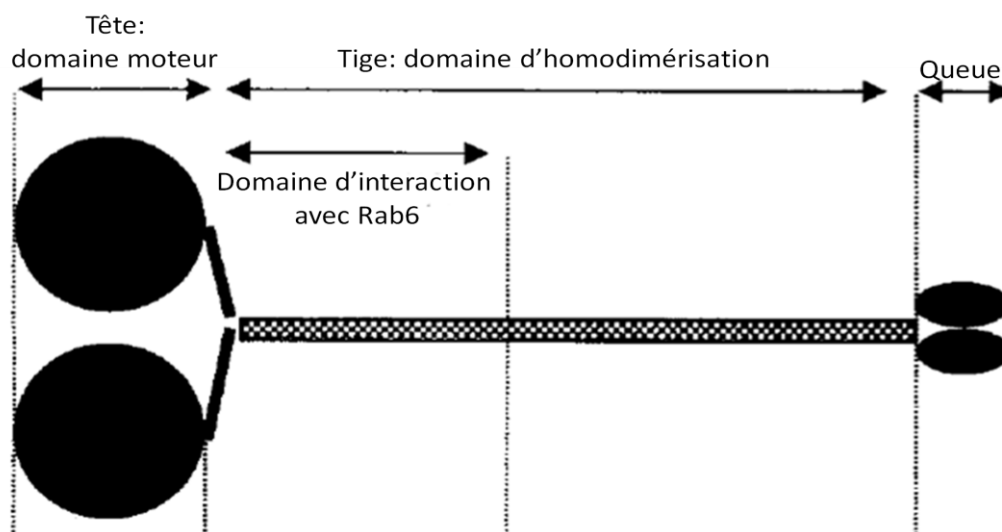


Figure 15 : Représentation schématique de MKlp2 (100). La tête globulaire à l'extrémité N-terminale contient le domaine moteur d'hydrolyse de l'ATP et peut interagir avec les microtubules. La partie centrale est composée de motifs coiled-coil et permet l'homodimérisation de la kinésine. En C-terminal se trouve une queue globulaire qui permet l'interaction avec les microtubules et des protéines cargo. Juste après le domaine moteur se trouve la zone d'interaction avec la petite GTPase Rab6.

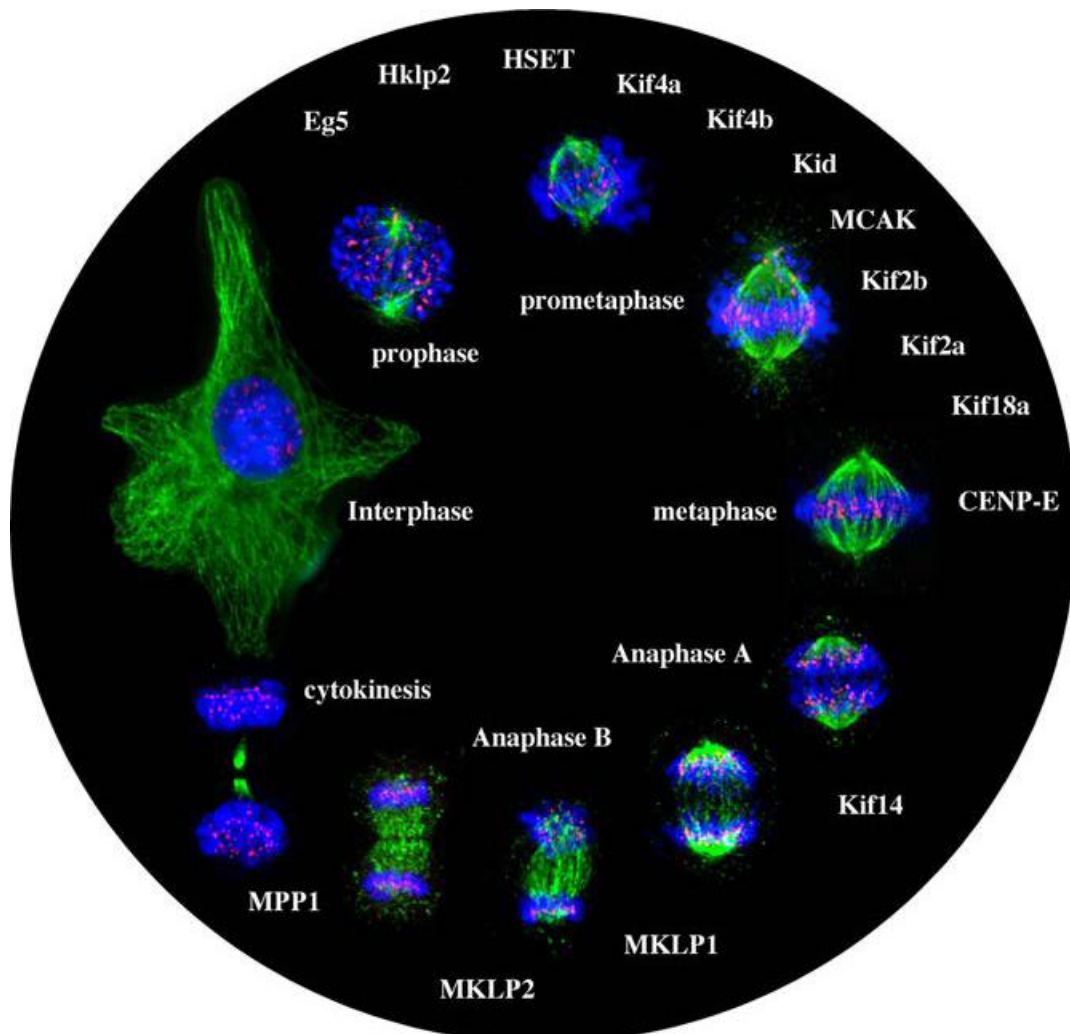
L'expression du gène est décrite comme étant ubiquitaire chez la souris avec une expression plus forte dans les testicules et la rate (101), chez l'Homme, un profil plus spécifique a été décrit (99). Ainsi son ARNm est fortement exprimé dans les tissus fœtaux tels que le foie, le thymus ou encore le cœur, les reins, la rate et les poumons. Il est fortement exprimé dans les tissus lors de la lymphopoïèse et de l'hématopoïèse. Chez l'adulte, il est préférentiellement exprimé dans les tissus présentant un taux de prolifération important (102) comme les testicules, le thymus, la moelle osseuse, la peau, mais aussi dans le système digestif et le cerveau (<http://www.proteinatlas.org>).

c) Rôle MKlp2 dans la mitose: la cytokinèse

(1) Les kinésines et la mitose

La mitose, ou division cellulaire, est un mécanisme essentiel à la prolifération cellulaire. Elle comporte plusieurs phases dans lesquelles une ou plusieurs kinésines sont impliquées (Figure 16A). Pendant la prophase, l'ADN se condense et le fuseau bipolaire se met en place, la kinésine Eg5 est indispensable à cette étape. Lors de la prometaphase l'enveloppe nucléaire est désintégrée et les microtubules se lient aux kinétochores, complexes protéiques localisés au niveau des centromères. La liaison correcte entre les microtubules et les kinétochores est assurée par les kinésines MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) et KIF2B (Figure 16B). Les chromatides sœurs se trouvent liées chacune à un pôle de la cellule par l'intermédiaire de microtubules reliés aux centrosomes. L'alignement des chromosomes attachés de manière bilatérale fait intervenir les kinésines CENP-E, KIF18A et KIF14. Lors de l'anaphase, les chromatides sœurs sont séparés et migrent le long des microtubules, à l'aide de MCAK, KIF18A, et KID, vers les pôles opposés de la cellule. La cytokinèse est une phase indépendante qui se déroule à la fin de la mitose et qui correspond à la séparation physique des deux cellules filles et implique les kinésines MKlp1 et 2 ainsi que MPP1.

A



B

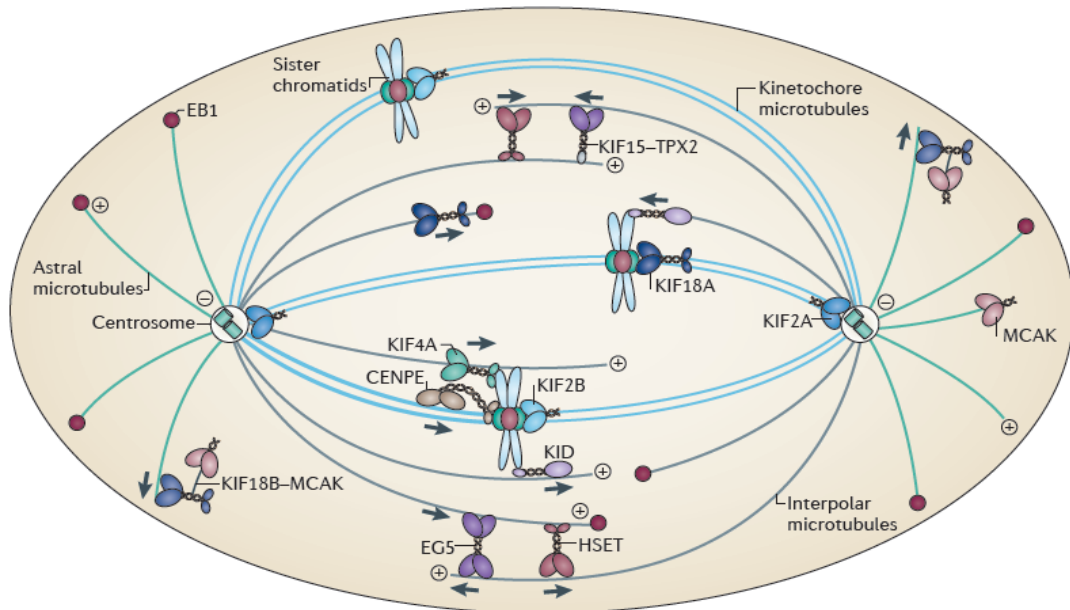


Figure 16 : Les kinésines et la mitose. A. Liste des kinésines impliquées dans la mitose. L'ADN est en bleu, les microtubules en vert et les centrosomes en rouge (103). B. Modèle simplifié du rôle des kinésines dans la mitose (104).

(2) La cytokinèse

La cytokinèse ou cytotérière est un processus qui se prépare au début de l'anaphase. Les cellules animales mettent en place un anneau contractile constitué de filaments d'acto-myosine qui resserre la membrane plasmique et contribue à la séparation des deux cellules filles (Figure 17). Une vingtaine de protéines, dont la fonction est conservée parmi les divers organismes (du nématode à l'Homme), sont impliquées dans ce processus. Elles sont localisées au niveau de l'anneau contractile, du fuseau central et dans les vésicules servant à l'expansion de la membrane plasmique. Parmi ces protéines clés de la cytokinèse on trouve MKIp2 (105).

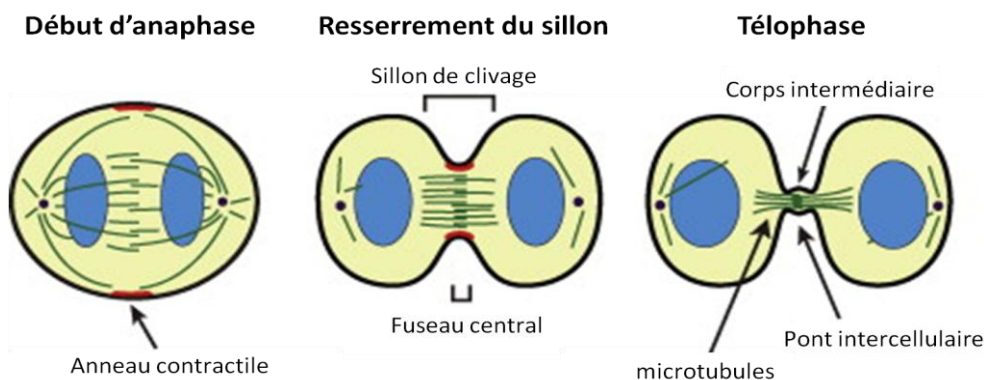


Figure 17 : Schéma de la cytokinèse dans les cellules animales. En début d'anaphase un anneau constitué de filaments d'actine et de myosine II se forme. Le sillon se resserre afin de séparer le cytoplasme en deux domaines distincts. La cytokinèse se termine par l'abscission, fission entre les deux cytoplasmes par la fusion des membranes, permettant la séparation des deux cellules filles (Modifié d'après (106)). L'ADN est en bleu, les microtubules en vert, l'anneau contractile en rouge, la membrane plasmique en noir et les centrosomes en violet.

(3) MKlp2 et la cytokinèse.

Il a été montré que la localisation de MKlp2 varie au cours de la mitose (Figure 18), elle est exprimée de façon diffuse dans le cytoplasme au début de la mitose, au niveau du fuseau central en anaphase et au niveau du corps intermédiaire lors de la télophase (105, 107). La relocalisation de MKlp2 lors de la mitose est concomitante avec celle du CPC (Chromosome Passenger Complex) des centrosomes vers le fuseau central (Figure 19). Le CPC est un complexe de quatre protéines : AURORA B, INCENP, la survivine et la borealine, il intervient à toutes les étapes de la mitose. En prophase il assure notamment la structuration des chromosomes, en phosphorylant l'histone H3. Il est recruté au niveau des centromères pendant la mise en place des kinétochores, permet de contrôler le bon attachement des chromosomes aux microtubules et retarde la transition métaphase anaphase en cas d'attachement monolatéral des chromatides soeurs. Pendant l'anaphase, le CPC est localisé au niveau du fuseau central ainsi qu'au cortex. Pendant la cytokinèse, le CPC participe au point de contrôle « NoCut » en retardant l'abscission si les chromatides n'ont pas correctement ségrégué à l'anaphase (108).

La relocalisation de MKlp2 et du CPC est coordonnée. Lorsque les chromosomes sont alignés en métaphase, le complexe cdk1/cycline B est inactivé et permet l'interaction interdépendante de MKlp2 avec le CPC qui induit leur relocalisation au niveau du fuseau central (109, 110). La liaison de MKlp2 avec l'extrémité dans les microtubules centraux, nécessaire à sa relocalisation, est dépendante de son interaction avec le CPC via INCENP. La présence d'AURORA B et MKlp2 au niveau du sillon de clivage est indispensable pour la progression du sillon et l'abscission. MKlp2 participe à la formation du sillon de clivage en se liant à la myosine II au niveau du cortex cellulaire. Elle permettrait aussi à AURORA B d'interagir avec la vimentine au niveau du corps intermédiaire (Figure 19). AURORA B phosphoryle la vimentine induisant la dépolymérisation du fuseau central nécessaire à la cytokinèse (111). La localisation de MKlp2 et de AURORA B au niveau du fuseau central pourrait permettre la formation du sillon de clivage. MKLP2 est donc indispensable au contrôle de l'achèvement de la division cellulaire.

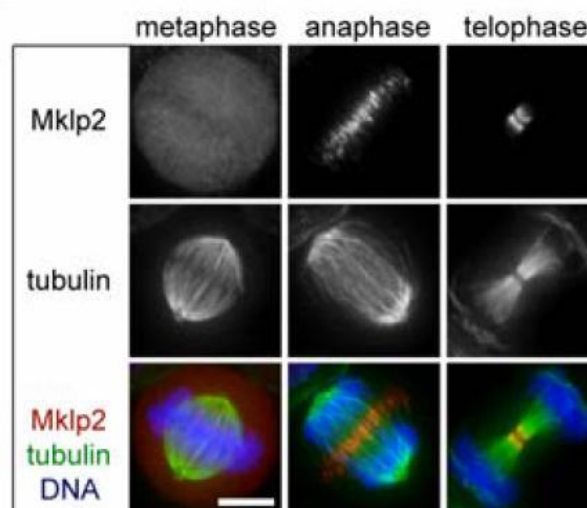


Figure 18 : Expression de MKlp2 dans les cellules au cours de la mitose (111). Barre de calibration 10µm.

La liaison entre le CPC et MKlp2 est régulée par la kinase Cdk1 (112) et la protéine Mad2 (113). Dans un premier temps Mad2 empêche MKlp2 de se lier aux microtubules tant que les chromosomes ne sont pas correctement alignés sur la plaque équatoriale et d'autre part Cdk1

phosphoryle INCENP et empêche ainsi la liaison avec MKlp2 (Figure 19). Ces deux protéines participent au point de contrôle de la mitose et sont inhibées quand l'attachement des kinétochores aux microtubules et l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale sont corrects.

MKlp2 contrôle aussi la localisation de Plk1 au niveau du fuseau central (114). Plk1 phosphoryle MKlp2 et permet sa liaison avec les microtubules et le bon déroulement de la cytotéière (Figure 19). La localisation de MKlp2/Plk1 au niveau du fuseau central permettrait la phosphorylation et la régulation d'autres acteurs. Plk1 permet notamment l'association du complexe Ect2-HsCyk-4 au niveau du fuseau central (115, 116), ce complexe induit l'activation de RhoA nécessaire à la formation et la progression du sillon de clivage.

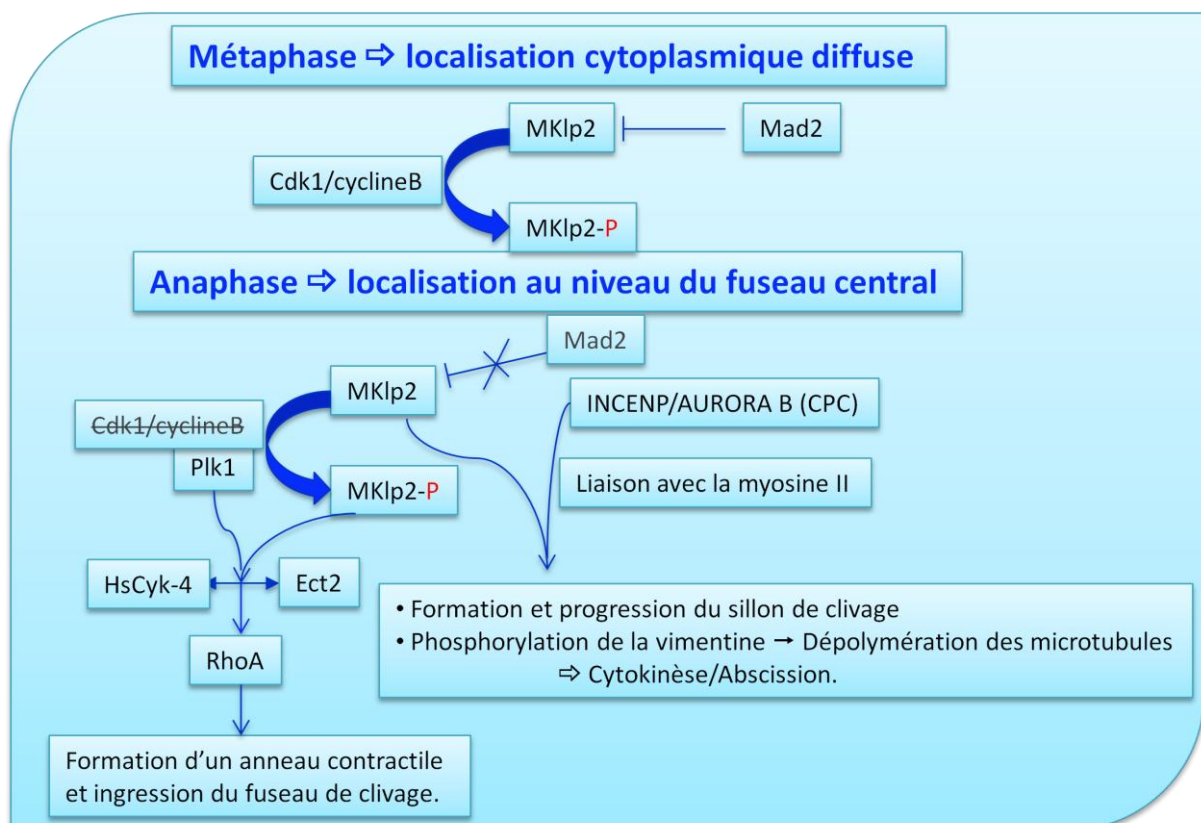


Figure 19 : Schématisation de la régulation de MKlp2 lors de la mitose. La fonction de MKlp2 est finement régulée au moment de l'anaphase afin d'assurer le bon déroulement de la cytokinèse. Elle participe à la formation du sillon de clivage en relocalisant le CPC et Plk1 au niveau du fuseau central suite à l'inactivation de Cdk1 et de Mad2 au début de l'anaphase. Ainsi l'interaction interdépendante entre MKlp2 et le CPC permet la formation et la progression du sillon de clivage d'une part via l'interaction de MKlp2 avec la myosine II (composant de l'anneau contractile) et d'autre part via l'action de AURORA B au niveau du fuseau central. Le rôle d'AURORA B lors de la cytokinèse n'est pas encore élucidé mais sa présence au niveau du cortex équatorial est indispensable au maintien et à la progression de l'anneau de clivage. MKlp2 interagit aussi avec Plk1 qui la phosphoryle régulant ainsi sa liaison avec les microtubules. Plk1 se lie sur MKlp2 permettant ainsi sa localisation au niveau du fuseau central lors de l'anaphase et lui permettant d'induire la formation du complexe Ect2-HsCyk-4 responsable de l'activation de la petite GTPase RhoA. RhoA est nécessaire à la formation du sillon de clivage et à sa progression stable (ingression) jusqu'à l'abscission permettant la séparation des deux cellules filles.

Ainsi MKlp2 est une protéine majeure de la cytokinèse, dont la fonction est finement contrôlée au cours de la mitose (Figure 19). Son inhibition par siRNA (107) ou un inhibiteur chimique réversible, le Paprotrain (117), entraîne la formation de cellules binucléées. En son absence le sillon de clivage se met en place mais l'abscission n'a pas lieu, empêchant la séparation des deux cellules

filles. Des problèmes de cytokinèse entraînent une polyploïdie et de l'instabilité génomique qui sont les moteurs de l'évolution des cancers (118).

d) Autres fonctions de MKlp2

Les protéines de la famille Rab régulent le transport vésiculaire et le trafic membranaire dans les cellules eucaryotes. Rab6 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et régule le trafic dans cet organite. La protéine MKlp2 a été décrite la première fois par Echard et ses collègues en 1998 (101) dans l'appareil de Golgi pour son rôle dans le transport rétrograde de protéines du Golgi vers le réticulum endoplasmique via son interaction avec Rab6. En effet, MKlp2 possède un domaine de fixation pour la petite GTPase Rab6 dans son domaine « tige » (Figure 15). La surexpression de Rab6 entraîne une redistribution des protéines du Golgi vers le réticulum endoplasmique de manière dépendante des microtubules qui pourrait impliquer MKlp2 (119). Sa surexpression ainsi que l'activation constitutive de Rab6 entraînent le même phénotype, c'est-à-dire la fragmentation de l'appareil de Golgi en petites structures dans le cytoplasme. MKlp2 participe donc à la dynamique de cet organite (101).

Dans la sous-famille Rab6, ont été caractérisés Rab6A et son variant d'épissage Rab6A' (119) ainsi que Rab6B codé par un gène différent (120). MKlp2 interagit avec Rab6A, qui est ubiquitaire, et Rab6B, préférentiellement exprimé dans le cerveau. Ce dernier est exprimé principalement dans la microglie, les cellules de Purkinje et les péricytes. Il est localisé dans l'appareil de Golgi, dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans le compartiment intermédiaire RE/Golgi (vésicules ERGIC) des cellules SK-N-SH (lignée de neuroblastome humain). Dans cette étude, les auteurs affirment aussi que MKlp2 est exprimé dans le cerveau et plus particulièrement dans les astrocytes, les cellules de Purkinje, les péricytes et la microglie. MKlp2 pourrait donc avoir un rôle spécifique dans le cerveau en interagissant avec Rab6B.

Une partie de mon travail a consisté à rechercher une implication possible de MKlp2 dans les fonctions endothéliales. Les cellules endothéliales sont responsables de la communication entre le sang circulant dans les vaisseaux sanguins et les tissus vasculaires environnants. Des dysfonctions endothéliales sont responsables de l'initiation de nombreuses pathologies comme l'angiogenèse tumorale, des réactions allergiques, des problèmes respiratoires adultes ou encore l'athérosclérose. Le seul lien que j'ai pu trouver dans la littérature entre MKlp2 et l'endothélium est le suivant, au cours de l'athérosclérose les cellules endothéliales sont activées par différentes cytokines, dont le TNF- α , sécrété par les monocytes envahissant le mur vasculaire. Les signaux induits par le TNF- α entraînent la modification de l'expression de différents gènes. Des expériences menées sur les HUVEC montrent que leur stimulation par le TNF- α entraîne une diminution de l'expression de KIF20A (121). Ceci suggère que ce gène pourrait être impliqué dans la régulation de l'homéostasie vasculaire par les cellules endothéliales.

e) KIF20A et cancers

(1) Les kinésines et le cancer

Il existe de nombreuses études montrant que les kinésines sont dérégulées dans de nombreux cancers, généralement elles sont surexprimées. Mais on ne peut affirmer que cette surexpression est systématiquement moteur dans le processus tumorigène, en effet elle peut

également s'avérer être la résultante d'une forte activité de prolifération des cellules tumorales qui sollicite les kinésines mitotiques. Néanmoins, l'importance des kinésines dans le développement des tumeurs et la résistance aux traitements devient de plus en plus évidente (Tableau 2) (104). Actuellement des essais cliniques en phase I et II sont en cours ciblant les kinésines Eg5 (KIF11) et CENP-E (centromere- associated protein E).

Tableau 2 : Les kinésines humaines dont la dérégulation est impliquée dans le cancer. Modifié d'après (104)

Nom	Implication dans le cancer
KIF2A	Surexpression expérimentale entraînant le développement du carcinome des cellules squameuses de la langue.
MCAK (KIF2C)	Marqueur pronostique du cancer du colon, surexpression et association avec un mauvais pronostic dans le cancer de l'estomac, surexpression dans le cancer du sein.
KIF4A	Amplification et surexpression dans le cancer des cervicales, marqueur pronostique du cancer du poumon.
CENP-E	Sous-expression dans le cancer du foie, surexpression associée avec un mauvais pronostic dans certains types de cancers du sein.
EG5 (KIF11)	Forte expression lors de la leucémie myéloïde chronique en crise blastique, surexpression dans le cancer du pancréas.
KIF14	Marqueur de prédiction du grade et de l'issue des cancers du sein et de l'ovaire, marqueur pronostique du cancer du poumon.
KIF15	Antigène tumoral du cancer du sein.
KIF18A	Surexpression dans le cancer colorectal, surexpression et association avec le grade de la tumeur, les métastases et la faible survie dans le cancer du sein.
MKLP1 (KIF23)	Surexpression dans les gliomes.
MKLP2 (KIF20A)	Surexpression dans les cancers du pancréas, de l'estomac, de la vessie et le GBM.
MPP1 (KIF20B)	Surexpression dans le cancer de la vessie.
HSET	Hautement prédictif des métastases dans le cerveau pour les cancers précoces et avancés du poumon, surexpression dans le cancer du sein entraînant une résistance au docetaxel.
KIF3C	Sous-expression dans les lignées cellulaires de cancers du sein résistantes au paclitaxel, surexpression dans le cancer du sein entraînant une résistance au docetaxel.

De nombreux inhibiteurs ont été développés contre Eg5 et entraînent la formation d'un mono-astre conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort de certaines cellules cancéreuses (Figure 20) (104). L'inhibition d'Eg5 est étudiée dans le cancer du rein à cellules claires, notamment au laboratoire par Prisca Exertier ((122) + article Annexe 1 (123)) qui a montré que son ciblage par l'ispinesib (inhibiteur allostérique), dans les xénogreffes de cellules de cancer du rein chez la souris, entraîne une diminution significative de la taille des tumeurs traitées par rapport à des tumeurs contrôles. D'autres études ont montré une efficacité prometteuse de l'ispinesib dans le cancer du sein (104).

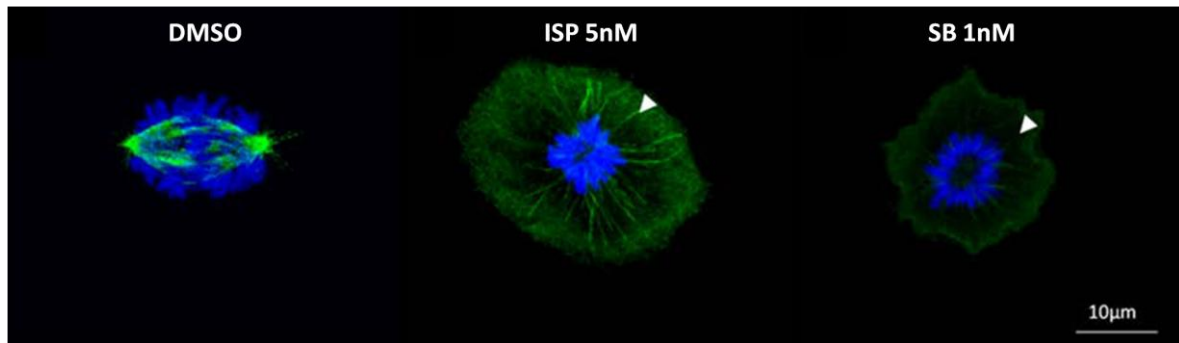


Figure 20 : Inhibition d'Eg5 dans les HUVEC. Lors de la mitose dans les cellules contrôles (DMSO), on observe la formation d'un fuseau mitotique bipolaire. L'inhibition de la kinésine Eg5 par deux inhibiteurs spécifiques de la protéine, l'ispinésinb mesylate ou le SB-743921 pendant 24h entraîne la formation d'un mono-astre de tubuline indiqué par les flèches. Ce mono-astre empêche la migration des chromosomes aux pôles de la cellule mère afin de se répartir équitablement dans les deux futures cellules filles (122).

(2) MKlp2 et cancers

KIF20A est décrit comme étant surexprimé dans la plupart des cancers (base de données Gene Expression Atlas <http://www.ebi.ac.uk/gxa/>) notamment dans le glioblastome, le cancer de l'estomac (124, 125) ou le cancer de la vessie (126, 127). Nous nous sommes demandés si le rôle de MKlp2 dans les cancers était uniquement lié à son rôle mitotique ou si elle pouvait avoir une autre fonction telle qu'une implication dans l'angiogenèse tumorale et la récurrence des glioblastomes par une contribution à la migration, la différenciation ou le trafic intracellulaire des cellules cancéreuses.

Récemment KIF20A a été décrit comme marqueur d'agressivité dans le cancer du foie (128). Il est significativement surexprimé dans les lignées d'hépatome et dans les biopsies d'hépatocarcinome, cette surexpression corrèle avec une instabilité chromosomique marquée, et un état peu différencié des cellules tumorales. C'est donc un marqueur de malignité des hépatocarcinome. Lors de la régénération du foie suite à une lésion, son ARNm s'accumule dans les cellules proliférantes avec un fort risque d'évolution tumorale. L'inhibition de KIF20A par siRNA dans les cellules du cancer du foie en culture (HuH7) interfère avec la cytokinèse et conduit à la polyploidisation des cellules et à une inhibition de la prolifération mais sans toutefois induire l'apoptose.

KIF20A est surexprimé de manière significative dans le cancer du pancréas ainsi que dans le mélanome et il a été proposé comme cible thérapeutique pour ces tumeurs (129). Dans le cancer du pancréas, KIF20A est décrit comme fortement surexprimé dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, ce qui en fait une cible de choix pour la mise en place d'une thérapie. Une étude (130) montre que MKlp2 permet le transport de la protéine DLG5 à la membrane au niveau des jonctions cellule-cellule où les deux protéines forment un complexe avec la β -caténine permettant ainsi la croissance des cellules cancéreuses. Ainsi l'inhibition de KIF20A entraîne la délocalisation de DLG5 ce qui diminue la viabilité des cellules cancéreuses et inhibe donc la croissance tumorale. Dans le cancer de l'estomac, l'expression de MKlp2 potentialise l'efficacité de la génistéine utilisée comme thérapie anti-cancéreuse (125). En effet, son inhibition permet une meilleure efficacité du traitement sur les cellules tumorales alors que sa surexpression entraîne une résistance. Dans le cas du mélanome le gène est surexprimé à la fois dans les cellules primaires et dans les métastases (131). Les patients surexprimant KIF20A présentent des mélanomes plus épais (3.2mm contre 1.9mm) et montrent une récurrence de la tumeur plus précoce que ceux avec une expression de MKlp2 plus

faible. L'épaisseur est un facteur pronostique défavorable du mélanome, KIF20A est donc considéré comme un marqueur mélanome. Si aucune preuve de son implication fonctionnelle n'a encore été publiée, Mklp2 est envisagée comme une cible de l'immunothérapie.

Dans le cas du syndrome myélodysplasique le traitement utilisé dans cette pathologie, le lenalidomide, inhibe l'angiogenèse, la cytokinèse et empêche la croissance des cellules tumorales (132). Expérimentalement, le lenalidomide entraîne une augmentation de l'apoptose et des cellules binucléées et diminue l'expression de KIF20A. Mklp2 serait donc l'une des cibles du lenalidomide dans cette maladie. Son inhibition entraîne la polyploïdisation des cellules cancéreuses conduisant à leur mort par apoptose et diminuant la progression tumorale. Dans de nombreux cancers, KIF20A permet la croissance tumorale en diminuant la polyploïdisation des cellules cancéreuses malgré leur prolifération rapide. Mklp2 pourrait donc être une cible thérapeutique prometteuse lors de l'inhibition de la croissance tumorale de nombreux cancers. Son inhibition par siRNA entraîne, de façon attendue, un défaut de la cytokinèse dans les cellules HeLa ou les tumeurs du foie (128), mais entraîne aussi des effets indépendants de la mitose comme la déstabilisation des lysosomes (133) entraînant la mort cellulaire dans le cas des MCF7 (cancer du sein) ou la diminution des contacts cellulaires entraînant une réduction de la viabilité des cellules tumorales pancréatiques (130). Dans ces deux modèles (MCF7 et cellules pancréatiques), l'inhibition de Mklp2 n'induit pas l'arrêt de la mitose ni la formation de cellules binucléées comme dans la plupart des lignées cellulaires. Dans ces cellules la fonction de Mklp2 semble liée au transport moléculaire, comme décrit dans le golgi via son interaction avec Rab6 (101), suggérant que Mklp2 possède un autre rôle dans certaines cellules tumorales, important pour la survie cellulaire et la tumorigenèse.

2. DPY19L1

a) Description du gène

Le gène DPY19L1 humain a été cloné la première fois en 1998 (134), il est composé de 22 exons et code pour une protéine de 77kDa qui contient 11 domaines potentiellement transmembranaires. Il appartient à une famille de 4 gènes issus de l'évolution du gène DPY19 de *C. elegans* (135). Chez le nématode, DPY19 présente une localisation membranaire (136). L'homologie de séquence laisse supposer que la protéine humaine est également membranaire, mais il existe peu de données quant à sa fonction et sa localisation subcellulaire. Le gène humain possède une expression ubiquitaire avec néanmoins quelques variations de son taux selon les tissus. Des analyses transcriptomiques le montre fortement exprimé dans le cerveau, les poumons, les testicules et les ovaires, le cœur, le foie et les reins. DPY19L1 est plus faiblement exprimé dans les muscles squelettiques, le pancréas et la rate. Dans le cerveau, DPY19L1 est exprimé dans les cellules épendymales chez le rat adulte, dans les cellules embryonnaires neuroépithéliales et dans les cellules souches neurales en culture. La protéine est fortement exprimée dans les cellules souches et les progéniteurs neuronaux mais est absente des neurones adultes (137).

b) Fonction connue

DPY signifie DUMPY, car la mutation d'un gène de cette famille entraîne la formation de nématodes plus courts que leurs congénères sauvages. DPY19 est impliqué dans la polarisation et la migration asymétrique des neuroblastes chez *C. elegans* (136). Lors du développement du nématode,

la cellule Q (précurseur des neuroblastes droits et gauches : QR et QL) donne naissance aux cellules QR et QL qui doivent ensuite migrer le long de l'axe antéro-postérieur afin de permettre le bon développement de l'organisme. La cellule QR migre vers l'avant et QL vers l'arrière. L'inhibition de DPY19 empêche la localisation correcte de ces cellules. Cette migration asymétrique est régulée par l'expression de la protéine Mab-5 dans ces cellules, son expression entraîne une migration antérieure et son absence induit la migration postérieure. L'expression de Mab-5 est régulée par DPY19. Chez l'Homme l'homologue de Mab-5 est la protéine Gsh2, un facteur de transcription nécessaire au développement des neurones GABAergiques. Une étude montre que Dpy19l1 est exprimée dans les neurones GABAergique en développement (137), elle semble donc avoir conservé sa fonction au cours de l'évolution des espèces. Une autre étude contredit ces données en démontrant que DPY19L1 est exprimé dans les neurones glutamatergiques en développement et est absent des neurones GABAergiques (138). Néanmoins ces deux études s'accordent sur le fait que dpy19l1 est impliquée dans la migration neuronale lors du développement cortical. Dans la seconde étude, les auteurs affirment que la protéine est responsable de la migration radiale des neurones glutamatergiques et pensent qu'elle serait aussi responsable de la formation des dendrites. Dpy19l1 étant prédite comme protéine membranaire, elle remplirait sa fonction de contrôle de la migration en transmettant des signaux extracellulaires.

c) Dpy19l1 et cancers

La protéine dpy19l1 est peu étudiée chez l'Homme, néanmoins elle est trouvée dérégulée dans de nombreux cancers par des études transcriptomiques ([Tableau 3](#)). Elle est notamment surexprimée dans le cancer du pancréas (Pancreatic Expression Database), le cancer du colon ou encore dans le glioblastome (Gene Expression Atlas). Le gène est sous exprimé dans quelques cancers comme le cancer de la prostate ou dans les oligodendrogliomes.

Tableau 3 : Analyses transcriptomiques de l'expression de DPY19L1 dans le cancer. Synthèse de plusieurs études réalisée à partir de Gene Expression Atlas.

Cancers	Régulation de DPY19L1	Etudes transcriptomiques
Glioblastome	Surexpression	E-GEOD-4290 , E-GEOD-4412
Adénocarcinome pulmonaire	Surexpression	E-MEXP-231 , E-GEOD-2514
Adénocarcinome œsophagien	Surexpression	E-GEOD-1420
Leucémie myéloïde aigüe	Surexpression	E-GEOD-14924
Cancer squameux de la tête et du cou	Surexpression	E-GEOD-6631
Cancer du poumon	Surexpression	E-GEOD-18842
Cancer colorectal	Surexpression	E-TABM-145 , E-GEOD-23878
Cancer du colon	Surexpression	E-GEOD-3726 , E-MEXP-3715
Carcinome nasopharyngial	Surexpression	E-GEOD-12452
Carcinome rénal à cellules claires	Surexpression	E-TABM-282
Sarcome rénal à cellules claires	Surexpression	E-GEOD-2712
Mélanome	Surexpression	E-GEOD-3189
Cancer du pancréas	Surexpression	E-GEOD-16515
Cancer de la prostate	Surexpression	E-MEXP-2034
Sarcome	Surexpression	E-GEOD-2719 , E-GEOD-21050
Carcinome rénal	Sous-expression	E-GEOD-7869
Cancer de la glande pituitaire	Sous-expression	E-GEOD-26966
Ostéosarcome	Sous-expression	E-MEXP-3628
Oligodendrogliome	Sous-expression	E-GEOD-4290
Carcinome ovarien séreux	Sous-expression	E-GEOD-14001
Cancer de la prostate	Sous-expression	E-TABM-26 , E-MEXP-1243

C. Projet de thèse

Le GBM est une tumeur dont la croissance et l'agressivité sont dépendantes de la vascularisation, c'est pourquoi la thérapie anti-angiogénique basée sur l'administration d'Avastin® a été autorisée dès 2009 pour tenter de ralentir la croissance des tumeurs récidivantes (42). Mais les cellules tumorales perçoivent cette inhibition comme un stress et réagissent en mettant au point des stratégies d'adaptation, en stimulant des voies angiogéniques alternatives ou en changeant de phénotype pour devenir plus agressives et invasives (51, 53-58, 61, 64). Les anti-angiogéniques n'apportent donc que peu de bénéfice à la survie des patients, et le GBM reste un cancer avec un très mauvais pronostic (paragraphe I.A.3.a)). C'est pourquoi la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques participant à la vascularisation de cette tumeur est nécessaire afin de limiter la croissance tumorale et de contrecarrer les mécanismes d'adaptation. La thématique du laboratoire est l'étude de l'angiogenèse physiologique et tumorale. En 2009, le groupe de Sophie Javerzat a identifié les gènes impliqués dans l'angiogenèse physiologique lors du développement de la CAM, dont certains sont surexprimés dans les tumeurs très vascularisées et notamment dans le GBM (paragraphe I.A.5, (92)). Les données de ce crible suggèrent que ces gènes sont surexprimés dans l'endothélium et pourraient donc avoir un rôle fonctionnel dans la vascularisation tumorale. D'autre part, le groupe de Sophie Javerzat et Martin Hagedorn a réalisé un second crible ayant permis d'identifier des gènes dont l'expression est régulé par la voie du VEGF (123). La compilation des

résultats de ces deux cribles nous a permis de sélectionner deux gènes, KIF20A et DPY19L1, qui sont exprimés à la fois lors de l'angiogenèse physiologique, surexprimés dans le GBM et dont l'expression semble contrôlée par la voie de signalisation du VEGF. Le but de ma thèse a été d'éprouver l'expression vasculaire de ces deux gènes chez les patients atteints de GBM, puis de mener une étude fonctionnelle afin de déterminer s'ils ont un rôle dans l'angiogenèse tumorale. D'autre part, le GBM étant une tumeur très hétérogène au niveau génétique, il n'existe que peu de marqueurs pronostiques fiables (11, 139). DPY19L1 et KIF20A étant fortement surexprimés dans le GBM, nous avons étudié leur potentiel pronostic dans une cohorte locale.

Dans un second temps, j'ai étudié l'échappement des GBM aux traitements anti-angiogéniques, tel que l'Avastin®, ainsi que l'implication de DPY19L1 et KIF20A dans ce processus via la mise en place d'un système d'étude *in vitro* et *in vivo*. Il est basé sur l'utilisation des cellules de patients atteints de GBM sélectionnées par le Pr Véronique Quillien (Centre Régional de Lutte contre le Cancer, Rennes) ayant la capacité de pousser sous forme de neurosphères et contenant une forte population de cellules souches, des cellules progénitrices et différenciées dont certaines expriment le marqueur endothélial CD31. Ce système permet de modéliser l'hétérogénéité cellulaire du GBM et devrait donc être plus proche de la réalité tumorale que les modèles de lignées adhérentes. Etant donné le rôle capital des cellules souches de GBM dans l'invasion tumorale et leur capacité de résistance aux traitements, les lignées de neurosphères constituent un modèle essentiel pour étudier la résistance du GBM aux traitements. Nous avons testé la capacité de ces lignées à former des tumeurs *in vivo* suite à leur implantation chez la souris immunodéficente. Ce modèle nous a permis d'étudier l'effet des anti-angiogéniques sur ce type de tumeur et de tester une combinaison de molécules ayant montré un effet anti-invasif sur les tumeurs U87. Cette étude avait pour but principal d'étudier la résistance aux anti-angiogéniques ainsi que l'implication des gènes candidats dans ce processus et la progression tumorale.

II. Matériels et méthodes

A. Obtention des échantillons tumoraux humains

Les cryocoupes GBM et les extraits ARNm des 50 patients ayant permis cette étude ont été obtenus auprès de la tumorotheque CHU du canceropole du Grand Sud Ouest en collaboration avec le Docteur Hugues Loiseau. Les lames et les ARNm sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Les coupes de GBM paraffinées (FFPE) ont été obtenues auprès du Docteur Sandrine Eimer, anatomopathologiste au CHU de Bordeaux, et sont stockées à température ambiante à l'abri de l'humidité jusqu'à leur utilisation.

B. Histologie

1. Coloration Hématoxyline-Eosine

Les lames congelées sont mises à température ambiante pendant 10 minutes. Elles sont fixées à l'éthanol 70° pendant 30 secondes puis rincées à l'eau distillée pendant 30 secondes. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline (ou hémalum en solution selon Mayer, Merk) pendant 30 secondes puis rincées à l'eau courante pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite trempées dans un bain d'éosine-éthanol 70% (1 :1) pendant 30 secondes. Enfin, les coupes sont déshydratées par bains successifs d'éthanol 70%, 80%, 95% et 100% puis, suite à deux bains dans du toluène, sont montées sous lamelles à l'aide de Pertex Mounting media (HistoLab).

Les coupes FFPE sont d'abord réhydratées par des bains successifs dans du toluène puis dans de l'éthanol 100%, 95%, 70% et 50% puis sont colorées selon le protocole classique décrit précédemment pour les coupes congelées.

2. Hybridation *in situ*

La méthode d'hybridation utilisée dans la cadre de ma thèse est basée sur des sondes oligonucléotidiques et non pas ARN comme la méthode classique. Elle permet de s'affranchir du clonage et des mises au point fastidieuses rencontrées avec les sondes ARN classiques. C'est la technique QuantiGene® ViewRNA développée par Panomics et Affymetrix (Figure 21).

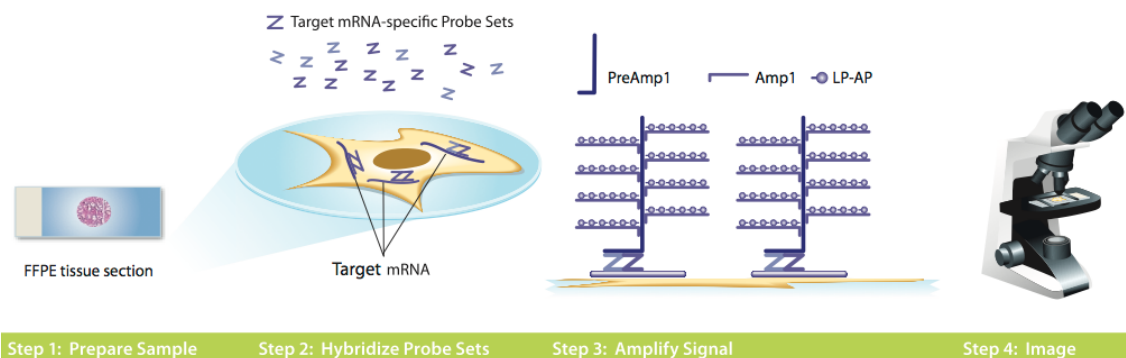


Figure 21 : Méthode d'hybridation *in situ* QuantiGene® ViewRNA sur coupes FFPE. Panomics | Affymetrix Sur des coupes de tissu paraffiné sont hybridées les sondes oligonucléotidiques en duplex (>=10 duplex par gène). Sur chaque duplex vient se fixer un système d'ADN branché en 3 couches différentes, la révélation se fait par le fast red, substrat de la phosphatase alcaline, qui est observable à la fois en lumière transmise (blanche) et en fluorescence. Ce système de révélation est très sensible et permet de détecter environ 10 molécules d'ARN correspondant à un seul gène par cellule.

Les coupes de tissus paraffinés de 4 à 6 µm d'épaisseur sont placées 30 minutes à 60°C puis fixées 1h avec du formaldéhyde 10% à température ambiante. Le tissu est déparaffiné à 80°C puis dans deux bains successifs d'HistoClear (National Diagnostics) et rincé dans deux bains d'éthanol 95%. Les lames sont ensuite séchées puis mises à bouillir dans la solution de prétraitement 1X à 100°C. Les tissus sont ensuite rincés deux fois avec de l'eau distillée et du PBS 1X puis digérés à la protéase à 40°C en chambre humide, le temps d'incubation est dépendant du tissu, afin de permettre à la sonde d'accéder à l'ARN. Après deux rinçages dans du PBS 1X, les coupes sont de nouveau fixées au formaldéhyde 4% pendant 5 min à température ambiante avant d'y hybrider la sonde pendant 3h à 40°C en chambre humide. Les lames sont ensuite conservées toute la nuit dans du tampon SSC 6X à température ambiante.

Le lendemain les tissus sont hybridés avec un système d'ADN branché en 3 étapes afin d'amplifier le signal et d'optimiser le signal obtenu. Les étapes de pré-amplification et d'amplification consistent en deux incubations d'1h à 40°C en chambre humide des coupes en présence des sondes PreAmp puis Amp ([Figure 21](#)). Entre chaque hybridation les coupes sont rincées trois fois dans le tampon de lavage aqueux. L'hybridation des coupes avec la sonde marquée à la phosphatase alcaline (LP-AP) est réalisée pendant 30 min à 40°C. Les lames sont rincées dans le tampon de lavage puis sont incubées avec l'AP-enhancer à température ambiante qui est la dernière étape d'amplification. La révélation se fait avec du Fast Red, substrat de la phosphatase alcaline, préparé dans du tampon naphtol (100mg dans 5mL) pendant 1h à 40°C. Les coupes sont rincées au PBS 1X, fixées au formaldéhyde 4% et de nouveau rincées au PBS 1X. Le tissu est contre-coloré à l'hématoxyline de Gill, rincé à l'eau courante puis dans de l'hydroxyde d'ammonium 0.01%. Les lames sont ensuite séchées puis montées à l'aide d'UltraMount (DAKO).

Toutes les incubations à 40°C en chambre humide ont été réalisées dans un four à hybridation *in situ*. Lors de ces étapes, afin d'éviter l'évaporation des réactifs, les lames sont recouvertes d'un morceau de parafilm.

La révélation au Fast Red permet d'obtenir un signal qui est observable à la fois en lumière transmise (blanche) et en fluorescence. Ce système de révélation est très sensible puisqu'il permet de détecter environ 10 molécules d'ARN, correspondant à un seul gène, par cellule.

3. Immunohistologie

Les coupes de tissus congelées sont sorties du congélateur à -80°C et laissées à température ambiante puis fixées au PAF 4% à RT avant d'être perméabilisées dans du PBS-0.1% Triton. Le blocage des sites aspécifiques se fait dans du PBS-BSA 5% 1h à température ambiante. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 1X-1% BSA ([Tableau 4](#)) sur la nuit à 4°C. Après plusieurs rinçages au PBS 1X, les tissus sont incubés avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (FluoProbes®, Interchim). Le montage des lames se fait à l'aide du milieu fluoromount (Interchim) contenant du DAPI.

Tableau 4 : liste des anticorps utilisés en immunohisto-cytochimie et western blot

Anticorps primaire, dilution (Hôte, Référence)	Anticorps secondaire
Immunohistologie	
CD31 humain, 1/100 (souris, DAKO)	Chèvre anti-souris 488, 547 ou 647 (Interchim)
Nestine humaine, 1/100 (souris, Millipore)	
Vimentine humain, 1/400 (souris, Interchim V9)	
α SMA humain, 1/100 (souris, DAKO)	
Endogline humain, CD105 (souris, B&D)	
Desmine humain, 1/100 (souris, DAKO)	
CD31 souris, 1/100 (rat, santacruz MEC13.3)	Chèvre anti-rat 547 (Interchim)
MKlp2 humain, 1/200 (chèvre, santacruz sc-104954)	Ane anti-chèvre 488 (Interchim)
MKlp2 humain, 1/200 (lapin, Abnova PAB 18406)	Chèvre anti-lapin 488 (Interchim)
MKlp2 humain, 1/500 (lapin, LSBio)	
Dpy19l1 humain, 1/500 (lapin, Abcam)	
Immunocytologie	
α -tubuline humain, 1/3000 (souris, Sigma T5168)	Chèvre anti-souris 547 (Interchim)
Phalloïdine rhodamine 1/2000 (Invitrogen)	Aucun
Western Blot	
Ki67, 1/500 (souris, DAKO MIB-1)	Chèvre anti-souris IRDye 680 ou 800 (LI-COR Bioscience)
HIF-1 α , 1/500 (souris, BD Biosciences)	
Actine, 1/500 (chèvre, santacruz sc-1616)	Ane anti-chèvre IRDye 800 (LI-COR)
MKlp2, 1/2000 (lapin, Bethyl laboratories)	Chèvre anti-lapin IRDye 680 (LI-COR)

C. Culture cellulaire

1. Lignées cellulaires

a) Cellules adhérentes

Les cellules de la lignée cellulaire hCMEC/D3 « human Cerebral Microvascular Endothelial Cells » (don du Dr. P. O. Couraud, Institut Cochin, Paris) sont cultivées dans un milieu EBM 2 (Lonza) complété par un kit EGM-MV singlequots (Lonza) contenant les nutriments nécessaires au maintien du métabolisme basal des cellules. La culture des hCMEC/D3 nécessite un prétraitement des boîtes de pétri avec de la gélatine 0.2%-PBS 1X (BD biosciences), qui permet l'adhérence des cellules au support, à 37°C et 5% CO₂.

La lignée U87 (ATCC/LGC Promochem, Molsheim, France), est cultivée en milieu DMEM 4.5g/L D-glucose (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) enrichi avec du sérum de veau fœtal à 10%, en présence de 100 U/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine, et 1% de L-glutamine (Dulbecco's) dans une atmosphère humide 5% CO₂ à 37°C.

b) Neurosphères

Les lignées de neurosphères ont été obtenues auprès du Dr Francis Belloc (Université Bordeaux 2). Elles ont été établies par l'équipe du Pr V. Quillien (IGDR, Université de Rennes 1) à partir d'échantillons de GBM humains, obtenus chez des patients admis en service de Neurochirurgie du CHU de Rennes (Pr Brassier), pour résection de tumeur cérébrale. Ils ont donné leur consentement après information selon la Loi du comité d'éthique en vigueur. Les tumeurs prélevées

ont toutes été diagnostiquées comme étant des astrocytomes infiltrant de grade IV selon l'OMS. Après dissociation mécanique des tissus tumoraux, les cellules ont été cultivées, selon les conditions, soit en Neurosphères (NS) : NS 85, NS 125, NS 142 soit en cellules adhérentes (Adh) : GBM Adh 85, GBM Adh 125, GBM Adh 142.

Les NS sont cultivées en plaque 24 puits dans du milieu DMEM/F12 (GIBCO, Invitrogen) contenant du supplément B27 et N2 (Invitrogen) avec 20ng/mL de bFGF et 20 ng/mL de EGF (PeproTech) pendant 14 jours. Les sphères sont ensuite dissociées par de la trypsine-EDTA PBS 1/250 (Promocell) puis les cellules vivantes sont comptées à la cellule de malassez avec du bleu trypan. Les cellules sont ensuite réensemencées à 10^4 cellules par puits dans les 8 puits du centre d'une plaque 24 puits. Les premières sphères apparaissent au bout de 4 à 5 jours. Entre les passages, tous les 3 à 4 jours la moitié du milieu est remplacée par du milieu neuf afin d'éviter qu'elles ne se différencient et pour leur permettre de continuer à proliférer.

Les cellules de ces lignées sont cultivées sous forme adhérente en présence de DMEM 10% SVF. Aucun pré-traitement des plaques/boîtes de culture n'est nécessaire pour la culture de ces cellules sous forme NS ou Adh.

2. Transfection siRNA

Les cellules sont transfectées avec le siRNA KIF20A (SMARTpool : ON-TARGETplus KIF20A siRNA, ThermoFisher) à 25pM selon le protocole de la Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen). Rapidement, d'un côté la lipofectamine est mélangée avec de l'opti-MEM (Invitrogen) et de l'autre le siRNA est dilué dans l'opti-MEM, les deux préparations sont combinées puis incubées à température ambiante pendant 20 min avant d'être ajoutées dans le milieu de culture.

3. Test de prolifération

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits de façon à être à environ 10% de confluence (3000 cellules par puits pour les U87) en milieu complet puis incubées à 37°C-5% CO₂ quelques heures le temps d'adhérer au plastique ou à la matrice selon les cellules. Le milieu est ensuite changé pour du milieu sans sérum afin de ralentir la croissance des cellules toute la nuit pour les synchroniser. Le lendemain les cellules sont traitées puis placées à l'IncuCyte™ (Essen Bioscience) pendant 96h. L'IncuCyte est un système d'imagerie cellulaire composé d'un microscope automatisé et compact placé dans un incubateur de culture. Il permet ainsi d'observer une cinétique cellulaire sur le long terme comme les phénomènes de prolifération et migration/invasion cellulaire, ou encore de mesurer l'apoptose induite par l'utilisation de drogue sur les cellules. L'appareil est couplé à un logiciel qui permet l'analyse des résultats. Une photo est prise toutes les deux heures afin de mesurer l'évolution de la confluence dans chaque puits au cours du temps.

4. Test de migration/invasion

a) Par chimiotaxie en chambre de Boyden

La migration/invasion en chambre de Boyden consiste à faire se déplacer les cellules par chimiotactisme à travers une membrane poreuse.

- Retrait des cellules sur la face supérieure
- Coloration des cellules sur la face inférieure

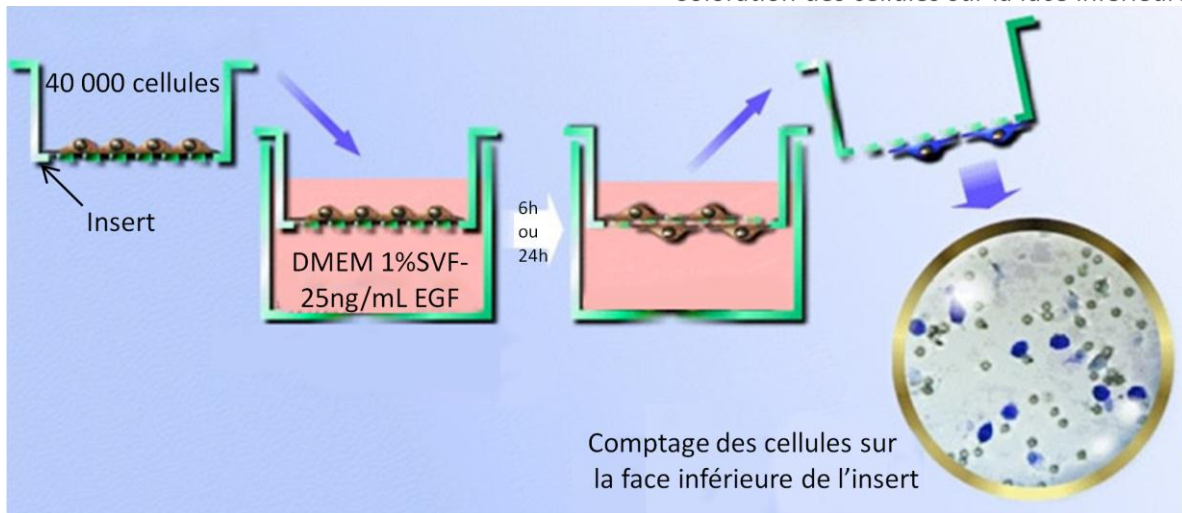


Figure 22 : Schéma de la migration/invasion en chambre de Boyden. Les cellules sont déposées sur la face supérieure de l'insert dans du milieu minimum, sous l'insert est placé du milieu 1% SVF dans lequel a été ajouté 25ng/mL d'EGF, modifié d'après <http://www.123bio.net/revues/jchabry/6d.html>.

Les NS sont dissociées puisensemencées à 40000 cellules par puits dans du DMEM sans sérum. Sous les inserts sont placés 750µL de milieu DMEM 1% SVF contenant 25ng/mL d'EGF. Pour la migration en chambre de Boyden, les cellules sont incubées 6h à 37°C 5% de CO₂ en normoxie ou hypoxie (0.1% O₂). Pour l'invasion, les chambres sont préalablement recouvertes de 10µg de matrigel non réduit (BD Biosciences) dilué dans du DMEM sans sérum, puis les cellules sont incubées 24h à 37°C en normoxie ou hypoxie.

Les chambres de Boyden sont ensuite fixées au PAF 4% puis les cellules ayant envahi/migré à travers la chambre sont colorées au DAPI afin d'être dénombrées au microscope. Le comptage des cellules est réalisé à l'aide du logiciel image J et les statistiques sont réalisées par un test non paramétrique de Mann-Whitney.

b) Par haptotaxie à l'IncuCyte

La migration/invasion à l'IncuCyte consiste à mesurer la migration des cellules suite à la création d'une cicatrice dans le tapis cellulaire grâce au « WoundMaker™ » (Essen Biosciences). Le WoundMaker est composé d'un support pour les plaques de culture cellulaire et d'un couvercle composé de picots de précision permettant la formation de cicatrices identiques dans chaque puits de la plaque sans altérer la matrice sur laquelle sont adhérentes les cellules.

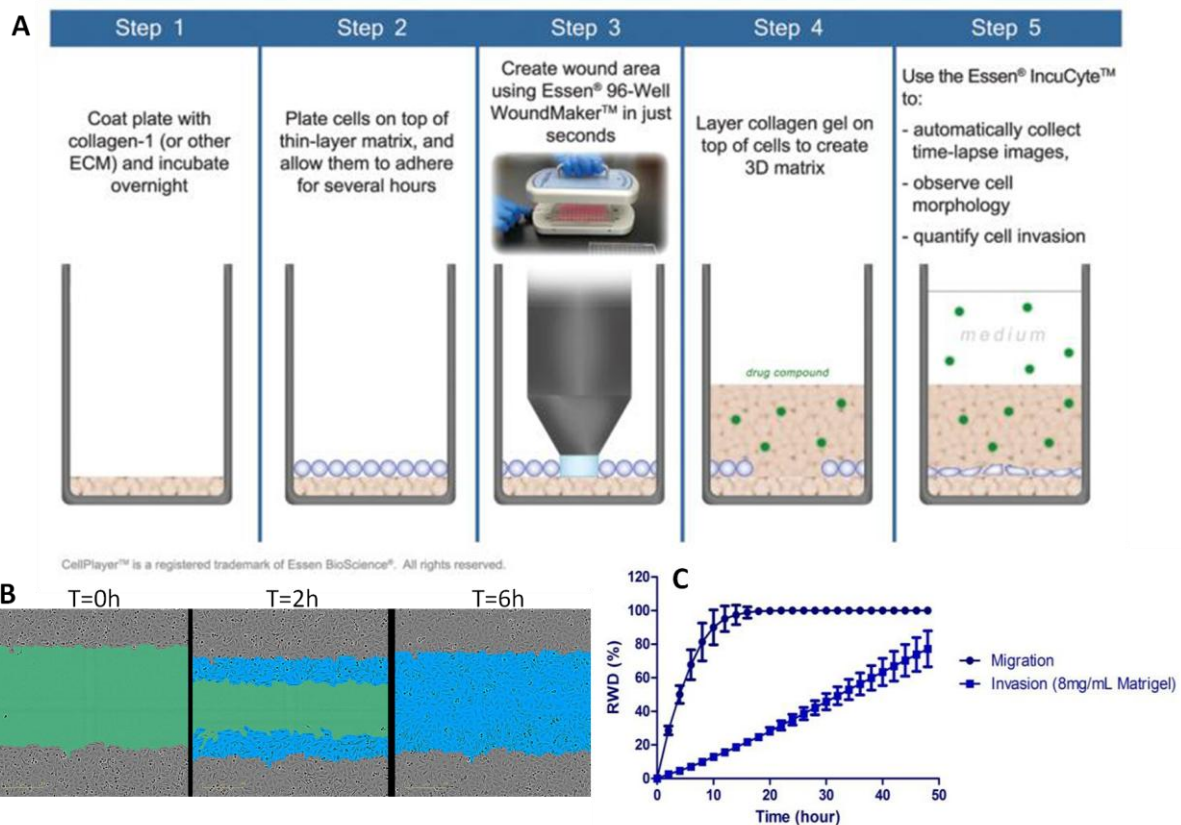


Figure 23 : Méthode de migration/invasion par cicatrice à l'aide du wound maker pour une expérience à l'IncuCyte. Les cellules sontensemencées sur une matrice en plaque 96 puits calibrée pour l'IncuCyte (ImageLock Plate Essen) afin de former un tapis cellulaire (A), une cicatrice est ensuite réalisée en plaçant la plaque dans le « wound maker ». Ce système permet d'obtenir des cicatrices identiques dans tous les puits. Les cellules migreront vers l'intérieur de la cicatrice (B). La plaque est ensuite placée dans l'incubateur contenant l'IncuCyte qui photographiera les puits toutes les 2h et mesurera la densité relative de cellules dans la cicatrice au cours du temps (C). RWD = relative wound density correspond au pourcentage de cellules ayant migré dans la cicatrice.

Pour la migration, les cellules sontensemencées en plaque 96 puits prétraitée sur la nuit avec du matrigel non réduit (100µg/mL) de façon à former un tapis confluent. Une cicatrice est réalisée à l'aide du « wound maker » (Figure 23), les cellules sont rincées avec du milieu sans sérum afin d'enlever les cellules non adhérentes. Les traitements sont ensuite appliqués sur les cellules et la plaque est placée à 37°C 5%CO₂ dans l'IncuCyte qui prend des photos toutes les 2h pendant 6 à 12h grâce à un système de caméra relié à un objectif de microscopie inversée.

Pour l'invasion, après avoir fait la cicatrice, les cellules sont d'abord recouvertes avec du matrigel non réduit (100µg par puits) dilué dans du milieu sans sérum, puis placées 30min à 37°C 5%CO₂ avant d'appliquer le traitement. L'invasion dure entre 24 et 48h.

L'IncuCyte mesure la densité relative dans la cicatrice reflétant la migration/invasion des cellules en un temps donné (Figure 23C).

5. Immunocytologie

Les cellules sontensemencées sur des disques de verre de 12 ou 14 mm de diamètre placés dans des plaques 4 puits puis incubés à 37°C, 5% CO₂. Selon les cellulesensemencées, les disques

sont préalablement traités ou non avec de la gélatine 0.2%-PBS 1X. Le protocole de marquage des cellules est similaire à l'immunohistochimie.

Brièvement les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4%, puis incubées avec l'anticorps primaire ([Tableau 4](#)) dilué dans du PBS 1X-0.1% Triton-1% BSA sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire dilué de la même façon que le primaire, à température ambiante. Les disques sont ensuite fixés sur une lame de microscope à l'aide de fluoromount contenant du DAPI.

D. Xénogreffe de cellules tumorales chez la souris

1. Implantation intracérébrale de NS

L'ensemble des expériences menées sur les animaux ont obtenu l'agrément du comité d'éthique en expérimentation animale.

Avant les implantations, les souris Rag2/γc (140), femelles et âgées de 12 à 15 semaines en moyenne, sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de 90μl d'anesthésiant (soit 1.5mg/Kg de Kétamine et 150μg/Kg de Xylazine).

La boîte crânienne est rendue accessible par une incision de la peau au dessus, la zone est ensuite nettoyée à la bétadine puis la souris est installée dans l'appareil stéréotaxique où elle est maintenue par des barres d'oreille placées contre ses tempes et par un porte-mâchoire ([Figure 24A](#)). L'aiguille est placée à 2.5mm sur la gauche du bregma, le point d'intersection entre la suture sagittale et la suture coronale ([Figure 24B](#)). L'injection des cellules est ensuite réalisée dans l'hémisphère gauche à 2.5mm de profondeur.

Les cellules implantées sont les neurosphères NS85, NS125 et NS142 dissociées, à raison de 5000 cellules par souris dans 1 à 3 μL.

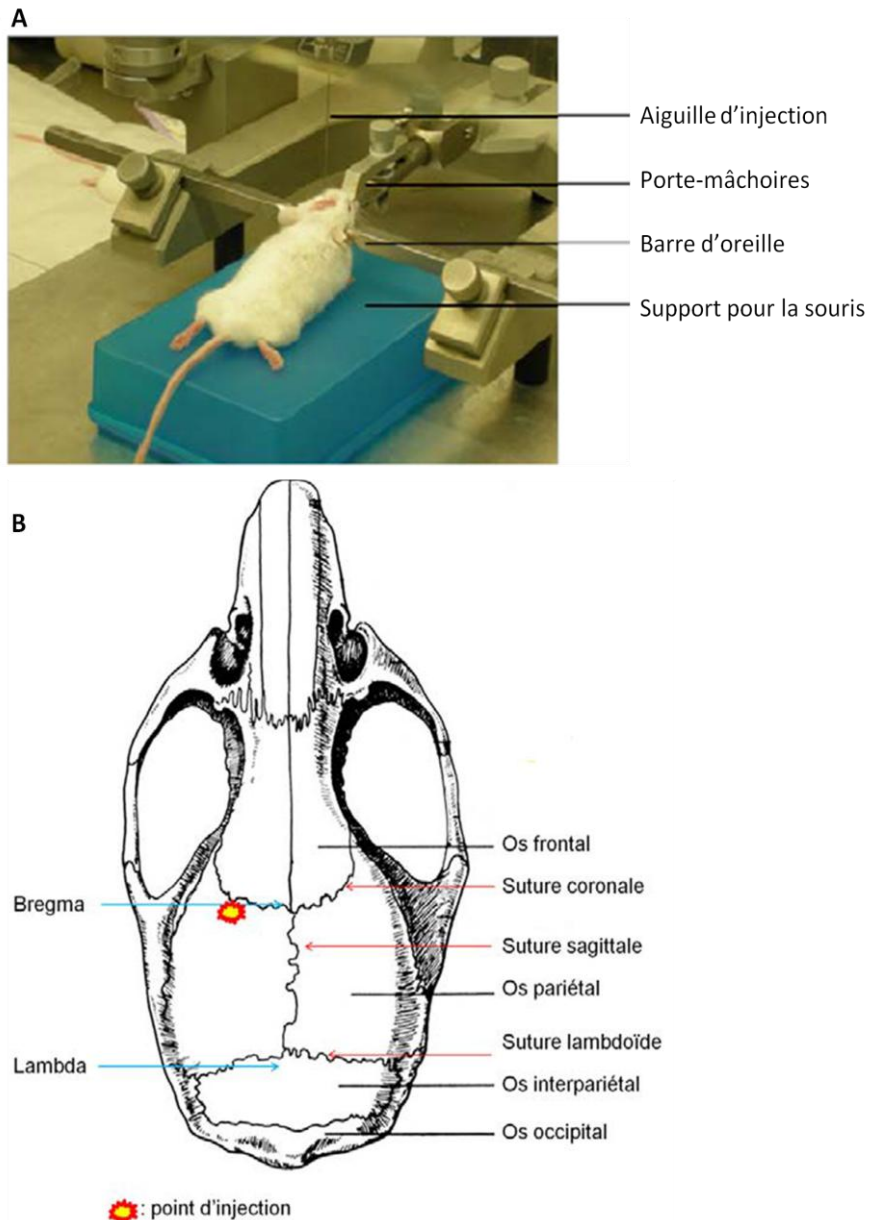


Figure 24 : Injection de cellule tumorale en intracérébrale chez la souris Rag2/yc. A. Appareil stéréotaxique servant à l'implantation des cellules tumorales, B. Schéma du crâne de souris représentant le point d'implantation des cellules, à 2.5mm du bregma et à 2.5mm de profondeur.

2. Traitement des animaux

Les différents traitements sont appliqués par injection en intra-péritonéale deux fois par semaine jusqu'au sacrifice des souris. Les souris implantées sont divisées en quatre groupes :

- Groupe contrôle : injection de sérum physiologique
- Groupe Avastin® : injection de 10mg/kg d'Avastin®
- Groupe Actemra : injection de 25mg/kg d'Actemra
- Groupe Combo : injection d'Avastin® (10mg/kg) et d'Actemra (25mg/kg)

Les drogues sont diluées dans du sérum physiologique pour un volume final de 100µL par souris.

3. Sacrifice des animaux et récupération des cerveaux

Une souris de chaque groupe est sacrifiée par dislocation cervicale tous les 15 jours suite aux premiers traitements, le cerveau est prélevé puis placé dans un tube dans l'azote le temps de sa congélation. Les cerveaux sont conservés à -80°C sans être inclus dans de l'OCT, méthode classique de congélation pour histologie, avant d'être coupés au cryostat. Les souris sont sacrifiées si elles présentent des signes de souffrance (cachéxie).

Les cerveaux congelés sont placés dans le cryostat Leica CM1850 afin de réaliser des coupes à 10µm placées sur des lames gélatinées (STA-ON, Leica).

E. Biologie moléculaire

1. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN à partir de culture cellulaire est réalisée par traitement au TriZol® (Invitrogen). Les cellules sont lysées dans le TriZol (1mL de TriZol pour 1 million de cellules), du chloroforme est ajouté afin de séparer la phase phénolique de la phase aqueuse, contenant les ARNm, par centrifugation à 12000g à 4°C. La phase aqueuse est prélevée puis les ARN sont précipités à l'aide d'isopropanol par centrifugation à 12000g à 4°C. Enfin le culot est lavé à l'éthanol 75% puis séché et les ARNm sont solubilisés dans de l'eau sans RNase.

Les ARNm sont ensuite dosés à l'aide du spectrophotomètre UV-visible nanodrop 1000 (Labtech) qui mesure leur concentration en ng/µL.

2. Reverse transcription (RT)

Les ARNm sont retro-transcrits en ADN complémentaires grâce au kit QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen. Les ARNm purifiés au TriZol (200ng à 1µg) sont incubés 2 à 3 min à 42° avec l'enzyme gDNA wipeout (1x) afin d'éliminer les éventuelles contaminations par l'ADN génomique. La synthèse d'ADNc est ensuite réalisée par l'incubation des ARNm avec la reverse transcriptase (1U) contenant l'inhibiteur de RNase, le tampon de l'enzyme (1X) et le mélange de primer, 20min à 42°C. L'enzyme est ensuite inactivée par une courte incubation à 95°C.

3. PCR quantitative relative

Les ADNc sont utilisés pour amplifier les gènes DPY19L1, FSTL1 et KIF20A humains ([Tableau 5](#)) ainsi que le gène de ménage HPRT grâce au thermocycleur Mx3000P® qPCR system (Stratagene, Agilent Technologies). Le mélange réactionnel est composé du super mix SYBR green 1X (ThermoFisher scientific), 150nM d'amorce est ajouté à 2µL d'ADNc. La PCR se déroule ensuite en 3 étapes : la première étape se déroule à 95°C pendant 10min afin d'activer l'enzyme, la seconde comprend 40 cycles de 3 séquences : 30s à 95°C, 1 min à 55°C et 1 min à 72°C, et la dernière étape correspond à la courbe de dissociation afin de vérifier la spécificité de l'amplification : 1min à 95°C, 30s à 55°C et 30s à 95°C.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées

Gènes	Amorces PCR	Taille de l'amplicon
KIF20A	Sens : 5' tcatgtggccaagttctcag 3' Anti-sens : 5' tccttgatgaacgagtgagc 3'	93 pb
FSTL1	Sens : 5' ccatctttcaaccctcctga 3' Anti-sens : 5' acagaccaatttccacagg 3'	117 pb
DPY19L1	Sens : 5' aaagcagccgaagaagtga 3' Anti-sens : 5' ttcaggcactactgcaacca 3'	112 pb
HPRT	Sens : 5' ccagacaagttgtgttagg 3' Anti-sens : 5' tccaaactcaactgaactc 3'	113 pb

Les amorces sont préalablement validées afin de vérifier qu'elles permettent bien une analyse quantitative des ARNm. Pour cela une courbe standard est réalisée à partir de l'amplification de dilutions sériées d'ARNm de référence. Les amorces dont l'efficacité de PCR est comprise entre 95 et 105% sont validées afin de réaliser des études d'expression par qPCR (Figure 25).

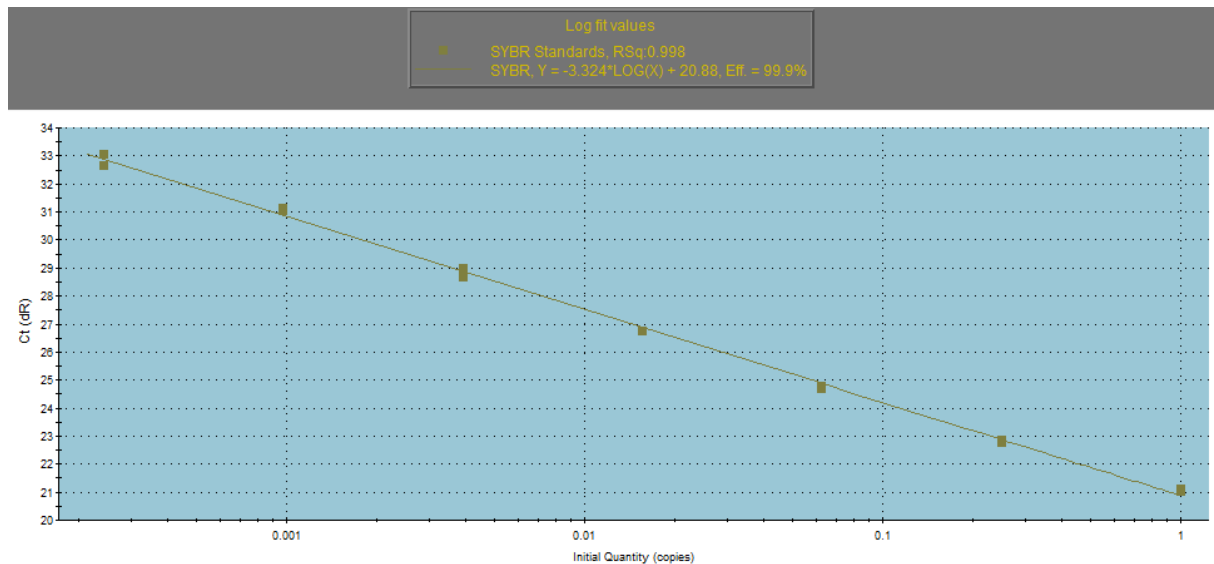


Figure 25 : courbe standard de validation des amorces pour la PCR quantitative. Les ADNc sont dilués au 1/4, 1/16..., la qPCR est réalisée puis l'efficacité de PCR est calculée grâce à la droite correspondant à la quantification relative obtenue pour les différentes dilutions.

4. Western Blot

a) Extraction de protéines

Les cellules sont lysées dans le tampon de charge 4x du western blot composé de 20mM de Tris-HCl pH6.8, 8%SDS, 0.4% de bleu de bromophénol, 40% glycérol et 400mM de béta-mercaptoéthanol. Les protéines sont ensuite dénaturées 5 min à 100°C avant d'être déposées sur le gel de polyacrylamide.

b) Western blot

Le gel est composé de deux parties : la partie résolutive (8 à 10% acrylamide/bisacrylamide, 0.4M tampon Tris pH8.8, 0.1% SDS, 0.1% APS et 0.3% TEMED) précédée du gel de concentration (4% acrylamide/bisacrylamide, 0.125M tampon Tris pH6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.3% TEMED). La migration se fait dans le tampon de migration (0.25M Tris, 1.92M glycine, 0.1%SDS) à 50V le temps

de concentrer les protéines dans le gel 4% puis à 100V pour les séparer selon leur taille. Le transfert est réalisé en milieu liquide (tampon de migration 80% - éthanol 20%) sur une membrane de nitrocellulose à 100 V.

La membrane est rincée au PBS 1X avant d'être saturée 1H à température ambiante sous agitation dans du tampon Odyssey (Odyssey Blocking Buffer, LI-COR). Elle est ensuite incubée avec les anticorps primaires dilués (Tableau 4) dans le tampon Odyssey – 0.1% Tween-20 toute la nuit à 4°C en rotation. Le lendemain, la membrane est rincée au PBS 1X-0.1% Tween-20 puis incubée avec l'anticorps secondaire dilué au 1/2000 (Tableau 4) dans le tampon Odyssey – 0.1% Tween-20 – 0.02% SDS 2h à température ambiante en rotation. Suite à plusieurs lavages dans du PBS-Tween et du PBS, la membrane est lue à l'Odyssey (LI-COR Odyssey Infrared Imaging System).

La quantification du signal est réalisée avec Image J.

F. Analyses statistiques

Les analyses statistiques et les représentations graphiques des données sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les données sont représentées avec une barre d'erreur correspondant à la SEM. Les tests statistiques réalisés sont le Mann-Whitney ou le test de Kruskal-Wallis suivi du test secondaire de Dunn selon le nombre de conditions comparées. Pour les analyses à plusieurs facteurs une ANOVA à deux voies est réalisée suivie du test de Bonferroni.

III. Résultats et Discussion

A. **Mise en évidence de nouveaux marqueurs vasculaires du GBM**

1. **Sélection de gènes potentiellement impliqués dans l'angiogenèse tumorale**

a) Introduction

Le GBM est une tumeur très complexe et hétérogène au niveau cellulaire, avec un rôle prépondérant des cellules souches tumorales qui pourraient être impliquées dans la récurrence. L'hétérogénéité est aussi marquée au niveau génétique (11), ce qui fait que malgré le développement des approches moléculaires afin de mieux comprendre les mécanismes mis en place dans son développement, il existe très peu de marqueurs d'expression fiables. C'est pourquoi la recherche de nouveaux marqueurs pronostiques et/ou nouvelles cibles thérapeutiques potentielles est nécessaire dans la lutte contre ce cancer qui reste incurable (139). Le GBM étant l'un des cancers solides les plus vascularisés, l'angiogenèse et les mécanismes de vascularisation sont la cible de nombreuses thérapies sans néanmoins apporter de bénéfice sur la survie globale des patients. En effet, comme présenté en introduction (paragraphe I.A.3.b)), le GBM s'adapte à ces traitements et récidive. Le laboratoire s'intéresse à la caractérisation de nouveaux modulateurs de l'angiogenèse dans les tumeurs solides comme le GBM, dont certains pourraient contribuer à la croissance tumorale et/ou à la récurrence en aval ou indépendamment du VEGF chez les patients traités à l'Avastin®.

Le crible présenté dans l'introduction a permis d'identifier les gènes potentiellement endothéliaux fortement surexprimés dans quatre cancers solides fortement vascularisés que sont le GBM, le cancer rénal à cellules claires, l'adénocarcinome pulmonaire et le cancer du colon ([Tableau 1](#)). Parmi eux se trouvent des gènes déjà connus pour leur implication dans l'angiogenèse physiologique, comme GTF2IRD1 (141), des gènes impliqués dans la tumorigenèse comme TTK (142), KIF20A ou KIF2C (143) mais non étudiés dans l'angiogenèse, et enfin des gènes, comme DPY19L1, dont la fonction était complètement inconnue chez l'Homme lorsque j'ai effectué mes travaux.

Lorsque je suis arrivée au laboratoire, le groupe de Sophie Javerzat et Martin Hagedorn s'intéressait aux gènes dont l'expression est régulée par le VEGF, acteur principal de l'angiogenèse (article Annexe 1 (123)). Un des objectifs de cette recherche était d'identifier des facteurs pro-angiogéniques en aval du VEGF, pouvant promouvoir l'angiogenèse dans le contexte d'un traitement avec l'Avastin®. Ce criblage a été mené sur le modèle de la CAM dont l'angiogenèse a été stimulée par application de VEGF-A humain. Une analyse transcriptomique (Affymetrix) a permis d'identifier les gènes exprimés de façon différentielle après induction de l'angiogenèse. Ceux dont l'ARNm était enrichi dans les cellules endothéliales, par rapport aux autres types cellulaires, ont été déterminés par analyses bioinformatiques. Puis les orthologues humains des gènes sélectionnés ont été identifiés. Les résultats montrent que le VEGF régule, comme attendu, des gènes endothéliaux tels que KDR (VEGFR2) ou PECAM1 (cd31) mais aussi des gènes non associés à l'angiogenèse à ce jour. Parmi ces derniers, on retrouve des membres de la famille des kinésines mitotiques étudiées par Prisca Exertier lors de sa thèse. Elle a notamment montré que KIF11/eg5 avait un rôle dans l'angiogenèse physiologique et tumorale indépendamment de son rôle mitotique. J'ai participé à la publication de ces résultats en réalisant des immunomarquages mettant en

évidence l'expression vasculaire d'Eg5 dans le carcinome rénal à cellules claires (article Annexe 1 (123)).

J'ai effectué une analyse bibliographique de ces gènes afin d'identifier ceux qui, de par leur structure, leur fonction ou leur profil d'expression, avaient le plus de chance d'être impliqués dans l'angiogenèse tumorale. La compilation des données a fait ressortir 4 gènes qui sont à la fois surexprimés dans les cancers fortement vascularisés et dont l'expression est induite par le VEGF suggérant leur implication dans l'angiogenèse physiologique et tumorale : TTK, KIF20A et KIF2C, ainsi que DPY19L1 (Tableau 1). TTK, KIF20A et KIF2C sont des protéines mitotiques. TTK est déjà couramment étudiée dans le contexte tumoral mais aucun lien avec l'angiogenèse n'avait été proposé. KIF2C a récemment été décrit comme marqueur pronostique des gliomes (144) et du cancer colorectal (145). KIF20A appartient à la famille des kinésines comme KIF2C et de nombreux arguments sont en faveur d'un rôle au niveau de l'endothélium, tout comme KIF11/Eg5 (voir chapitres I.A.5 et I.B.1). En ce qui concerne DPY19L1, comme nous l'avons vu, ce gène avait été très peu étudié chez l'Homme et sa fonction était inconnue, mais le fait qu'il soit exprimé lors de l'angiogenèse développementale, que son expression soit induite par le VEGF et qu'il soit surexprimé dans le tissu tumoral nous a incités à l'étudier.

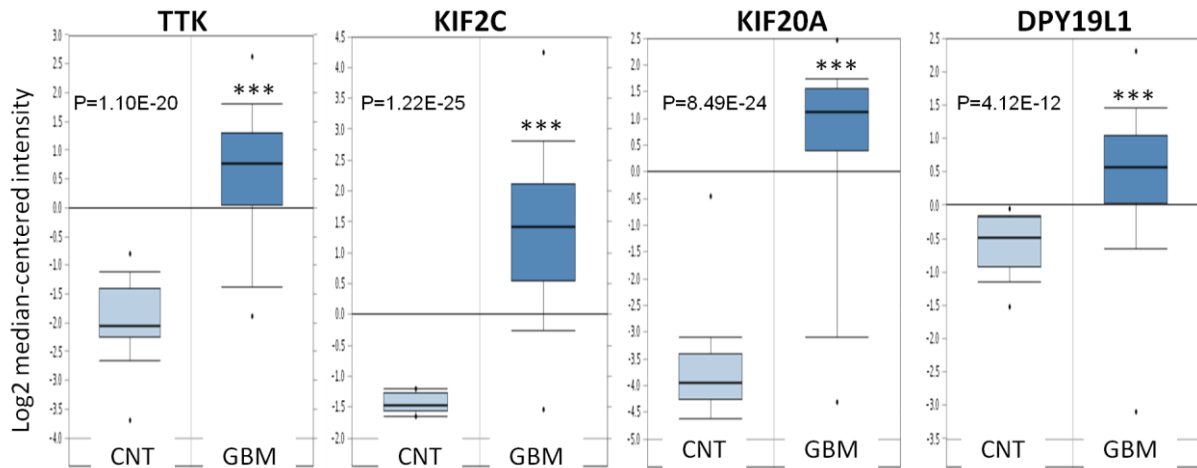
Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la valeur pronostique de ces gènes dans le cadre du GBM. Pour cela nous avons interrogé les bases de données afin de confirmer leur surexpression dans le cancer par rapport au tissu sain, puis nous avons regardé si cette surexpression avait un effet sur la durée de survie des patients atteints de ce cancer.

b) Données transcriptomiques

Deux bases de données ont été interrogées, Oncomine et Rembrandt. Oncomine permet de savoir si un gène est différentiellement exprimé dans un type tumoral, par rapport au tissu sain correspondant, ou dans un type tumoral de grade distinct. Rembrandt (<https://caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt>) est une base de données spécialisée dans les gliomes qui permet non seulement d'évaluer les spécificités de profil, mais aussi de faire des corrélations entre l'expression des gènes et la survie des patients. L'interrogation de ces bases de données révèle que les gènes sélectionnés sont très significativement surexprimés dans le GBM par rapport au cerveau sain (Figure 26). Les données Oncomine montrent une surexpression de 5.6x pour TTK dans le GBM par rapport aux cerveaux non tumoraux, de 6.8x et 18.6x pour KIF2C et KIF20A respectivement, et de 2x pour DPY19L1 (Figure 26A). Celles de Rembrandt (Figure 26B) indiquent que la surexpression de nos marqueurs est de 5.4x pour TTK, 2.5x pour KIF2C, 15.5x pour KIF20A et 1.91x pour DPY19L1. Les résultats obtenus à partir de ces deux bases de données sont très similaires pour DPY19L1 et TTK mais sont moins significatifs pour les kinésines dans les données Oncomine. Ces différences sont vraisemblablement le fait de l'hétérogénéité génétique des tumeurs des patients. KIF20A est le plus fortement surexprimé chez les patients atteints de GBM. KIF20A et TTK semblent être très faiblement exprimés dans le cerveau sain (Figure 26B) ce qui est une information pertinente dans le cas d'une perspective de ciblage thérapeutique. En effet leur inhibition serait plus spécifique des cellules tumorales limitant ainsi les effets indésirables sur les cellules saines. Mais ceci est à confirmer par analyse quantitative car les données transcriptomiques ne sont pas toujours corrélées à l'expression réelle dans les cellules.

Ces données confirment que le développement du GBM entraîne une modification de l'expression des gènes sélectionnés, en faisant ainsi des marqueurs pronostiques potentiels. Nous avons donc regardé s'il y avait une corrélation entre leur niveau de surexpression et la survie des patients par analyse des données transcriptomiques de la base de données Rembrandt.

A



B

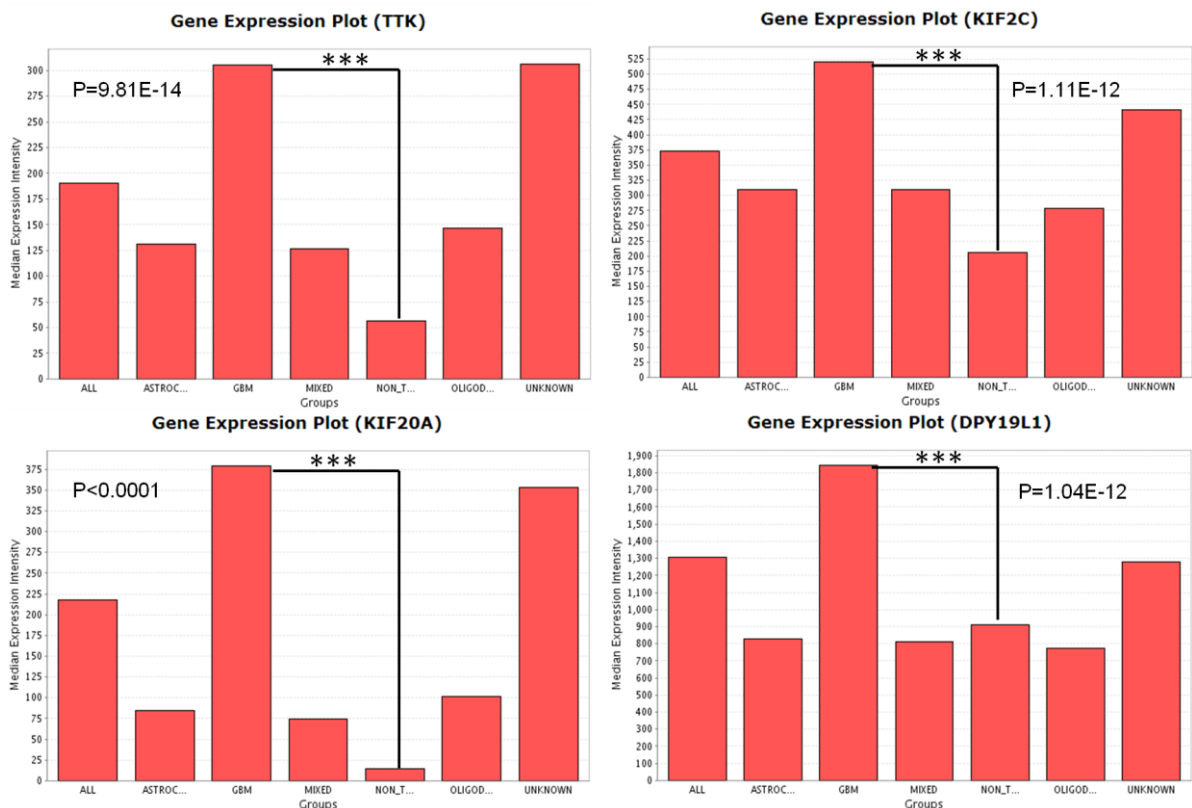


Figure 26 : Surexpression significative de nos gènes d'intérêt dans le GBM. Représentation des valeurs médianes d'expression transcriptomiques des gènes chez les patients. **A.** Données Oncomine (<https://www.oncomine.org>), GBM = 81 et CNT (cerveaux non tumoraux) = 23. T-test p-value<0.0001 pour tous les gènes. **B.** Données Rembrandt (<https://caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt>) ALL : tous les gliomes (454), ASTROC : astrocytomes (148), GBM : glioblastomes (228), MIXED Groups (11), NON-T : cerveaux non tumoraux (28), OLIGOD : oligodendrogliomes (67), UNKNOWN (67), T-test p-value<0.0001 pour tous les gènes, la valeur de p-value exacte de KIF20A n'est pas disponible.

c) Corrélations de survie

Une analyse de corrélation entre l'expression de nos gènes et la survie des patients porteurs de GBM a été réalisée à partir de la base de données Rembrandt en collaboration avec le Dr. Letenneur (ISPED, CHU Bordeaux Segalen). La corrélation de survie est réalisée selon la méthode de Kaplan-Meier qui consiste à calculer la probabilité de survie des patients d'une cohorte à chaque fois qu'un décès survient, et ce en fonction du temps. Elle permet de déterminer la médiane de survie qui correspond au temps où 50% des patients est encore en vie. C'est une donnée importante dans la comparaison de deux courbes de survie. Cette méthode est couramment utilisée en recherche médicale afin d'évaluer l'effet d'un traitement en mesurant le nombre de patients encore en vie après un temps T entre un groupe contrôle et un groupe test. La représentation de la courbe de survie Kaplan-Meier se fait sous forme d'un escalier dont chaque marche représente un décès et correspond à la probabilité de survie à ce temps ([Figure 27](#)). Classiquement, les courbes sont analysées par le test du log-rank (Mantel-Cox) qui analyse si, lors de chaque décès, l'écart entre les courbes est dû au hasard ou non. Ce test, lorsqu'il est significatif, permet de rejeter l'hypothèse que les deux courbes sont semblables et met en évidence une corrélation entre le paramètre étudié et la survie des patients.

Pour notre étude nous avons étudié l'effet de la surexpression de DPY19L1, KIF2C, KIF20A et TTK sur la survie des patients atteints de GBM. Pour cela les patients ont été divisés en 2 ou 3 groupes selon leur niveau d'expression : intermédiaire avec un niveau d'expression similaire à celui du cerveau sain, surexpression > 2x par rapport au niveau d'expression dans le cerveau sain et sous-expression < 2x. La survie au cours du temps a ensuite été mesurée pour chacun de ces groupes, puis les courbes ont été comparées par le test du log-rank. La cohorte étudiée est composée de 181 patients dont la majorité surexprime nos gènes : 101/181 pour DPY19L1, 163/181 pour KIF20A, 112/181 pour KIF2C et 150/181 pour TTK. Comme attendu, très peu de patients les sous-expriment, dans le cas de DPY19L1 et KIF2C il n'y en a aucun, pour KIF20A il n'y en a qu'un et pour TTK ils sont 7. Les analyses Kaplan-Meier, disponibles sur le site de Rembrandt, mettent en évidence une corrélation significative entre la surexpression de DPY19L1 et la courte durée de survie des patients ([Figure 27A](#)). En effet, elle entraîne une diminution de la médiane de survie des patients d'environ 1/3, elle passe de 600 jours pour les patients avec une expression moyenne à 390 jours chez ceux qui le surexpriment. En ce qui concerne KIF20A ([Figure 27B](#)), KIF2C et TTK les analyses ne révèlent aucune corrélation entre leur taux d'expression et la survie des patients.

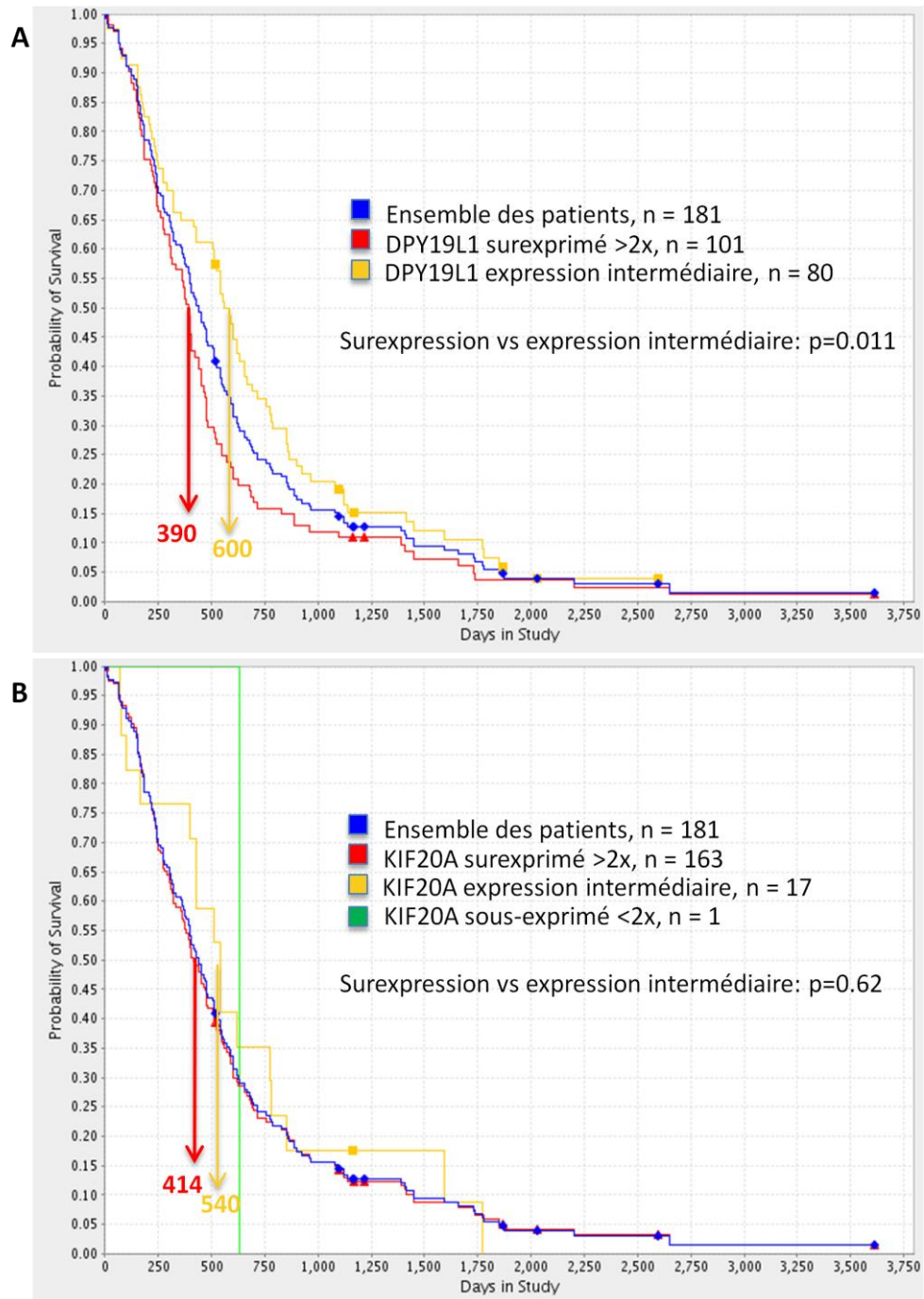


Figure 27 : Analyses Kaplan-Meier de l'expression de DPY19L1 et KIF20A dans les tumeurs GBM (Données Rembrandt). **A.** Les courbes de survie entre les patients qui surexpriment DPY19L1 et ceux qui ne le surexpriment pas (expression intermédiaire) sont significativement différentes, ce qui signifie que DPY19L1 est un marqueur pronostique du GBM. La surexpression de DPY19L1 entraîne une diminution de la médiane de survie des patients de 1/3. **B.** Dans le cas de KIF20A les courbes ne sont pas significativement différentes, donc KIF20A n'est pas un marqueur pronostique du GBM. Test statistique log-rank (Mantel-Cox).

Des analyses complémentaires ont été réalisées afin d'affiner le pronostic de survie lié à l'expression de DPY19L1 et de le comparer aux quelques marqueurs d'expression déjà proposés dans la littérature. Ceci pourrait permettre de mieux déterminer le type de tumeur et d'adapter le traitement. Nous avons donc recherché une éventuelle relation entre DPY19L1 et d'autres facteurs comme STAT3, un marqueur pronostique accepté du GBM (146) ; CD133, un marqueur des cellules souches ; PECAM1, un marqueur endothélial ; et FSTL1, un marqueur pronostique récemment proposé (147). Dans la littérature les GBM ayant une composante souche et/ou angiogénique importante ont un mauvais pronostic et ont une survie réduite. Ces deux gènes n'ayant pas d'influence sur la survie des patients, nous avons recherché si dans ce type de GBM (très angiogénique et/ou avec une composante souche importante) DPY19L1 était surexprimé. Ainsi, si la surexpression de DPY19L1 est corrélée avec celle de CD133 ou PECAM1, cela pourrait aider à améliorer le pronostic des patients et à affiner le traitement. En effet les GBM à composante angiogénique importante répondent aux traitements utilisés en thérapie anticancéreuse classique, alors que les GBM à composante souche majoritaire sont réfractaires aux anti-angiogéniques (voir paragraphes I.A.3.a) et I.A.4). La surexpression de STAT3 ou de FSTL1 est corrélée avec la diminution de la survie des patients, nous avons donc voulu savoir s'il y avait une interaction statistique entre DPY19L1 et l'un de ces gènes afin de renforcer son pouvoir pronostique. On parle d'interaction statistique entre deux facteurs quand l'effet de l'un est modifié en fonction de l'expression de l'autre.

Nous avons testé l'effet de l'expression de DPY19L1 sur la survie des patients surexprimant chacun des facteurs. Pour cela nous avons classé les patients de la cohorte de Rembrandt en quatre groupes : expression intermédiaire de DPY19L1 et du facteur testé, surexpression de DPY19L1 uniquement, surexpression du facteur uniquement et surexpression des deux gènes. Nous n'avons pas constitué de groupe de sous-expression car, hormis CD133 (15 cas sur 181), aucun des marqueurs n'est significativement sous-exprimé par rapport à l'expression chez les personnes n'ayant pas de GBM. L'expression de DPY19L1 modifie significativement la survie des patients ayant une expression différentielle de FSTL1 uniquement (Cox et test d'interaction, $p=0.0354$, [Figure 28](#)). Ce qui signifie qu'il y a une interaction statistique entre DPY19L1 et FSTL1. Dans une étude de 2008, Reddy et son équipe ont montré que FSTL1 (follistatin-like1) était surexprimé de 4x dans la majorité des GBM (147) par rapport aux gliomes de bas grade et au cerveau sain. Ils ont aussi montré que sa surexpression, couplée à celle de p53, entraînait une diminution significative de la médiane de survie des patients (8 mois au lieu de 13 mois pour ceux qui ne co-surexpriment pas ces deux gènes, $p=0.04$). Les auteurs avaient proposé FSTL1 comme un nouveau marqueur pronostique du GBM.

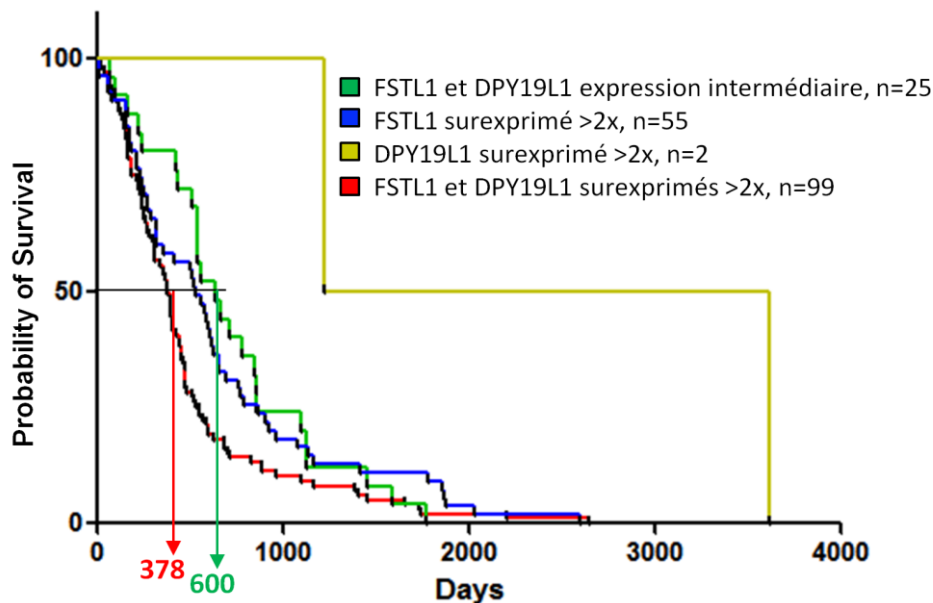


Figure 28 : Analyse Kaplan-Meier de la co-expression de DPY19L1 et FSTL1 dans les tumeurs GBM (données Rembrandt). La surexpression de ces deux gènes entraîne la diminution de la médiane de survie d'environ 1/3. Le risque de décéder précocement est multiplié par 1.63 (log-Rank et test d'interaction, $p=0.0354$) chez les patients qui surexpriment DPY19L1 et FSTL1.

Dans les échantillons de la base de données Rembrandt, la surexpression de FSTL1 corrèle également avec une diminution significative de la durée de survie des patients (log-rank $p=0.019$), suggérant son potentiel pronostique. Nous avons ensuite analysé l'effet de la co-expression de FSTL1 et DPY19L1 sur la survie. L'effet de la surexpression de DPY19L1 chez les patients ne surexprimant pas FSTL1 ne peut pas être évalué sur ces cohortes car seulement deux patients sur 181 sont dans ce cas. On peut noter que l'un de ces deux patients a survécu pendant une durée exceptionnellement longue, mais aucune interprétation ne peut être faite sur un cas isolé. Nous avons ensuite comparé le risque de décéder précocement des patients qui ne surexpriment pas DPY19L1 en fonction de l'expression de FSTL1 (comparaison des courbes bleu et verte). Ce risque est de 0.633 avec un indice de confiance à 95% (IC95) de [0.376 – 1.170]. Sachant que le risque 1 correspond à une absence d'effet, le fait qu'il soit compris dans l'IC95 indique que l'expression différentielle de FSTL1 n'a aucun effet significatif sur la survie des patients exprimant faiblement DPY19L1. Par contre le risque de décès est multiplié par 1.63 quand DPY19L1 est surexprimé chez les patients qui surexpriment aussi FSTL1 (risque = 1.63 ; IC95 [1.087 – 2.431], comparaison des courbes bleu et rouge). Ceci signifie que l'expression de DPY19L1 modifie légèrement mais de façon significative la survie des patients qui surexpriment FSTL1.

Ces résultats étant obtenus à partir de données d'expression transcriptomiques, une validation par une approche plus sensible est nécessaire.

d) Etude des gènes candidats chez les patients atteints de GBM

Afin de confirmer les corrélations suggérées par l'exploitation des bases de données publiques, des RT-PCR semi-quantitatives ont été réalisées afin de déterminer, dans un premier temps, l'expression de DPY19L1, KIF20A et FSTL1 chez une cohorte locale (CHU Bordeaux) de 50 patients, atteints de GBM, sélectionnés par le Pr Hugues Loiseau. Parmi ces patients, nous avons 19 femmes et 31 hommes, 12 patients ont moins de 50 ans. Pour 7 patients nous disposons d'un

prélèvement de la tumeur primaire et un prélèvement de la tumeur après récurrence. Le premier objectif était de confirmer la valeur pronostique de DPY19L1 ainsi que son intérêt par rapport à FSTL1. En ce qui concerne KIF20A, malgré une absence de corrélation pronostique dans l'étude transcriptomique, des données préliminaires laissant supposer son implication dans l'angiogenèse tumorale nous ont incités à étudier plus précisément son expression chez les patients. Dans un premier temps nous avons quantifié l'expression des gènes par qPCR puis nous avons réalisé des corrélations de survie.

(1) Quantification de l'expression de KIF20A, DPY19L1 et FSTL1

Les PCR quantitatives ont été réalisées à partir d'ARN de tumeurs de patients et les résultats obtenus normalisés par rapport à un ARN de cerveau sain (ARN de référence, Invitrogen). L'ARNm KIF20A est surexprimé par l'ensemble des tumeurs de patients de la cohorte par rapport au cerveau non tumoral (Figure 29A). En effet la tumeur pour laquelle l'expression est la plus faible montre un niveau de KIF20A environ 3x supérieur à celle du cerveau sain. En ce qui concerne DPY19L1 et FSTL1, leur niveau d'expression est nettement plus faible puisqu'en moyenne, ils sont surexprimés de 1.2x et 4x respectivement dans les GBM de la cohorte. Les moyennes d'expression de nos gènes candidats obtenues dans cette cohorte sont du même ordre que les données transcriptomiques d'Oncomine et Rembrandt avec une forte surexpression de KIF20A et une surexpression plus modérée de DPY19L1 et FSTL1 (Figure 29B), confirmant ainsi les données transcriptomiques. D'autre part, la comparaison de l'expression de ces gènes dans la tumeur primaire et dans la secondaire, chez les 7 patients pour lesquels nous disposons d'échantillons pairés, ne montre pas de corrélation significative. Il faudrait disposer d'un plus grand nombre d'échantillons afin de déterminer si l'expression de ces gènes est modifiée lors de la récurrence.

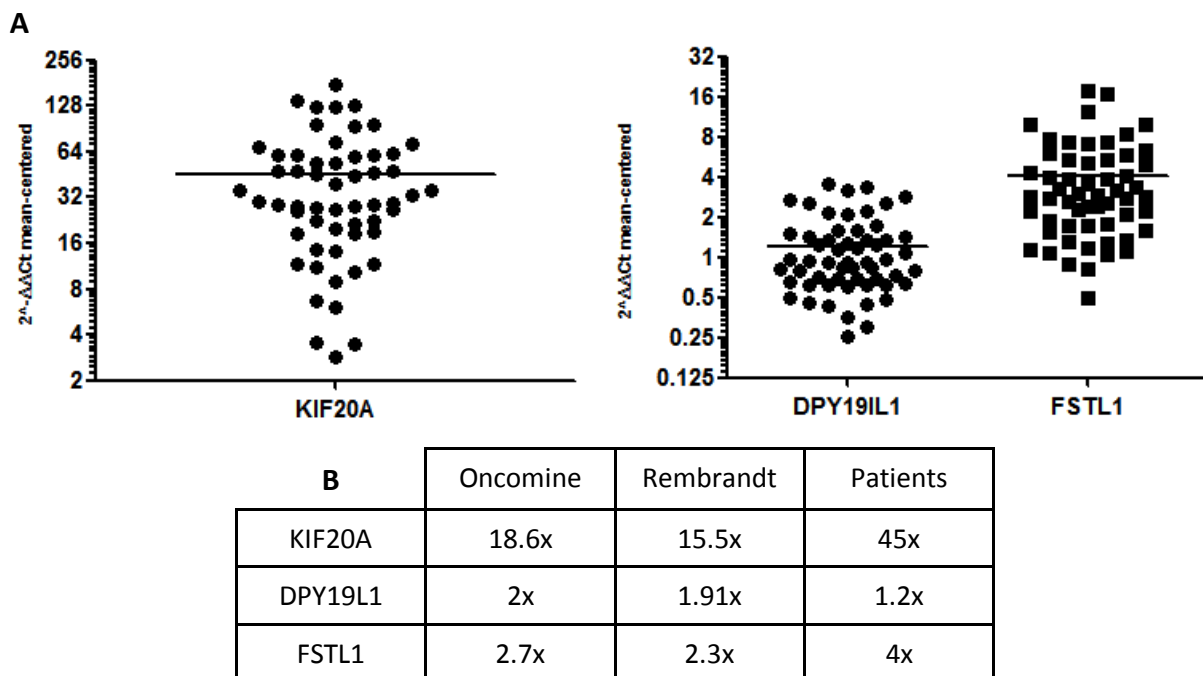


Figure 29 : Quantification de l'expression de nos facteurs d'intérêt chez une cohorte de 50 patients GBM locaux (CHU Bordeaux) sélectionnés par le Professeur Hugues Loiseau A. Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de KIF20A, DPY19L1 et FSTL1 dans les cerveaux de patients atteints de GBM comparés à une ARN de référence de cerveau sain. Représentation des données $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ centrées sur la moyenne. B. Synthèse et comparaison de la moyenne d'expression de nos gènes sur les bases de données et dans notre cohorte. KIF20A est fortement surexprimé chez les patients atteints de GBM alors que FSTL1 et DPY19L1 sont surexprimés de façon plus modérée.

Ces données nous ont permis de différencier, par rapport au seuil de surexpression déterminé, les patients qui surexpriment nos gènes de ceux qui les expriment plus faiblement et ainsi d'éprouver les résultats de corrélations de survie précédemment obtenus par analyse des données de Rembrandt ([Figure 27](#)).

(2) Corrélations de survie

Dans la cohorte locale, il manque la durée de survie de 5 patients qui sont actuellement toujours en vie, les données de ces patients sont donc censurées. C'est-à-dire qu'elles sont représentées sur la courbe Kaplan-Meier mais sont traitées de façon différente par rapport aux autres données, seules les données du dernier recensement sont prises en compte dans l'analyse. Ce sont tous des patients dont la survie est exceptionnellement longue, avec une durée de vie supérieure à 2 ans pour 3 d'entre eux et supérieure à 3 ans pour les deux autres. Parmi ces patients, un surexprime les trois gènes, un surexprime KIF20A et FSTL1 et deux ne surexpriment que FSTL1. Le dernier patient censuré ne surexprime aucun des trois gènes et présente la survie la plus longue. Au vu du faible nombre de patients à survie exceptionnellement longue, on ne peut pas faire d'interprétation statistique de valeur pronostique des gènes étudiés pour cette classe de patients. Dans les deux cohortes, publique et locale, la médiane de survie globale (indépendamment de l'expression des gènes) est très similaire, 430 jours dans la cohorte locale et 438 jours dans celle de Rembrandt. Ces deux cohortes sont donc relativement identiques concernant la survie des patients. Par contre, la répartition des patients par niveau d'expression des gènes n'est pas la même. Dans la cohorte locale, les trois gènes sont exprimés à un taux inférieur au seuil fixé pour la surexpression chez la majorité des patients, alors que d'après la base de données Rembrandt plus de la moitié d'entre eux les surexprime. Nous avons donc testé si malgré le nombre plus faible de patients les surexprimant, DPY19L1, seul ou en association avec FSTL1, est associé à une diminution de la survie des patients, comme ce qui a été démontré précédemment.

Les analyses de corrélation ont été réalisées par un test du log-rank (Mantel-Cox) suivi d'un test Gehan-Breslow-Wilcoxon. Le log-rank est un rapport proportionnel entre les courbes au cours du temps, mais ici les rapports tendent vers 1 au-delà de 1000 jours, ce qui a pour effet d'écraser la différence moyenne entre nos courbes de surexpression et d'expression moyenne. Le second test utilisé, Gehan-Breslow-Wilcoxon, permet de pondérer les événements précoces par rapport aux événements plus tardifs afin de réaliser le test sur la majorité des patients.

Pour réaliser l'analyse de corrélation de survie, la limite de surexpression de KIF20A a été placée au niveau de la moyenned'expression de la cohorte, 45x, car il est fortement exprimé chez l'ensemble des patients ([Figure 30A](#)). Si nous avons gardé le même seuil que sur Rembrandt, soit 2x, nous n'aurions pas pu séparer nos patients en deux groupes de niveau d'expression différentiel. Malgré ce changement de seuil, le résultat est équivalent, l'expression de KIF20A n'influe pas sur la durée de survie des patients ([Figure 30A](#), log-rank $p=0.56$ et Gehan-Breslow-Wilcoxon $p=0.18$) : **Le taux d'expression de KIF20A n'est donc pas un marqueur pronostique du GBM.**

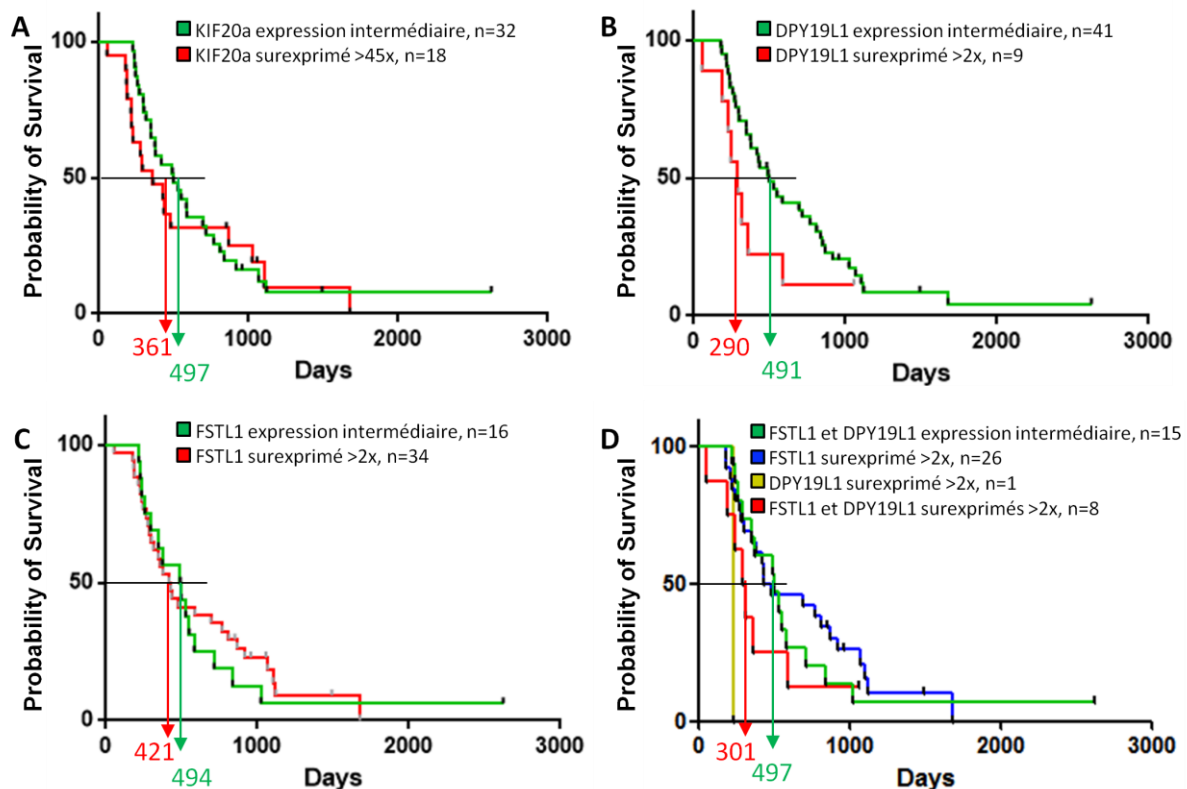


Figure 30 : Analyses Kaplan-Meier de notre cohorte de 50 patients en fonction de l'expression de KIF20A (A), DPY19L1 (B), FSTL1 (C) et de FSTL1 et DPY19L1 (D). L'analyse a été réalisée par RT-PCR quantitative (n=4). La surexpression de DPY19L1 (>2x) entraîne une diminution de la médiane de survie des patients d'environ 1/2 (test Gehan-Breslow-Wilcoxon, $p=0.0380$), donc DPY19L1 est un marqueur de mauvais pronostic. KIF20A et FSTL1 ne sont pas des marqueurs pronostiques dans cette cohorte car leur expression n'influe pas sur la survie des patients (test gehan-Breslow-Wilcoxon $p=0.1837$ et 0.9506 respectivement).

Pour FSTL1 et DPY19L1 le seuil de surexpression a été placé à 2x, comme sur la base de données Rembrandt, nous permettant de séparer les patients en un groupe de surexpression et un groupe d'expression intermédiaire, similaire à l'expression dans le cerveau sain. Dans le cas de DPY19L1, le test log-rank est à la limite de la significativité, $p=0.0934$. Ceci s'explique par le fait que le groupe de surexpression ne comporte que 9 individus. C'est pourquoi nous avons utilisé le second test, Gehan-Breslow-Wilcoxon, qui nous permet de mettre en évidence une corrélation de survie en privilégiant les patients qui sont décédés plus tôt. Ce test est significatif, $p=0.0380$, et indique donc que la surexpression de DPY19L1 corrèle avec une diminution significative de la médiane de survie d'environ $\frac{1}{2}$ (Figure 30B), ce qui confirme les données bioinformatiques (Figure 27). Nous confirmons donc que DPY19L1 est un marqueur pronostique du GBM. L'effet de la co-expression de DPY19L1 et FSTL1 sur la survie des patients a ensuite été étudié.

Les données Rembrandt montraient que la surexpression de FSTL1 corrèle avec une diminution de survie d'environ la moitié par rapport à une expression moyenne (399 jours et 666 jours respectivement) et est donc un marqueur de mauvais pronostic ($p=0.019$). Dans la cohorte locale ces résultats ne sont pas reproduits. En effet, la surexpression de FSTL1 n'est pas corrélée avec une survie réduite des patients (Figure 30C, log-rank $p=0.7022$ et Gehan-Breslow-Wilcoxon $p=0.9506$). Donc dans cette étude, FSTL1 n'est pas un marqueur pronostique quand on regarde son expression seule. Nous avons ensuite étudié l'effet de la co-surexpression de FSTL1 et DPY19L1. Les patients sont séparés en quatre groupes distincts selon l'expression des gènes : expression

intermédiaire, surexpression de FSTL1 ou de DPY19L1 et co-surexpression des deux gènes ([Figure 30D](#)). Les patients qui surexpriment FSTL1 uniquement ont une médiane de survie similaire à ceux qui expriment les deux gènes de manière intermédiaire, 457 et 497 jours respectivement. Seul un patient ne surexprime pas FSTL1 parmi ceux qui surexpriment DPY19L1 et est décédé de façon précoce (228 jours). Mais celui-ci ne nous permet pas de conclure quant à l'effet de la surexpression de DPY19L1 sur la survie des patients ne surexprimant pas FSTL1. La médiane de survie des patients surexprimant les deux gènes est de 301 jours, résultat similaire à ceux obtenus par l'étude de DPY19L1 seul (290 jours). Donc l'expression de DPY19L1 influence la survie des patients de manière indépendante de celle de FSTL1 dans cette cohorte, à la différence des données Rembrandt qui montraient une interaction statistique entre ces deux gènes. Ceci peut s'expliquer parce que la cohorte locale est moins étendue que la cohorte publique (50 contre 181). Dans les deux cohortes, les patients surexprimant DPY19L1 mais pas FSTL1 sont peu nombreux, 1 seul dans notre cohorte et 2 dans celle de Rembrandt. Pour confirmer un effet potentiel de la co-expression de ces deux gènes sur la survie des patients, il faudrait une cohorte avec une répartition plus équitable des patients dans les quatre groupes d'expression. Dans leur étude ([147](#)), Reddy et ses collègues ont montré que FSTL1 seul ne modifie pas significativement la survie des patients, ce que nous avons aussi observé dans la cohorte locale ([Figure 30C](#)). Néanmoins ils ont montré que sa co-expression avec P53 était corrélée avec un mauvais pronostic. Il semble que DPY19L1 seul donne une information pronostique d'un degré équivalent à FSTL1 couplé à P53.

L'étude de l'expression de nos gènes candidats chez une cohorte locale de 50 patients atteints de GBM couplée à l'étude des bases de données nous permet de confirmer que **DPY19L1 peut être envisagé comme marqueur pronostique du GBM.**

Les gènes KIF20A et DPY19L1 sont surexprimés lors de l'angiogenèse physiologique et dans quatre types de cancers fortement vascularisés (paragraphe I.A.5). De plus leur expression est fortement induite par le VEGF suggérant qu'ils sont impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Il est aussi probable que ces gènes puissent contribuer à la résistance aux anti-angiogéniques chez certains patients. Nous nous sommes donc intéressés au profil d'expression cellulaire de ces gènes afin de déterminer s'ils étaient exprimés au niveau des vaisseaux et plus précisément dans l'endothélium des vaisseaux tumoraux.

2. Profils d'expression des gènes d'intérêt

Avant d'étudier ces gènes chez les patients, nous avons exploré les bases de données d'expression, ARN et protéine, afin d'éprouver les données du crible qui prédisaient une expression majoritaire dans les cellules endothéliales pour DPY19L1 et KIF20A dans le GBM.

a) *Exploration des bases de données*

(1) Profil d'expression au cours du développement embryonnaire

Nous avons tout d'abord étudié l'expression de KIF20A au cours du développement embryonnaire chez la souris afin de déterminer s'il pouvait participer à ce processus et plus précisément à la vascularisation. Nous avons donc interrogé la base de données Genepaint (<http://www.genepaint.org/>) qui héberge les images d'hybridation *in situ*, sur des embryons de souris, avec des sondes correspondant à plusieurs milliers de gènes. KIF20A montre un signal d'hybridation *in situ* dans l'ensemble de l'embryon (Figure 31A), avec un marquage plus intense au niveau somitique (Figure 31C et D) ainsi que dans les capillaires cérébraux (Figure 31E et F) qui ressemble à celui obtenu avec le gène de la VE-cadhérine.

La VE-cadhérine est une protéine majeure au niveau endothélial. Lors du développement de la souris et du poisson zèbre son expression est spécifique de ces cellules dès les premiers stades du développement vasculaire des tissus embryonnaires (148). Chez la souris c'est un marqueur très précoce de la différenciation des cellules endothéliales (149) puisqu'on détecte son expression dès le stade E7.5 dans le sac vitellin et au stade E9.5 dans les îlots sanguins qui donneront naissance aux cellules endothéliales. A E14.5 (Figure 31B), la VE-cadhérine est exprimée dans les ventricules du cœur ainsi que dans les cellules bordant l'atrium, dans l'artère dorsale et les vaisseaux inter-somitiques (Figure 31D) et dans les capillaires du cerveau en développement (Figure 31F).

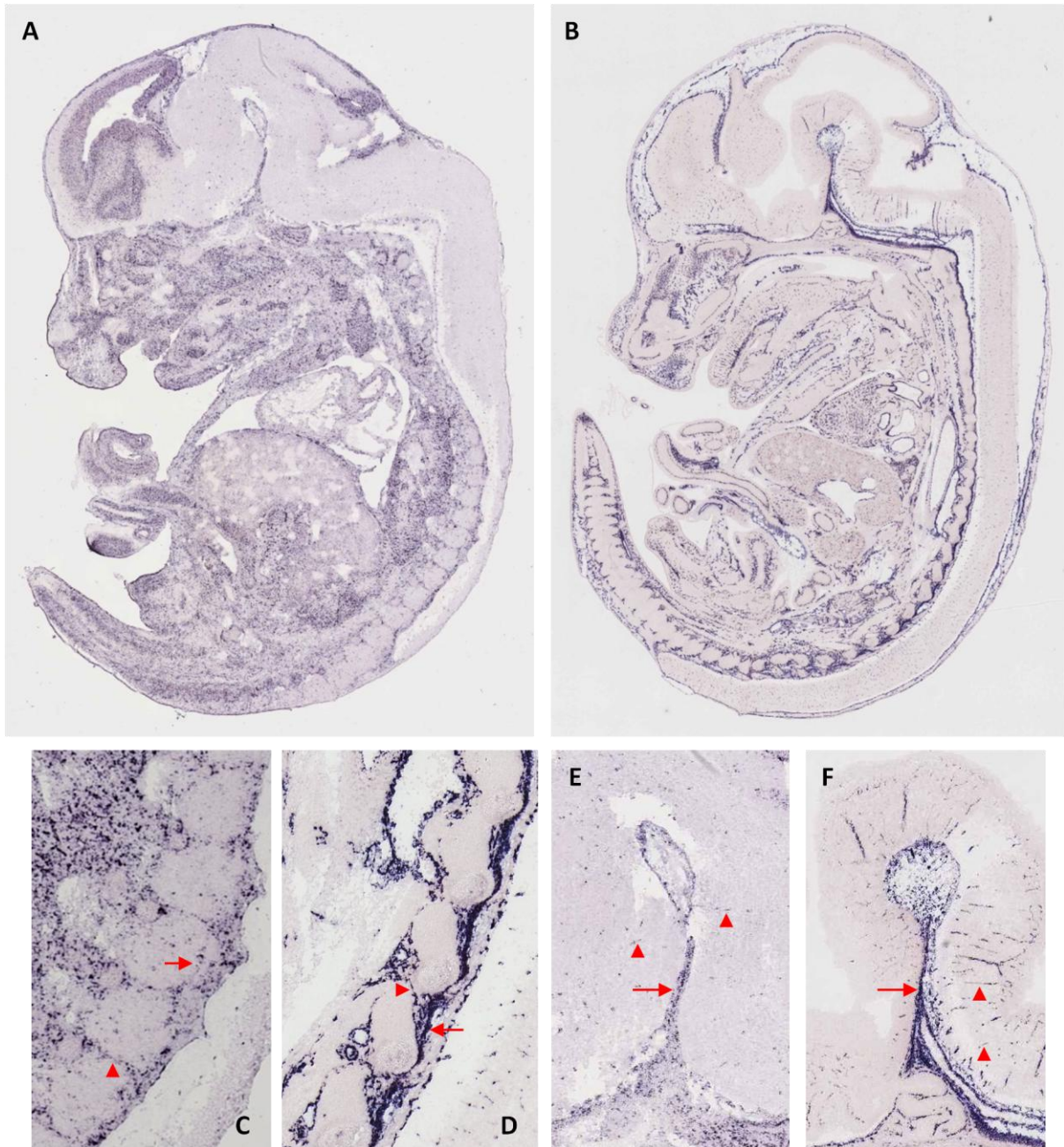


Figure 31 : Expression de KIF20A dans les vaisseaux intersomitiques et le système nerveux central chez l'embryon de souris au stade E14.5 (<http://www.genepaint.org>). Hybridation *in situ* KIF20A **A, C, E** ; VE-cadhérine (CDH5) **B, D, F** sur des coupes longitudinales d'embryons de souris au stade E14.5. **A et B.** Embryons entiers ; **C et D.** Agrandissement au niveau des somites des embryons. Les têtes de flèches pointent sur les vaisseaux inter-somitiques et les flèches pointent sur l'artère dorsale. **E et F.** Agrandissement au niveau de la tête des embryons, les têtes de flèches pointent les petits capillaires et les flèches une artère carotide interne.

Le marquage différentiel de KIF20A, mis en avant par les hybridations in situ chez les embryons de souris, comparable à celui de la VE-cadhérine, suggère une fonction de ce gène lors de l'angiogenèse développementale. L'angiogenèse tumorale utilise certains des régulateurs activés au cours de l'angiogenèse physiologique. Nous avons donc cherché à savoir si l'expression de KIF20A était associée à la vascularisation dans le tissu tumoral comme dans l'embryon. Nous avons ensuite analysé l'expression de ce gène sur des TMA (Tissue MacroArray) publiques de tumeurs.

(2) Profil d'expression tumoral

Nous avons interrogé la base de données Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) qui recense des marquages immunohistologiques d'un panel de tissus sains et tumoraux. Nous nous sommes focalisés sur les GBM, tumeur au sein de laquelle l'angiogenèse est très active. Des marquages immunohistologiques réalisés sur des TMA de cerveaux non tumoraux montrent un marquage nucléaire de MKlp2 dans les cellules endothéliales du cortex (Figure 32A, flèches rouges) et une forte expression dans les cellules gliales (flèches noires). Sur les TMA de gliomes, on observe un marquage intense d'une population de cellules tumorales et de certains capillaires (Figure 32B et C). Dans les gliomes de bas grade, MKlp2 semble être localisé dans les noyaux des cellules endothéliales et chez certains patients le marquage y est aussi cytoplasmique (Figure 32B). Dans les GBM, le marquage MKlp2 se situe aussi au niveau vasculaire mais semble plus cytoplasmique que dans les gliomes de bas grade (Figure 32C), suggérant un rôle distinct de celui qui est décrit lors de la cytokinèse.

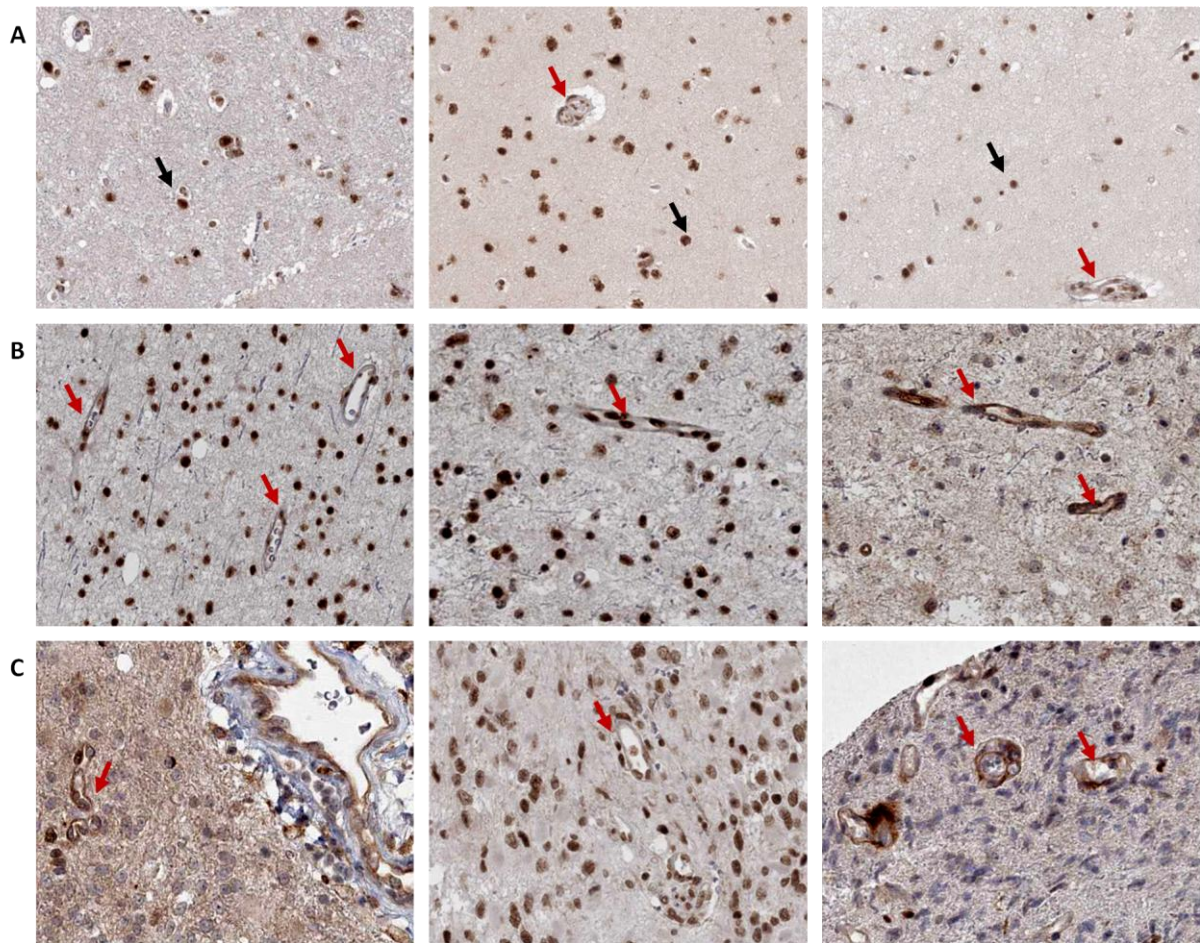


Figure 32: Expression vasculaire de MKlp2 dans les gliomes (Human Protein Atlas). Immunohistochimie sur TMA. **A.** Cortex cérébral non tumoral, **B.** gliomes de bas grade, **C.** gliomes de haut grade (GBM). Flèches rouges = vaisseaux sanguins, flèches noires = cellules gliales.

Nous avons ensuite voulu confirmer expérimentalement ces données d'expression tissulaire de KIF20A et étudier le profil d'expression de DPY19L1 non référencé dans les bases de données publiques. Nous avons décidé de mener notre étude sur des échantillons de GBM hébergés au laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Bordeaux ainsi qu'à la tumorotheque du canceropôle GSO. Nous avons utilisé deux techniques distinctes mais complémentaires : l'hybridation *in situ* sur coupes de tumeurs FFPE et l'immunohistochimie sur coupes de tissus congelés. L'hybridation *in situ* est une technique fiable qui permet de détecter l'expression des gènes de façon très précise, mais n'est pas toujours corrélée à l'expression de la protéine. Nous l'avons donc couplée à la technique d'immunohistochimie qui permet de localiser la protéine. L'utilisation d'anticorps polyclonaux peut entraîner l'obtention de résultats artéfactuels surtout sur les coupes FFPE. La comparaison des données obtenues avec ces deux techniques permet de définir un profil d'expression plus fiable qu'avec une seule méthode.

b) Profil d'expression de KIF20A et DPY19L1 chez les patients

(1) Mise au point de la technique d'hybridation *in situ*

Dans un premier temps la localisation cellulaire des gènes candidats a été déterminée par hybridation *in situ*. Le but premier de ma thèse consistait à mener une étude à grande échelle sur une dizaine de gènes surexprimés dans quatre grands types de cancers solides très angiogéniques

par hybridation *in situ* et par immunohistologie sur coupe de tumeurs FFPE. Il nous fallait donc une méthode rapide, fiable et sensible. La technique classique d'hybridation *in situ* nécessite le clonage du gène, son amplification et la synthèse de sondes ARN. Ces sondes sont sensibles à la dégradation et nécessitent une mise au point délicate. Nous avons donc engagé un partenariat avec la société Panomics/Affimetrix pour la mise en œuvre et l'optimisation d'une nouvelle technologie. Cette technique a été développée afin d'être utilisée en clinique au même titre que l'immunohistochimie sur des coupes de tumeurs FFPE afin d'établir le diagnostic tumoral. Une collaboration entre l'hôpital central du Massachusetts et Affimetrix est actuellement en cours afin de valider et de développer de nouveaux marqueurs tumoraux à l'aide de cette technique sur des coupes de tissus paraffinés (<http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=116408&p=irol-newsArticle&iD=1702937&highlight=>). Elle permettrait d'étudier de nouveaux marqueurs cancéreux pour lesquels il n'existe pas d'anticorps fiables et spécifiques pour les tissus paraffinés. Le développement de nouvelles sondes nécessite moins d'une semaine alors que le développement d'un nouvel anticorps nécessite plusieurs mois, permettant un gain de temps appréciable pour la validation de nouveaux biomarqueurs pronostiques.

Cette technologie utilise des sondes oligonucléotidiques et un système d'ADN branché qui amplifie le signal, augmentant ainsi la sensibilité puisqu'elle détecte jusqu'à une molécule d'ARNm par cellule en fluorescence. De plus, elle ne nécessite qu'une mise au point par tissu et est ensuite applicable pour toutes les sondes sélectionnées, offrant un gain de temps appréciable. La réalisation de l'expérience d'hybridation *in situ*, en elle-même, avec cette technologie, est aussi rapide que l'immunohistologie puisque le résultat est obtenu en moins de deux jours.

La mise au point des conditions optimales de marquage a été réalisée selon le protocole QuantiGene® viewRNA (Affimérix/Panomix) en étroite collaboration avec les développeurs à Londres. Nous étions le premier laboratoire français à utiliser cette technologie suscitant un vif intérêt de la part des cliniciens afin de l'adapter à l'étude de nouveaux marqueurs dans le cadre de tumeurs complexes. Les conditions sont à déterminer pour chaque type de tissus en sondant un gène dont l'expression est ubiquitaire: l'ubiquitine C (UBC). Dix lames d'un même tissu sont soumises au protocole d'hybridation en faisant varier les temps de prétraitement à 100°C et d'exposition à une protéase (Tableau 6, Figure 33) afin de déterminer les conditions permettant d'obtenir un marquage correct tout en préservant la structure du tissu.

Tableau 6 : Conditions de mise au point de l'hybridation *in situ*

Incubation avec la protéase (min)	Prétraitement à ébullition (min)			
	0	5	10	20
0	Lame 1			
10		Lame 2	Lame 5	Lame 9
20		Lame 3	Lame 6	Lame 8
40		Lame 4	Lame 7	Lame 10

Dans notre étude, la mise au point a aussi été réalisée avec la sonde correspondant au marqueur endothélial CD31 afin de déterminer les conditions optimales pour obtenir un marquage vasculaire satisfaisant. En effet les structures microvasculaires typiques du GBM sont très sensibles à la dénaturation et les conditions permettant leur maintien sont délicates à déterminer.

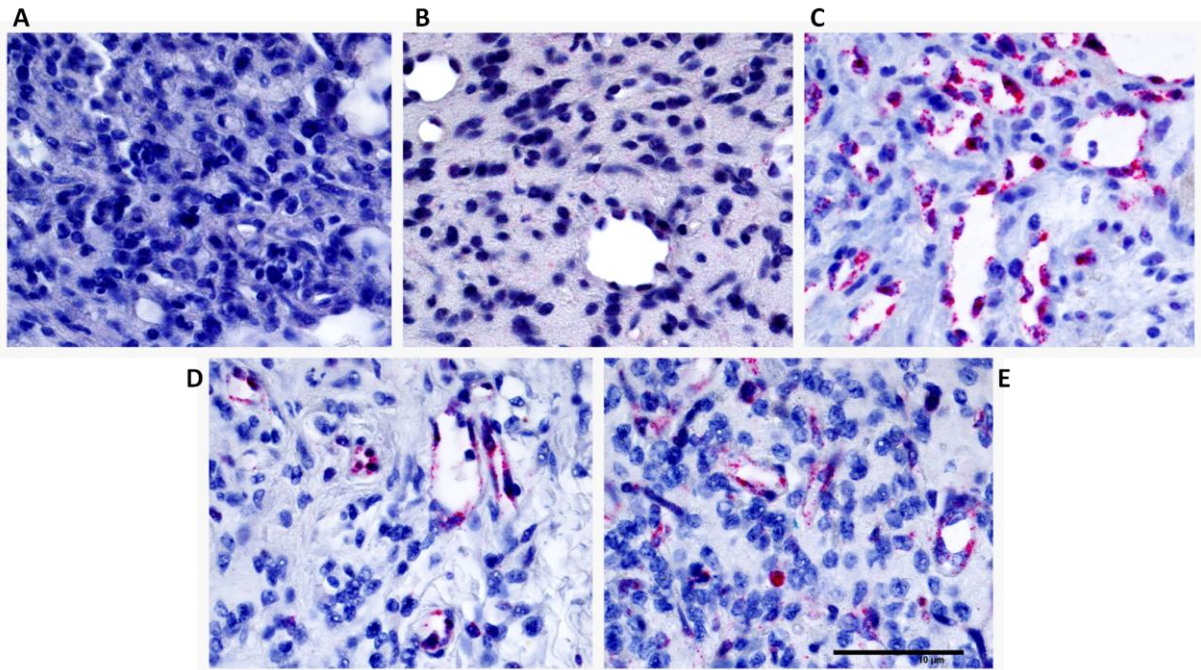


Figure 33: Mise au point de l'hybridation *in situ*. Coupes FFPE de GBM humains hybridés avec la sonde cd31. **A.** aucun prétraitement à ébullition ni d'incubation avec la protéase ; **B.** ébullition 5 min, protéase 10 min ; **C.** ébullition 10 min, protéase 10 min ; **D.** ébullition 5 min, protéase 20 min ; **E.** ébullition 10 min, protéase 20 min. barre de calibration 20µm.

Suite à cette étape de mise au point, les conditions optimales pour les coupes de GBM provenant du service d'anatomopathologie du CHU de Bordeaux sont de 10 min de prétraitement et 10 min de protéase, c'est ainsi que nous obtenons le meilleur rapport qualité du tissu/marquage correct. Ces conditions ont été appliquées à l'hybridation avec les sondes de KIF20A et DPY19L1 mais n'ont pas permis de détecter de marquage suggérant que la sensibilité est insuffisante pour des gènes à expression modérée comme ces deux gènes. À ce stade, il est apparu peu opportun d'utiliser cette technique sur de grandes quantités d'échantillons précieux simultanément (TMA). Nous avons donc décidé de travailler sur des lames individuelles en essayant de définir le temps de perméabilisation minimum pour obtenir un signal.

(2) Localisation de KIF20A et DPY19L1

Nous avons donc étudié l'expression de KIF20A et DPY19L1 chez 10 patients non sélectionnés pour leur niveau d'expression des gènes candidats. Le marquage correspondant aux deux gènes (Figure 34A-B et A'-B'), obtenus chez 7 et 8 patients pour DPY19L1 et KIF20A respectivement, est associé à des structures similaires à celles positives pour le marqueur endothélial CD31 (Figure 34C-C'), ce qui laisse supposer que les cellules endothéliales expriment l'ARNm de DPY19L1 et de KIF20A dans le GBM. Sur les images Figure 34A' et Figure 34B', les structures gloméruloïdes, signe de micro-proliférations vasculaires caractéristiques du GBM, sont aussi positives pour nos marqueurs. Ce qui est en faveur d'une expression endothéliale et d'un rôle dans l'angiogenèse du GBM.

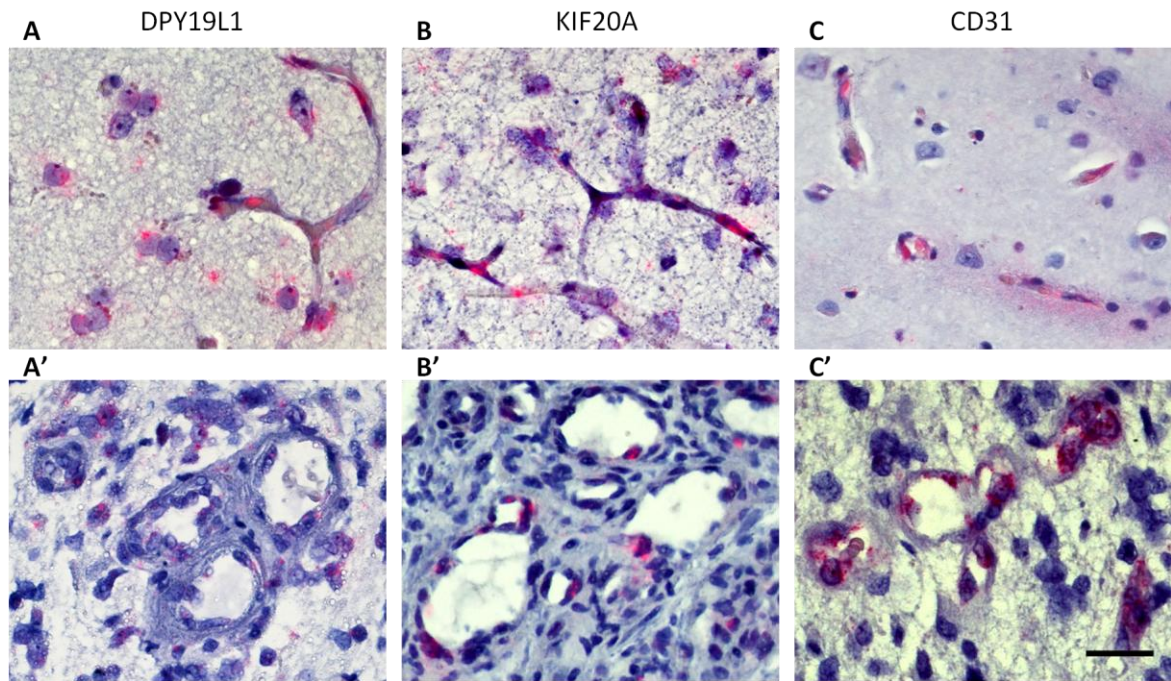


Figure 34: Localisation vasculaire de DPY19L1 et KIF20A. Coupes FFPE de GBM humain, A-B'. Fusion de l'image en lumière blanche et de l'image en fluorescence ; C'. Image en lumière blanche. A, A'. Sondes DPY19L1 ; B, B'. Sondes KIF20A ; C, C'. Sondes CD31. A'-C'. Structures vasculaires gloméruloïdes. Contre-coloration hématoxyline. Barre de calibration = 20µm.

Les marquages réalisés avec les sondes DPY19L1 et KIF20A montrent aussi une localisation dans certaines cellules tumorales (Figure 35). Dans le cas de KIF20A, il y a deux possibilités, soit ces cellules tumorales sont en mitose, ce qui explique pourquoi elles sont positives pour ce gène, soit elles ne sont pas en division, ce qui suggèrerait une autre fonction de KIF20A dans certaines cellules tumorales. Sur l'image Figure 35B, les noyaux des cellules tumorales positives pour KIF20A ne semblent pas mitotiques, nous n'observons pas de condensation des chromosomes et la membrane nucléaire paraît intacte. Donc KIF20A pourrait avoir un autre rôle que sa fonction mitotique dans ces cellules.

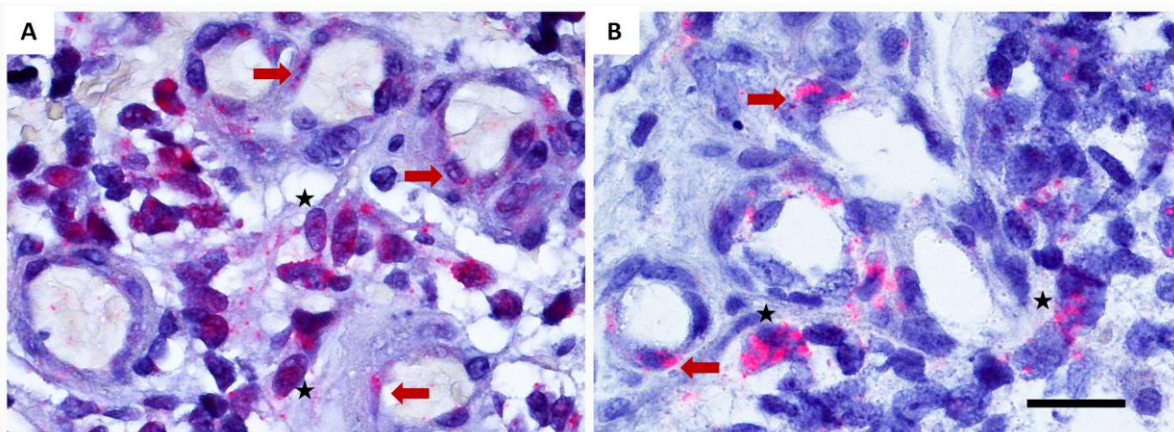


Figure 35: Expression de DPY19L1 et KIF20A dans les cellules tumorales et endothéliales des GBM. Coupes FFPE de GBM humains. A. DPY19L1 ; B. KIF20A. Cellules endothéliales (flèches) ; cellules tumorales (étoiles) ; barre de calibration = 20µm.

L'expression de ces deux gènes associée à des cellules vasculaires est en faveur d'un rôle vasculaire. Dans le cas de KIF20A, les résultats suggèrent un rôle différent de celui qui est majoritairement décrit, lors de la cytokinèse. Pour les gènes candidats, DPY19L1 et KIF20A, les conditions d'hybridation ont été difficiles à déterminer car ces gènes sont faiblement exprimés par

rapport à cd31 ou à l'UbC. Ainsi pour observer un marquage, il a fallu augmenter les temps d'incubation avec la protéase, ce qui fait que les tissus étaient abîmés et l'assignation à un type cellulaire délicate. De même, les conditions permettant de garder le tissu intact n'offraient qu'un marquage ténu même en fluorescence. Le GBM est une tumeur très hétérogène composée de zones nécrotiques associées à des zones angiogéniques, et réagissant de manière différente aux prétraitements mis en œuvre pour l'hybridation *in situ*. De plus, les composantes principales de la tumeur chez chaque patient sont différentes, compliquant la mise au point de cette technique pour chaque tissu. Ainsi cette nouvelle technologie, très prometteuse pour les analyses diagnostiques, nécessite encore quelques améliorations afin d'être utilisée pour la caractérisation de nouveaux marqueurs du GBM notamment lorsque ceux-ci sont exprimés à des niveaux relativement modérés. C'est pourquoi nous avons décidé de coupler les hybridations *in situ* à une étude par immunohistochimie afin d'éprouver l'expression vasculaire des gènes candidats.

c) Caractérisation dpy19l1 et MKlp2 chez les patients GBM

La localisation de dpy19l1 et MKlp2 a d'abord été recherchée sur des coupes de tumeurs de patients n'ayant subi aucun test préliminaire concernant ces gènes, afin de tester les anticorps et d'obtenir une première information sans à priori. Puis nous avons étudié ces protéines chez cinq patients ayant la plus forte expression des gènes parmi notre cohorte afin de mettre en évidence la spécificité d'expression cellulaire. Nous nous intéresserons d'abord au profil d'expression de dpy19l1 puis à celui de MKlp2.

(1) Dpy19l1

(a) Profil d'expression

Les premières données obtenues dans cette étude indiquent que DPY19L1 est un marqueur pronostique du GBM, sa surexpression étant liée à une survie réduite chez les patients. Le GBM est une tumeur avec le pire des pronostics dont la croissance est dépendante de sa vascularisation et de l'angiogenèse, il est donc nécessaire de caractériser les gènes impliqués dans ces processus afin de pouvoir développer des thérapies ciblées. Les données transcriptomiques et ARN montrent une expression vasculaire préférentielle de DPY19L1 dans le GBM, suggérant une implication dans l'angiogenèse tumorale. DPY19L1 est un gène pour lequel il existe peu de données chez l'Homme. La protéine possède 11 segments transmembranaires et aurait une fonction de c-Mannosyltransférase lui permettant de réguler la migration des neuroblastes chez le nématode (136, 150). Chez les Mammifères cette fonction semble conservée puisque la protéine est exprimée dans les cellules souches neuronales (137, 138), mais il n'existe aucune donnée fonctionnelle dans le contexte tumoral. Afin d'étudier dpy19l1 dans le GBM et de déterminer son expression cellulaire et subcellulaire, des études d'expression ont été réalisées sur coupes de tissus et dans les cellules en culture.

En premier lieu nous avons voulu confirmer la localisation endothéliale de dpy19l1, suggérée par les hybridations *in situ*, par des co-marquages avec le marqueur endothélial cd31. Ces expériences ont montré que Dpy19l1 est effectivement exprimé au niveau vasculaire mais ne colocalise pas avec cd31 (Figure 36A, B). En effet le marquage est majoritairement détecté dans le cytoplasme de cellules bordant les cellules endothéliales des capillaires sanguins (flèches blanches).

Nous avons également observé ponctuellement Dpy1911 au niveau nucléaire dans certaines cellules endothéliales (Figure 36B : têtes de flèches blanches) et tumorales (étoiles). Ainsi, contrairement à ce que notre hypothèse et les hybridations *in situ* suggéraient, dpy1911 semble être exprimée préférentiellement dans les cellules périvasculaires et non endothéliales. Rappelons que l'interprétation des hybridations *in situ* était délicate dans la mesure où les tissus étaient fragilisés par les pré-traitements et nous ne pouvions réaliser des co-marquages avec une sonde endothéliale sur une même coupe, permettant d'identifier avec plus de précision les cellules exprimant dpy1911. Afin d'identifier les cellules exprimant cette protéine, nous avons réalisé différents co-marquages avec les marqueurs des cellules périvasculaires, l' α SMA (α smooth muscle actin) et la desmine qui marquent les cellules musculaires lisses et les péricytes (151, 152). Le marquage dpy1911 colocalise avec l' α SMA et la desmine (Figure 36C et D, flèches). Dpy1911 est donc exprimée dans les péricytes/cellules musculaires lisses chez les patients atteints de GBM et pourrait avoir un rôle dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux plutôt que dans leur formation. Ces résultats ont été reproduits chez tous les patients étudiés quel que soit leur niveau d'expression de DPY19L1 mesuré par qPCR, suggérant que les différences de niveau d'expression pourraient être corrélées à des différences de constitution de la vasculature tumorale.

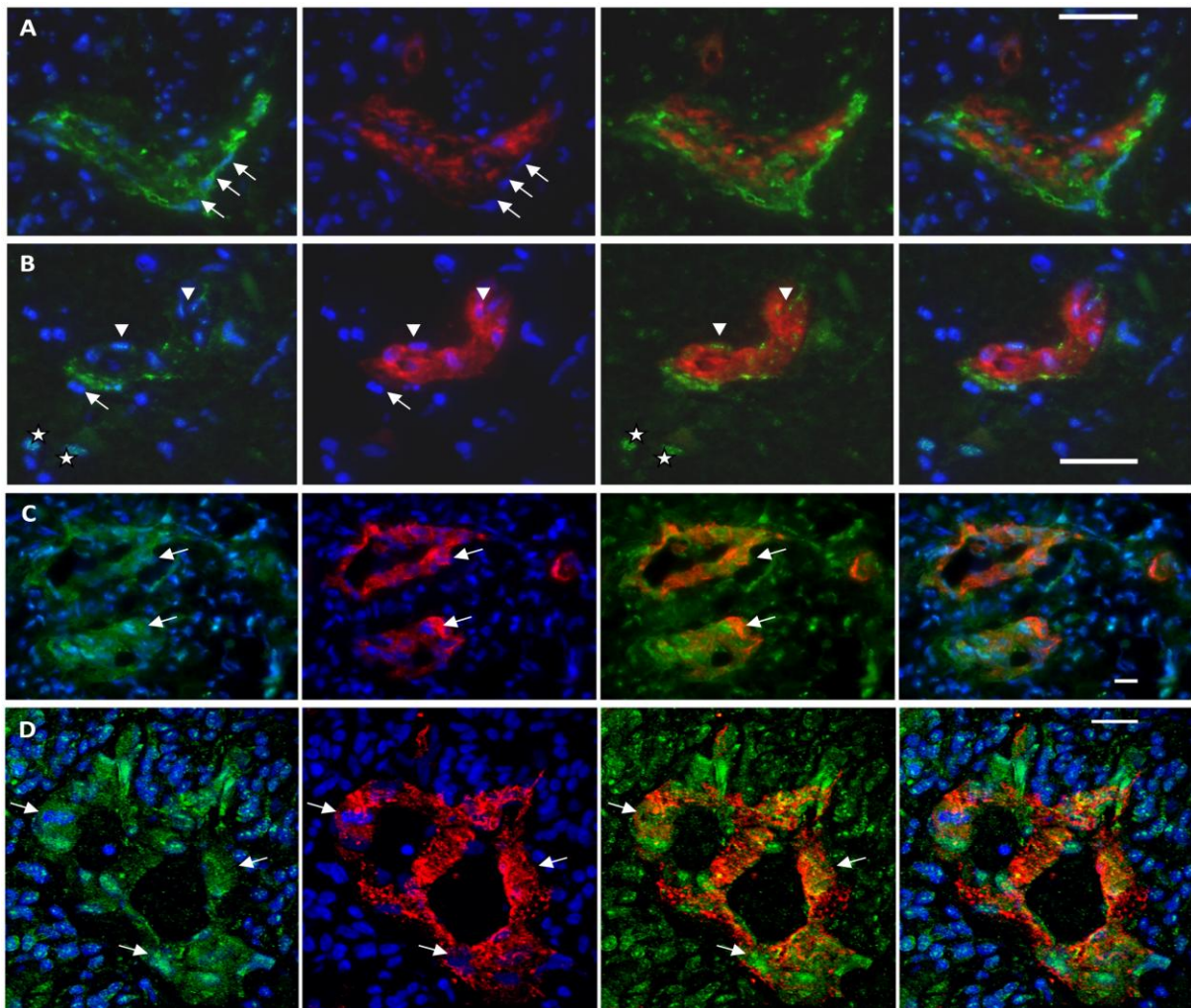


Figure 36 : Expression de dpy1911 au niveau périvasculaire chez les patients atteints de GBM. Co-marquages dpy1911 (vert) et cd31 (A-B), α -SMA (C) ou desmine (D) en rouge. Barres de calibration = 20 μ m, flèches = cellules périvasculaires, têtes de flèches = cellules endothéliales, étoiles = cellules tumorales. A-B. Microscopie à épifluorescence, C-D. Microscopie confocale

L'expression préférentielle de dpy19l1 dans les cellules musculaires lisses a ensuite été testée sur des lignées cellulaires à la fois au niveau nucléaire, par qPCR, et au niveau protéique par immunocytologie (Figure 37). Dans les cellules en culture, l'expression de DPY19L1 a été trouvée faible dans les cellules endothéliales (HUVEC, HUAEC et hCMEC) contrairement à ce qui était prédit par les analyses bioinformatiques (92, 123), moyenne dans les cellules tumorales (U87 et HeLa), et forte dans les SMC (Figure 37A), ce qui est en accord avec les résultats d'immunohistologie sur les coupes de tumeurs de patients (Figure 36). Dans les SMC, DPY19L1 est deux fois plus exprimé que dans les U87. (0.45 et 0.24 respectivement). Nous avons voulu valider ce résultat en western blot mais les résultats n'ont pas corrélé avec les résultats de dosage de transcrit. En effet la protéine n'a pas pu être détectée dans les SMC. Il est possible qu'une régulation traductionnelle contrôle l'expression de DPY19L1 en fonction de l'état de confluence ou de migration des cellules. Des expériences sont en cours pour explorer cette possibilité.

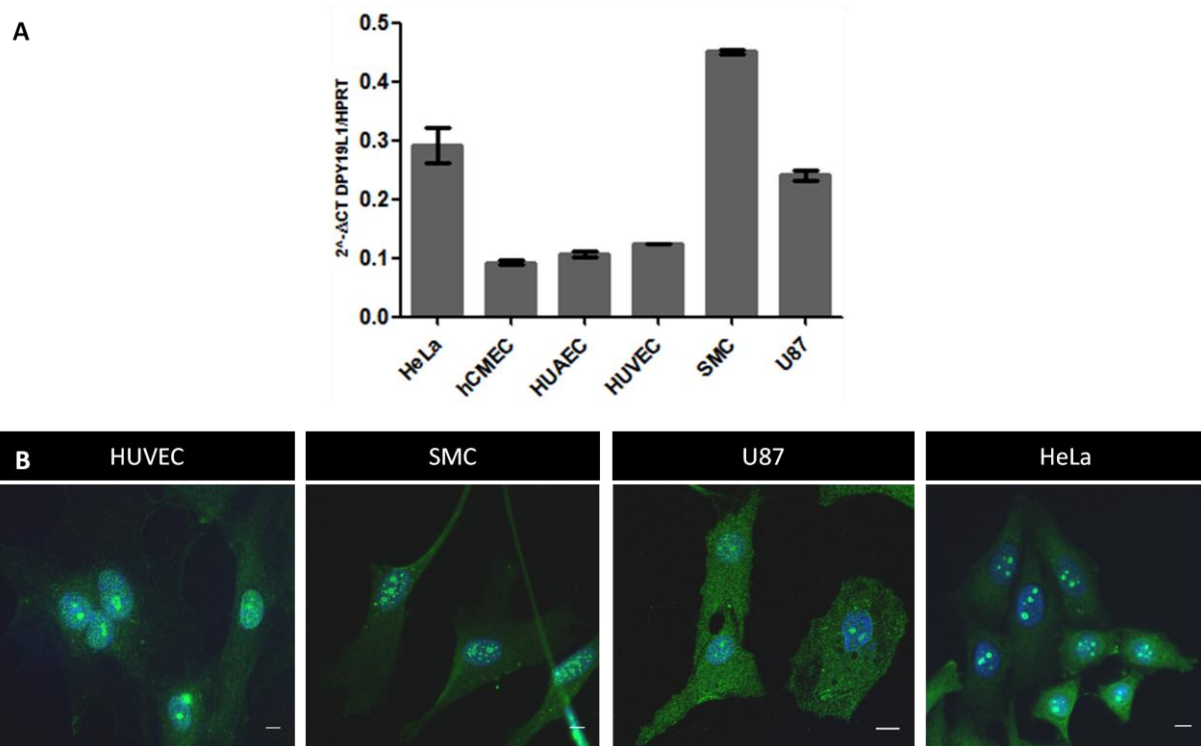


Figure 37 : Expression de DPY19L1 dans les cellules en culture. A. qPCR réalisée sur trois extractions différentes d'ARN à partir de cellules en culture, expression de DPY19L1 normalisée par rapport à HPRT ; B. Immunocytologie sur différentes lignées cellulaires fixées. Cellules tumorales (HeLa, U87), cellules endothéliales (hCMEC, HUVEC et HUAEC) et cellules musculaires lisses (SMC), échelle de taille = 5µm, barres d'erreur SEM. Microscopie confocale.

Dans les cellules en culture, dpy19l1 est faiblement exprimée et de façon diffuse dans le cytoplasme de toutes les cellules testées, et de manière plus intense, sous forme ponctiforme dans le noyau (Figure 37C). Ce marquage ponctiforme est similaire à celui observé dans certaines cellules tumorales et endothéliales sur les coupes de tumeurs de patients (Figure 36, étoiles). Il ressemble à un marquage nucléolaire suggérant un rôle dans la synthèse des ribosomes. Mais dpy19l1 étant décrite comme une protéine membranaire (138) sa localisation nucléaire et cytoplasmique diffuse n'est pas en accord avec la littérature. De plus le niveau d'expression de dpy19l1 semble identique dans toutes les cellules utilisées, ce qui contredit les résultats obtenus chez les patients et par les qPCR qui indiquaient une expression préférentielle dans les vSMC. De plus en immunohistochimie, l'anticorps utilisé génère beaucoup de bruit de fond qui rend parfois le signal spécifique difficile à

détecter. Ces résultats non concordants et l'absence de détection de la protéine en western blot, nous ont conduits à ne pas poursuivre l'étude vers des tests fonctionnels en culture car nous ne disposons pas des outils nécessaires. Cependant, une interprétation fonctionnelle du profil d'expression périvasculaire de DPY19L1 sera proposée dans la partie III.B.2.e)(1) de ce manuscrit suite à l'observation de son expression dans des cellules tumorales transdifférenciées en cellules murales.

(b) Discussion : DPY19L1, un nouveau marqueur diagnostique du glioblastome

Cette étude a permis de mettre en évidence un nouveau marqueur diagnostique du GBM dont l'expression semble vasculaire dans cette pathologie. Les données obtenues par quantification de l'expression de DPY19L1 chez une cohorte locale de patients atteints de GBM ont permis de confirmer les données publiques, à savoir que la surexpression de ce gène entraîne une augmentation de 1/3 du risque de décéder précocement ([Figure 27](#), [Figure 30](#)). Contrairement à ce qui était prédit par l'exploration des bases de données publiques, nous n'avons pas mis en évidence d'interaction statistique entre DPY19L1 et FSTL1, marqueur diagnostique du GBM récemment décrit ([147](#)), sur la survie des patients de notre cohorte. Il serait intéressant de savoir si sur une cohorte élargie avec des groupes d'expression équilibrés, cette interaction, qui permettrait d'atteindre une valeur pronostique plus élevée, peut être validée.

Dpy19l1 possède 11 domaines transmembranaires, elle devrait donc être localisée au niveau de la membrane plasmique, dans le golgi ou du réticulum endoplasmique. Or dans les cellules en culture utilisées dans notre étude, cette protéine est détectée à l'intérieur du noyau et de façon diffuse dans le cytoplasme ([Figure 37C](#)). Il se peut que la protéine soit relocalisée à la membrane en réponse à certains signaux cellulaires, ou dans un environnement particulier. Tous les contrôles possibles ont été réalisés sur la fiabilité de l'anticorps que nous avons utilisé pour les immunomarquages (contrôles négatifs, compétition avec le peptide antigène). Néanmoins si une exploration fonctionnelle devait être poursuivie, il sera essentiel de valider l'expression subcellulaire de Dpy19l1, soit avec un anticorps dirigé contre la protéine recombinante, soit par surexpression de la protéine taggée.

Les hybridations *in situ* ont mis en évidence une localisation vasculaire de DPY19L1 similaire à celle du marqueur endothélial CD31 laissant supposer une expression endothéliale. Mais les immunohistochimies et les qPCR ont localisé l'expression de dpy19l1 dans les cellules musculaires lisses/péricytes et non dans les cellules endothéliales. Ces cellules ont un rôle physiologique important dans le développement et le maintien du réseau vasculaire lors du développement embryonnaire ([152-155](#)) mais aussi lors de l'angiogenèse tumorale ([156-160](#)). Les vaisseaux sanguins sont constitués de deux types cellulaires distincts en étroite interaction : les cellules endothéliales qui forment la paroi du vaisseau, et les cellules murales (péricytes et vSMC) qui enveloppent le tube vasculaire ([Figure 38](#)).

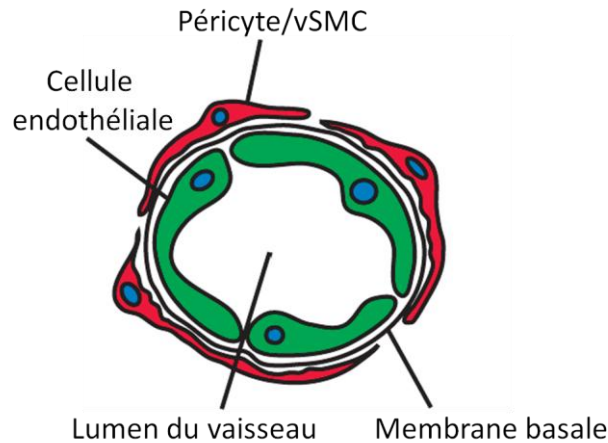


Figure 38 : Organisation d'un capillaire sanguin, modifié d'après (154).

Les péricytes/vSMC, qui expriment le PDGFR β , sont recrutés par l'endothélium en développement qui sécrète du PDGF-B, afin d'uniformiser le diamètre des capillaires et de stabiliser le nouveau réseau vasculaire (153). Les cellules murales contrôlent aussi la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales, assurant ainsi le développement et la maturation correcte du réseau vasculaire. Sans ces cellules, les vaisseaux sont plus fins, ponctués avec de petits lumens et moins stables. Les péricytes/vSMC produisent des facteurs de croissance et de survie pour les cellules endothéliales tout en empêchant leur prolifération intense. Il y a une communication constante entre les cellules endothéliales et les cellules murales permettant d'assurer la fonction vasculaire et le maintien de l'intégrité du réseau vasculaire (152). Dans le glioblastome caractérisé par une angiogenèse très active, les cellules murales ont un rôle très important afin de stabiliser les vaisseaux néoformés. Les péricytes/vSMC tumoraux sont recrutés à partir de précurseurs de la moelle osseuse par la sécrétion de PDGF-B mais aussi par l'hypoxie via HIF1 α et SDF1 α (157) afin de promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux nécessaires à la croissance tumorale (160). Ils participent aussi à la micro-prolifération vasculaire caractéristique du GBM en stabilisant les niches périvasculaires. L'inhibition de la prolifération/recrutement de péricytes lors du développement tumoral induit une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales et les rend plus sensibles aux traitements anti-angiogéniques (152, 161). Ce résultat indique que les péricytes/vSMC ont un rôle protecteur du réseau vasculaire lors du développement physiologique et tumoral. DPY19L1, étant exprimé dans les péricytes/vSMC, pourrait avoir un rôle soit dans le recrutement de ces cellules par le réseau vasculaire en développement, soit dans la signalisation entre les cellules endothéliales et les cellules murales. Chez le nématode et dans le cerveau de souris DPY19L1 est décrit comme participant à la migration des précurseurs neuronaux (136, 138). Il est donc raisonnable de penser qu'il peut aussi être impliqué dans la migration des péricytes suite aux signaux envoyés par les néovaisseaux.

Récemment, dpy19l1 a été décrite comme ayant une activité C-mannosyltransférase, dans une étude qui n'était pas parue lorsque j'ai étudié DPY19L1 (150). Elle a donc un rôle de glycosylation sur les protéines possédant un ou plusieurs motifs de répétition thrombospondine (TSR) : WSXWS. La C-mannosylation est une glycosylation particulière caractérisée par le transfert d'un groupement α -mannopyranosyl sur le carbone C2 du premier tryptophane du motif TSR (162). Cette modification est plus fréquente sur les protéines solubles, permettant ainsi leur sécrétion, ou sur des récepteurs comme les récepteurs aux cytokines de type I. Chez l'Homme, il existe 48 sites de C-mannosylation répartis sur 10 protéines dont les thrombospondines 1 et 2, des protéines impliquées dans

l'angiogenèse (BAI 1, 2 et 3 ; ADAMTS), les sémaphorines F et G, le procollagène 1, des protéines du complément, ou encore l'IL12. L'effet de la C-mannosylation est mal connu car très peu de C-mannosyltransférases ont été identifiées (163). Néanmoins, il y a quelques données sur l'effet de cette modification sur les lipopolysaccharides (LPS) dans les macrophages (164) ou encore sur la thrombospondine 1 (TSP1) (165). Dans le premier exemple, la C-mannosylation des LPS entraîne une plus forte sécrétion de TNF- α . TSP1 possède trois sites TSR mais seuls les deux premiers sont modifiés (165), ce qui permettrait sa liaison avec le TGF β , la fibronectine ou l'héparine (163).

Chez le nématode, DPY19 est nécessaire à l'orientation et à la migration des neuroblastes le long de l'axe antéropostérieur (136). Afin de remplir sa fonction, il mannosyle MIG21 impliquée dans la migration neuronale (150), permettant ainsi le bon développement de l'animal. Chez les Mammifères, il existe quatre gènes DPY19 : DPY19L1, L2, L3 et L4, dont trois sont présents chez l'ensemble des vertébrés (DPY19L1/L2, L3, L4). Dpy19L1 ayant la séquence la plus similaire à la protéine du nématode (51% d'identité), il est raisonnable de penser que c'est elle qui a conservé la fonction de C-mannosyltransférase chez les vertébrés (150). Ainsi, dans le GBM, dpy19L1 agirait dans les SMC/péricytes en glycosylant une ou plusieurs cibles afin de permettre à ces cellules de remplir leur rôle de maintien de l'intégrité du réseau vasculaire. L'une des cibles potentielles pourrait être la thrombospondine 1 qui induit la prolifération et la migration des SMC (166-168) et est impliquée dans la malignité du GBM (169).

TSP1 est une protéine de la matrice extracellulaire, dont la synthèse dans les vSMC est stimulée par le PDGF synthétisé à la fois par les cellules endothéliales et les SMC (166-168). Cette protéine permet la prolifération des SMC en culture et induit leur migration *in vivo* (170, 171). Elle participe à l'angiogenèse en se liant sur ses récepteurs CD36 et CD47 exprimés par les cellules endothéliales (172) inhibant ainsi l'angiogenèse. TSP1 peut aussi induire l'angiogenèse de manière concentration dépendante en se liant aux récepteurs $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$ par sa partie amino-terminale, et induit notamment la formation de micro-vaisseaux. Elle interagit avec le TGF β qui a un rôle important dans la communication entre les péricytes/vSMC et les cellules endothéliales (160). TSP1 est donc une protéine importante pour le développement physiologique du réseau vasculaire, elle permet de le stabiliser en recrutant les cellules murales mais aussi de contrôler sa croissance en inhibant l'angiogenèse. Elle est fortement surexprimée dans la plupart des GBM et participe à la malignité tumorale car elle active le TGF β qui est impliqué dans l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules tumorales (169).

Mon hypothèse est que l'ajout d'un groupement α -mannopyranosyl sur TSP1 par dpy19L1 permettrait d'activer le TGF β ce qui activerait les péricytes/vSMC qui migrent vers les néovaisseaux afin de les stabiliser et ainsi contribuer à l'angiogenèse du GBM et son développement. Le TGF β latent est activé par la liaison sur plusieurs domaines de TSP1 (173, 174) et notamment les séquences TSR qui sont les cibles de la C-mannosylation. La glycosylation de TSP1 par dpy19L1 pourrait entraîner un changement de conformation facilitant la liaison et l'activation du TGF β . Les domaines TSR de la TSP1 sont aussi connus pour induire l'inhibition de l'angiogenèse et l'apoptose des cellules endothéliales (172). Dpy19L1 pourrait contrecarrer cet effet inhibiteur en c-mannosylant TSP1 et ainsi participer à l'angiogenèse dans le GBM. Elle pourrait aussi participer aux mécanismes de récurrence du GBM suite aux traitements anti-angiogéniques en permettant la stabilisation des néovaisseaux

suite à la diminution du taux de VEGF ou en participant à la vascularisation du GBM par un autre mécanisme que l'angiogenèse.

Nous avons mis en évidence un nouveau marqueur de mauvais pronostic du GBM qui semble avoir un rôle au niveau vasculaire et pourrait participer à la résistance/récurrence du GBM. Nous n'avons pas pu obtenir de données quant à l'implication fonctionnelle de dpy19l1 dans l'angiogenèse. Néanmoins la thrombospondine étant une cible de l'activité C-mannosyltransférase, on peut émettre l'hypothèse d'une contribution de dpy19l1 au niveau du développement et la migration des péricytes/vSMC et/ou elle pourrait empêcher l'inhibition de l'angiogenèse afin de permettre le développement du réseau vasculaire dans le GBM.

Le deuxième gène candidat KIF20A codant MKlp2 a également été soumis à une étude de profil d'expression chez les patients ainsi que dans les cellules en culture.

(2) MKlp2

(a) Profil d'expression

Afin de vérifier l'expression de MKlp2 dans les gliomes et les GBM décrits sur la base de données Human Protein Atlas, des marquages ont été réalisés sur des coupes gliomes de bas grade ([Figure 39](#)) et de GBM ([Figure 40](#)).

Dans les gliomes de bas grade, une expression vasculaire nucléaire est observée tout comme ce qui était décrit sur la [Figure 32B](#). MKlp2 est exprimée dans les noyaux des cellules endothéliales ([Figure 39](#), têtes de flèches). Son expression est aussi observée dans les noyaux des cellules entourant les vaisseaux cd31 positifs sans aucune colocalisation avec le marqueur endothélial, ce qui suggère une expression par les cellules murales. Son expression nucléaire endothéliale semble liée à sa fonction mitotique suggérant que ces cellules sont en prolifération.

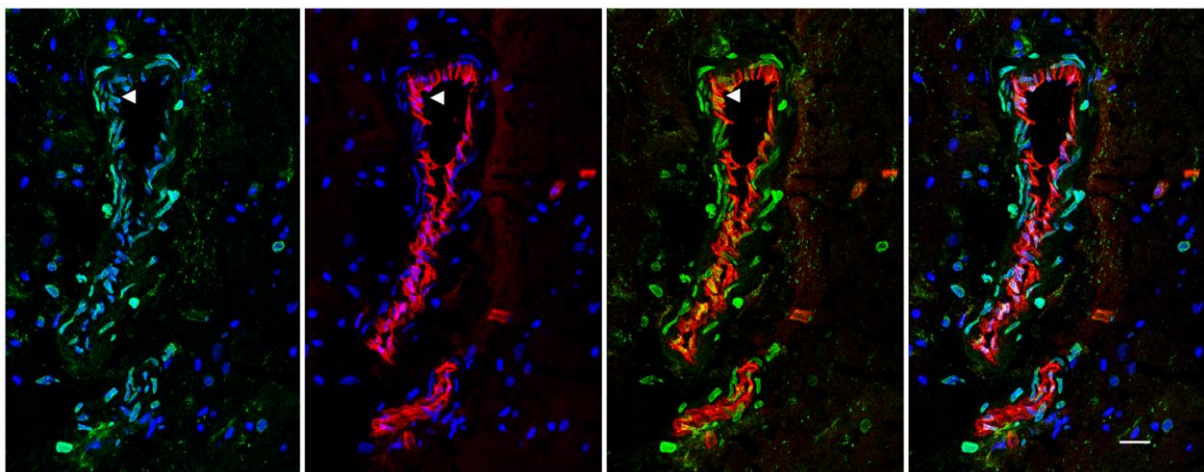


Figure 39 : Expression de MKlp2 chez les patients atteints de gliomes de bas grade : exemple d'un oligo-astrocytome mixte. Co-marquages MKlp2 (vert) et cd31 (rouge). Échelle de taille = 20µm, têtes de flèches = cellules endothéliales. Microscopie confocale.

L'expression de MKlp2 a ensuite été explorée dans le GBM et est observée au niveau vasculaire ([Figure 40](#)), ce qui est en accord avec les données publiques ([Figure 32C](#)). Ce marquage est cytoplasmique dans les cellules entourant les structures marquées par cd31 ([Figure 40A](#)), donc cette

protéine n'est pas exprimée par les cellules endothéliales cd31 positives, mais sans doute par des cellules murales telles que les péricytes ou les vSMC. C'est pourquoi des doubles marquages avec deux marqueurs de ces cellules : l' α SMA et la desmine (Figure 40B et C) ont été réalisés. MKlp2 ne colocalise avec aucun de ces marqueurs. Le marquage est présent en étroite association avec les structures capillaires (Figure 40, flèches), les cellules positives semblent aussi participer à la structure même des vaisseaux, elles sont présentes dans les espaces entre les cellules vasculaires (Figure 40, étoiles). MKlp2 est aussi exprimée dans les micro-proliférations vasculaires (Figure 40D), structures typiques du GBM contenant des cellules endothéliales, des péricytes/vSMC, des cellules souches tumorales, des astrocytes, des macrophages et des cellules de la microglie (158). Il semblerait que dans le GBM, MKlp2 soit exprimée dans des cellules tumorales recrutées au niveau des vaisseaux et pouvant avoir un rôle de renforcement du réseau vasculaire sans se transdifférencier en cellules murales ou endothéliales.

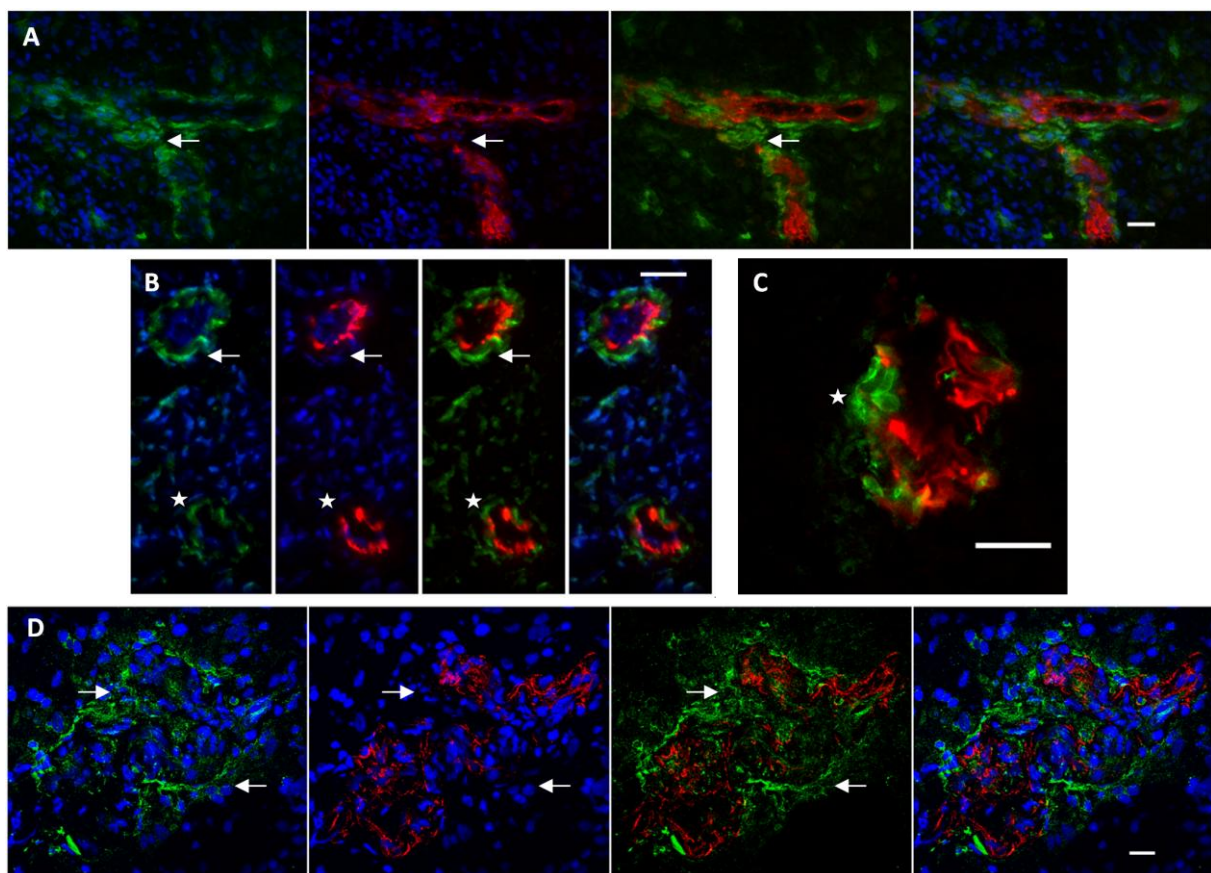


Figure 40 : Expression de MKlp2 chez les patients atteints de GBM. Co-marquages MKlp2 (vert) avec cd31 (A); l' α SMA (B et D) ou la desmine (C) en rouge. Barres de calibration = 20 μ m, flèches = cellules négatives pour les marqueurs vasculaires et positives pour MKlp2, étoiles = cellules positives pour MKlp2 semblant impliquées dans la structure des vaisseaux. A-C. Microscopie à épifluorescence, D. Microscopie confocale.

Dans les zones de niches vasculaires, il existe une forte proximité entre le marquage α SMA et MKlp2 (Figure 41A, flèches), sans colocalisation, sauf dans certaines cellules pour lesquelles on note une expression de ces deux protéines (Figure 41A, étoiles), suggérant que quelques vSMC expriment MKlp2 dans les micro-proliférations vasculaires. Mais l'identité de ces cellules reste inconnue, il est possible qu'il s'agisse des cellules tumorales ou bien des cellules souches tumorales recrutées au niveau des vaisseaux pour participer à leur formation ou leur stabilisation. Afin de déterminer l'identité de ces cellules, un co-marquage avec le marqueur de cellules souches, la nestine, a été

réalisé (Figure 41B). MKlp2 colocalise parfaitement avec la nestine confirmant son expression par les cellules souches tumorales dans les échantillons de glioblastome humain. Ainsi ces résultats suggèrent que MKlp2 pourrait être impliquée dans le mimétisme vasculaire des cellules souches tumorales, avec une fonction cellulaire distincte de sa fonction connue au cours de la division cellulaire.

Le profil d'expression de MKlp2 a aussi été étudié dans différents types de cellules en culture ; cellules tumorales (U87 et HeLa), cellules endothéliales (hCMEC et HUVEC) et SMC ; par qPCR, western blot et immunologie (Figure 42).

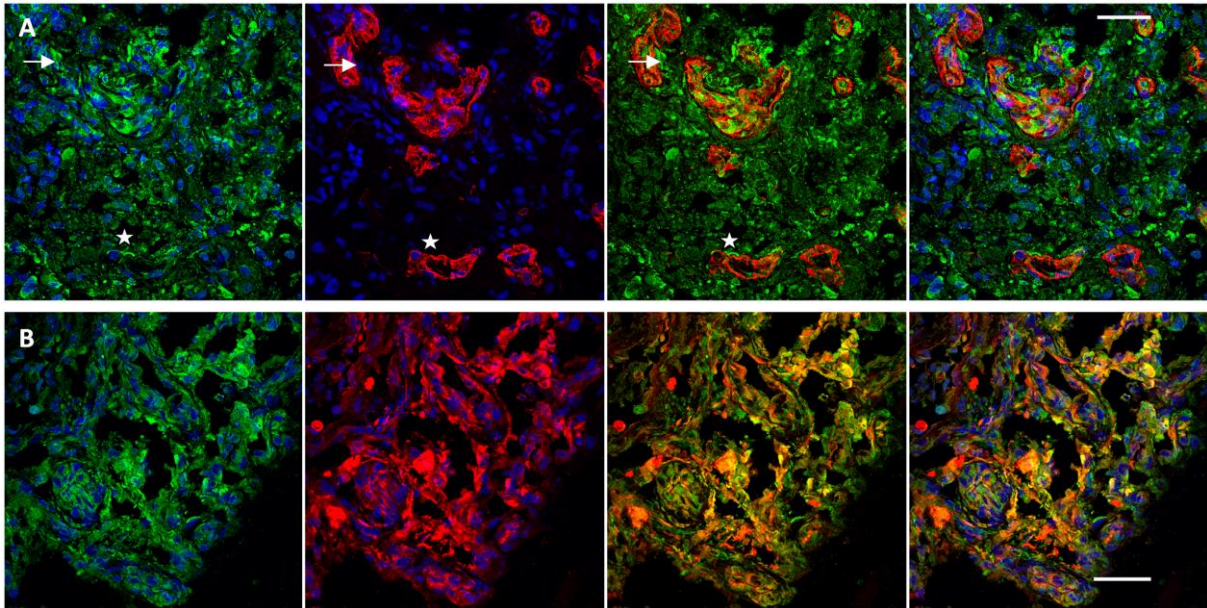


Figure 41 : Expression de MKlp2 dans les cellules souches chez les patients atteints de GBM. Co-marquage MKlp2 (vert) avec l' α SMA (rouge, A.) ou la nestine (rouge, B.). Barre de calibration = 40 μ m, flèches = cellules positives pour MKlp2 et négatives pour l' α SMA, étoiles = cellules positives pour MKlp2 et l' α SMA. Microscopie confocale.

KIF20A est exprimé de façon plus importante dans les cellules tumorales, U87 et HeLa, que dans les cellules endothéliales ou musculaires lisses (Figure 42A), ce qui est peut être lié à leur taux de prolifération plus important et à la fonction mitotique de MKlp2. En western blot (Figure 42B) nous observons, dans tous les types cellulaires testés, une bande aux alentours de 100kDa, la taille attendue de MKlp2, confirmant ainsi le profil d'expression mis en avant par la qPCR. Il montre aussi une forte expression dans les hCMEC/d3 qui sont des cellules micro-vasculaires du cerveau immortalisées. La surexpression dans ces dernières pourrait s'expliquer par un taux de prolifération plus important dans les cellules immortalisées.

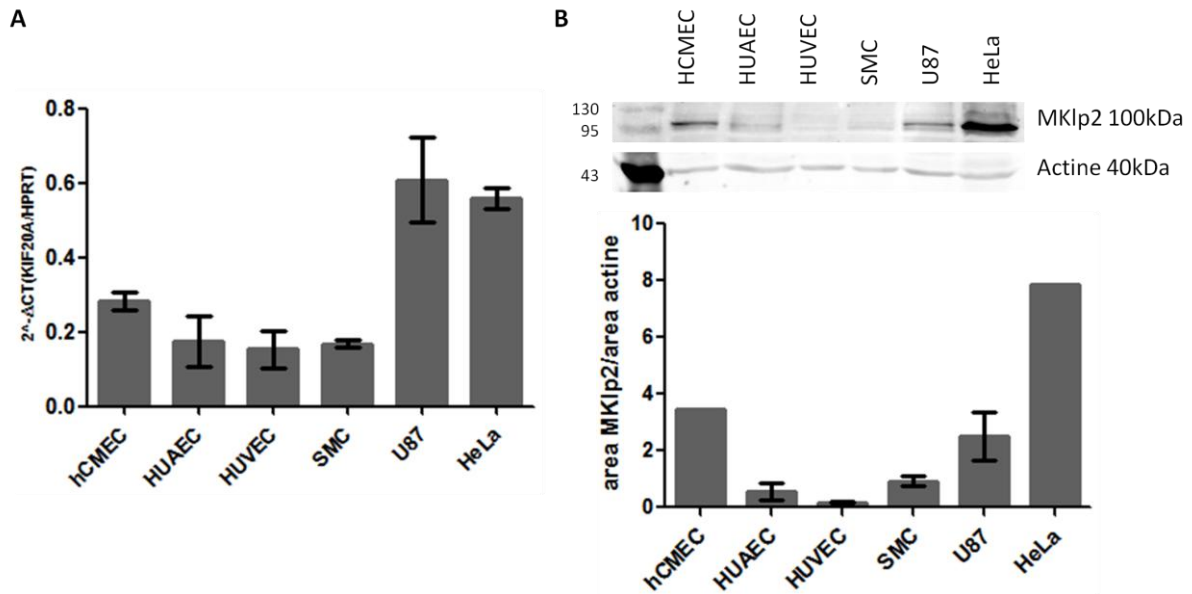


Figure 42 : Expression de KIF20A/MKlp2 dans les cellules en culture. A. qPCR réalisées sur trois extractions d'ARN à partir de cellules en culture, expression de KIF20A normalisée par rapport à l'expression de HPRT ; B. Western Blot et quantification de deux gels réalisés avec deux extraits protéiques différents, expression de MKlp2 normalisée par rapport à l'actine. Cellules tumorales (HeLa, U87), cellules endothéliales (hCMEC, HUVEC et HUAEC) et cellules musculaires lisses (SMC). Barres d'erreur SEM.

La localisation sub-cellulaire a ensuite été recherchée dans les cellules U87, HUVEC et hCMEC afin de vérifier si, dans les cellules exprimant un fort taux de MKlp2, la protéine a une localisation particulière et différente des autres types cellulaires (Figure 43). Dans tous les types cellulaires, une localisation au niveau de l'anneau contractile est détectée lors de la télophase (Figure 43A2 et 3, flèches), ainsi qu'une expression cytoplasmique diffuse et nucléaire plus intense lors de l'interphase (Figure 43A1). La localisation au niveau du corps intermédiaire confirme que les anticorps utilisés sont spécifiques de MKlp2 car cette localisation est en accord avec le rôle de la protéine pendant le cycle cellulaire (102).

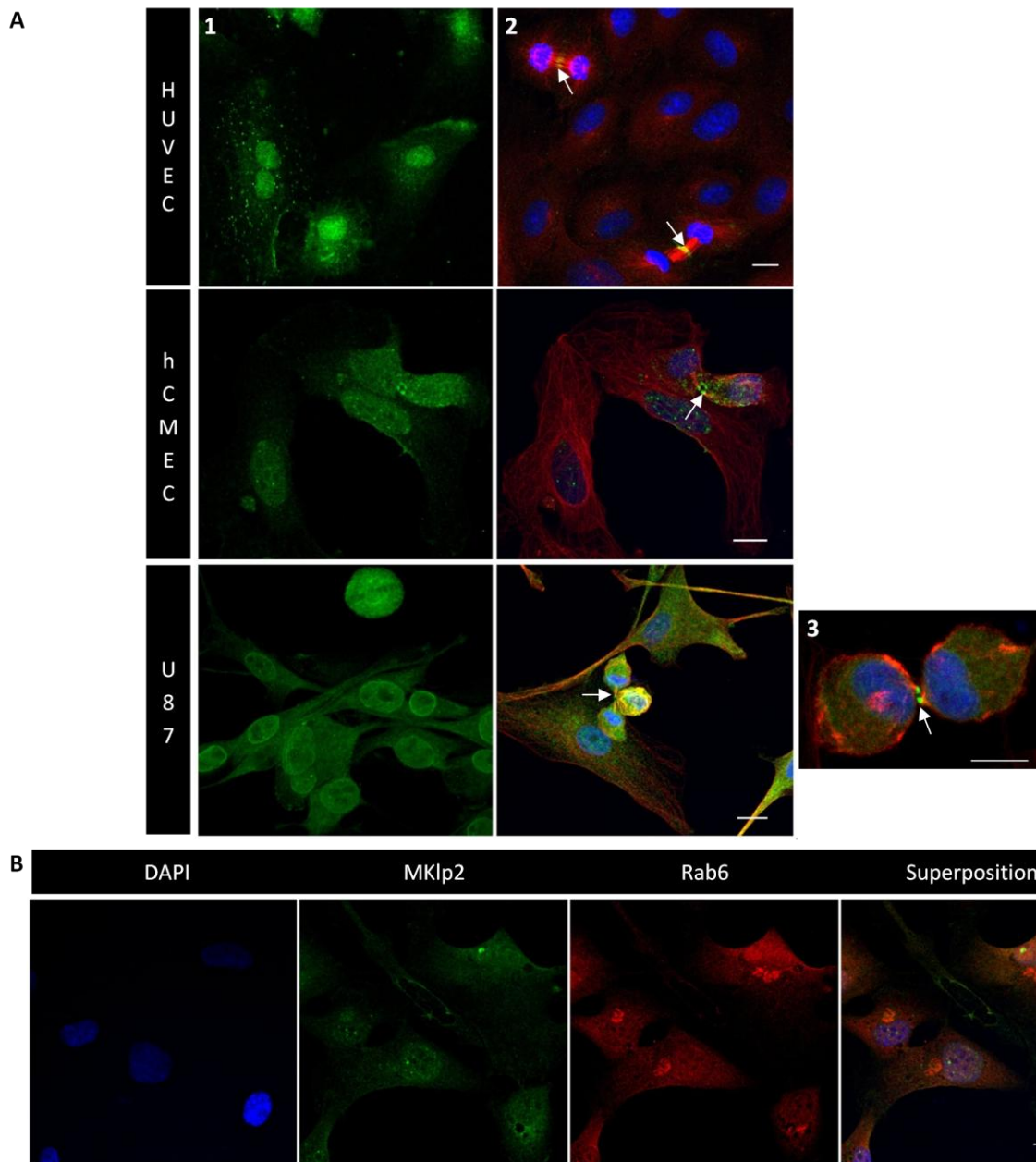


Figure 43 : Caractérisation de l'expression subcellulaire de MKlp2. A1. MKlp2 ; A2-3. Co-marquage MKlp2 (vert), α -tubuline (rouge) et DAPI (bleu), MKlp2 est exprimée au niveau du corps intermédiaire lors de la cytotéiérèse ; A3. Agrandissement de deux cellules U87 en cytokinèse ; B. Co-marquage MKlp2 (vert) et Rab6 (rouge) dans les hCMEC, ne montrant pas de colocalisation entre les deux protéines dans ces cellules ni dans le U87. Barre de calibration = 5 μ m, flèches = corps intermédiaire. Microscopie confocale.

MKlp2 est aussi décrite comme participant au transport rétrograde de protéines de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique via son interaction avec Rab6 (101). La colocalisation avec Rab6 a donc été testée dans les hCMEC (Figure 43B) et les U87 (résultats non montrés). Rab6 est une protéine exprimée dans l'appareil de Golgi (120), comme le montre le marquage (en rouge). On retrouve l'expression uniforme de MKlp2 dans le cytoplasme des cellules (en vert) qui ne colocalise pas avec Rab6 contrairement à ce qui est décrit dans certains articles (100, 101, 119, 120) (Figure 43B, superposition). Notons que l'expression de MKlp2 dans l'appareil de golgi n'est pas mise en évidence dans toutes les études publiées (105, 175). Nos marquages ne permettent pas de mettre en évidence une localisation particulière dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines, ni

un rôle différent de celui, majoritairement décrit pour MKlp2, lors de la cytokinèse, dans les cellules étudiées.

Afin d'explorer un potentiel rôle de MKlp2 dans les cellules en culture, autre que son rôle dans le cycle cellulaire, différents tests ont été effectués suite à l'extinction de la protéine par ARN interférent (siRNA) dans les U87. La transfection des U87 avec 25nM de siRNA KIF20A entraîne une extinction totale de l'expression de la protéine (Figure 44A).

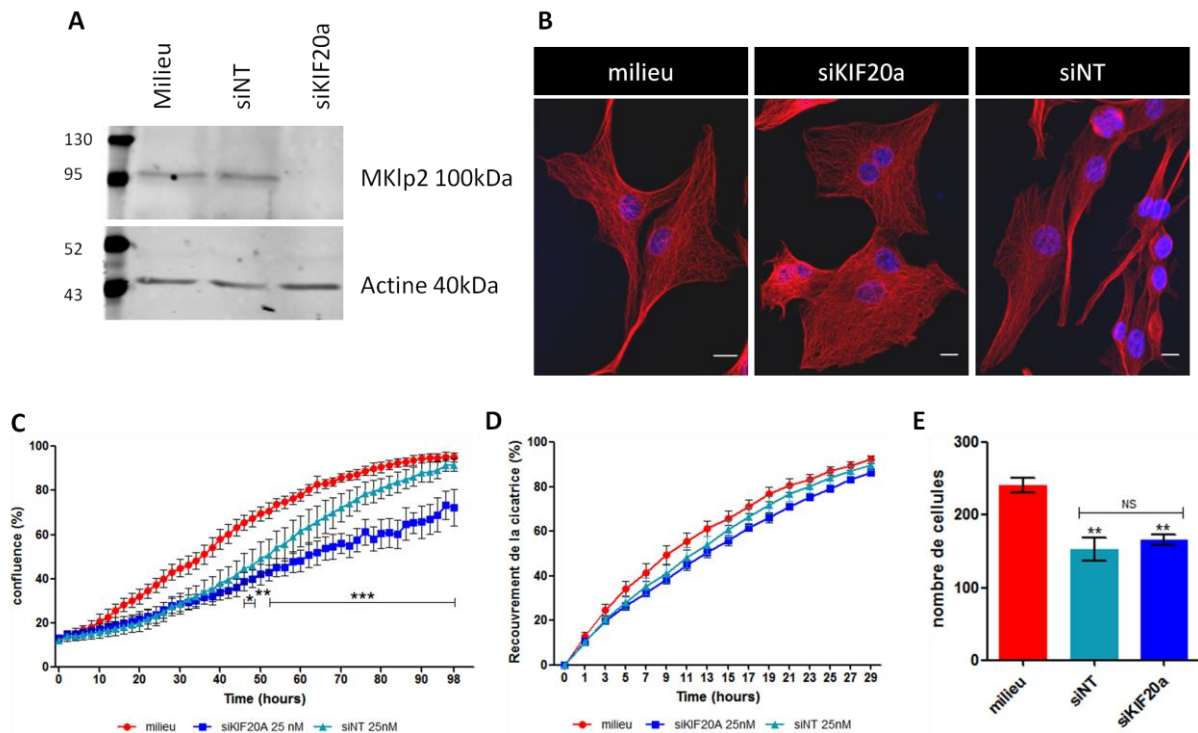


Figure 44 : Tests fonctionnels suite à l'extinction de MKlp2 dans les U87. Les cellules U87 en culture ont été transfectées selon le protocole de la lipofectamine RNAiMax avec 25nM de siRNA KIF20A ou de siRNA contrôle (non target, NT) pendant 24, 48 et 72h. L'expression de la protéine MKlp2 est inhibée à tous les temps testés. **A.** Western Blot, 24h de transfection ; **B.** immunomarquages α -tubuline (rouge) sur des cellules U87 transfectées ou non (milieu) avec les siKIF20A ou NT 25nM pendant 48h, microscopie confocale ; **C.** Test de prolifération en plaque 96 puits à l'IncuCyte en milieu complet, siNT vs siKIF20A significatif à partir de 42h, une étoile = $p < 0.05$, deux étoiles = $p < 0.01$ et trois étoiles = $p < 0.001$; **D.** Test de migration en plaque 96 puits à l'IncuCyte 48h après transfection en milieu 1% SVF, non significatif ; **E.** Migration en chambre de Boyden, milieu vs siRNA significatif $p < 0.05$, milieu vs siRNA non significatif. Les tests IncuCyte et Boyden ont été réalisés deux fois de manière indépendante (barres d'erreur SEM).

L'inhibition de MKlp2 par siRNA dans les U87 entraîne la formation de cellules binucléées absentes dans les conditions milieu et siNT (Figure 44B). Ce résultat est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature sur le rôle de KIF20A dans le cycle cellulaire (107). En effet, l'absence de MKlp2 cause un défaut de cytokinèse entraînant l'accumulation de cellules binucléées. Ce résultat qui complète celui obtenu avec le western blot démontre que le siRNA inhibe bien la synthèse de MKlp2 dans les U87. Une fois le siRNA validé, l'effet de l'inhibition de MKlp2 sur la prolifération de cellules a été testé. Comme attendu (128), l'inhibition de MKlp2 entraîne une diminution de la prolifération des U87 (Figure 44C). La transfection fragilise les cellules ce qui explique pourquoi les U87 traitées avec les siRNA NT et KIF20A ont une prolifération ralentie par rapport aux cellules non traitées (milieu). À partir de 36h après la transfection, les cellules traitées avec le siNT récupèrent une vitesse de prolifération équivalente aux cellules non traitées et alors que les cellules transfectées

avec le siRNA KIF20A maintiennent une prolifération ralentie, la différence devenant significative à partir de 42h ($p < 0.05$, [Figure 44C](#)).

L'hypothèse résultant de l'analyse du profil d'expression de MKlp2 chez les patients est que la protéine est exprimée dans des cellules tumorales, ou cellules souches tumorales recrutées au niveau des vaisseaux afin de participer à la vascularisation. L'effet de son inhibition sur la migration des cellules tumorales U87 a donc été testé ([Figure 44D](#)). Les cellules ont étéensemencées sur une matrice de matrigel (100 μ g/mL) ou de collagène I (100 μ g/mL) puis transfectées avec 25nM de siRNA afin de réaliser l'expérience de comblement de la brèche 24h après transfection. Nous avons remarqué que l'inhibition de MKlp2 entraîne une diminution de l'adhérence aux matrices utilisées. Ainsi lors des expériences de comblement de la cicatrice, les cellules se décollent fortement rendant difficile l'analyse de la migration dans ce modèle. Néanmoins, dans les puits où les cellules se sont le moins décollées, on observe que l'inhibition de MKlp2 n'induit aucune différence de migration par rapport à des cellules traitées ou non avec le siNT. Afin de vérifier l'absence d'effet du siRNA sur la migration, l'expérience a été réalisée dans des chambres de Boyden où un défaut d'adhérence ne perturbe pas l'expérience. Les cellules ont été transfectées en plaque 6 puits pendant 24h ou 48h puisensemencées dans la partie supérieure de la chambre de Boyden afin de migrer pendant 6h. La transfection entraîne une diminution significative de la capacité migratoire des U87 par chimiotaxie dans les heures qui suivent ([Figure 44E](#)). Mais l'inhibition de MKlp2 ne perturbe pas la migration des U87 par rapport à celles traitées avec le siNT. MKlp2 ne semble donc pas impliquée dans la migration des U87 en culture.

Nos travaux ont montré que KIF20A/MKlp2 est exprimé dans le cytoplasme des cellules souches tumorales dans les GBM. Ceci suggère un rôle différentiel dans le GBM par rapport aux gliomes de grades inférieurs pour lesquels seule une expression nucléaire dans les cellules tumorales et endothéliales a été constatée. L'expression cytoplasmique est en faveur d'un rôle, autre que lors de la mitose, permettant la vascularisation du GBM, comme suggéré par les données préliminaires (paragraphe I.A.5). Les expériences *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence ce rôle différentiel.

(b) Discussion : Implication de KIF20A/MKlp2 dans la récurrence du GBM ?

Notre étude a aussi permis de mettre en évidence un nouveau marqueur vasculaire du GBM : KIF20A/MKlp2.

La protéine est décrite comme participant au transport rétrograde de vésicules de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique via son interaction avec la petite protéine Rho, Rab6 (101). Elle est donc décrite comme étant exprimée dans l'appareil de Golgi, ce qui n'a pas pu être mis en évidence ici (Figure 43). Elle participe au cycle cellulaire en contrôlant la cytokinèse (111), c'est pourquoi elle est localisée au niveau du corps intermédiaire (Figure 43) lors de la cytotérièse. MKlp2 est surexprimée dans la plupart des cancers (118, 128-131, 133), mais pas dans les cellules saines correspondantes ce qui en fait une cible potentielle pour des thérapies anticancéreuses (176, 177). Dans la littérature il est décrit que KIF20A aurait d'autres rôles que lors de la mitose, y compris au niveau vasculaire, ou il a été décrit comme régulé par le TNF- α et pourrait participer à la réponse inflammatoire dans le contexte de lésions athérosclérotiques (121) ou encore dans la migration des cellules épithéliales (178). Les données du laboratoire, de la littérature ainsi que celles disponibles dans les bases de données nous ont amenés à penser que KIF20A/MKlp2 serait impliqué dans la vascularisation du glioblastome, en faisant ainsi une cible potentielle anti-angiogénique alternative au VEGF lors du traitement de ce cancer.

L'étude de son profil d'expression chez les patients atteints de gliomes de bas grade montre une expression nucléaire dans les cellules vasculaires (Figure 39), ce qui est en accord avec les bases de données (Figure 32) et avec son rôle mitotique. Dans le GBM, gliome de haut grade, MKlp2 est aussi exprimée dans le cytoplasme au niveau vasculaire, suggérant un rôle autre que son activité lors de la cytokinèse (Figure 32, Figure 34 et Figure 40), mais il n'est exprimé dans aucun type cellulaire participant à la structure classique des vaisseaux. En effet, la protéine n'est exprimée ni par les cellules endothéliales, ni par les cellules murales, mais plutôt par des cellules étroitement associées aux vaisseaux exprimant le marqueur de cellules souches, la nestine, suggérant une expression dans ces cellules. Elle est aussi fortement exprimée dans les micro-proliférations vasculaires constituées de cellules endothéliales, de péricytes/vSMC, de cellules de la microglie et de cellules souches. Les micro-proliférations forment des niches vasculaires permettant le maintien et la croissance des cellules souches tumorales (88).

Les GSC constituent une population de cellules très importante dans le développement tumoral ainsi que dans la vascularisation de la tumeur et probablement dans sa résistance et la récurrence suite aux différents traitements mis en place. Ainsi comme MKlp2 semble exprimée par ces cellules dans le GBM, elle pourrait être impliquée dans la vascularisation tumorale ou dans la genèse et le développement de la tumeur ainsi que dans sa récurrence. Mais notre hypothèse est que KIF20A serait plutôt impliquée dans la mise en place du réseau vasculaire. En effet, KIF20A est exprimée dans les structures vasculaires lors du développement embryonnaire chez la souris (Figure 31) suggérant un rôle dans leur mise en place. De plus dans la littérature, il est décrit que MKlp2 pourrait être impliquée dans la régulation de l'homéostasie vasculaire par les cellules endothéliales (121). Les données obtenues dans cette étude sont aussi en faveur d'un rôle vasculaire pour KIF20A, MKlp2 étant exprimée par quelques vSMC dans les niches vasculaires. Ainsi elle pourrait participer à la différenciation des GSC en vSMC/péricytes et stabiliser les néovaisseaux, un processus qui vient

d'être décrit (78) et que je discuterai en regard de l'ensemble de nos résultats, ou être impliquée dans le phénomène de mimétisme vasculaire (38). MKlp2 pourrait aussi permettre le transport de molécules de signalisation à la membrane afin d'assurer la communication entre les GSC et les cellules du microenvironnement comme décrit dans le cancer du pancréas (130). La signalisation avec les cellules endothéliales aiderait au maintien du réseau vasculaire. KIF20A pourrait aussi participer à la résistance des GSC aux traitements anti-tumoraux comme cela a été décrit dans le cancer de l'estomac (125). En effet, son inhibition dans le cancer de l'estomac entraîne une diminution de la viabilité cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire et augmente la sensibilité des cellules tumorales à la génistéine (traitement utilisé dans ce cancer), alors que sa surexpression entraîne une résistance au traitement.

Pour tester ces hypothèses, il fallait s'engager vers l'étude de KIF20A dans les GSC afin d'examiner l'effet de son inhibition sur ces cellules. En effet l'étude menée sur les lignées cellulaires n'a pas permis de mettre en avant un rôle autre que celui décrit lors de la mitose. Les U87 ne contenant qu'une faible proportion de cellules souches (0.15%), cela peut expliquer le manque d'effet du siRNA observé sur la migration. Il est également nécessaire d'examiner l'effet de son absence sur le développement tumoral *in vivo* ainsi que sur la vascularisation des tumeurs. En effet, si les hypothèses sont vérifiées, nous devrions observer des tumeurs plus petites et nettement moins vascularisées en l'absence de MKlp2 que dans les tumeurs contrôles.

Les résultats décrits dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence un gène, KIF20A/MKlp2, exprimé par les cellules souches tumorales et qui semble impliqué dans la vascularisation tumorale et la résistance/récurrence du GBM. Sa contribution aux processus de vascularisation alternatifs à l'angiogenèse dépendante du VEGF nécessitait la mise au point de nouveaux modèles modélisant la réponse des cellules de GBM aux traitements anti-angiogéniques.

B. Mise au point d'un nouveau modèle d'étude du GBM et observation de sa résistance aux traitements anti-angiogéniques

1. Le modèle U87 xéno greffé chez la souris et son utilisation en essai préclinique

Le laboratoire s'intéresse aux mécanismes de l'angiogenèse tumorale et notamment aux voies de vascularisation alternatives à l'angiogenèse dépendantes du VEGF. Il existe de nombreux modèles d'études expérimentaux du GBM (179), les plus courants sont les lignées cellulaires de gliomes humains ; U87, U251, SF-188, SF126 et T98G pouvant être implantées chez la souris immunodéprimée ; et les cellules murines (GL261) ou de rat (C6). Mais aucun de ces modèles ne récapitule totalement l'hétérogénéité clinique du GBM humain (179). La lignée cellulaire la plus utilisée dans l'étude de cette tumeur, à la fois pour les tests *in vitro* et *in vivo*, et notamment au laboratoire (58, 180, 181), est la lignée de GBM humain U87-MG.

La xéno greffe de ces cellules dans le cerveau de souris immunodéficientes induit le développement d'une tumeur compacte très angiogénique. Le traitement de ces tumeurs par des anti-angiogéniques tels que l'Avastin® récapitule les effets pro-invasifs observés chez l'Homme (61), ce qui en fait un bon modèle pour étudier la résistance de ces tumeurs aux thérapies actuelles. Le groupe de Sophie Javerzat a précisé la cinétique de croissance de ce modèle de récurrence. Les tumeurs contrôles (non traitées) occupent la moitié du cerveau 36 jours après implantation et présentent des bords francs, il n'y a pas d'invasion du cerveau par les cellules tumorales (Figure 45A). Ces tumeurs sont richement vascularisées, signe d'une angiogenèse active (Figure 45C et D). Le traitement des souris xéno greffées par l'Avastin® entraîne une diminution du volume tumoral (Figure 45B) ainsi que du nombre de vaisseaux (Figure 45C et D) et double la médiane de survie des souris traitées (181). Chez ces souris, l'émergence de foyers d'invasion par les cellules tumorales est observée (Figure 45B flèches), ainsi que la présence de tumeurs satellites signe d'invasion massive et collective des cellules tumorales dans le cerveau sain. Dans ce modèle, l'Avastin® entraîne donc le changement du profil tumoral d'un phénotype angiogénique vers un phénotype pro-invasif, réponse également modélisée par l'inhibition de l'expression du VEGF avec les shRNA (181). Dans cette étude le laboratoire avait également évalué l'inhibition de IL-6 seul ou en combinatoire avec celle du VEGF.

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine qui régule de nombreux processus biologiques dont l'angiogenèse et la progression tumorale (182). Chez les patients atteints de gliome, son expression est liée au degré de malignité de la tumeur (183) avec une forte surexpression dans le GBM. Le gène de l'IL-6 étant localisé sur le chromosome 7, sa surexpression dans le GBM est souvent liée à une amplification de ce locus (184). De plus, la surexpression de l'IL-6 est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de GBM (185). L'équipe de De Groot a montré que lors de l'inhibition du VEGF, de nombreux gènes pro-invasifs étaient surexprimés et parmi eux se trouvent les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 (61, 66). Deux études ont montré que ces protéines étaient régulées par l'interleukine 6 (IL-6) dans le GBM (186, 187). Expérimentalement, la stimulation des U87, T98G et U251 avec l'IL-6 induit l'expression de MMP-9 dans ces trois lignées de GBM humains, et celle de MMP-2 dans les U87. IL-6 active la voie JAK-STAT3 et l'utilisation de siRNA contre STAT3 diminue l'expression de MMP-2 dans les U87 et réduit leur capacité invasive (186). Ces données

suggèrent que l'inhibition de l'IL-6 en combinaison avec l'Avastin® pourrait diminuer, voire même inhiber, le phénotype invasif mis en place par la tumeur suite aux traitements anti-angiogéniques.

Le groupe de Sophie Javerzat a étudié l'effet de l'inhibition de la voie de l'IL-6 sur la croissance des tumeurs U87 xéno greffées chez la souris immunodéprimée. Pour cela deux approches ont été testées, l'utilisation d'un siRNA anti-IL6 (181) ou d'un anticorps bloquant du récepteur de l'IL-6, le Tocilizumab (RoActemra ou Actemra™) développé par Roche et utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (article en cours d'écriture dans lequel je suis co-premier auteur, résumé en Annexe 2) et qui a un effet antiprolifératif sur les U87 (188). Ces deux études ont montré que l'inhibition du VEGF ou de l'IL-6 induit une réponse pro-invasive du foyer tumoral. L'inhibition combinée de ces deux cytokines entraîne la diminution significative de la masse tumorale, de la vascularisation mais aussi de l'invasion du cerveau sain dans le modèle angiogénique U87. Ainsi le ciblage de l'IL-6 permettrait de contrôler le phénotype invasif induit par le traitement des tumeurs par l'Avastin® chez la souris.

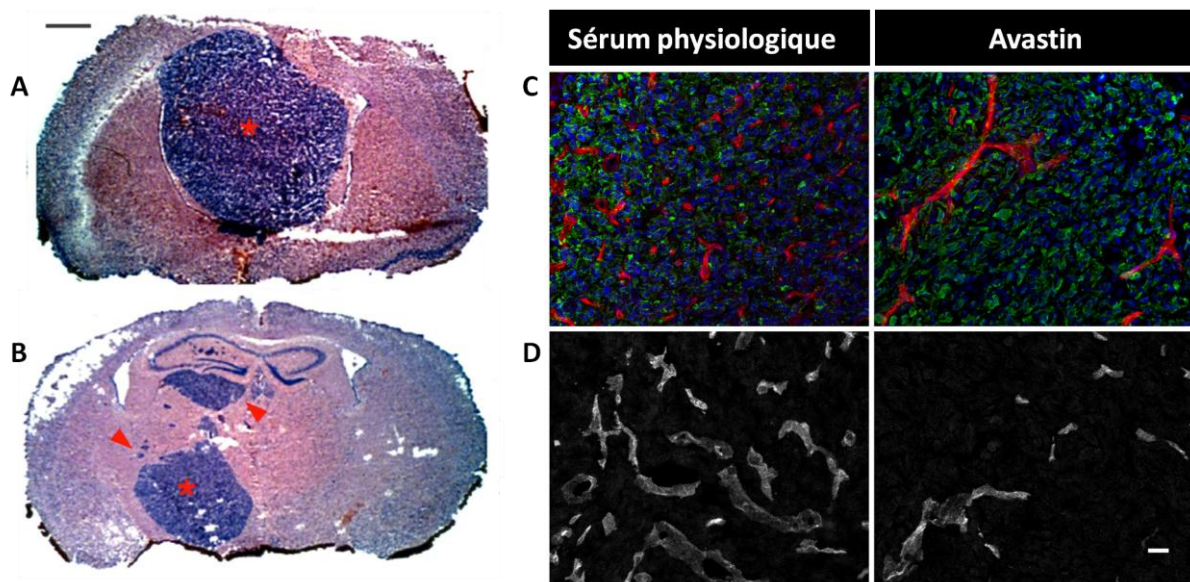


Figure 45 : Caractérisation des tumeurs U87 chez la souris suite au traitement par l'Avastin®. Les cellules U87 sont implantées en intracraniale dans l'hémisphère gauche de souris immunodéficientes, les souris sont ensuite réparties en deux groupes afin de recevoir des traitements différents : sérum physiologique ou Avastin®. Les souris sont sacrifiées et des immunohistologies sont réalisées sur les coupes de tissus. **A-B.** Coloration hématoxyline éosine sur des coupes de cerveaux de souris non traitées (**A**) ou traitées à l'Avastin® (**B**) 36 jours après implantation, images issues de (181) ; **C.** Co-marquages vimentines (vert) pour les cellules tumorales et endoglins (rouge) pour les vaisseaux ; **D.** Marquages cd31. Barres de calibration = 1mm (**A-B**) ou 50µm (**C-D**) ; étoiles = masse tumorale ; flèches = invasion. **C-D.** Microscopie confocale.

Au cours de cette étude, je me suis plus particulièrement intéressée à la récurrence sous Avastin® seul dans le modèle U87. Je souhaitais notamment voir si des phénomènes de vascularisation alternatifs à la voie angiogénique, dépendante du VEGF, étaient à l'origine de la récurrence. En effet, plusieurs études commençaient à évoquer de nouveaux modes alternatifs de vascularisation mis en place par le GBM, et notamment le phénomène de transdifférenciation des cellules tumorales/GSC en cellules endothéliales (34-36, 74), en parallèle de l'angiogenèse ou suite aux traitements anti-angiogéniques (décrit en introduction dans les chapitres I.A.2.d) et I.A.4). Ceci nous a donc incités à étudier ce phénomène dans les tumeurs U87 xéno greffées chez la souris suite à leur traitement par l'Avastin®. Pour réaliser cette étude, nous disposons au laboratoire de deux anticorps anti-cd31 spécifiques permettant de discriminer les cellules endothéliales humaines et

murines. Des co-marquages cd31 H&M (humain et murin) ont été réalisés à l'aide de ces deux anticorps afin de déterminer si certaines cellules tumorales humaines (U87) exprimaient le marqueur endothélial et formaient des structures tubulaires fonctionnelles.

Chez les souris contrôles, les cellules tumorales sont négatives pour le cd31 humain. Par contre, chez les souris traitées à l'Avastin®, de nombreuses cellules tumorales isolées expriment le marqueur endothélial cd31 humain et en particulier à proximité de vaisseaux murins réfractaires au traitement (Figure 46A). Certaines de ces cellules s'orientent dans le prolongement des vaisseaux murins (Figure 46B) et des zones de contact sont détectables. Dans les zones hypoxiques, où l'Avastin® a détruit tous les vaisseaux murins, des structures tubulaires semblables à des vaisseaux, composées de cellules tumorales exprimant le cd31 humain, sont observées (Figure 46C, photo de gauche). Afin de savoir si les cellules tumorales forment réellement des structures vasculaires fonctionnelles capables de compenser les carences induites par l'effet anti-angiogénique de l'Avastin®, nous avons étudié les échantillons en contraste de phase et observé des hématies dans les tubes, signe que la circulation sanguine s'effectue dans ces vaisseaux formés de cellules tumorales (Figure 46C, photo de droite). Comme dans les tumeurs contrôles aucune cellule tumorale n'exprime le cd31 humain, nous pouvons conclure que c'est le traitement par l'Avastin® et probablement l'hypoxie qu'il provoque qui est à l'origine de la transdifférenciation. Or chez les patients, différentes études montrent l'existence de vaisseaux formés de cellules tumorales exprimant les marqueurs endothéliaux (34, 35, 40) et ce phénomène serait induit par l'hypoxie *in vitro* (36, 40). Notre étude conforte l'hypothèse selon laquelle l'Avastin® induit la transdifférenciation, dans un modèle de GBM *in vivo*, en réponse à un environnement hypoxique. Ce mécanisme contribuerait à la récurrence tumorale observée. Chez les souris traitées à l'Avastin® sur du long terme (au-delà de 60 jours après implantation), nous avons en effet détecté des masses tumorales vascularisées s'échappant de la boîte crânienne. Une étude publiée peu de temps après l'obtention de ces résultats montre la présence de vaisseaux sanguins fonctionnels exprimant le cd31 humain dans les tumeurs formées suite à la xénogreffe de cellules U251 et U87 chez la souris. Nous étions les premiers à avoir observé ce phénomène dans les xénogreffes de GBM et cette étude confirme nos résultats, à ceci près que les auteurs observent des marquages cd31 humains chez les souris non traitées alors que nous n'en avons observé aucun (74). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les lignées de souris utilisées ne sont pas les mêmes (souris nude dans la publication et Rag2/ γ C dans ma thèse) ou par le fait que les tumeurs ne sont peut être pas eu même stade de développement. L'équipe de Shaifer a aussi observé, par des expériences *in vitro*, que ces vaisseaux, formés de cellules tumorales transdifférenciées, sont résistants aux radiations ionisantes et aux anti-angiogéniques (74). Ceci suggère donc que la transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales est un mécanisme de résistance/récurrence du GBM, comme le suggéraient nos propres résultats.

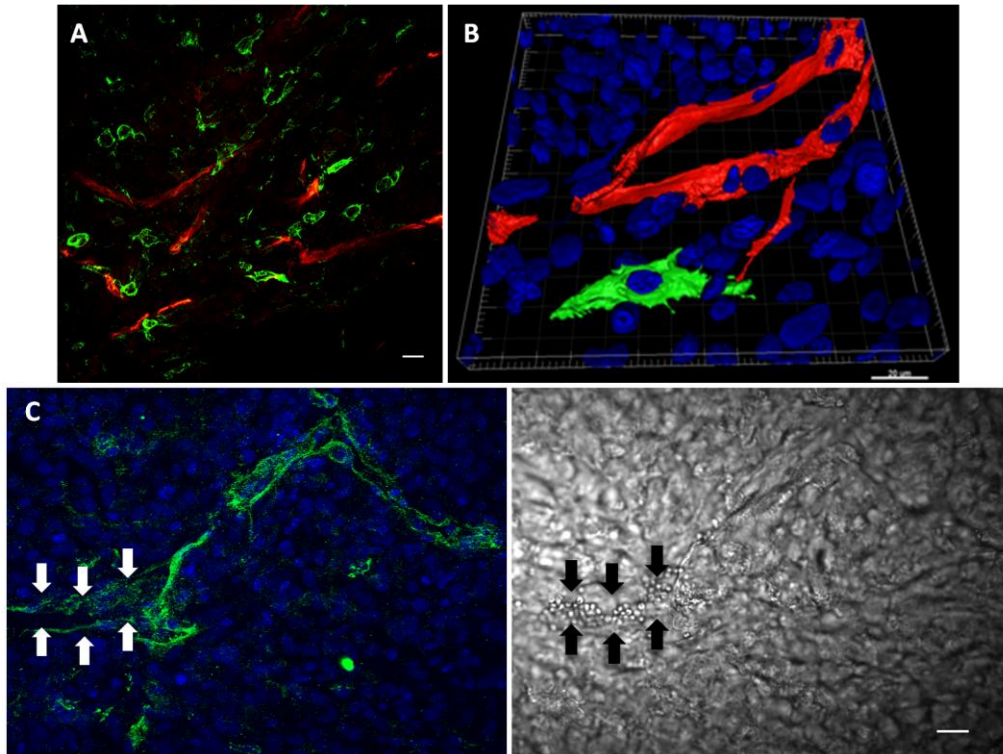


Figure 46 : Le traitement des tumeurs U87 à l'Avastin® entraîne l'expression du marqueur endothélial cd31 par les cellules tumorales. A-B. Co-marquages cd31 murin (rouge) et cd31 humain (vert) sur des coupes de tumeurs U87 implantées chez la souris immunodéprimée (marquages cd31 H&M) ; B. Agrandissement et projection 3D au niveau d'une cellule tumorale (vert) dans le prolongement d'un vaisseau murin (rouge) ; C. Vaisseau formé par des cellules tumorales humaines, photo de gauche : marquage cd31 humain (vert), photo de droite : photo en lumière transmise mettant en évidence des hématies dans le vaisseau humain (flèches). Barre de calibration = 20µm. Microscopie confocale.

Afin de stimuler encore davantage cette réponse et pouvoir évaluer l'effet de molécules potentiellement inhibitrices, nous avons décidé de mettre au point un nouveau modèle de xélogreffe basé sur l'utilisation de cellules GBM humain maintenues en culture sous forme de neurosphères et contenant une forte proportion de GSC. De fait, ces cellules, une fois xélogreffées chez la souris, étaient supposées répondre de manière plus marquée à l'Avastin® en se transdifférenciant, nous permettant ainsi la modélisation de ce phénomène, l'étude de la résistance aux anti-angiogéniques ainsi que l'étude de l'expression de nos gènes candidats dans ce mécanisme. Nous avons également dans l'optique d'évaluer l'effet du traitement combinatoire Avastin®/Actemra sur un nouveau modèle plus agressif et sans doute réfractaire aux traitements, de par sa teneur élevée en cellules souches.

2. Le modèle NS : caractérisation de la cinétique de croissance et du phénotype vasculaire, effet des traitements

a) Introduction

Ce modèle est basé sur l'utilisation de cellules de glioblastomes isolées de patients et maintenues en culture sous forme de neurosphères (NS). Dans des conditions de culture bien définies, en milieu appauvri en sérum et supplémenté par des facteurs de croissance, notamment EGF et bFGF, les cellules de ces lignées poussent sous forme de sphéroïdes pouvant atteindre 1 mm de diamètre (Figure 47A). L'intérêt majeur de ce modèle est qu'il est enrichi en cellules souches tumorales au caryotype stable et donc comparable à celui de la tumeur d'origine. Il héberge

également des cellules progénitrices et des cellules différenciées, reconnaissables et quantifiables par cytofluorimétrie en fonction de leurs antigènes de surface spécifiques. La culture de ces cellules en présence du sérum induit la sélection d'un type cellulaire et la formation de cultures clonogéniques entraînant la perte d'une partie des caractéristiques de la tumeur d'origine. Ainsi les neurosphères doivent procurer un modèle d'étude du GBM plus proche de la réalité tumorale que les lignées adhérentes, elles récapitulent le génotype et le phénotype des tumeurs primaires et permettent une meilleure compréhension de la pathologie (90). Trois lignées de ce type ont été obtenues auprès du Pr. V. Quillien (CNRS UMR 6061, Rennes) qui les a caractérisées sur le plan cytogénétique (CGH array et FISH), transcriptomique (puce ADN illumina) et protéomique (cytométrie de flux) (189).

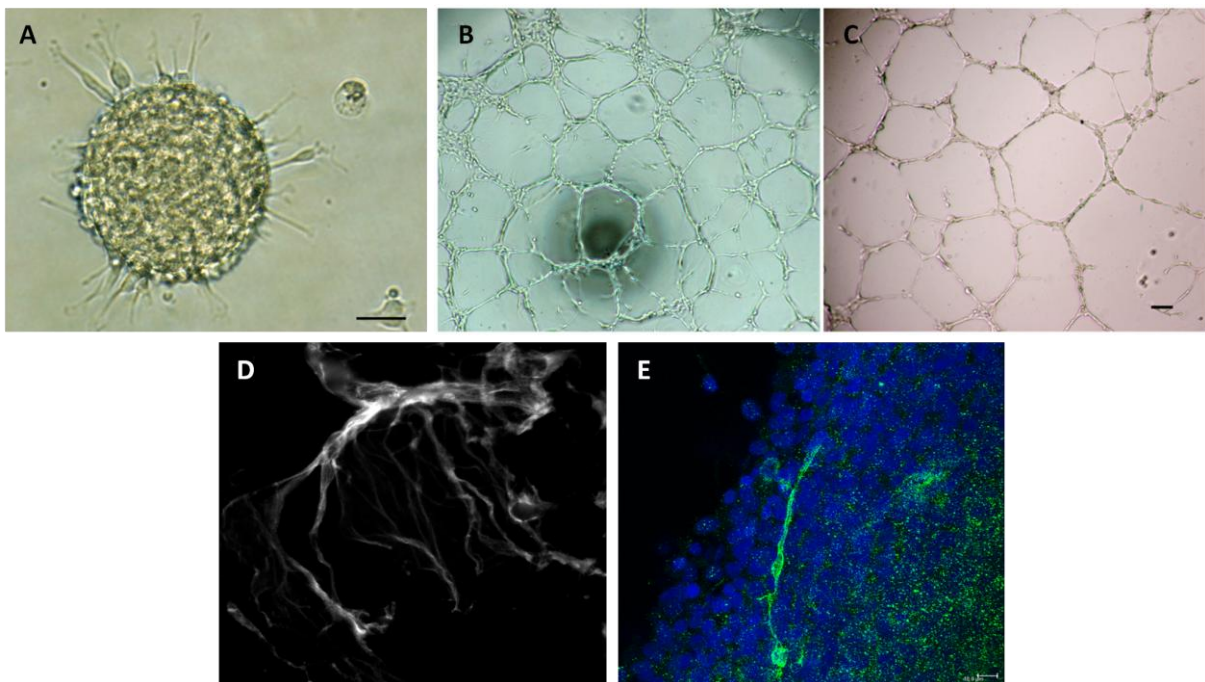


Figure 47 : Caractérisation des NS en culture. Les NS sont maintenues sous forme de sphéroïdes en culture (A) dans un milieu sans sérum complétementé avec du EGF et du bFGF. Les trois lignées de NS utilisées forment des tubes sur une matrice de matrigel en 20h (B), comparables à ceux obtenus avec les HUVEC en 15h (C). D-E. Expression de CD31 par les cellules de NS (D. photo A.P. Gadeau INSERM u1034). Barres de calibration = 100µm (A-C) et 10µm (E).

Les trois lignées de NS utilisées dans cette étude ont un statut différent pour le gène de l'EGFR, les NS125 l'expriment normalement, les NS85 possèdent le gène muté EGFRvIII codant pour le récepteur sous sa forme constitutivement active et les NS142 présentent une amplification de ce gène. Les mutations/amplifications/réarrangements du gène de l'EGFR sont présents dans 30 à 40% des GBM, en faisant ainsi l'anomalie génétique la plus courante (190). La mutation EGFRvIII correspond à la délétion des exons 2 à 7 formant une protéine tronquée à laquelle il manque le domaine extracellulaire de liaison avec les ligands. La protéine EGFRvIII ne peut donc plus lier ses ligands mais est constitutivement active et n'est ni internalisée ni dégradée comme le récepteur normal. Le phénotype des tumeurs exprimant ce variant est donc similaire à celui des tumeurs présentant uniquement une amplification du gène. La dérégulation de l'EGFR entraîne une augmentation de la prolifération, de l'invasion et de l'angiogenèse des GBM tout en empêchant l'apoptose des cellules tumorales (65, 191, 192) rendant les tumeurs plus résistantes aux chimiothérapies. L'EGFR régule aussi l'angiogenèse dans le GBM via les protéines GBP1 (193) et l'IL-8

par la voie NFκB (194). Les tumeurs possédant une anomalie activatrice (amplification ou mutation EGFR) ont donc un profil plus agressif, invasif et angiogénique que les autres tumeurs et leur développement est plus rapide chez la souris (192). C'est donc un bon modèle pour tester la combinaison Avastin®/Actemra qui diminue l'invasion induite par les traitements à l'Avastin® sur les tumeurs U87 xénogreffées chez la souris.

Nous avons tout d'abord voulu savoir si chacune de ces lignées était capable de former des tubes *in vitro*, comme cela a été décrit récemment dans la littérature pour les neurosphères de GBM (33, 34, 36, 38, 40), suggérant des capacités de transdifférenciation ou de mimétisme vasculaire de ces cellules. J'ai constaté que les trois lignées de NS forment des structures tubulaires très similaires à celles observées avec les HUVEC (cellules endothéliales) sur du matrigel (Figure 47B et C). Ce résultat suggère qu'elles sont capables d'effectuer la tubulogénèse (angiogénèse *in vitro*) comme les cellules endothéliales. Le marquage des neurosphères en entier (Figure 47D et E) montre que les NS hébergent environ 0.7% de cellules exprimant le marqueur endothélial cd31 et parfois une organisation en réseau tubulaire est observée. Ce résultat a d'abord été obtenu par le Dr. Alain Pierre Gadeau à l'Inserm u1034 et nous l'avons ensuite confirmé. Ces données suggèrent que les cellules NS sont capables de se différencier en cellules endothéliales afin de former un réseau vasculaire, ce qui permettra d'étudier le phénomène de mimétisme vasculaire et/ou la transdifférenciation dans le GBM sous traitement anti-angiogénique.

Ces trois lignées ont été greffées chez la souris immunodéprimée en stéréotaxie afin de caractériser leur comportement *in vivo*. Seules deux lignées ont été capables de former des tumeurs, les lignées NS85 et NS142. Ces lignées présentent toutes deux une surexpression de l'EGFR, l'une par l'amplification, l'autre qui possède aussi le variant. Donc ces deux lignées sont représentatives des cas majoritaires chez les patients. Comme elles ont montré un développement et une histologie identique, la majorité des expériences a été réalisée sur la lignée NS142. Le fait que les NS125, ayant une expression normale d'EGFR, ne permettent pas le développement d'une tumeur chez la souris immunodéprimée corrèle avec le fait que la suractivation de la signalisation de ce récepteur est un élément essentiel pour la croissance de tumeurs xénogreffées chez la souris, comme cela a été décrit dans la littérature (192).

b) Caractérisation du développement tumoral in vivo

Les cellules NS ont été implantées en orthotopique dans l'hémisphère gauche chez la souris immunodéficente sous forme dissociée par la trypsine. Quinze jours après l'implantation, quelques souris ont été sacrifiées afin d'observer le développement tumoral. À ce stade, les cellules envahissent le striatum de l'hémisphère d'implantation (Figure 48A), laissant le reste du cerveau relativement intact. Un grossissement plus fort (Figure 48B) permet d'observer que les cellules tumorales se regroupent autour des vaisseaux sanguins à proximité du striatum, signe de co-option vasculaire. Les tumeurs se développent moins rapidement que les tumeurs formées à partir des U87 qui sont létales en un mois. Les cellules NS entraînent le développement d'une tumeur létale en deux mois environ. Une fois le développement tumoral caractérisé, les souris ont été traitées à l'Avastin® afin d'observer son effet sur ces tumeurs. Le traitement a débuté un mois après l'implantation, à raison de deux injections par semaine, jusqu'au sacrifice des souris. Les tumeurs traitées présentent une cinétique de développement et une histologie semblables aux tumeurs contrôles (Figure 48C), signe que l'Avastin® est inefficace sur ce type de tumeur.

Les tumeurs NS présentant un phénotype très invasif, nous avons testé la combinaison Actemra/Avastin® sur ces tumeurs afin de diminuer/empêcher l'invasion et la croissance tumorale, comme observé sur les tumeurs U87 ((181) et Annexe 2). Les traitements ont été débutés 15 jours après l'implantation, alors que les cellules tumorales ont déjà commencé à envahir le corps calleux gauche. Nous n'observons aucune différence significative de la croissance tumorale chez les différents groupes de traitement, ni au niveau durée de survie ni au niveau histologie, toutes les tumeurs sont semblables (Figure 48C). En deux mois elles occupent l'intégralité de l'hémisphère d'implantation, entraînent une déformation du cerveau de la souris et réduisent le volume du controlatéral. La tumeur envahit aussi l'hémisphère controlatéral par le striatum. Les traitements, qui montrent des effets prometteurs sur les tumeurs U87, semblent ici sans effet, suggérant que les mécanismes de développement des tumeurs NS sont différents de ceux mis en place par les U87.

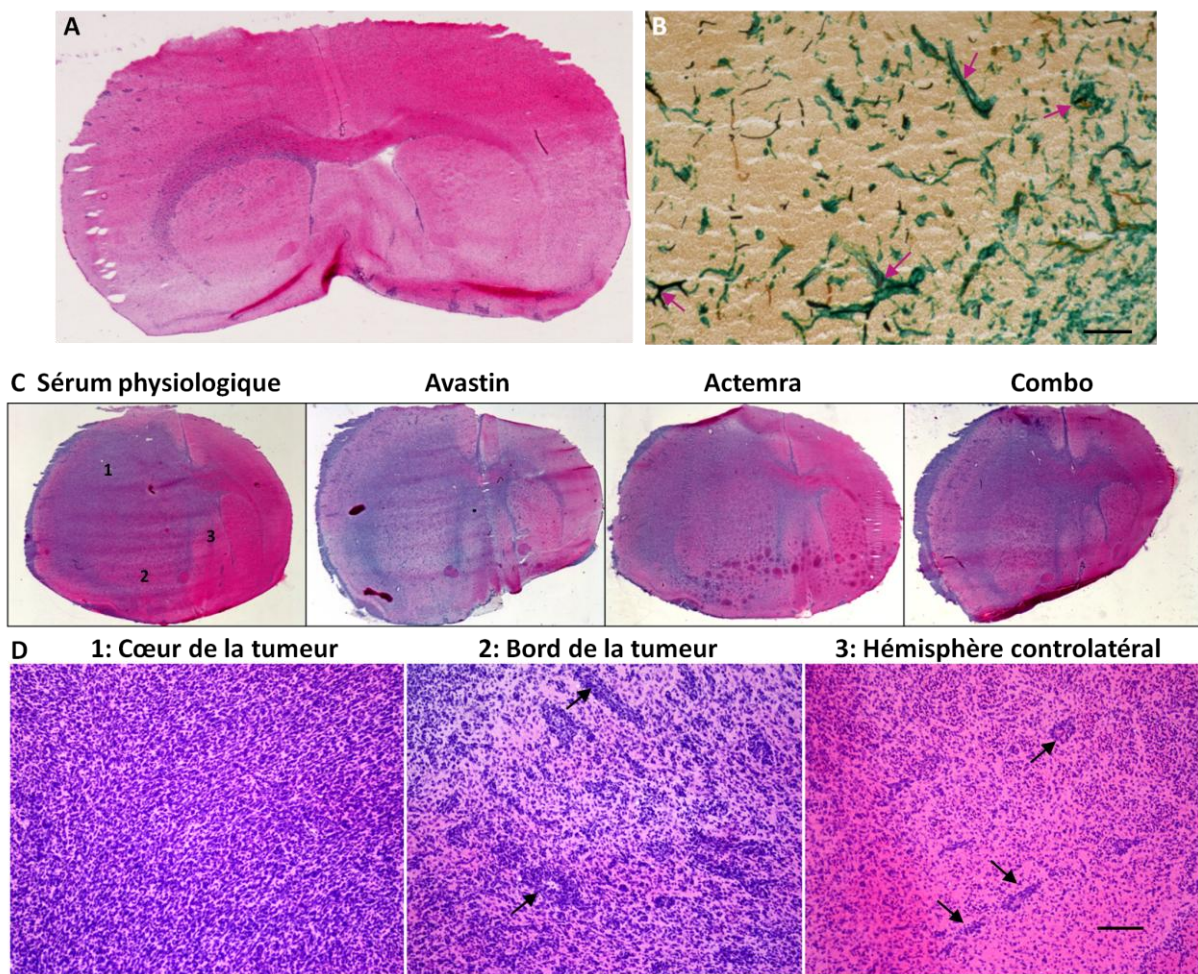


Figure 48 : Développement tumoral suite à l'implantation de cellules NS142 dans l'hémisphère gauche de souris immunodéficientes. Coloration hématoxyline-éosine de coupes de cerveau de souris 15 jours (A), 39 jours (B) et 61 jours après implantation (C-D). La tumeur se développe au niveau du striatum dans l'hémisphère d'implantation (A) dès 15 jours après l'implantation. À plus fort grossissement (B) on observe que les cellules tumorales encerclent les vaisseaux à proximité du striatum, co-marquage CD31 murin (marron) et vimentine humaine (vert). Les souris ont été réparties en quatre groupes afin de recevoir des traitements différents : sérum physiologique, Avastin®, Actemra et Avastin®+Actemra (combo) ; chez les différents groupes, la progression tumorale est comparable et létale en 60 jours en moyenne. La tumeur envahit tout l'hémisphère d'implantation ainsi qu'une partie de l'hémisphère controlatéral (C). D. Trois zones distinctes sont déterminées dans la tumeur, le cœur de la tumeur est dense et homogène, en bord de tumeur les cellules tumorales sont regroupées autour des vaisseaux (cuffs). Dans l'hémisphère controlatéral, l'invasion par les cellules tumorales s'observe autour des vaisseaux. Barre de calibration = 50µm (B) et 100µm (C) ; A et C. photos prises au microscope Nikon, objectif 0.5x (A et C). Flèches = signe de co-option vasculaire.

À plus fort grossissement (*Figure 48D*), le cœur de la tumeur paraît très compact avec une forte densité cellulaire. Dans des zones moins denses et sur le bord de la tumeur dans l'hémisphère d'implantation, les cellules tumorales sont systématiquement détectées autour des vaisseaux. Dans les tumeurs précoces, les cellules tumorales démontrent un comportement purement co-optif : la masse tumorale se forme par confluence des foyers ayant migré le long des vaisseaux cérébraux (cuffs vasculaires) et expansion centrifuge. Ceci explique pourquoi ces tumeurs sont totalement réfractaires à l'Avastin®. Afin d'examiner la morphologie et le nombre de vaisseaux, des immunomarquages ont été réalisés sur des coupes de cerveaux entiers de souris ayant subi les différents traitements (*Figure 49*). Des co-marquages cd31 H&M ont aussi été réalisés afin de savoir si la transdifférenciation des GSC en cellules endothéliales contribuait à la croissance de ces tumeurs avec ou sans traitement.

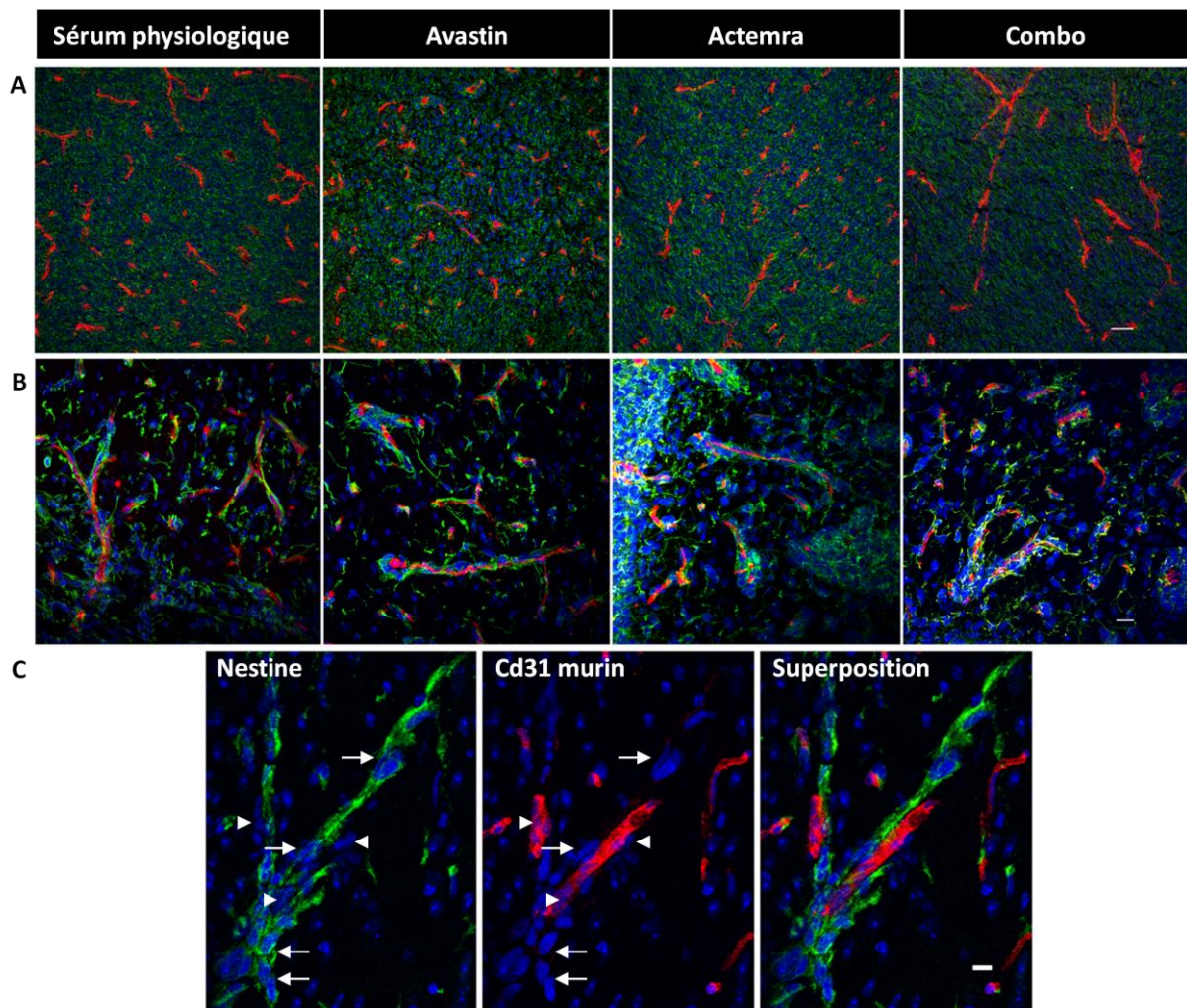


Figure 49 : Mise en évidence des vaisseaux sanguins dans la tumeur NS chez la souris. Co-marquages des vaisseaux par le cd31 murin (rouge) et des cellules tumorales par la nestine (vert) dans le cœur de la tumeur (**A**) et sur son bord (**B**). Le cœur de la tumeur est très dense au niveau cellulaire et très vascularisé quel que soit le traitement appliqué aux souris (**A**). Sur le bord de la tumeur sont observés de nombreux foyers d'invasion ainsi que la formation de « cuffs » autour de chaque vaisseau murin (**B**). **C.** Agrandissement au niveau d'un vaisseau sur le bord de la tumeur en condition contrôle. Les cellules tumorales (flèches) sont accolées aux vaisseaux sanguins (têtes de flèches = cellules endothéliales), signe de co-option vasculaire. Barres de calibration 100µm (**A**) et 20µm (**B** et **C**). Microscopie confocale.

Dans le cœur de la tumeur, marqué par la nestine humaine permettant de différencier les cellules tumorales des cellules murines, de nombreux vaisseaux sanguins, marqués par le cd31 murin, sont observés quel que soit le traitement appliqué ([Figure 49A](#)). Ceci suggère que les traitements Avastin®, Actemra et Combo ne sont pas efficaces sur ce genre de tumeur. De plus aucun marquage cd31 humain n'est observé (données non montrées), ce qui signifie que, dans ce modèle, il n'y a pas de transdifférenciation, pas même dans les conditions de traitement par l'Avastin® qui induisaient ce phénomène dans les tumeurs U87. En bord de tumeur, sur le front d'invasion, les cellules tumorales sont intimement liées aux vaisseaux murins ([Figure 49C](#)). Elles longent les vaisseaux sanguins et forment systématiquement des « cuffs » caractéristiques de la co-option vasculaire (paragraphe I.A.2.b). Ceci confirme les premières observations faites avec les colorations hématoxyline-éosine ([Figure 48](#)). Les cellules NS semblent utiliser la co-option vasculaire comme seul mode de vascularisation, et non pas l'angiogenèse, expliquant sans doute pourquoi l'Avastin® est sans effet sur la croissance tumorale et n'induit pas la transdifférenciation des GSC en cellules endothéliales.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les traitements n'affectent pas la vascularisation des tumeurs NS, les vaisseaux ont été quantifiés chez les souris des quatre groupes ([Figure 50](#)). La quantification a été réalisée dans le cœur de la tumeur et sur son bord par le marquage cd31 murin sur une coupe longitudinale de cerveau par souris (n=8, [Figure 50A](#)). Dans la masse tumorale, les vaisseaux sont moins nombreux mais plus gros que sur le bord. Les vaisseaux sont irréguliers, de gros vaisseaux côtoient de tout petits capillaires, ce qui est caractéristique du GBM. Cette étude montre que le nombre de vaisseaux ([Figure 50B](#)), ainsi que leur taille ([Figure 50C](#)), est similaire dans tous les groupes de souris, quel que soit le traitement, sur le bord ou dans la masse tumorale. Ceci confirme que l'effet anti-angiogénique de l'Avastin® ou de l'Actemra seul et anti-invasif du combo Avastin®/Actemra est inefficace sur les tumeurs NS. La vascularisation des tumeurs NS semble indépendante du VEGF et de l'IL-6, contrairement aux tumeurs U87 qui sont principalement angiogéniques.

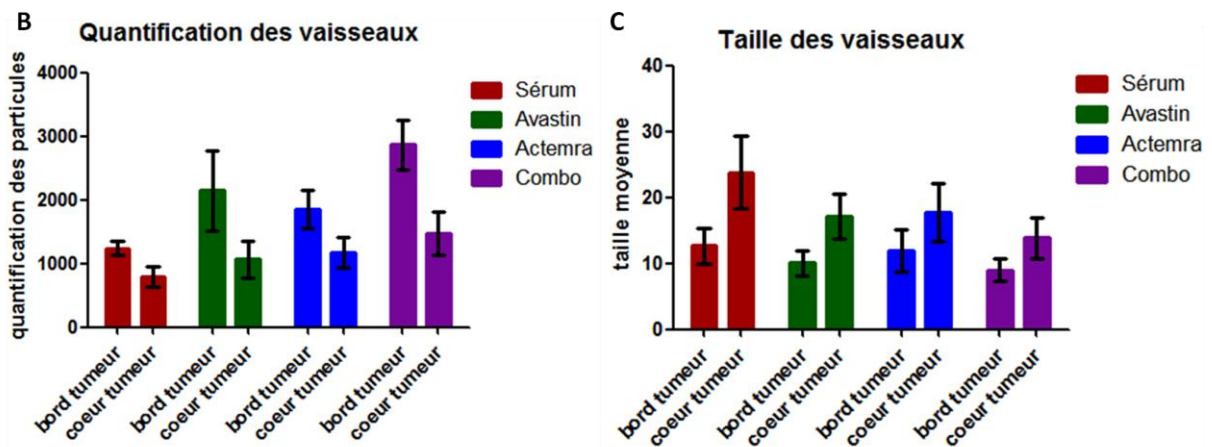
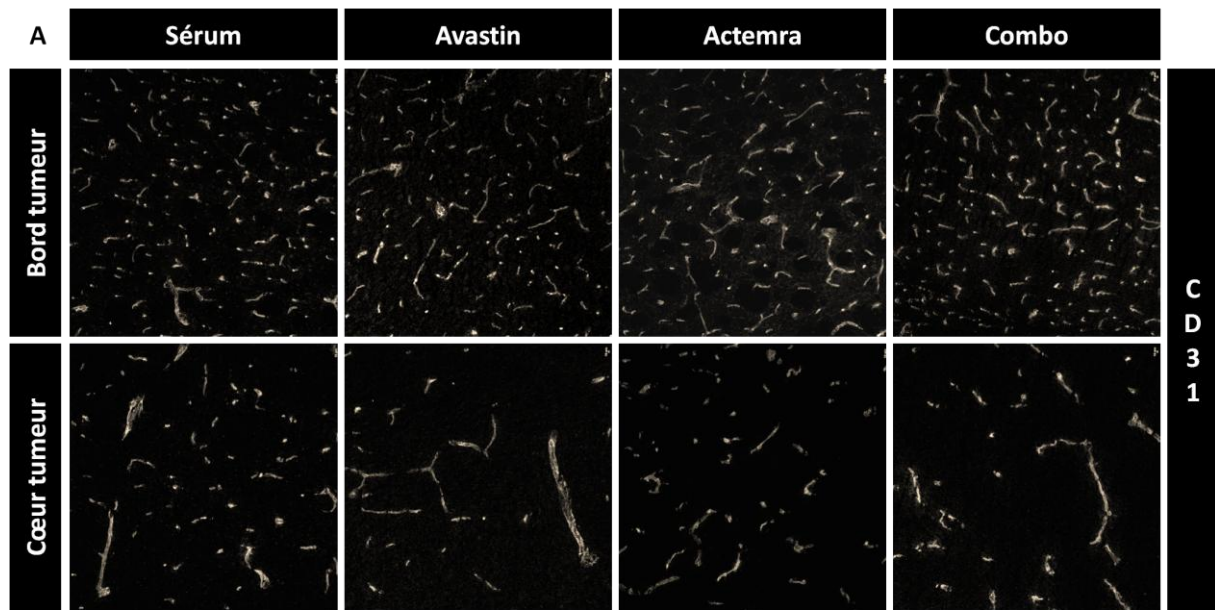


Figure 50 : Les vaisseaux ne sont pas affectés par les différents traitements utilisés chez la souris. A. Les vaisseaux sont marqués avec cd31 murin sur des coupes de souris des quatre groupes dans le cœur de la tumeur et sur son bord. B-C. La quantification du nombre de vaisseaux et de leur taille a été réalisée sur des coupes de 8 souris par groupe avec une photo par zone et par souris. Test statistique ANOVA à deux voies non significatif.

L'immunohistologie est une approche qui présente des limites lorsque l'objectif est la caractérisation de l'effet des traitements sur l'ensemble de la vasculature tumorale, notamment lorsque ces effets sont modérés. De même, il est délicat par immunohistologie de distinguer les vaisseaux tumoraux cooptés des vaisseaux néo-angiogéniques. Pour ces raisons, le laboratoire s'est engagé vers la mise au point de nouvelles approches d'imagerie vasculaire. C'est dans ce contexte que le modèle co-optif NS a servi de tumeur type pour mettre au point la discrimination entre vasculature angiogénique et co-optée par tomographie aux rayons X à haute résolution.

c) Imagerie de la vasculature tumorale par tomographie aux rayons X

Cette technologie a été développée par le Dr. C. Petibois en collaboration avec le Pr. Y. Hwu (Academia Sinica, Taipei, Taiwan) (195). Le principe est le suivant. Pour une imagerie de la vasculature du cerveau, les souris xéno greffées sont perfusées au niveau des carotides par une suspension de nanoparticules d'or. Les cerveaux sont disséqués et immédiatement soumis à une

tomographie à basse résolution par émission d'un faisceau de rayon X produits par synchrotron. Cette première acquisition permet d'avoir la topographie générale de la tumeur. Puis la moitié des échantillons sont inclus en résine tandis que des échantillons pairés sont conservés pour histologie de confirmation et imagerie infrarouge des collagènes, glucose et glycogène notamment (196).

Les données d'imagerie infra-rouge sur le modèle NS sont en cours d'exploitation. Pour la tomographie, les images de tous les plans sont collectées par microscopie à transmission utilisant une lentille hautement résolutive. Les études préliminaires se sont portées sur le modèle U87 xenogreffé chez lequel la densité microvasculaire totale peut être quantifiée, ainsi que l'ensemble des paramètres morphométriques de la vasculature. Comme illustré sur la [Figure 51](#), cette approche permet d'avoir une image globale de la vascularisation de tumeur avec une résolution suffisante pour détecter des tumeurs angiogéniques de très petite taille, inférieure au mm^3 .



Figure 51 : Microtomographie à haute résolution d'une tumeur U87 après 5 jours de croissance. Taille de la tumeur = 417x181 microns.

Nous avons soumis notre nouveau modèle co-optif de NS à cette approche, en parallèle avec le modèle U87 précédemment caractérisé. Comme nous le voyons sur la [Figure 52](#), la vascularisation des tumeurs NS, diffuses et co-optimées, se distingue de celle des tumeurs U87, compactes et angiogéniques. En effet, les tumeurs NS présentent un réseau vasculaire significativement moins dense (de densité comparable à celle du cerveau concordante avec la co-option des vaisseaux cérébraux). Les vaisseaux tumoraux présentent une morphologie très altérée par rapport aux vaisseaux normaux, ils sont systématiquement tortueux ou pincés ([Figure 52](#), têtes de flèches). Des images de perforation suggérant des phénomènes d'intussusception ont également été détectées (non montré).

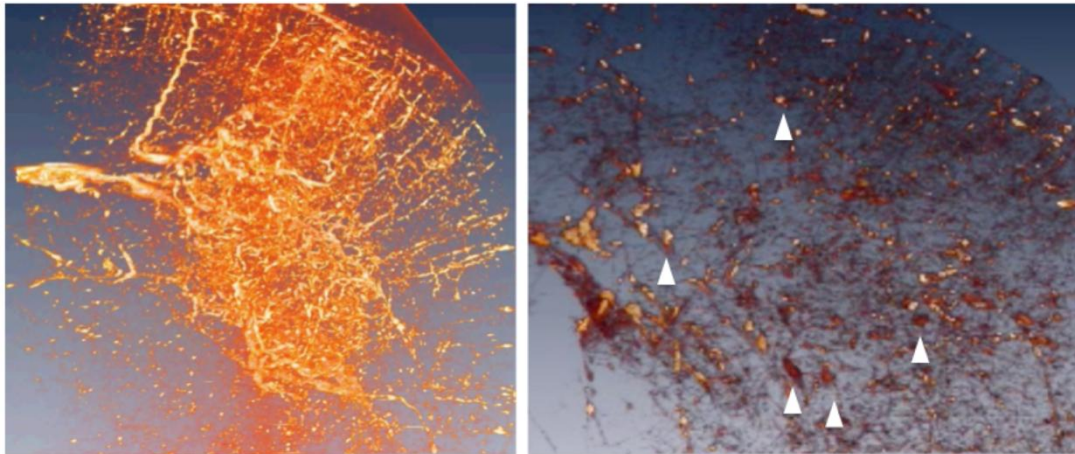


Figure 52 : Microtomographie comparative à haute résolution de la vasculature de tumeurs U87 (à gauche), NS142 (à droite). Ces tumeurs ont été obtenues 20 jours après implantation de 1000 cellules. Le modèle NS présente une vasculature peu dense, hétérogène avec de nombreux pincement et renflement (têtes de flèche).

Le laboratoire travaille désormais à l'obtention d'une résolution subcellulaire de la microtomographie (50 nm) ainsi qu'à la quantification de l'ensemble des paramètres morphométriques permettant de discriminer les foyers tumoraux cooptifs, se basant sur le modèle NS, et angiogéniques, se basant sur le modèle U87. Ces paramètres sont : la densité, le diamètre moyen et la distribution des capillaires en fonction de leur diamètre, l'hétérogénéité moyenne du diamètre des capillaires entre les embranchements, le nombre de points d'embranchements par capillaire, la distance internœud, la distribution des angles formés par les nœuds, le degré d'ellipsisation, la quantification et la distribution des torsions des capillaires et de leur tortuosité, la distribution des embranchements, le ratio volume vasculaire/volume tumoral. Ces données seront couplées à des quantifications de composantes clés du métabolisme par imagerie infra-rouge comme évoqué ci-dessus, elles aussi obtenues en trois dimensions.

d) Tests *in vitro*

Parallèlement aux expériences *in vivo*, des expériences *in vitro* ont été menées afin de déterminer l'effet des traitements sur les cellules tumorales elles-mêmes. Les NS xénogreffées chez la souris étant très invasives, nous avons testé l'effet des inhibiteurs, Avastin® et Actemra, sur la capacité invasive des cellules *in vitro*.

Nous avons donc observé l'effet des inhibiteurs sur l'invasion des NS142 par haptotaxie (expérience du comblement de la cicatrice). Les doses testées sont de 1mg/mL ou de 0.5mg/mL pour les simples traitements et de 0.5mg/mL ou de 0.25mg/mL de chaque traitement dans le cas des combinaisons. Ces doses ont le même effet sur les cellules et n'entraînent pas une diminution de leur viabilité pendant les tests d'invasion. Lors des expériences de comblement de la brèche (invasion par haptotaxie), les cellules referment la cicatrice en 60h, quel que soit le traitement appliqué (Figure 53A). Donc ni l'Avastin® ni l'Actemra n'ont d'effet sur la migration des NS142. Dans le GBM, l'hypoxie est un facteur qui augmente l'invasion des cellules tumorales, dans le tissu sain, vers des zones oxygénées. Afin d'étudier l'effet de l'hypoxie sur les capacités invasives des NS, nous avons réalisé des expériences en chambre de Boyden recouvertes de matrigel (100µg/mL). L'expérience a été réalisée sur 24h en normoxie (20% d'O₂) ou en hypoxie (0.1% d'O₂). Un western blot a été réalisé afin de confirmer que les cellules étaient bien en conditions hypoxiques, en analysant l'expression du

facteur de transcription HIF1 α . Cette protéine est l'un des agents principaux de l'hypoxie et est dégradée en condition normoxique. Lorsque les NS sont cultivées avec 0.1% d'oxygène pendant 6 ou 24h, HIF1 α est détectée, signe que les cellules sont bien en hypoxie (Figure 53B). Nous avons ensuite dénombré les NS ayant traversé la couche de matrigel dans l'insert et observé que l'hypoxie ne modifiait pas la cinétique d'invasion de ces cellules en chambre de Boyden (Figure 53C). Nous avons ensuite testé leurs capacités invasives en présence d'Avastin® ou d'Actemra en hypoxie ou en normoxie. Comme observé précédemment dans le test du comblement de la brèche, en normoxie les deux inhibiteurs n'influencent pas sur l'invasion des NS. Dans les conditions hypoxiques, les résultats sont similaires, ni l'Avastin® ni l'Actemra ne perturbent l'invasion des NS en chambre de Boyden.

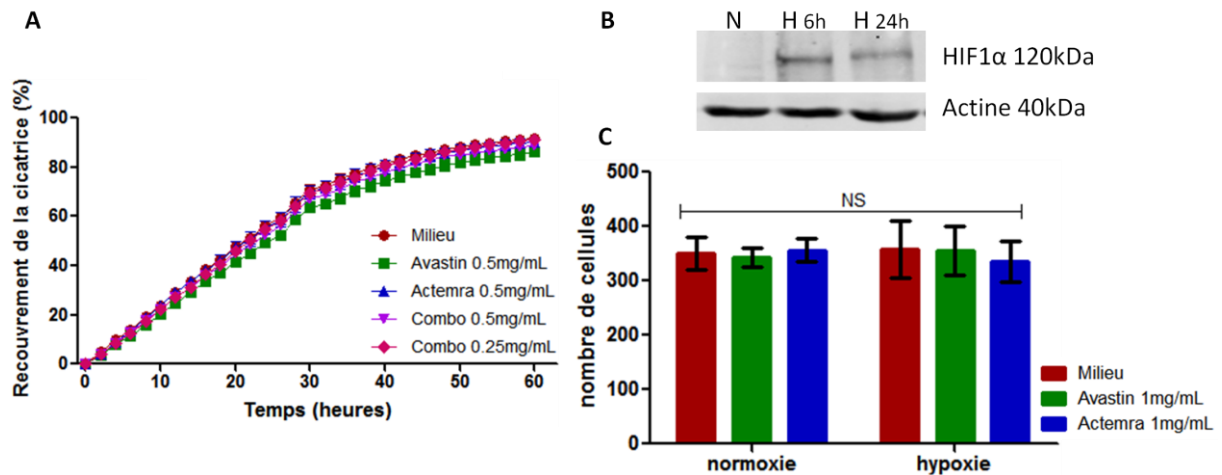


Figure 53 : Effet de l'Avastin® et de l'Actemra sur les capacités invasives des NS142. Les NS142 ont été traitées avec 0.5 ou 1 mg/mL d'Avastin® ou d'Actemra et avec une combinaison de 0.25 ou 0.5 mg/mL des deux anticorps (combo). **A.** Invasion par haptotaxie analysée par l'IncuCyte. **B.** Western blot HIF1 α avec des NS142 cultivées en normoxie (N) ou en hypoxie 6h (H 6h) et 24h (H 24h). **C.** Invasion en chambre de Boyden en condition d'hypoxie (0.1% d'oxygène) ou de normoxie pendant 24h. In vitro l'inhibition du VEGF et du récepteur à l'IL-6 n'a aucun effet sur les capacités invasives des NS142. Représentation de la moyenne \pm SEM, tests statistiques non significatif (NS).

Ces expériences confirment les données obtenues *in vivo*, l'Avastin® utilisé dans le traitement des GBM, lors de leur récurrence chez les patients, est totalement inefficace sur ce type de tumeur très invasive et essentiellement co-optive. De plus, la combinaison des deux inhibiteurs qui permettait de contrôler l'angiogenèse, l'invasion et la croissance tumorale des tumeurs U87, n'a ici aucun effet. Les tumeurs NS142 se vascularisent et envahissent le cerveau des souris de manière indépendante des voies du VEGF et de l'IL-6. Ces résultats rappellent que chaque tumeur est unique et qu'il est nécessaire de caractériser de nouveaux marqueurs afin de mieux classer les tumeurs et d'établir des thérapies ciblées en fonction du type de GBM.

Dans le chapitre précédent (III.A), nous avons montré que DPY19L1 et MKI2 pourraient participer à la vascularisation et à la résistance du GBM aux traitements, leur expression est détectée dans des cellules murales possiblement transdifférenciées à partir de cellules tumorales, et des cellules souches tumorales associées aux vaisseaux respectivement. Les cellules tumorales souches étant d'emblée intimement associées à la vasculature du cerveau dans le modèle de tumeur NS, nous avons voulu savoir si l'expression de dpy19l1 et MKI2 corrélait avec la migration des cellules tumorales autour des vaisseaux dans ce modèle.

e) *Expression et localisation de DPY19L1 et KIF20A dans le modèle NS*

Le taux d'expression de DPY19L1 et KIF20A a été testé par qPCR dans les trois lignées de NS afin de vérifier qu'elles les expriment suffisamment pour mener une étude. Les NS expriment toutes DPY19L1 et KIF20A et de façon plus importante que les HUVEC qui les expriment à un très faible taux, comme nous l'avons montré précédemment. De toutes, ce sont les NS142 qui expriment le plus fortement ces deux gènes, c'est pourquoi la plupart des études ont été réalisées avec ces cellules.

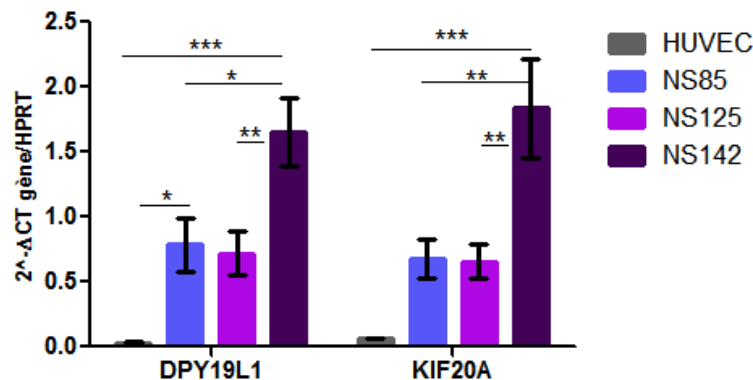


Figure 54 : Expression de DPY19L1 et KIF20A/MKlp2 dans les neurosphères. Quantification de l'expression, par PCR, des gènes candidats, dans toutes les lignées de NS et dans les HUVEC, normalisée par rapport au gène de ménage HPRT. Expérience réalisée 3 fois. Une étoile p<0.05, deux étoiles p<0.01, trois étoiles p<0.001.

(1) DPY19L1

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de dpy19l1 dans les cellules en culture. Dans les NS, dpy19l1 est exprimée de façon diffuse avec un marquage plus intense au niveau du noyau. Comme dans les autres types cellulaires testés, dpy19l1 se localise sous forme ponctiforme dans le noyau. Dans les NS, comme dans les autres lignées cellulaires étudiées (U87, HUVEC, SMC...), dpy19l1, dont la localisation est prédite membranaire, n'est pas détectée au niveau membranaire comme le laisse supposer sa structure protéique comprenant 11 segments transmembranaires (Figure 55).

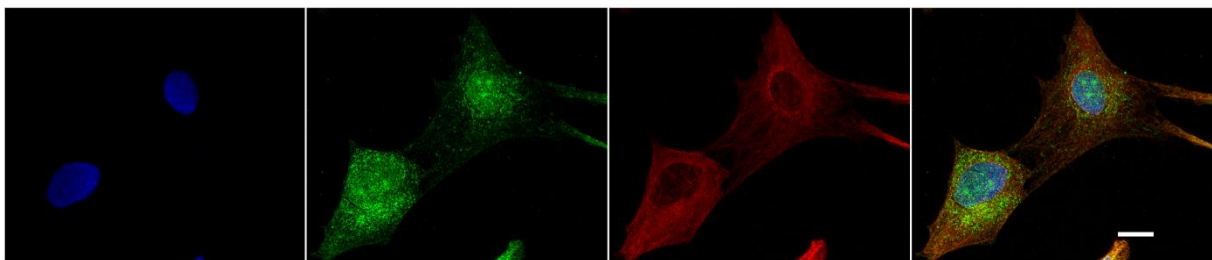


Figure 55 : Expression de dpy19l1 dans les NS142 en conditions adhérentes. Co-marquage dpy19l1 (vert) et α -tubuline (rouge) dans les NS142 après leur étalement sur plastique. Barre de calibration = 20 μ m ; microscopie confocale.

Afin de déterminer si dpy19l1 est impliquée dans la co-option des tumeurs NS xénotransplantées chez la souris, nous avons réalisé des immunohistochimies sur des coupes de cerveaux de souris ayant développé ou non une tumeur. Nous avons aussi étudié sa colocalisation avec l' α SMA afin de déterminer si dans ces tumeurs, dpy19l1 est exprimée par les vSMC comme ce qui a été observé chez les patients (Figure 36). Dans le cerveau d'une souris ayant été implantée avec les NS125 et n'ayant pas développé de tumeur (contrôle négatif), l'expression de dpy19l1 n'est pas détectée (Figure 56A).

Ces résultats suggèrent que dpy19l1 n'est exprimée que dans les cellules tumorales. Dans la masse tumorale, dpy19l1 est exprimée au niveau vasculaire et plus précisément dans les vSMC ([Figure 56B](#)). Ce résultat est similaire à celui obtenu chez les patients. Il a été très récemment décrit que les cellules tumorales sont recrutées au niveau des vaisseaux du cerveau et se différencient en vSMC afin de les stabiliser, ce qui les rend résistants aux traitements (78). Nos résultats suggèrent que DPY19L1 est exprimé spécifiquement dans ces cellules qui jouent un rôle essentiel dans deux voies alternatives de croissance tumorale : la transdifférenciation et la co-option ((33, 37, 38) et paragraphe I.A.2.d).

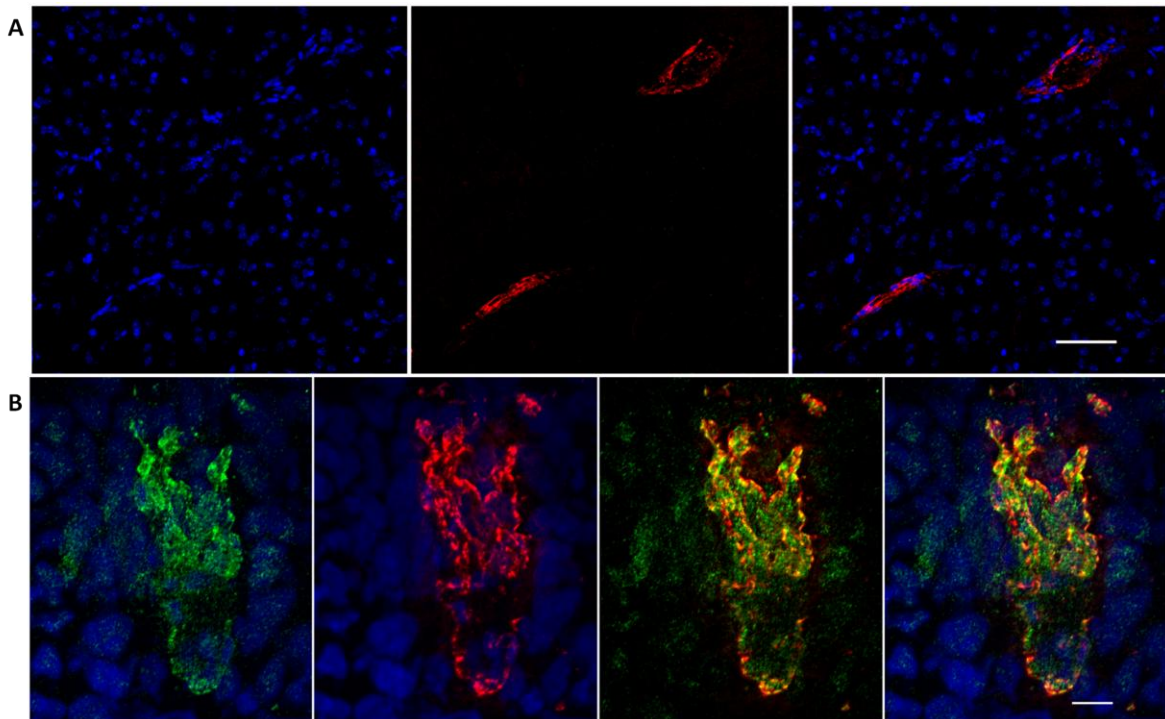


Figure 56 : Expression de dpy19l1 dans le GBM expérimental chez la souris. Co-marquages dpy19l1 (vert) et α SMA (rouge) dans le cerveau d'une souris n'ayant pas développé de tumeur (A) et dans une tumeur NS142 implantée chez la souris (B). L'expression de dpy19l1 n'est pas détectée dans le cerveau sain murin mais uniquement dans le GBM humain xénotransplanté. Dans la tumeur elle est exprimée dans les vSMC, comme ce qui a été décrit dans les GBM de patients. Barres de calibration = 50 μ m (A) et 10 μ m (B) ; microscopie confocale.

Afin de déterminer si dpy19l1 est impliquée dans le recrutement et la transdifférenciation des cellules tumorales en cellules murales, des co-marquages dpy19l1, α SMA et cd31 murin ont été réalisés ([Figure 57](#)). Dpy19l1 est exprimée au niveau des vaisseaux murins mais ne colocalise pas avec cd31, confirmant que la protéine est exprimée par les cellules tumorales humaines. Elle colocalise parfaitement avec l' α SMA confortant l'hypothèse qu'elle marque les cellules tumorales recrutées au niveau des vaisseaux cérébraux et transdifférenciées en vSMC. Dpy19l1 pourrait donc être impliquée dans ce phénomène en permettant la migration et l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales murines. Cette hypothèse est corroborée par une publication récente attribuant un rôle pro-adhésif à dpy19l1 que nous discuterons à la fin de ce chapitre (197).

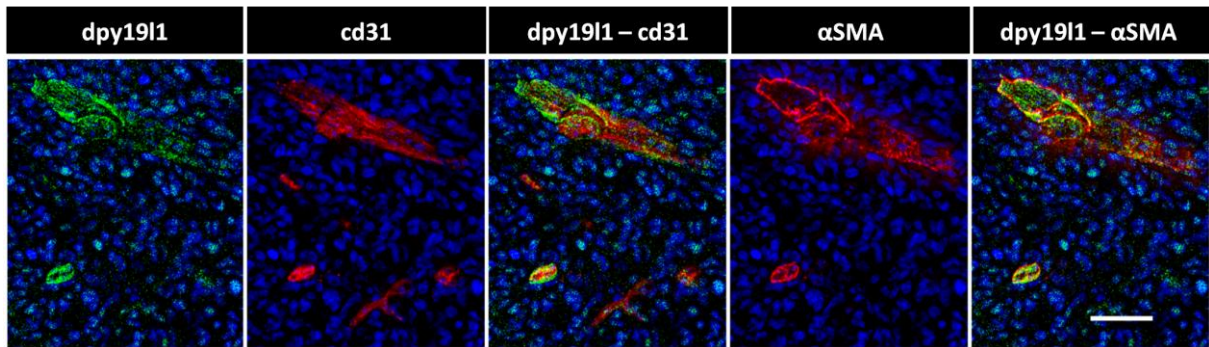


Figure 57 : Expression de dpy19l1 par des cellules tumorales exprimant l' α SMA dans les tumeurs NS. Co-marquages dpy19l1 (vert), cd31 murin et α SMA (rouge) dans une tumeur NS142 implantée chez la souris. Barre de calibration = 50 μ m ; microscopie confocale.

(2) MKlp2

De la même manière, nous nous sommes intéressés à l'expression de KIF20A dans les tumeurs NS chez la souris. MKlp2 étant exprimée dans les cellules souches tumorales chez les patients atteints de GBM, elle a été étudiée dans les cellules NS afin de déterminer si elle y avait une localisation différente par rapport aux autres types cellulaires (HUVEC, U87...). Dans les NS, MKlp2 est détectée au niveau du corps intermédiaire, lors de la cytotiérèse (Figure 58A). En interphase, son expression est diffuse avec un marquage un peu plus fort au niveau du noyau. MKlp2 ne co-localise pas avec Rab6 (Figure 58B). Dans les NS, comme dans toutes les cellules testées, MKlp2 ne montre donc aucune localisation particulière autre que celle au niveau du corps intermédiaire en fin de mitose. L'expression sub-cellulaire de MKlp2 dans les NS142 a été testée dans différentes conditions de culture. Les cellules ont été cultivées en milieu DMEM 1% SVF (Figure 58), avec 25ng/mL d'EGF et/ou de FGF (résultats non montrés), la localisation de la protéine était identique dans chaque condition.

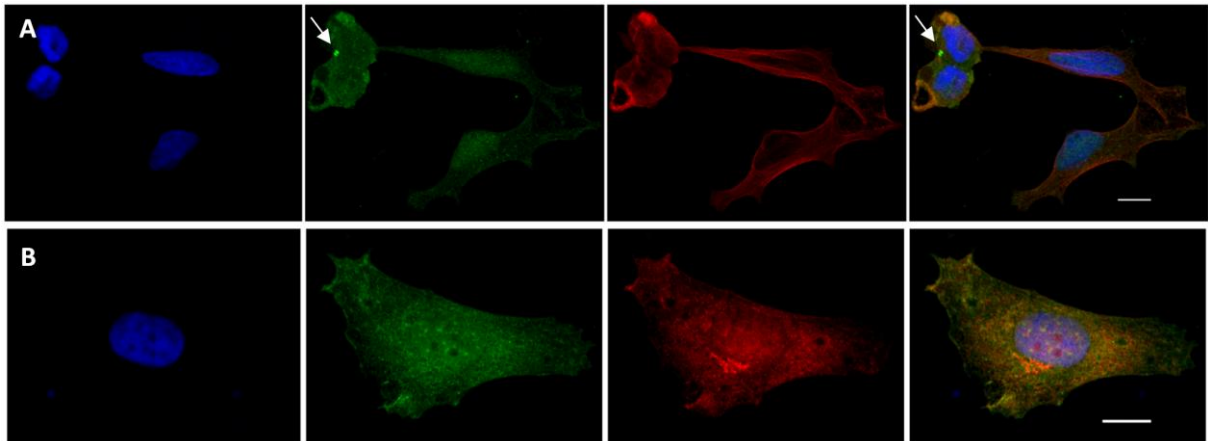


Figure 58 : Expression de MKlp2 dans les NS142. Co-marquages MKlp2 (vert) et α -tubuline (rouge, A) ou Rab6 (rouge, B) sur les NS142 juste après leur étalement. Barres de calibration = 20 μ m ; flèches = corps intermédiaire ; microscopie confocale.

Afin de tester si MKlp2 a un rôle particulier dans les NS, son expression a été observée lors de leur différenciation. Les NS ont été dissociées puis réensemencées dans du milieu NS ou dans du milieu avec sérum qui entraîne leur différenciation. L'expression de MKlp2 diminue 48h après l'ajout de sérum dans le milieu pour disparaître totalement au bout de 5 jours (Figure 59, gauche). La diminution de MKlp2 semble liée à l'arrêt de la prolifération des cellules, représenté par l'expression

de Ki67. Si l'expérience est prolongée, une nette augmentation de l'expression de MKlp2 est observée au bout de 7 jours alors que l'expression de Ki67 reste quasiment indétectable (Figure 59, droite), reflétant le fait que le taux de prolifération des cellules est faible. Ceci suggère que MKlp2 aurait un rôle dans les NS juste après leur différenciation, indépendamment de son rôle mitotique. Afin d'étudier sa fonction dans les NS, il faudrait réaliser des expériences fonctionnelles comme par exemple de la surexpression et observer l'effet sur la différenciation des NS.

Le profil d'expression de MKlp2 a ensuite été étudié dans les tumeurs NS chez la souris. La protéine n'a pas pu être détectée ni dans le cerveau non tumoral d'une souris, ni en association avec la vasculature tumorale des tumeurs co-optimales. Ainsi KIF20A a un profil d'expression différent dans les tumeurs angiogéniques et co-optimales. Ceci suggère que KIF20A/MKlp2 ne participe pas au développement de ces tumeurs malgré la forte population de GSC.



Figure 59 : Expression de MKlp2 dans les neurosphères adhérentes. Les neurosphères sont ensemencées en milieu DMEM 10% SVF pendant plusieurs jours puis elles sont lysées afin de réaliser un western blot. Les protéines sont déposées en duplicats pour les NS et en triplicats pour les adhérentes (adh). Ici ce sont les NS142 qui sont représentées, des résultats similaires sont obtenus avec les NS85.

3. Discussion

Ce travail nous a permis de développer un nouveau modèle de GBM, permettant la modélisation de la composante co-option qui n'est pas reproduite dans les tumeurs U87, basé sur l'utilisation de cellules de GBM de patients cultivées sous forme de sphères (73, 90). Ce modèle a été développé afin d'étudier les mécanismes de résistance du GBM aux traitements anti-angiogéniques. En effet, il est composé d'une forte population de GSC étant décrites comme ayant un rôle important dans l'adaptation de la tumeur et sa récurrence (72, 75, 79-81). Le modèle de gliome expérimental U87, modèle angiogénique qui permet de reproduire l'effet pro-invasif des traitements à l'Avastin® sur le GBM, nous a permis d'observer la présence de vaisseaux sanguins fonctionnels dans les zones hypoxiques de la tumeur, dont les vaisseaux ont été détruits par l'Avastin® (Figure 46). Ces vaisseaux sont issus de la transdifférenciation de cellules tumorales en cellules endothéliales, confirmant ainsi les données de la littérature (34-36, 40, 74, 89). De nombreuses études suggèrent que ce sont les GSC qui ont la capacité d'acquiescer l'expression des marqueurs endothéliaux (cd31, vWF...), les U87 comprenant environ 0.15% de cellules souches, nous avons souhaité étudier ce phénomène à l'aide de trois lignées de cellules de patients composées d'une forte population de cellules souches. Ces cellules xéno-greffées chez la souris immunodéficente permettent la croissance d'une tumeur très invasive et totalement résistante au traitement Avastin®. La tumeur obtenue est parfaitement perfusée par les vaisseaux murins, signifiant que le mode de vascularisation majoritaire n'est pas l'angiogenèse, comme les U87, et expliquant pourquoi l'Avastin® est inefficace sur ce type de tumeur. La tumeur se développe autour des vaisseaux et co-opte ainsi tout le réseau vasculaire de l'hôte. D'autre part, aucun vaisseau transdifférencié n'est observé dans ces tumeurs, traitées ou non

à l'Avastin®. Ceci s'explique sans doute par le fait que, les cellules tumorales co-optant les vaisseaux cérébraux, la tumeur n'est pas soumise à une pression de sélection pour former de nouveaux vaisseaux indépendamment du VEGF. Ainsi les NS142 et 85 peuvent être proposées comme un nouveau modèle de GBM se développant d'emblée, et essentiellement, de manière co-optive et invasive, sans angiogenèse.

Ces tumeurs semblaient donc être un bon modèle pour confirmer l'effet anti-invasif de la combinaison Avastin®/Actemra observé sur les tumeurs U87. Sur les tumeurs U87, l'Actemra (anticorps bloquant du récepteur à l'IL-6) a un effet similaire à l'Avastin®, il inhibe l'angiogenèse mais entraîne un phénotype invasif des cellules tumorales. La combinaison Avastin® et Actemra permet de contrôler ce changement de phénotype des U87 et ralentit la croissance tumorale de manière significative (article en cours d'écriture, Annexe 2). Mais contrairement à ce qui était attendu, les tumeurs formées à partir des cellules NS sont complètement insensibles à ce traitement. Ces cellules permettent donc de modéliser un type de GBM ayant une résistance intrinsèque aux traitements anti-angiogéniques se développant essentiellement par co-option des vaisseaux cérébraux (53). Les NS sont donc un bon modèle pour étudier les mécanismes de résistance du GBM aux traitements actuels.

Ainsi, les cellules de NS permettent le développement d'une tumeur très différente des tumeurs U87, illustrant la variabilité des tumeurs pouvant être diagnostiquées en clinique. Alors que les tumeurs U87 sont essentiellement compactes et angiogéniques, les tumeurs NS sont invasives et co-optives. La croissance tumorale de ces deux types ne met pas en jeu les mêmes voies de signalisation, expliquant la différence de réponse observée suite aux traitements. Ces deux modèles rappellent que chaque tumeur est unique et qu'il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles afin de développer des thérapies ciblées. D'autre part, en clinique, le GBM est une tumeur très hétérogène, dans une même tumeur cohabitent différentes composantes (angiogénique, co-optive, souche...) favorisant la résistance et la récurrence tumorale. Les traitements actuels, y compris l'Avastin®, exercent vraisemblablement une pression de sélection sur la tumeur induisant la sélection d'une sous-population cellulaire insensible à la thérapie qui va repeupler la masse tumorale et permettre le maintien de la croissance tumorale. De nouvelles mutations peuvent émerger du fait de l'instabilité chromosomique extrême des cellules de GBM. Ces différents mécanismes d'échappement aux traitements doivent être pris en compte afin de développer de nouvelles thérapies combinatoires ciblant différentes composantes tumorales afin de limiter les phénomènes d'adaptation et la récurrence. Dans le chapitre précédent, deux gènes ont été identifiés comme pouvant participer à la vascularisation du GBM et étant potentiellement impliqués dans la résistance/récurrence tumorale. Ils ont donc été étudiés dans les tumeurs NS et seul DPY19L1 a été détecté au niveau des vaisseaux tumoraux des tumeurs NS. Dpy19l1 est exprimée par des cellules tumorales positives pour le marqueur des vSMC, l' α SMA, accolées à certains vaisseaux murins. Ainsi dans ce modèle, les GSC ne se différencieraient pas en cellules endothéliales mais en vSMC afin de stabiliser les vaisseaux co-optés et de profiter du réseau vasculaire cérébral murin pour la croissance tumorale. Une étude récente propose que les GSC sont recrutées par les vaisseaux via la voie SDF1/CXCR4, elles migrent le long d'un gradient de SDF1 sécrété par les cellules endothéliales puis se transdifférencient en vSMC/péricytes suite à l'activation de la voie du TGF β (Figure 60) (78). L'équipe de Cheng a isolé des GSC à partir de tumeurs humaines et a observé que ces cellules avaient la capacité de se différencier en péricytes in vitro. Ils ont mis au point un système permettant de

reconnaitre aisément les cellules tumorales suite à leur xélogreffe chez la souris. Ce modèle a permis aux auteurs de déterminer que les marqueurs péricytaire (α SMA, NG2, desmine...) colocalisaient avec le marquage GFP, exprimée par les cellules tumorales dans 57 à 89% des péricytes. Ayant obtenu ces résultats dans la majorité des tumeurs étudiées, les auteurs concluent que la transdifférenciation de GSC en péricytes est un événement courant dans la croissance tumorale. Afin de définir l'origine des péricytes tumoraux, les auteurs ont réalisés des analyses FISH et ont observé que la majorité des péricytes exprimaient les anomalies chromosomiques typiques des cellules tumorales (amplification du chromosome 7, perte du chromosome 10...) confirmant ainsi que les GSC se transdifférencient en péricytes (78). Ils ont aussi observé que l'élimination ciblée de ces G-péricytes (GSC transdifférenciés en péricytes) induit des perturbations dans le mur vasculaire, les vaisseaux collapsent ce qui entraîne la régression tumorale, suggérant que la transdifférenciation des GSC en péricytes participe activement au développement tumoral. Ainsi, les G-péricytes stabiliseraient les vaisseaux tumoraux, et pourraient participer à la résistance tumorale, en les rendant moins sensibles à l'inhibition du VEGF (198).

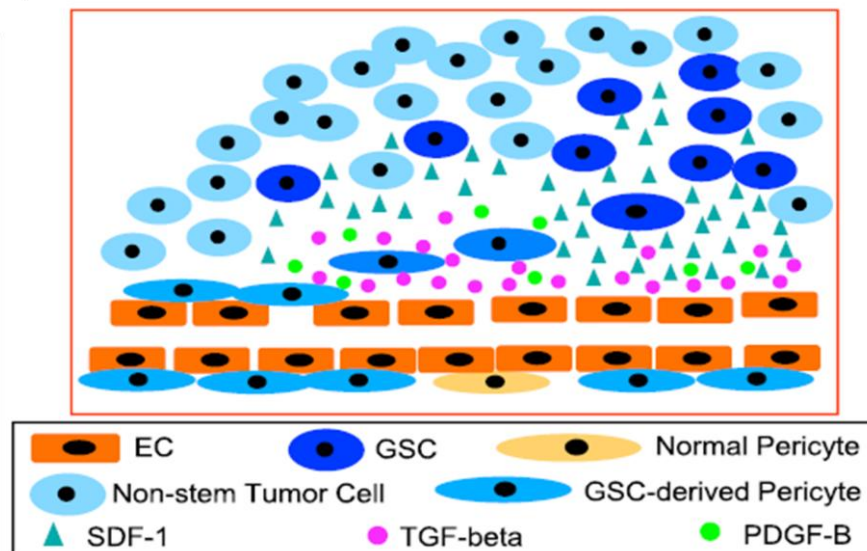


Figure 60 : Recrutement et transdifférenciation des GSC en péricytes dans le GBM (78). Les GSC exprimant CXCR4 sont recrutées par les cellules endothéliales sécrétant SDF1 qui forme un gradient le long duquel migrent les GSC. La différenciation en péricytes/vSMC est ensuite induite par le TGF β afin de renforcer la structure vasculaire. Dpy1911, permettant l'activation de la signalisation du TGF β par la glycosylation de TSP1, participerait à la transdifférenciation des GSC en vSMC. EC = cellules endothéliales.

Dpy1911, d'après l'hypothèse émise dans le paragraphe précédent (III.A.2.c)(1)(b)), participerait à l'activation de la signalisation du TGF β en glycosylant TSP1. Ainsi les résultats obtenus dans les tumeurs NS, montrant l'expression de la protéine dans les cellules tumorales exprimant l' α SMA, semblent confirmer son implication dans le recrutement des cellules tumorales au niveau vasculaire. Dans le modèle NS, dpy1911 serait aussi impliquée dans le phénomène de transdifférenciation des GSC en péricytes/vSMC. Dpy1911 pourrait également participer à la co-option vasculaire par les GSC qui se transdifférencieraient ensuite en vSMC. En effet, une étude récente décrit DPY19L1 comme étant un gène impliqué dans l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales lors de la formation de métastases (197). Cette étude est basée sur un criblage d'une banque de cellules tumorales coliques génétiquement modifiées en condition d'adhésion sur des cellules endothéliales. Les auteurs ont identifié DPY19L1 comme l'un des 5 gènes dont la perte d'expression provoque une perte de la capacité d'adhésion aux vaisseaux. Les tumeurs NS se

développent essentiellement par co-option vasculaire, 15 jours après leur implantation, des « cuffs » sont observés (Figure 48). Ce mode de développement est similaire à l'étape d'adhésion initiatrice de métastases coliques dans le poumon, précédant l'intravasation. Ainsi dpy19l1 pourrait être impliquée dans le développement des tumeurs NS en permettant l'adhésion des GSC aux vaisseaux cérébraux. Lors du processus de co-option, dpy19l1 pourrait donc avoir un rôle dans le développement tumoral précoce puis dans le maintien de la vascularisation dans les tumeurs NS. Afin de déterminer avec précision le rôle de cette protéine dans le développement et la vascularisation du GBM, des études fonctionnelles sont nécessaires, notamment des expériences d'inhibition afin de déterminer le rôle de dpy19l1 sur le développement tumoral.

Le second gène candidat de notre étude, KIF20A, a aussi été étudié dans les tumeurs NS mais la protéine n'y est pas détectée malgré la forte présence de GSC. Les études menées chez les patients (paragraphe III.A.2.c)(2)) suggéraient une expression préférentielle de MKlp2 dans les GSC localisées dans les niches périvasculaires. Le fait qu'elle ne soit pas détectée dans ce type de tumeur suggère que MKlp2 ne participe pas au développement des tumeurs strictement co-optimales. Ainsi la protéine participerait à la vascularisation chez certains patients dont la tumeur est angiogénique et n'aurait aucun rôle dans les tumeurs très invasives et co-optimales comme les NS. Il faudrait donc étudier son expression dans les tumeurs U87 afin de vérifier cette hypothèse et confirmer les données de patients. Les expériences *in vitro* montrent que l'expression de MKlp2 varie au cours de la différenciation des NS, son expression diminue dans les premiers jours suivant l'ajout de sérum dans le milieu de culture, puis augmente au bout d'une semaine alors que la prolifération n'est pas active. Ce qui signifie que cette réexpression de MKlp2 n'est pas liée à son rôle lors de la mitose. Ces résultats préliminaires suggèrent un rôle de KIF20A dans la différenciation des NS qui pourrait avoir des conséquences lors du développement tumoral. Au laboratoire, nous avons montré qu'une autre kinésine mitotique, KIF11/Eg5, possède une double fonction, lors de la mitose et lors de l'angiogenèse développementale et tumorale (article Annexe 1 (123)). Lors du développement embryonnaire chez le poulet et le poisson zèbre, l'inhibition chimique de KIF11 perturbe le développement vasculaire de ces deux organismes, suggérant un rôle important dans les cellules endothéliales. D'autre part, nous avons montré que son inhibition, *in vitro*, empêche la formation de structures tubulaires, mimant l'angiogenèse, et, *in vivo*, diminue la vascularisation des tumeurs GBM implantées sur la CAM (cellules U87) ou des tumeurs RCC (carcinome rénal à cellules claires) xénogreffées chez la souris (cellules RENCA, modèle syngénique). L'ensemble de ces résultats montre qu'en dehors de son rôle lors du cycle cellulaire, contrôlant la prolifération cellulaire, KIF11/Eg5 participe au développement vasculaire chez le poisson zèbre, l'embryon de souris ainsi que lors du développement tumoral. Ainsi, notre étude suggère que certaines kinésines mitotiques peuvent avoir une double fonction, à l'image de KIF11/Eg5. Nous émettons donc désormais l'hypothèse que KIF20a/MKlp2 a une fonction non mitotique dans la spécification de certaines GSC et leur association et contribution à une sous population de vaisseaux tumoraux. Mais des expériences sont nécessaires afin de comprendre le rôle tenu par MKlp2 dans ce contexte.

D'autre part, la caractérisation du modèle co-optimale que j'ai mis au point à partir des cellules NS de GBM, par cette approche d'imagerie multimodale, contribuera à l'évaluation précise de l'efficacité de molécules thérapeutiques sur GBM co-optimale et sur GBM angiogénique. L'équipe a récemment montré que l'on pouvait reproduire l'hétérogénéité d'une tumeur de patient en greffant un mélange de cellules à phénotype angiogénique et co-optimale. Sur ces tumeurs mixtes, le Dr. Petibois

a pu montrer que la microtomographie discrimine les zones angiogéniques des zones cooptées qui peuvent être quantifiées l'une par rapport à l'autre. Ce modèle contribuera donc à la validation de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique capables de contrôler la croissance de l'ensemble des zones du foyer tumoral.

Cette étude a permis de mettre au point un nouveau modèle de GBM expérimental totalement insensible aux traitements anti-angiogéniques Avastin® et Actemra. Ce modèle permettra d'étudier les mécanismes de résistance du GBM et de tester de nouvelles cibles anti-tumorales. De plus ces tumeurs se développent sans activer l'angiogenèse, elles sont essentiellement co-optives. Ces tumeurs vont donc permettre d'étudier ce mode de vascularisation participant activement à la récurrence de la tumeur chez les patients traités avec l'Avastin® afin de développer des traitements contrecarrant ce mécanisme. Dans ce modèle, l'un des gènes candidats définis au début de ce travail, DPY19L1, pourrait contribuer à la croissance tumorale.

IV. Conclusion & Perspectives

Le glioblastome a été qualifié de multiforme pour illustrer son hétérogénéité cellulaire et moléculaire qui contribue fortement à la résistance aux traitements actuels. Malgré les nombreuses études réalisées afin de déterminer les mécanismes mis en œuvre dans le développement tumoral et l'identification des modifications génétiques principales, le GBM reste incurable. La thérapie classique consistant à associer la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie au Témzolomide puis à administrer de l'Avastin® à la récurrence ont essentiellement un rôle palliatif. Avec le recul nécessaire depuis que l'Avastin® a été utilisé pour la 1^{ère} fois sur le GBM, nous pouvons considérer que l'anti-angiogénèse est vécue par les cellules tumorales comme un stress auquel les cellules de GBM, hautement instables sur le plan génétique, sont capables de répondre en adoptant des stratégies alternatives de croissance (41, 51, 53-58, 61, 62, 64, 67, 72). Il est donc nécessaire d'identifier les voies qui peuvent participer à cet échappement.

Mes travaux ont consisté à rechercher si parmi de nouveaux modulateurs potentiels de l'angiogénèse développementale identifiés au laboratoire, certains pouvaient exercer une fonction dans le contexte tumoral. KIF11, KIF20A et DPY19L1 avaient été identifiés comme significativement induits au moment du switch angiogénique de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet (92), et également induits par la stimulation de ce tissu par le VEGF (123). Il s'agissait donc de candidats intéressants pour vérifier une implication dans l'angiogénèse tumorale. Au cours de sa thèse, Prisca Exertier au laboratoire, a confirmé l'implication de KIF11/Eg5 dans l'angiogénèse développementale en utilisant des inhibiteurs spécifiques de cette kinésine et différents modèles in vitro (test d'angiogénèse in vitro, essai sur anneau aortique, essai sur membrane chorioallantoïdienne, inhibition par morpholino sur embryon de poisson zèbre) (122, 123). Elle a ensuite recherché une participation d'Eg5 à la vascularisation tumorale et j'ai participé à cette étude en définissant les profils d'expression d'Eg5 dans des échantillons de tumeurs humaines. Nous avons ainsi pu montrer que les adénocarcinomes rénaux, en particulier, présentent une surexpression d'Eg5 spécifique de l'endothélium tumoral. L'expression d'Eg5 est également détectée dans certains vaisseaux de glioblastome. Au vu de son rôle essentiel au cours de la mitose, Eg5 est déjà envisagée comme cible thérapeutique pour plusieurs cancers. Nos travaux suggèrent que son inhibition pourrait non seulement bloquer la prolifération des cellules tumorales et induire leur apoptose mais également exercer un effet anti-angiogénique en ciblant les propriétés d'adhésion et de migration des cellules endothéliales.

Bien qu'issus des mêmes cribles de sélection, les deux autres candidats sur lesquels j'ai conduit mes travaux, DPY19L1 et KIF20A, n'ont pas révélé les mêmes profils d'expression tumorale qu'Eg5. Pour ces deux candidats, la prédiction d'expression endothéliale était basée sur l'analyse bioinformatique de données EST ainsi que, pour KIF20A, sur les profils d'expression par hybridation in situ sur embryon de souris. Néanmoins, après avoir testé l'expression de ces deux gènes sur des coupes de nombreux échantillons de GBM, j'ai pu conclure que dans cette tumeur, ce ne sont pas les cellules endothéliales qui surexpriment ces deux gènes mais des cellules d'origine tumorale intimement associées aux structures vasculaires. Nous avons identifié ces cellules comme étant des cellules tumorales transdifférenciées en cellules murales pour DPY19L1, et des cellules souches tumorales pour KIF20A/MKlp2.

Au moment où je mettais en évidence ces profils, une série de publications ont, pour la première fois, fourni des preuves expérimentales très convaincantes de la participation des cellules

de glioblastome à la vascularisation tumorale, soit par mimétisme vasculaire (33), soit par transdifférenciation en cellules de type endothélial (34-36, 40, 74), soit ,plus récemment, par transdifférenciation en cellules de type mural (37, 38, 78). Au vu de l'expression de DPY19L1 et MKlp2 dans les cellules d'origine tumorale accolées aux vaisseaux, j'ai cherché à savoir si DPY19L1 et/ou MKlp2 pouvaient participer à ces modes de vascularisation alternatifs et dans quelle mesure ils contribueraient à l'échappement des tumeurs à l'Avastin®. Nous nous sommes du fait posé la question de savoir quelle était la contribution relative de chaque mode de vascularisation VEGF indépendante, incluant la co-option à l'échappement des GBM aux antiangiogéniques.

Dans le cas de MKlp2, nous avons déterminé qu'elle était exprimée dans les GSC n'exprimant ni les marqueurs endothéliaux, ni les marqueurs des cellules murales suggérant que MKlp2 pourrait être impliquée dans le recrutement des GSC par les vaisseaux et que son expression serait perdue lors de leur transdifférenciation en cellules endothéliales ou murales. Par analogie avec Eg5 pour laquelle de récentes études , dont la nôtre, décrivent un rôle de cette kinésine dans la migration des cellules endothéliales (123) et tumorales (199), il est raisonnable de penser que MKlp2 pourrait participer à la migration des GSC vers les vaisseaux tumoraux. Afin de valider cette hypothèse il aurait fallu que nous disposions d'inhibiteurs chimiques spécifiquement dirigés contre MKlp2. De telles molécules, dérivées du paprotrain (PAssenger PROteins TRANsport INhibitor) sont en cours de validation par une société privée avec laquelle le laboratoire est en contact qui devrait prochainement pouvoir les fournir pour des essais précliniques. Il sera alors possible de tester notre hypothèse sur un modèle de migration de GSC mis au point très récemment au laboratoire par le Dr. Daubon. Cet essai consiste à implanter des neurosphères préalablement marquées par un colorant fluorescent dans des tranches de 400 microns de cerveau de souris. En quelques jours, les cellules tumorales en périphérie de la sphère migrent à distance le long des capillaires du cerveau qui sont révélés par immunomarquage, acquisition confocale et reconstruction 3D. L'intérêt de cet essai est qu'il modélise au mieux le microenvironnement dans lequel les GSC sont susceptibles d'initier un comportement co-optif. D'autre part des résultats préliminaires, montrent que cet essai est sensible à l'application de régulateurs connus et offre une réponse quantifiable en quelques jours seulement avec une très bonne reproductibilité. Si notre hypothèse est correcte, l'application topique de petits inhibiteurs de MKlp2 devrait inhiber ou modifier significativement la co-option dans ce nouvel essai ex-vivo très pertinent.

J'ai principalement exploité mes données sur DPY19L1 en démontrant sa valeur en tant que marqueur pronostique. Assez rapidement après le début de mes travaux de thèse, je me suis rendue compte que l'expression de DPY19L1 n'était pas, comme attendue, endothéliale mais murale, et disposant de très peu d'outils et de données publiées sur cette molécule, je n'ai pas voulu risquer de m'engager vers une exploration fonctionnelle. Entretemps plusieurs articles ont été publiés qui me permettent, en les interprétant avec mes propres données de profil d'expression, de bâtir une nouvelle hypothèse sur l'implication de DPY19L1 dans la transdifférenciation murale, et/ou la co-option et la résistance à l'Avastin® :

- Nous avons montré que dans les GBM de patients, DPY19L1 est exprimé dans les cellules murales (vSMC/pericytes) positives pour l' α SMA. Des études récentes ont mis en évidence l'importance de la transdifférenciation des GSC en cellules murales dans la croissance tumorale et suggèrent que ce mécanisme est impliqué dans la

- résistance/récurrence du GBM aux anti-angiogéniques (37, 38, 78). En particulier, l'équipe de Francescone a analysé des séries d'exérèses de GBM humain avant traitement, et a observé, dans la majorité des échantillons, la présence de quelques vaisseaux formés de cellules exprimant les marqueurs péricytaire α SMA et PDGFR et négatives pour le marqueur endothélial cd31 (37, 38). Ils ont démontré que ces cellules étaient d'origine tumorale, c'est à dire provenaient de la transdifférenciation de GSC et qu'elles exprimaient le récepteur R2 du VEGF, Flk-1. Ces cellules sont capables de former des réseaux pseudoendothéliaux en test d'angiogenèse *in vitro*. Les auteurs ont montré que cette capacité à former des tubes est dépendante de Flk1 mais, de façon inattendue, elle est indépendante du VEGF et par conséquent elle n'est pas inhibée par l'Avastin®. Ces observations ont été corroborées par des essais *in vivo* dans lesquels les cellules de GBM xénogreffées chez la souris expriment un shRNA dirigé contre Flk1. Chez ces souris, les tumeurs formées ne contiennent que des vaisseaux endothéliaux et sont significativement plus petites que les tumeurs contrôles, attestant de la contribution de la transdifférenciation murale à la malignité du GBM. DPY19L1 avait été identifié initialement au laboratoire comme induit au cours de l'angiogenèse induite par le VEGF suggérant que l'expression de DPY19L1 est dépendante de la signalisation du VEGF/Flk-1 (123). En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, je propose que dans les vSMC transdifférenciées à partir de GSC, Flk1 pourrait induire l'expression de DPY19L1 indépendamment du VEGF et participer à la constitution de vaisseaux résistants à l'Avastin®.
- Une autre étude publiée par l'équipe de Cheng, démontre également la participation de la transdifférenciation des GSC en cellules murales dans la vascularisation du GBM (78). Les auteurs montrent que les GSC sont recrutées par les cellules endothéliales et se transdifférencient en vSMC suite à l'activation de la signalisation du TGF β . Une étude parue lors de la rédaction de cette thèse décrit dpy19l1 comme étant une C-mannosyltransférase (150) glycosylant les motifs de répétition thrombospondine, suggérant que dpy19l1 interagit avec la thrombospondine (TSP1). L'hypothèse que je peux émettre suite à l'examen de l'ensemble de ces données est que dpy19l1 glycosylerait TSP1, permettant son interaction avec le TGF β qui a un rôle important dans la communication entre les péricytes/vSMC et les cellules endothéliales (160). Le TGF β est aussi impliqué dans l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules tumorales (169). Ainsi dpy19l1 pourrait participer à transdifférenciation des GCS en vSMC/péricytes en activant TGF β lorsqu'elles sont en contact avec les cellules endothéliales.
 - Nous avons également montré que DPY19L1 est surexprimé dans les cuffs vasculaires formés par les GSC transdifférenciées en cellules murales qui participent à la co-option dans le modèle NS xénogreffé. Ainsi, les cellules qui surexpriment DPY19L1 ont des capacités remarquables de reconnaissance et d'adhésion à l'endothélium. Or, une étude très récente, publiée lors de l'écriture de ce manuscrit, décrit DPY19L1 comme étant un gène impliqué dans l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales (197). Cette démonstration est le fruit d'un crible de génomique fonctionnelle des gènes favorisant cette adhésion dans le contexte prémétastatique de l'adénocarcinome colique. Les auteurs ont produit une banque de clones de cellules tumorales coliques présentant des mutations gain ou perte de fonction de l'ensemble des gènes du génome, par RHGP

(Random Homozygous Gene Perturbation). Ces clones ont été criblés sur leur capacité à adhérer comme le font les cellules tumorales sauvages à des cellules microvasculaires dans un essai *in vitro*. A l'issue de ce crible, DPY19L1 a été identifié comme l'un des 5 gènes dont la perte d'expression provoque une perte de la capacité d'adhésion aux vaisseaux. Les tumeurs NS se développent essentiellement par co-option vasculaire qui met en œuvre des mécanismes similaires à l'étape d'adhésion initiatrice de métastases coliques dans le poumon, précédant l'intravasation. Nous avons montré que dpy19l1 est exprimée dans ces tumeurs, dans les vSMC accolées à des vaisseaux sanguins cérébraux, exprimant le cd31 murin. Ces données suggèrent donc que dpy19l1 pourrait être impliquée dans le développement des tumeurs co-optimales en permettant l'adhésion des GSC transdifférenciées en vSMC aux cellules endothéliales cérébrales. Ainsi, l'ensemble des résultats de ma thèse concernant DPY19L1 suggèrent que ce gène est impliqué dans le recrutement et la transdifférenciation des GSC au niveau des vaisseaux sanguins préexistants renforçant ou co-optant le réseau vasculaire cérébral. Afin de déterminer avec précision le rôle de cette protéine dans la croissance tumorale et la vascularisation du GBM, le développement d'outils moléculaires et d'inhibiteurs chimiques est désormais nécessaire.

Notre approche, basée sur la sélection de deux nouveaux gènes candidats participant à la croissance d'un tissu embryonnaire vascularisé et consistant à évaluer leur implication dans le contexte tumoral a permis de valider DPY19L1 comme nouveau marqueur pronostique du GBM. Dans la mesure où nous avons trouvé que ce gène est surexprimé dans le modèle co-optif, il pourrait s'agir d'un indicateur du potentiel co-optif des cellules chez le patient (corrélant avec un mauvais pronostic de survie malgré les traitements), ce qui pourrait orienter la prise en charge thérapeutique et son suivi. Ceci valorise le criblage initial car ce marqueur n'est pas mis en évidence dans les données de signature moléculaire publiées récemment (4, 6). L'ensemble des altérations génétiques de plusieurs centaines de biopsies viennent en effet d'être obtenues par séquençage de l'exome complet et décrites dans deux études indépendantes. Ces données ne procurent que très peu d'informations nouvelles et ne dégagent pas de nouvelles pistes thérapeutiques. En particulier les voies EGFR et PDGFR qui sont mises en avant dans ces publications ont été les premières cibles thérapeutiques choisies pour le GBM. Les inhibiteurs regroupent des analogues de l'ATP se fixant sur les sites catalytiques tyrosine-kinase tels que l'Erlotinib®, le Gefetinib®, le Lapatinib® (EGFR) ou le Sunitinib® et l'Imatinib® (PDGFR) ainsi que des anticorps spécifiques comme le Cetuximab® bloquant la liaison de l'EGFR avec ses ligands. Ils ne sont pas efficaces en clinique. D'autres cibles moléculaires dérégulées dans les gliomes ont également leurs inhibiteurs comme les tyrosines kinases de la famille SRC qui contribuent au caractère infiltrant des gliomes (200, 201), de la voie de signalisation PI3K/Akt ainsi que d'autres régulateurs clés comme mTOR. Malgré une recherche intensive ces dernières années dans le domaine de la thérapie moléculaire ciblée, l'efficacité de celle-ci reste faible (202). Les causes de cet échec sont multiples. Parmi celles-ci, on peut citer l'accès et la biodisponibilité limités de ces drogues au sein de la tumeur, due à la barrière hémato-encéphalique qui joue un rôle important dans la protection du cerveau et est imperméable aux molécules de haut poids moléculaire (203, 204), ainsi que l'hétérogénéité moléculaire et cellulaire importante des gliomes (5, 205, 206). En réponse à ces problèmes, de nouveaux concepts thérapeutiques émergent, à l'image de la thérapie personnalisée. Dans celle-ci, le profil moléculaire tumoral du patient serait déterminé afin de proposer une thérapie adaptée aux caractéristiques moléculaires de la tumeur

(207). L'émergence de ce concept offre des perspectives thérapeutiques à explorer mais risque fort de se heurter à des reprogrammations des cellules tumorales résiduelles leur permettant d'échapper par un mode de croissance indépendant de la cible quel que soit le profil, par exemple proneural ou mésenchymateux, de la tumeur primaire. Donc, je pense que le glioblastome ne pourra être cerné sur le plan thérapeutique sans la combinaison systématique d'inhibiteurs de prolifération, d'angiogenèse, de transdifférenciation et de co-option. Ainsi, avant que de chercher directement de nouvelles cibles thérapeutiques, il nous faut comprendre et maîtriser davantage le potentiel de plasticité inhérente aux cellules de GBM. Il faut également développer des moyens nous permettant de typer les tumeurs de patients en fonction de leur potentiel et ce non seulement au moment du diagnostic mais également au cours du traitement. C'est pourquoi les perspectives que j'envisagerais de l'exploitation de mes résultats sur DPY19L1 seraient de l'utiliser comme indicateur de potentiel co-optif plutôt que comme cible thérapeutique. Enfin, il est important de modéliser au mieux la croissance du GBM et ses différentes réactions aux traitements standards. Il est également très essentiel de pouvoir imager et discriminer avec une résolution la plus fine possible la tumeur dans son ensemble, son volume, la composition de son stroma et sa vasculature. Les travaux d'imagerie multimodale engagés récemment par S. Javerzat et C. Petibois, et dont la mise au point utilise le modèle NS décrit dans cette thèse, devrait contribuer significativement à la compréhension des mécanismes de résistance. Les projets s'engagent vers la mise au point de modèle mixte initiée par le Pr. Moenner et le Dr. Petibois, modèle composé de cellules capables d'angiogenèse, de co-option et de transdifférenciation et de leur imagerie fine. Des résultats préliminaires montrent que dans ces tumeurs, l'imagerie discrimine les zones de co-option, des zones angiogéniques même lorsque celles-ci ne représentent qu'1% de la tumeur. Ainsi, cette imagerie hautement résolutive permettra de diagnostiquer, avec une précision incomparable par rapport à l'histologie, l'effet bénéfique ou au contraire adverse de certaines molécules.

Des résultats préliminaires dans le contexte de ces projets viennent ainsi de révéler un effet inattendu de l'Avastin® sur les tumeurs co-optimales NS. Mes propres analyses basées sur l'immunohistologie m'avaient permis de conclure que l'Avastin® n'a aucun effet sur des tumeurs co-optimales, ni en terme de volume tumoral, ni en terme de vascularisation. Je n'avais pas pu mettre en évidence dans ces tumeurs traitées de vaisseaux angiogéniques transdifférenciés. J'en avais conclu que l'Avastin®, n'ayant aucun effet sur les vaisseaux co-optés, ne pouvait exercer de pression de sélection nécessaire pour induire une transdifférenciation des cellules souches tumorales. L'analyse tomographique de ces tumeurs traitées par l'Avastin® qui est en cours, semble contredire mes conclusions. Les premières images montrent en effet quelques foyers de microprolifération vasculaire en périphérie des tumeurs NS si elles ont été traitées à l'Avastin®. Si ces résultats sont confirmés, il sera essentiel de comprendre comment dans un contexte où la fonction anti-angiogénique de l'Avastin® n'a pas d'effet, et donc en absence de stress hypoxique pouvant exercer une pression de sélection, l'Avastin® pourrait quand même induire des microproliférations vasculaires dont l'origine (transdifférenciation ?) restera à démontrer, ainsi que leur participation à la récurrence sous traitement. Les approches de modélisation mixte/imagerie multimodale doivent permettre d'appréhender l'effet de nouvelles molécules thérapeutiques contre le GBM avec des conclusions beaucoup plus précises sur les modes de résistance potentiels.

Références

1. D. N. L. W.K. Cavenee, H. Ohgaki , O. D. Wiestler. (World Health Organization, 2006), pp. 312.
2. F. B. Furnari *et al.*, Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development* **21**, 2683 (Nov 1, 2007).
3. H. Ohgaki, P. Kleihues, The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 764 (Feb 15, 2013).
4. C. W. Brennan *et al.*, The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **155**, 462 (Oct 10, 2013).
5. T. F. Cloughesy, W. K. Cavenee, P. S. Mischel, Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annual review of pathology*, (Aug 5, 2013).
6. V. Frattini *et al.*, The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nature genetics* **45**, 1141 (Oct, 2013).
7. G. P. Dunn *et al.*, Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & development* **26**, 756 (Apr 15, 2012).
8. K. H. Vousden, X. Lu, Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer* **2**, 594 (Aug, 2002).
9. R. G. Verhaak *et al.*, Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* **17**, 98 (Jan 19, 2010).
10. H. S. Phillips *et al.*, Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer cell* **9**, 157 (Mar, 2006).
11. A. Sottoriva *et al.*, Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 4009 (Mar 5, 2013).
12. J. Folkman, P. Cole, S. Zimmerman, Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Annals of surgery* **164**, 491 (Sep, 1966).
13. M. A. Gimbrone, Jr., S. B. Leapman, R. S. Cotran, J. Folkman, Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *The Journal of experimental medicine* **136**, 261 (Aug 1, 1972).
14. G. Bergers, L. E. Benjamin, Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer* **3**, 401 (Jun, 2003).
15. I. Fischer, J. P. Gagner, M. Law, E. W. Newcomb, D. Zagzag, Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain pathology* **15**, 297 (Oct, 2005).
16. M. E. Hardee, D. Zagzag, Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *The American journal of pathology* **181**, 1126 (Oct, 2012).
17. D. Zagzag *et al.*, Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **80**, 837 (Jun, 2000).
18. D. Ribatti, B. Nico, E. Crivellato, A. Vacca, The structure of the vascular network of tumors. *Cancer letters* **248**, 18 (Apr 8, 2007).
19. P. Carmeliet, R. K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298 (May 19, 2011).

20. P. Baluk, H. Hashizume, D. M. McDonald, Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current opinion in genetics & development* **15**, 102 (Feb, 2005).
21. H. F. Dvorak, J. A. Nagy, J. T. Dvorak, A. M. Dvorak, Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *The American journal of pathology* **133**, 95 (Oct, 1988).
22. S. Y. Cheng, M. Nagane, H. S. Huang, W. K. Cavenee, Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12081 (Oct 28, 1997).
23. A. Abramsson *et al.*, Analysis of mural cell recruitment to tumor vessels. *Circulation* **105**, 112 (Jan 1, 2002).
24. P. Carmeliet, R. K. Jain, Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **10**, 417 (Jun, 2011).
25. N. Nagano, H. Sasaki, M. Aoyagi, K. Hirakawa, Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta neuropathologica* **86**, 117 (1993).
26. J. Holash *et al.*, Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**, 1994 (Jun 18, 1999).
27. C. Zhao *et al.*, Distinct contributions of angiogenesis and vascular co-option during the initiation of primary microtumors and micrometastases. *Carcinogenesis* **32**, 1143 (Aug, 2011).
28. D. Zagzag *et al.*, In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Experimental neurology* **159**, 391 (Oct, 1999).
29. D. Lyden *et al.*, Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature medicine* **7**, 1194 (Nov, 2001).
30. M. R. Machein, S. Renninger, E. de Lima-Hahn, K. H. Plate, Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas. *Brain pathology* **13**, 582 (Oct, 2003).
31. M. Kioi *et al.*, Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**, 694 (Mar, 2010).
32. M. Aghi, K. S. Cohen, R. J. Klein, D. T. Scadden, E. A. Chiocca, Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer research* **66**, 9054 (Sep 15, 2006).
33. S. El Hallani *et al.*, A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain : a journal of neurology* **133**, 973 (Apr, 2010).
34. L. Ricci-Vitiani *et al.*, Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**, 824 (Dec 9, 2010).
35. R. Wang *et al.*, Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* **468**, 829 (Dec 9, 2010).
36. Y. Soda *et al.*, Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 4274 (Mar 15, 2011).
37. R. Francescone *et al.*, Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *The Journal of biological chemistry* **287**, 24821 (Jul 13, 2012).

38. S. Scully *et al.*, Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 12950 (Sep 12, 2012).
39. F. J. Rodriguez, B. A. Orr, K. L. Ligon, C. G. Eberhart, Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget* **3**, 98 (Jan, 2012).
40. Y. Zhao *et al.*, Endothelial cell transdifferentiation of human glioma stem progenitor cells in vitro. *Brain research bulletin* **82**, 308 (Jul 30, 2010).
41. V. G. Sophie Javerzat, Andreas Bikfalvi, Balancing risks and benefits for anti-angiogenic drugs for malignant glioma. *Future Neurology*, (2013).
42. M. H. Cohen, Y. L. Shen, P. Keegan, R. Pazdur, FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The oncologist* **14**, 1131 (Nov, 2009).
43. R. Stupp *et al.*, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 987 (Mar 10, 2005).
44. W. B. Pope, A. Lai, P. Nghiemphu, P. Mischel, T. F. Cloughesy, MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. *Neurology* **66**, 1258 (Apr 25, 2006).
45. M. C. Chamberlain, Antiangiogenesis: biology and utility in the treatment of gliomas. *Expert review of neurotherapeutics* **8**, 1419 (Oct, 2008).
46. J. J. Verhoeff *et al.*, Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. *BMC cancer* **9**, 444 (2009).
47. T. N. Kreisl *et al.*, Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 740 (Feb 10, 2009).
48. O. L. Chinot *et al.*, AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Advances in therapy* **28**, 334 (Apr, 2011).
49. A. Lai *et al.*, Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 142 (Jan 10, 2011).
50. O. L. Chinot, Bevacizumab-based therapy in relapsed glioblastoma: rationale and clinical experience to date. *Expert review of anticancer therapy* **12**, 1413 (Nov, 2012).
51. O. Keunen *et al.*, Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3749 (Mar 1, 2011).
52. E. Nossek, Z. Ram, F. Bokstein, D. Blumenthal, Antiangiogenesis in recurrent glioblastoma: proof of principle. *Neurology international* **1**, e21 (2009).
53. G. Bergers, D. Hanahan, Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature reviews. Cancer* **8**, 592 (Aug, 2008).
54. F. Azam, S. Mehta, A. L. Harris, Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *European journal of cancer* **46**, 1323 (May, 2010).
55. S. E. Abdullah, R. Perez-Soler, Mechanisms of resistance to vascular endothelial growth factor blockade. *Cancer* **118**, 3455 (Jul 15, 2012).
56. S. Giuliano, G. Pages, Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. *Biochimie*, (Mar 16, 2013).

57. J. L. Rubenstein *et al.*, Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia* **2**, 306 (Jul-Aug, 2000).
58. A. Saidi *et al.*, Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer* **122**, 2187 (May 15, 2008).
59. O. Casanovas, D. J. Hicklin, G. Bergers, D. Hanahan, Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer cell* **8**, 299 (Oct, 2005).
60. J. L. Li *et al.*, DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer research* **71**, 6073 (Sep 15, 2011).
61. J. F. de Groot *et al.*, Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro-oncology* **12**, 233 (Mar, 2010).
62. K. V. Lu *et al.*, VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer cell* **22**, 21 (Jul 10, 2012).
63. I. Fischer *et al.*, High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro-oncology* **10**, 700 (Oct, 2008).
64. A. Bikfalvi, M. Moenner, S. Javerzat, S. North, M. Hagedorn, Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochemical Society transactions* **39**, 1560 (Dec, 2011).
65. J. S. Guillozo *et al.*, Molecular mechanisms underlying effects of epidermal growth factor receptor inhibition on invasion, proliferation, and angiogenesis in experimental glioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 3697 (Jun 1, 2009).
66. A. K. Lucio-Eterovic, Y. Piao, J. F. de Groot, Mediators of glioblastoma resistance and invasion during anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 4589 (Jul 15, 2009).
67. Y. Piao *et al.*, Acquired Resistance to Anti-VEGF Therapy in Glioblastoma Is Associated with a Mesenchymal Transition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 4392 (Aug 15, 2013).
68. P. Rath *et al.*, In Vivo c-Met Pathway Inhibition Depletes Human Glioma Xenografts of Tumor-Propagating Stem-Like Cells. *Translational oncology* **6**, 104 (Apr, 2013).
69. T. Borovski *et al.*, Therapy-resistant tumor microvascular endothelial cells contribute to treatment failure in glioblastoma multiforme. *Oncogene* **32**, 1539 (Mar 21, 2013).
70. M. E. Hardee *et al.*, Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta. *Cancer research* **72**, 4119 (Aug 15, 2012).
71. D. Y. Cho *et al.*, Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell transplantation* **22**, 731 (2013).
72. C. H. Chau, W. D. Figg, Angiogenesis inhibitors increase tumor stem cells. *Cancer biology & therapy* **13**, 586 (Jun, 2012).
73. M. Venere, H. A. Fine, P. B. Dirks, J. N. Rich, Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia* **59**, 1148 (Aug, 2011).
74. C. A. Shaifer, J. Huang, P. C. Lin, Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer* **127**, 2063 (Nov 1, 2010).

75. A. Salmaggi *et al.*, Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia* **54**, 850 (Dec, 2006).
76. M. G. N. a. A. Y. Nikitin, Cancer Stem Cells in Solid Tumors. *Stem Cell Biology in Health and Disease*, 295 (2010).
77. M. Shipitsin, K. Polyak, The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **88**, 459 (May, 2008).
78. L. Cheng *et al.*, Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* **153**, 139 (Mar 28, 2013).
79. Z. Huang, L. Cheng, O. A. Guryanova, Q. Wu, S. Bao, Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein & cell* **1**, 638 (Jul, 2010).
80. M. K. Kang, S. K. Kang, Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem cells and development* **16**, 837 (Oct, 2007).
81. L. Cheng, S. Bao, J. N. Rich, Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochemical pharmacology* **80**, 654 (Sep 1, 2010).
82. D. Beier, J. B. Schulz, C. P. Beier, Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Molecular cancer* **10**, 128 (2011).
83. A. Filatova, T. Acker, B. K. Garvalov, The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochimica et biophysica acta* **1830**, 2496 (Feb, 2013).
84. Z. Li *et al.*, Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell* **15**, 501 (Jun 2, 2009).
85. E. E. Bar, A. Lin, V. Mahairaki, W. Matsui, C. G. Eberhart, Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *The American journal of pathology* **177**, 1491 (Sep, 2010).
86. O. Mendez *et al.*, Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Molecular cancer* **9**, 133 (2010).
87. J. M. Heddleston, Z. Li, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland, J. N. Rich, The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell cycle* **8**, 3274 (Oct 15, 2009).
88. C. Calabrese *et al.*, A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer cell* **11**, 69 (Jan, 2007).
89. J. Dong *et al.*, Glioma stem/progenitor cells contribute to neovascularization via transdifferentiation. *Stem cell reviews* **7**, 141 (Mar, 2011).
90. J. Lee *et al.*, 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* **9**, 391 (May, 2006).
91. A. V. Kofman, R. Abounader, When tumor cells make blood vessels: implications for glioblastoma therapy. *Future oncology* **7**, 841 (Jul, 2011).
92. S. Javerzat *et al.*, Correlating global gene regulation to angiogenesis in the developing chick extra-embryonic vascular system. *PLoS one* **4**, e7856 (2009).
93. N. Hirokawa, Y. Noda, Y. Okada, Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Current opinion in cell biology* **10**, 60 (Feb, 1998).

94. R. D. Vale, T. S. Reese, M. P. Sheetz, Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39 (Aug, 1985).
95. H. Miki, M. Setou, K. Kaneshiro, N. Hirokawa, All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7004 (Jun 19, 2001).
96. H. Miki, M. Setou, N. Hirokawa, R. G. Group, G. S. L. Members, Kinesin superfamily proteins (KIFs) in the mouse transcriptome. *Genome research* **13**, 1455 (Jun, 2003).
97. C. Zhu *et al.*, Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Molecular biology of the cell* **16**, 3187 (Jul, 2005).
98. H. Miki, Y. Okada, N. Hirokawa, Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends in cell biology* **15**, 467 (Sep, 2005).
99. F. Lai, A. A. Fernald, N. Zhao, M. M. Le Beau, cDNA cloning, expression pattern, genomic structure and chromosomal location of RAB6KIFL, a human kinesin-like gene. *Gene* **248**, 117 (May 2, 2000).
100. A. Echard, A. el Marjou, B. Goud, Expression, purification, and biochemical properties of rabkinesin-6 domains and their interactions with Rab6A. *Methods in enzymology* **329**, 157 (2001).
101. A. Echard *et al.*, Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**, 580 (Jan 23, 1998).
102. R. D. Fontijn *et al.*, The human kinesin-like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis. *Molecular and cellular biology* **21**, 2944 (Apr, 2001).
103. J. A. Good, D. A. Skoufias, F. Kozielski, Elucidating the functionality of kinesins: an overview of small molecule inhibitors. *Seminars in cell & developmental biology* **22**, 935 (Dec, 2011).
104. O. Rath, F. Kozielski, Kinesins and cancer. *Nature reviews. Cancer* **12**, 527 (Aug, 2012).
105. E. Hill, M. Clarke, F. A. Barr, The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *The EMBO journal* **19**, 5711 (Nov 1, 2000).
106. J. Guizetti, D. W. Gerlich, Cytokinetic abscission in animal cells. *Seminars in cell & developmental biology* **21**, 909 (Dec, 2010).
107. R. Neef, U. Gruneberg, F. A. Barr, Assay and functional properties of Rabkinesin-6/Rab6-KIFL/MKlp2 in cytokinesis. *Methods in enzymology* **403**, 618 (2005).
108. F. A. Barr, U. Gruneberg, Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* **131**, 847 (Nov 30, 2007).
109. U. Gruneberg, R. Neef, R. Honda, E. A. Nigg, F. A. Barr, Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *The Journal of cell biology* **166**, 167 (Jul 19, 2004).
110. M. Kitagawa, S. Y. Fung, N. Onishi, H. Saya, S. H. Lee, Targeting Aurora B to the equatorial cortex by MKlp2 is required for cytokinesis. *PloS one* **8**, e64826 (2013).
111. S. Hümmer, Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (2009).
112. S. Hummer, T. U. Mayer, Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Current biology : CB* **19**, 607 (Apr 14, 2009).
113. S. H. Lee, F. McCormick, H. Saya, Mad2 inhibits the mitotic kinesin MKlp2. *The Journal of cell biology* **191**, 1069 (Dec 13, 2010).

114. R. Neef *et al.*, Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *The Journal of cell biology* **162**, 863 (Sep 1, 2003).
115. M. Petronczki, M. Glotzer, N. Kraut, J. M. Peters, Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Developmental cell* **12**, 713 (May, 2007).
116. R. B. Chalamalasetty, S. Hummer, E. A. Nigg, H. H. Sillje, Influence of human Ect2 depletion and overexpression on cleavage furrow formation and abscission. *Journal of cell science* **119**, 3008 (Jul 15, 2006).
117. S. Tcherniuk *et al.*, Relocation of Aurora B and survivin from centromeres to the central spindle impaired by a kinesin-specific MKLP-2 inhibitor. *Angewandte Chemie* **49**, 8228 (Oct 25, 2010).
118. J. Li, J. Wang, H. Jiao, J. Liao, X. Xu, Cytokinesis and cancer: Polo loves ROCK'n' Rho(A). *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* **37**, 159 (Mar, 2010).
119. A. Echard *et al.*, Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms. *Molecular biology of the cell* **11**, 3819 (Nov, 2000).
120. F. J. Opdam *et al.*, The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus. *Journal of cell science* **113 (Pt 15)**, 2725 (Aug, 2000).
121. A. J. Horrevoets *et al.*, Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* **93**, 3418 (May 15, 1999).
122. P. Exertier, Sciences de la Vie et de la Santé, Université Bordeaux 1 (2012).
123. S. J. Prisca Exertier, Baigang Wang, Mélanie Franco, John Herbert, Natalia Platonova, Marie Winandy, Nadège Pujol, Olivier Nivelles, Sandra Ormenese, Virginie Godard, Jürgen Becker, Roy Bicknell, Raphael Pineau, Jörg Wilting, Andreas, M. H. Bikfalvi, Impaired angiogenesis and tumor development by inhibition of the mitotic kinesin Eg5. *Oncotarget*, (26/10/2013, 2013).
124. S. Claerhout *et al.*, Gene expression signature analysis identifies vorinostat as a candidate therapy for gastric cancer. *PLoS one* **6**, e24662 (2011).
125. G. R. Yan *et al.*, Genistein-induced mitotic arrest of gastric cancer cells by downregulating KIF20A, a proteomics study. *Proteomics* **12**, 2391 (Aug, 2012).
126. Y. Lu *et al.*, Cross-species comparison of orthologous gene expression in human bladder cancer and carcinogen-induced rodent models. *American journal of translational research* **3**, 8 (2010).
127. J. R. Ho *et al.*, Deregulation of Rab and Rab effector genes in bladder cancer. *PLoS one* **7**, e39469 (2012).
128. I. Gasnereau *et al.*, KIF20A mRNA and its product MKlp2 are increased during hepatocyte proliferation and hepatocarcinogenesis. *The American journal of pathology* **180**, 131 (Jan, 2012).
129. K. Imai *et al.*, Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. *British journal of cancer* **104**, 300 (Jan 18, 2011).
130. K. Taniuchi *et al.*, Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell. *Cancer research* **65**, 105 (Jan 1, 2005).
131. J. Yamashita *et al.*, Kinesin family member 20A is a novel melanoma-associated antigen. *Acta dermato-venereologica* **92**, 593 (Nov, 2012).

132. A. Matsuoka *et al.*, Lenalidomide induces cell death in an MDS-derived cell line with deletion of chromosome 5q by inhibition of cytokinesis. *Leukemia* **24**, 748 (Apr, 2010).
133. L. Groth-Pedersen *et al.*, Identification of cytoskeleton-associated proteins essential for lysosomal stability and survival of human cancer cells. *PLoS one* **7**, e45381 (2012).
134. T. Nagase *et al.*, Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **5**, 355 (Dec 31, 1998).
135. A. R. Carson, J. Cheung, S. W. Scherer, Duplication and relocation of the functional DPY19L2 gene within low copy repeats. *BMC genomics* **7**, 45 (2006).
136. L. Honigberg, C. Kenyon, Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 proteins in *C. elegans*. *Development* **127**, 4655 (Nov, 2000).
137. K. Kurokawa *et al.*, A mammalian dpy-19 homologue is expressed in GABAergic neurons. *Medical molecular morphology* **38**, 79 (Jun, 2005).
138. K. Watanabe *et al.*, Dpy19l1, a multi-transmembrane protein, regulates the radial migration of glutamatergic neurons in the developing cerebral cortex. *Development* **138**, 4979 (Nov, 2011).
139. V. N. Patel *et al.*, Network signatures of survival in glioblastoma multiforme. *PLoS computational biology* **9**, e1003237 (Sep, 2013).
140. F. Mazurier *et al.*, A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **19**, 533 (May, 1999).
141. B. Enkhmandakh *et al.*, Essential functions of the Williams-Beuren syndrome-associated TFII-I genes in embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 181 (Jan 6, 2009).
142. R. Colombo *et al.*, Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase. *Cancer research* **70**, 10255 (Dec 15, 2010).
143. S. Gnjatic *et al.*, NY-CO-58/KIF2C is overexpressed in a variety of solid tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127**, 381 (Jul 15, 2010).
144. L. Bie, G. Zhao, Y. P. Wang, B. Zhang, Kinesin family member 2C (KIF2C/MCAK) is a novel marker for prognosis in human gliomas. *Clinical neurology and neurosurgery* **114**, 356 (May, 2012).
145. K. Ishikawa *et al.*, Mitotic centromere-associated kinesin is a novel marker for prognosis and lymph node metastasis in colorectal cancer. *British journal of cancer* **98**, 1824 (Jun 3, 2008).
146. J. V. Alvarez *et al.*, A STAT3 Gene Expression Signature in Gliomas is Associated with a Poor Prognosis. *Translational oncogenomics* **2**, 99 (2007).
147. S. P. Reddy *et al.*, Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through transcriptome analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 2978 (May 15, 2008).
148. D. Vestweber, VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 223 (Feb, 2008).
149. G. Breier *et al.*, Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* **87**, 630 (Jan 15, 1996).

150. F. F. Buettner, A. Ashikov, B. Tiemann, L. Lehle, H. Bakker, C. elegans DPY-19 Is a C-Mannosyltransferase Glycosylating Thrombospondin Repeats. *Molecular cell*, (Apr 2, 2013).
151. O. Skalli *et al.*, Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **37**, 315 (Mar, 1989).
152. K. S. Stewart, Z. Zhou, P. Zweidler-McKay, E. S. Kleinerman, Delta-like ligand 4-Notch signaling regulates bone marrow-derived pericyte/vascular smooth muscle cell formation. *Blood* **117**, 719 (Jan 13, 2011).
153. H. Gerhardt, C. Betsholtz, Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and tissue research* **314**, 15 (Oct, 2003).
154. G. Bergers, S. Song, The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology* **7**, 452 (Oct, 2005).
155. S. Song, A. J. Ewald, W. Stallcup, Z. Werb, G. Bergers, PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nature cell biology* **7**, 870 (Sep, 2005).
156. P. Wesseling *et al.*, Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **54**, 304 (May, 1995).
157. R. Du *et al.*, HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer cell* **13**, 206 (Mar, 2008).
158. N. Charles, E. C. Holland, The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell cycle* **9**, 3012 (Aug 1, 2010).
159. H. Takeuchi, N. Hashimoto, R. Kitai, T. Kubota, K. Kikuta, Proliferation of vascular smooth muscle cells in glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery* **113**, 218 (Aug, 2010).
160. N. A. Charles, E. C. Holland, R. Gilbertson, R. Glass, H. Kettenmann, The brain tumor microenvironment. *Glia* **60**, 502 (Mar, 2012).
161. L. E. Benjamin, D. Golijanin, A. Itin, D. Pode, E. Keshet, Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of clinical investigation* **103**, 159 (Jan, 1999).
162. A. Furmanek, J. Hofsteenge, Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta biochimica Polonica* **47**, 781 (2000).
163. A. Gonzalez de Peredo *et al.*, C-mannosylation and o-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **1**, 11 (Jan, 2002).
164. E. Muroi *et al.*, C-Mannosylated peptides derived from the thrombospondin type 1 repeat enhance lipopolysaccharide-induced signaling in macrophage-like RAW264.7 cells. *Glycobiology* **17**, 1015 (Sep, 2007).
165. J. Hofsteenge *et al.*, C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *The Journal of biological chemistry* **276**, 6485 (Mar 2, 2001).
166. R. A. Majack, S. C. Cook, P. Bornstein, Platelet-derived growth factor and heparin-like glycosaminoglycans regulate thrombospondin synthesis and deposition in the matrix by smooth muscle cells. *The Journal of cell biology* **101**, 1059 (Sep, 1985).
167. R. A. Majack, S. C. Cook, P. Bornstein, Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 9050 (Dec, 1986).

168. R. A. Majack, L. V. Goodman, V. M. Dixit, Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *The Journal of cell biology* **106**, 415 (Feb, 1988).
169. T. Kawataki *et al.*, Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta expression with malignancy of glioma. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* **20**, 161 (Sep, 2000).
170. J. S. Isenberg *et al.*, Endogenous thrombospondin-1 is not necessary for proliferation but is permissive for vascular smooth muscle cell responses to platelet-derived growth factor. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **24**, 110 (Apr, 2005).
171. R. Moura, M. Tjwa, P. Vandervoort, K. Cludts, M. F. Hoylaerts, Thrombospondin-1 activates medial smooth muscle cells and triggers neointima formation upon mouse carotid artery ligation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 2163 (Oct, 2007).
172. P. Bornstein, Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling* **3**, 189 (Dec, 2009).
173. S. Schultz-Cherry *et al.*, Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *The Journal of biological chemistry* **270**, 7304 (Mar 31, 1995).
174. S. M. Ribeiro, M. Poczatek, S. Schultz-Cherry, M. Villain, J. E. Murphy-Ullrich, The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* **274**, 13586 (May 7, 1999).
175. A. Eggleston, Rab6-KIFL in a pinch. *Nature cell biology* **3**, E9 (Jan, 2001).
176. R. Osawa *et al.*, Identification of HLA-A24-restricted novel T Cell epitope peptides derived from P-cadherin and kinesin family member 20A. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**, 848042 (2012).
177. Y. Tomita *et al.*, Identification of promiscuous KIF20A long peptides bearing both CD4+ and CD8+ T-cell epitopes: KIF20A-specific CD4+ T-cell immunity in patients with malignant tumor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, (May 28, 2013).
178. Z. Odrowaz, A. D. Sharrocks, The ETS transcription factors ELK1 and GABPA regulate different gene networks to control MCF10A breast epithelial cell migration. *PloS one* **7**, e49892 (2012).
179. M. Candolfi *et al.*, Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of neuro-oncology* **85**, 133 (Nov, 2007).
180. M. Hagedorn *et al.*, Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1643 (Feb 1, 2005).
181. A. Saidi *et al.*, Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **125**, 1054 (Sep 1, 2009).
182. S. Loeffler, B. Fayard, J. Weis, J. Weissenberger, Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **115**, 202 (Jun 10, 2005).
183. C. Rolhion *et al.*, Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas. *Journal of neurosurgery* **94**, 97 (Jan, 2001).

184. A. Tchirkov *et al.*, IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *British journal of cancer* **85**, 518 (Aug 17, 2001).
185. C. Y. Chang *et al.*, Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **12**, 930 (Nov, 2005).
186. R. Li *et al.*, IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncology reports* **23**, 1553 (Jun, 2010).
187. Q. Liu *et al.*, IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *Journal of neuro-oncology* **100**, 165 (Nov, 2010).
188. M. Kudo *et al.*, Antitumor effect of humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (tocilizumab) on glioma cell proliferation. Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery* **111**, 219 (Aug, 2009).
189. T. Avril *et al.*, Human glioblastoma stem-like cells are more sensitive to allogeneic NK and T cell mediated killing compared to serum-cultured glioblastoma cells. *Brain Pathol*, (Jul 26, 2011).
190. H. K. Gan, A. H. Kaye, R. B. Luwor, The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **16**, 748 (Jun, 2009).
191. T. E. Taylor, F. B. Furnari, W. K. Cavenee, Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. *Current cancer drug targets* **12**, 197 (Mar, 2012).
192. A. Schulte *et al.*, Glioblastoma stem-like cell lines with either maintenance or loss of high-level EGFR amplification, generated via modulation of ligand concentration. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 1901 (Apr 1, 2012).
193. M. Li *et al.*, Guanylate binding protein 1 is a novel effector of EGFR-driven invasion in glioblastoma. *The Journal of experimental medicine* **208**, 2657 (Dec 19, 2011).
194. R. Bonavia *et al.*, EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF-kappaB, interleukin-8 pathway. *Oncogene* **31**, 4054 (Sep 6, 2012).
195. C. C. Chien *et al.*, Gold nanoparticles as high-resolution X-ray imaging contrast agents for the analysis of tumor-related micro-vasculature. *Journal of nanobiotechnology* **10**, 10 (2012).
196. R. Noreen, M. Moenner, Y. Hwu, C. Petibois, FTIR spectro-imaging of collagens for characterization and grading of gliomas. *Biotechnology advances* **30**, 1432 (Nov-Dec, 2012).
197. J. Marquez *et al.*, Identification of hepatic microvascular adhesion-related genes of human colon cancer cells using random homozygous gene perturbation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **133**, 2113 (Nov, 2013).
198. A. Y. Liu, G. Ouyang, Tumor angiogenesis: a new source of pericytes. *Current biology : CB* **23**, R565 (Jul 8, 2013).
199. X. D. Sun *et al.*, Dimethylenastron suppresses human pancreatic cancer cell migration and invasion in vitro via allosteric inhibition of mitotic kinesin Eg5. *Acta pharmacologica Sinica* **32**, 1543 (Dec, 2011).
200. A. Angers-Loustau, R. Hering, T. E. Werbowetski, D. R. Kaplan, R. F. Del Maestro, SRC regulates actin dynamics and invasion of malignant glial cells in three dimensions. *Mol Cancer Res* **2**, 595 (Nov, 2004).
201. C. V. Lund *et al.*, Reduced glioma infiltration in Src-deficient mice. *J Neurooncol* **78**, 19 (May, 2006).

202. R. Y. Bai, V. Staedtke, G. J. Riggins, Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends in molecular medicine* **17**, 301 (Jun, 2011).
203. P. Carmeliet, R. K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249 (Sep 14, 2000).
204. R. K. Jain *et al.*, Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* **8**, 610 (Aug, 2007).
205. M. Snuderl *et al.*, Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* **20**, 810 (Dec 13, 2011).
206. N. J. Szerlip *et al.*, Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3041 (Feb 21, 2012).
207. M. Mohme, M. C. Neidert, L. Regli, M. Weller, R. Martin, Immunological challenges for peptide-based immunotherapy in glioblastoma. *Cancer treatment reviews*, (Sep 8, 2013).

Annexes

Annexe 1: Impaired angiogenesis and tumor development by inhibition of the mitotic kinesin Eg5.

Prisca Exertier^{1,2}, Sophie Javerzat^{1,2}, Baigang Wang^{3,8}, Mélanie Franco^{1,2}, John Herbert⁴, Natalia Platonova^{1,2}, Marie Winandy⁵, Nadège Pujol^{1,2}, Olivier Nivelles⁶, Sandra Ormenese⁷, **Virginie Godard**^{1,2}, Jürgen Becker⁸, Roy Bicknell⁴, Raphael Pineau⁹, Jörg Wilting^{8*}, Andreas Bikfalvi^{1,2*}, Martin Hagedorn^{1,2*}

- Publié le 26 octobre 2013 dans Oncotarget.

Impaired angiogenesis and tumor development by inhibition of the mitotic kinesin Eg5

Prisca Exertier^{1,2}, Sophie Javerzat^{1,2}, Baigang Wang^{3,8}, Mélanie Franco^{1,2}, John Herbert⁴, Natalia Platonova^{1,2}, Marie Winandy⁵, Nadège Pujol^{1,2}, Olivier Nivelles⁶, Sandra Ormenese⁷, Virginie Godard^{1,2}, Jürgen Becker⁸, Roy Bicknell⁴, Raphael Pineau⁹, Jörg Wilting^{8*}, Andreas Bikfalvi^{1,2*}, Martin Hagedorn^{1,2*}

¹ Univ. Bordeaux, LAMC, UMR 1029, F-33405 Talence, France

² INSERM, LAMC, UMR 1029, F-33405 Talence, France

³ Ruhr-Universität Bochum, Medizinische Fakultät; Abt. f. Anatomie und Embryologie, D-44780 Bochum, Germany

⁴ Molecular Angiogenesis Group, Institute of Biomedical Research, Univ Birmingham, Medical School, Edgbaston, Birmingham, UK

⁵ GIGA, Zebrafish Facility, Tour B34, Université de Liège, Belgium

⁶ GIGA, Unité de Biologie Moléculaire et Génie Génétique, Tour B34, Université de Liège, Belgium

⁷ GIGA, Imaging and Flow Cytometry Facility, Tour B34, Université de Liège, Belgium

⁸ Zentrum Anatomie, Abteilung Anatomie und Zellbiologie, Georg-August-Universität Goettingen, Germany

⁹ Animalerie mutualisée, University of Bordeaux I, Talence, France

* Co-PIs

Correspondence to: Martin Hagedorn, **email:** m.hagedorn@angio.u-bordeaux1.fr

Keywords: Angiogenesis, Eg5 kinesin, Mklp2 kinesin, VEGF, ispinesib

Received: October 11, 2013

Accepted: October 24, 2013

Published: October 26, 2013

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

Kinesin motor proteins exert essential cellular functions in all eukaryotes. They control mitosis, migration and intracellular transport through interaction with microtubules. Small molecule inhibitors of the mitotic kinesin KIF11/Eg5 are a promising new class of anti-neoplastic agents currently evaluated in clinical cancer trials for solid tumors and hematological malignancies. Here we report induction of Eg5 and four other mitotic kinesins including KIF20A/Mklp2 upon stimulation of *in vivo* angiogenesis with vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A). Expression analyses indicate up-regulation of several kinesin-encoding genes predominantly in lymphoblasts and endothelial cells. Chemical blockade of Eg5 inhibits endothelial cell proliferation and migration *in vitro*. Mitosis-independent vascular outgrowth in aortic ring cultures is strongly impaired after Eg5 or Mklp2 protein inhibition. *In vivo*, interfering with KIF11/Eg5 function causes developmental and vascular defects in zebrafish and chick embryos and potent inhibition of tumor angiogenesis in experimental tumor models. Besides blocking tumor cell proliferation, impairing endothelial function is a novel mechanism of action of kinesin inhibitors.

INTRODUCTION

The ability of solid tumors to attract blood vessels (tumor angiogenesis) is one of the rate-limiting steps for tumor progression [1]. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) is a key hypoxia-induced angiogenic protein secreted by tumor cells acting on the endothelium

to induce and sustain new blood vessel growth [2]. Neutralizing VEGF-A with drugs such as the humanized anti-VEGF-A antibody bevacizumab (Avastin) potently blocks tumor growth in numerous animal models. Associated with standard chemotherapy, bevacizumab is used worldwide against multiple cancer types and allows prolonged or progression-free survival. However, by far not all patients respond to anti-VEGF therapy and severe

side effects such as hypertension and proteinuria have been reported, a fact which has led to the retirement of bevacizumab as a treatment for metastatic breast cancer [3]. It is therefore a challenge to explore the molecular networks that regulate blood vessel growth to identify novel druggable targets.

To discover novel downstream effectors of VEGF-A activity in the endothelium *in vivo*, we monitored global gene expression changes after application of recombinant human VEGF-A on the differentiated day-13 chick chorio-allantoic membrane (CAM) [4]. Numerous known genes associated with angiogenesis were up regulated by VEGF-A. Among the new ones, KIF4A, KIF11/Eg5, KIF15, KIF20A/Mklp2 and KIF23, all genes encoding mitotic kinesins, were consistently up regulated.

Kinesins make up a family of about 45 proteins in humans; at least 12 of them are implicated in mitosis [5]. KIF11 encodes the Eg5 protein, which is essential for cell division [6]. Murine *Knsl1* (KIF11) null-embryos die prior to implantation between morula and blastocyst stage [7, 8]. KIF20A/Mklp2 exerts important functions during mitosis by ensuring cleavage furrow formation and cytokinesis [9].

First evidence that kinesin inhibition might be explored as a new anti-cancer strategy came in 2004 [10] and chemical inhibitors of Eg5 have been designed and tested with success against solid tumors in preclinical tumor models [11]. Consequently, there are increasing numbers of clinical trials investigating the efficacy of Eg5 inhibitors alone or associated with classical chemotherapy

in hematological and solid malignancies [12]. There is a general consent that inhibitors of the mitotic kinesins, especially Eg5, have the potential to overcome side-effects associated with classical microtubule targeting agents such as Taxol, which include neutropenia, hair loss and peripheral neuropathy as well as resistance, thereby often limiting their usability [5, 13].

Mitotic kinesins have been studied in the context of cell division almost exclusively in tumor cells [12]. Beside their role in mitosis, an increasing number of reports point to the possibility that they may exert other biological functions. KIF11/Eg5 plays an important role in normal and cancer cell migration [14, 15]. Only recently, an important role of Eg5 in protein translation has been discovered [16] and KIF4A has been shown to be implicated in neuronal survival [17]. Since KIF11/Eg5 and KIF20A/Mklp2 are promising drug targets, we sought to investigate the impact of their respective inhibitors on angiogenesis, a process that is central to tumor progression.

RESULTS

VEGF-A-induced gene expression *in vivo*

Human recombinant VEGF-A induces growth of new capillaries inside the CAM within 24h (Fig. 1b, c). Chicken microarray analysis of angiogenic areas of three

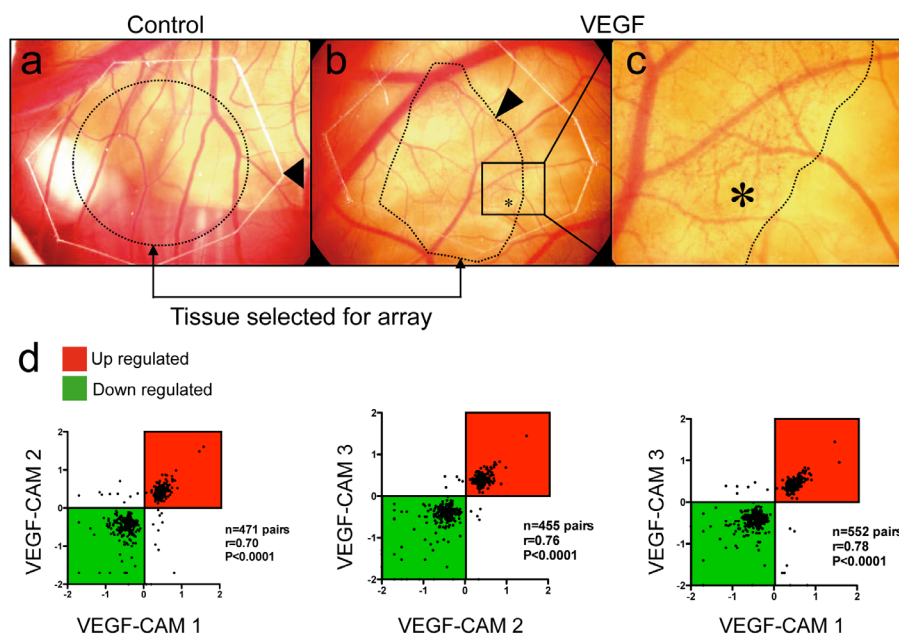


Figure 1: Affymetrix GeneChip screening for VEGF-A-induced genes during CAM vascularization. Solvent or human recombinant VEGF-A was deposited on the differentiated CAM at day 13 of development. (a, b, c) 24h later, tissue with visible newly formed capillaries (asterisk in c) was isolated and further processed for mRNA isolation (n=3 CAMs per group). Control CAMs (a) did not show any vascular alterations (arrow: border of the carrier plastic disc). (d) To verify reproducibility of these experiments, fold-change values of genes regulated in VEGF-treated CAMs were plotted against each other for correlation analysis. Significant correlations (Spearman's r ranging from 0.7 to 0.78, $P < 0.0001$) were found for all comparisons indicating that VEGF effects on the CAM were consistent.

Table 1: Vascular gene expression program induced by VEGF-A.

Human gene	Gene product	VEGF vs Control (mean)	q-value	Ratio % EC-EST/Non-EC-EST
KIF11	kinesin family member 11	23.22	0.10	--
CENPL	centromere protein L isoform 2	4.56	0.29	--
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial precursor	4.39	0.01	--
CENPE	centromere protein E	4.05	0.29	--
ECSM2	hypothetical protein LOC641700	3.45	0.00	--
CD34	CD34 antigen isoform a	2.96	0.00	--
CLDN5	claudin 5	2.88	0.29	--
DPY19L1	dpy-19-like 1	2.65	0.02	--
MYCT1	myc target 1	2.59	0.00	--
ZNF521	zinc finger protein 521	2.59	0.00	--
CDH5	cadherin 5, type 2 preproprotein	2.54	0.00	--
SOX18	SRY-box 18	2.48	0.29	--
C13orf3	hypothetical protein LOC221150	2.28	0.29	--
SOX17	SRY-box 17	2.28	0.10	--
LMO2	LIM domain only 2	2.20	0.29	--
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor precursor	2.08	0.00	--
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	2.86	0.00	171.25
SEC14L1	SEC14 (<i>S. cerevisiae</i>)-like 1 isoform a	2.60	0.00	61.47
TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	4.20	0.00	35.13
PDGFB	platelet-derived growth factor beta isoform 1, preproprotein	2.21	0.01	21.96
PRCP	prolylcarboxypeptidase isoform 1 preproprotein	6.37	0.00	17.56
RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	2.97	0.04	17.56
PODXL	podocalyxin-like isoform 2 precursor	2.27	0.00	13.17
NRP1	neuropilin 1 isoform a	2.42	0.00	12.55
MYO1C	myosin IC isoform c	3.25	0.00	11.86
ELK3	ELK3 protein	2.07	0.01	10.25
LAMA4	laminin, alpha 4 isoform 1 precursor	2.68	0.00	9.27
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	3.19	0.29	8.78
CDH13	cadherin 13 preproprotein	2.41	0.10	8.78
IFNGR1	interferon gamma receptor 1 precursor	2.05	0.29	8.78
USP1	ubiquitin specific protease 1	3.29	0.26	6.59
SEC24C	SEC24-related protein C	2.71	0.05	6.59
C14orf108	chromosome 14 open reading frame 108	2.20	0.05	6.59
SERPINH1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1 precursor	2.24	0.00	6.23
KIAA1671	KIAA1671 protein	2.41	0.18	5.85
FLI1	Friend leukemia virus integration 1	2.75	0.32	4.39
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	2.55	0.26	4.39
BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	2.50	0.44	4.39
TM4SF18	transmembrane 4 L six family member 18	2.34	0.44	4.39
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1 isoform 2	3.06	0.12	3.84
KIF20A	kinesin family member 20A	3.66	0.26	3.66
DOCK9	dedicator of cytokinesis 9	4.73	0.30	3.51
AKAP12	A-kinase anchor protein 12 isoform 2	2.62	0.25	3.29
RRM1	ribonucleoside-diphosphate reductase M1 chain	2.60	0.07	3.22
PDE4B	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific isoform 2	3.89	0.29	3.14
LMBR1	limb region 1 protein	2.43	0.29	3.14
PSMD1	proteasome 26S non-ATPase subunit 1	2.91	0.02	3.05

CLIC2	chloride intracellular channel 2	2.43	0.29	2.93
PRPF8	U5 snRNP-specific protein	2.10	0.07	2.85
NUP93	nucleoporin 93kDa	2.84	0.26	2.79
RBBP4	retinoblastoma binding protein 4	1.85	0.29	2.56
AMD1	S-adenosylmethionine decarboxylase 1 isoform 1 precursor	2.08	0.46	2.51
GOT2	aspartate aminotransferase 2 precursor	2.50	0.02	2.45

In silico endothelial-enriched ortholog genes (q-value <0.5) regulated more than 2-fold in at least 2 of 3 comparisons are shown (n=53). As expected, and consistent with active vascular network formation, numerous key angiogenic regulators were induced, such as TEK, CD34, SOX18, LMO2, PECAM1, NRP1, FLI1 and KDR (italicized). Also note induction of mitotic kinesins, KIF11 (encoding Eg5) and KIF20A (in bold). 317 probe sets with significant increase after VEGF-A stimulation in at least two out of three comparisons are shown in Supplemental Table S1.

individual CAMs was performed. 317 probes showed significantly increased expression (more than 2-fold in at least two out of three comparisons; Table S1). Fold-changes of significantly regulated genes in VEGF-A-stimulated CAMs replicates showed strong correlation (Spearman R ranging from 0.7 to 0.78, P<0.0001 in all comparisons: VEGF CAM 1 vs. VEGF CAM 2, VEGF CAM2 vs. VEGF CAM 3, VEGF CAM 1 vs. VEGF CAM 3; Fig. 1d).

An automated reciprocal blast search identified human orthologs of the 317 chick genes and an *in silico* prediction of endothelial vs. non-endothelial expression of these revealed those with expression enriched in endothelium [19, 25]. 206 human ortholog genes were identified and submitted to gene ontology (GO) using the DAVID interface (Table S2). Interestingly, GO terms associated with mitosis were highly significantly enriched (11.6-fold, FDR: 7.44x10⁻¹³). Another annotation cluster identified GO term “blood vessel development” (enrichment 5.5-fold, FDR 1.66x10⁻⁴). A total of 53 single genes with human orthologs and preferential endothelial expression (q-value >0.5) were identified (Table 1). This list contained numerous key angiogenic regulators with known endothelial expression indicating that relevant biological material was isolated for microarray analysis.

One of the genes with strong up-regulation and specific prediction of endothelial cell over-expression was KIF11 (coding for the Eg5 protein), a molecule that has not yet been studied in the context of angiogenesis. Up-regulation of a total of five kinesins by VEGF-A was confirmed by semi-quantitative qPCR and was 4.79 for KIF4A, 3.8 for KIF11, 6.25 for KIF15, 5.58 for KIF20A and 2.95 for KIF23 using HNRPH1 as normalizer because its expression did not differ between control and VEGF-treated CAMs (Supplemental Table S1, last line). Increased production of Eg5 protein was further confirmed *in vitro*, after stimulating HUVECs with VEGF₁₆₅ protein. Increase in Eg5 protein could be abolished by simultaneous application of the neutralizing anti-VEGF antibody Avastin (Fig. S1).

Kinesin expression and localization

We performed an *in silico* bioinformatic screen [25] on all genes encoding kinesins. Eight out of 38 kinesin transcripts showed enrichment in the endothelial EST pool more than two-fold, including the VEGF-A-induced kinesins KIF11, KIF15 and KIF20A (Table S3).

In freshly isolated human foreskin, Eg5 staining overlapped to a great extent with that of CD31, indicating that blood endothelial cells strongly express Eg5 protein (Fig. 2a). Lymphatic vessels identified by podoplanin immunoreactivity were also Eg5 positive (Fig. 2b).

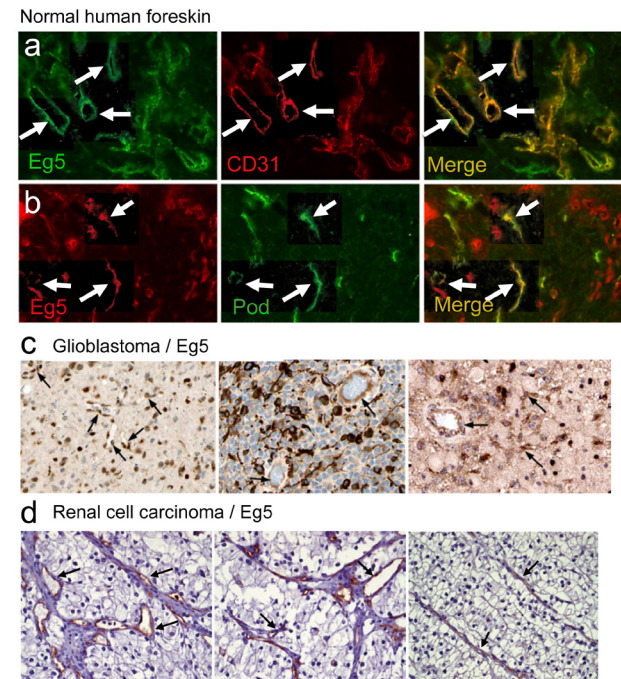


Figure 2: Eg5/KIF11 expression studies in normal and cancerous tissues. (a, b) Sections of human foreskin were double-stained with anti-Eg5 and either anti-CD31 or anti-podoplanin antibodies. CD31-positive blood capillaries were also positive for Eg5 (arrows). (b) Colocalisation of Eg5 and podoplanin was also observed in lymphatic vessels (arrows). (c) Immunohistological staining reveals also expression of Eg5 in tumor blood vessels in three different glioblastoma patients (arrows). (d) Strong vascular expression for Eg5 is also found in renal cell carcinoma patients (arrows).

Immunohistological analysis of human glioblastoma samples revealed staining of Eg5 in endothelial and tumor cells (Fig. 2c). In renal cell carcinoma, predominant staining was observed in capillaries (Fig. 2d). Mklp2/KIF20A protein showed an even stronger expression in endothelial cells in several normal tissues (heart, placenta, endometrium, oral mucosa; Fig. S4a-d) and glioblastoma vessels (Fig. S4e, f). KIF20A transcripts were found mostly in ECs in glioblastoma (n=4 patients, arrows; Fig. S4h), matching the vascular localization of CD31 (Fig. S4g). All five VEGF-induced kinesins are over expressed in a large number of human malignancies as evidenced by

Oncomine analysis (Fig. S2a). In small cell lung cancer, fibrosarcoma and glioblastoma, these kinesins are found up regulated, compared to normal tissue (Fig S2b-d). We further focused on KIF11 and KIF20A expression in glioblastoma and found general over-expression in this pathology in two additional studies (Fig S3, left graphs). When expression values were plotted individually per patient, a heterogeneous expression pattern was revealed with about one third of patients under-expressing KIF11 and KIF20A, whereas two-thirds of patients over-express both genes (Fig S3, right graphs).

To further shed light on the co-expression of the

Endothelial cells

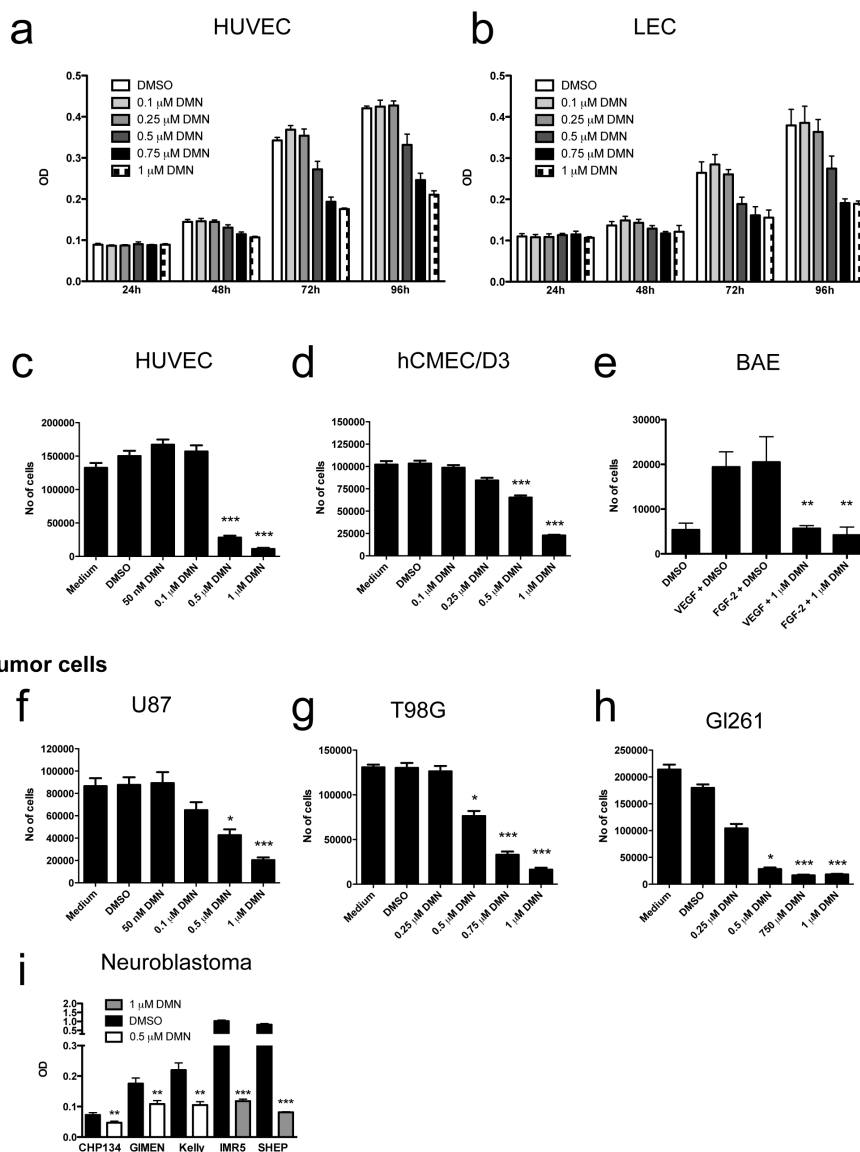


Figure 3: Chemical inhibition of Eg5 in normal and malignant cells. (a, b) Specific inhibition of Eg5 by dimethylenastron (DMN) leads to a dose-dependent blockade of cell proliferation in both, blood (HUVEC) and lymphatic endothelial cells (LEC). (c, d) Nearly complete inhibition is achieved in HUVECs and human brain endothelial cells (hCMEC/D3) after 72h at 1 μM (P<0.0001) in the presence of serum. (e) Eg5 inhibition blocks endothelial cell proliferation regardless the mitogen used for stimulation (FGF-2 or VEGF) in bovine aortic endothelial cells (BAE; P<0.005). (f-h) Human and murine glioma cell proliferation is inhibited with comparable efficacy. (i) Growth of five neuroblastoma cell lines is also significantly inhibited in the presence of 0.5 or 1 μM DMN.

five kinesins, we performed co-expression analysis using KIF11 gene as bait (Fig. S5a). Expression was low in normal brain, but elevated in anaplastic oligodendroglioma (French_brain study¹) and all five kinesins were highly

co-expressed (correlation from 0.903 for KIF4A to 0.872 for KIF15; black arrows). Similar co-expression could be evidenced in a glioblastoma study (Freje_brain study; Fig. S5b). Co-expression could be linked to other pathological features such as the vascularization state of a tumor, as evidenced in the Wurbach_liver study for hepatocellular

1 Oncomine nomenclature to identify original studies. Detailed reference can be found at www.oncomine.org.

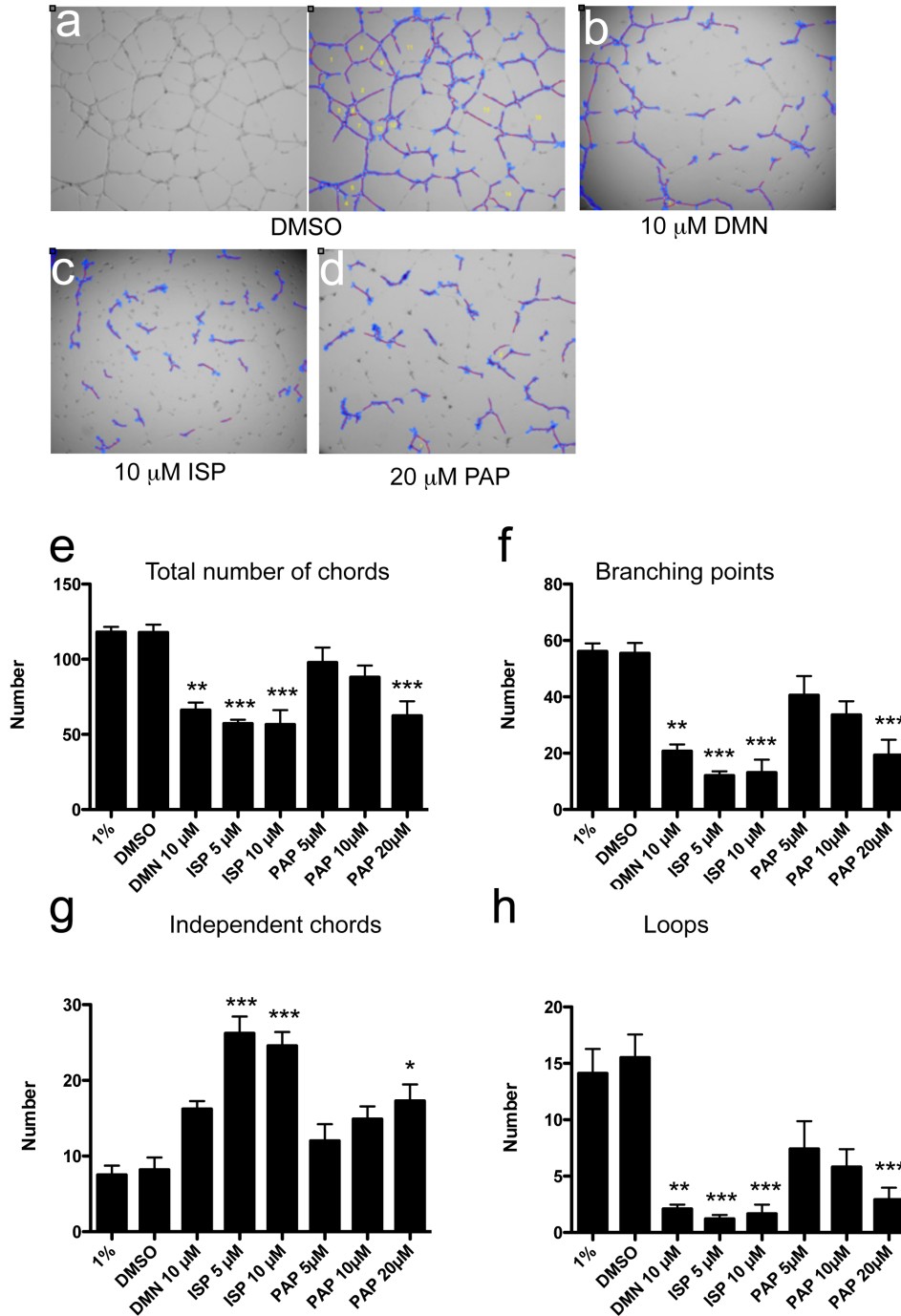


Figure 4: Inhibition of Eg5 or KIF20A protein function impairs *in vitro* angiogenesis in the absence of mitosis. (a-d) HUVECs grown on matrigel received indicated treatments. They were photographed at 4x magnification after 14h and morphologically annotated by the WIMASIS platform (ISP = Ispinesib; DMN = dimethylenastron; PAP = paprotrain; a) left image: unprocessed raw data, right image: automated annotation by WIMASIS). (e-h) Morphological parameters characteristic of *in vitro* angiogenesis are significantly reduced by chemical inhibition of Eg5 or Mklp2 protein.

carcinoma: KIF11, KIF4A and KIF15 were strongly co-expressed with KIF20A (>0.8 ; Fig. S6) and expression levels increased with the degree of vascularization and were highest in tumors with macroscopic vascular invasion.

We also used data provided by the BioGPS project [26] to compare KIF11 and KIF20A expression in 84 human tissues and cell lines. Only 8 cell lines had relative KIF11 mRNA levels higher than 20 (Fig. S7), highest levels were found in 721_B_lymphoblasts (274.8), followed by other lymphoblastic lines and CD105⁺ and CD34⁺ endothelial cells (167.95 and 64.75). Highly comparable data were found for KIF20A, relative expression values of KIF11 and KIF20A were highly correlated (Spearman $r=0.8492$, $P<0.0001$). These expression data point to a potential role of kinesins in the angiogenic process.

Eg5 blockade inhibits proliferation of endothelial cells and tumor cell lines

Growth of HUVECs and LECs was inhibited by dimethylnastron (DMN) in a dose- and time-dependent manner (Fig. 3a-c). Inhibition became evident after 72h of treatment with first effects at 0.5 μM and maximal effects at 1 μM . Significant growth inhibition at doses from 0.5 to 1 μM was also observed in the brain microcapillary endothelial cell line hCMEC/D3 (Fig. 3d), and bovine aortic endothelial cells (BAE) stimulated with VEGF-A or FGF-2 in reduced growth medium (Fig. 3e). Eg5 blockade at 1 μM led to complete growth inhibition after 72h, regardless of the type of mitogen used (Fig. 3i). Similar inhibition was observed in the human malignant glioma cell lines U87 and T98G (Fig. 3f, g), the murine glioma cell lines GL261 (Fig. 3h), and five different neuroblastoma cell lines (Fig. 3i).

KIF11/Eg5 and KIF20A/Mklp2 inhibition interferes with in vitro angiogenesis in the absence of mitosis

Strong perturbation of in vitro angiogenesis was observed after Eg5 blockade using two specific inhibitors, dimethylnastron (DMN; Fig. 4b) and ispinesib (ISP; Fig. 4c and Video 1), whereas solvent-treated cultures were not affected (Fig. 4a and Video 2). Inhibition was observed with ispinesib at both doses (5 and 10 μM). Number of vascular chords was reduced by 2-fold, branching points by nearly 90%, independent chords increased 3-times and number of loops was reduced by 90% (Fig. 4e-h). Less potent inhibition was observed with the Eg5 inhibitor DMN (Fig. 4e-h). Chemical blockade of Mklp2/KIF20A protein using paprotrain also inhibited chord formation (Fig. 4d), albeit at higher doses (20 μM) and to a lesser extent than the KIF11/Eg5 inhibitors (Fig. 4e-h). Mitosis

is a very rare event in our assay conditions (Fig. S8). These results demonstrate that kinesin inhibition affects biological processes relevant for angiogenesis, which are distinct from mitosis.

Kinesin inhibition affects endothelial cell adhesion, spreading and migration

Vascular chord formation requires cell adhesion and migration. Eg5 function is required for proper cell adhesion of HUVECs plated on different matrix proteins. Ispinesib-treated cells (5 μM) adhered poorly and detached after washing prior to Coomassie staining (Fig. S9a). Cells appeared more rounded and phalloidin staining revealed an altered organization of the actin cytoskeleton, with an appearance of cortical actin and strong reduction of stress fibers (Fig. S9b). Quantification of the number of spreading cells revealed a significant decrease after Eg5 blockade using ispinesib ($P<0.0001$, Fig. S9c). Endothelial cell migration was measured over an 18h time period. Migrating HUVECs in serum and DMSO control wounds covered around 90% of the denuded area (Fig. S10a, b), whereas Ispinesib-treated cultures were covered by 36% and paprotrain cultures only by 28% ($P<0.0001$; Fig S10c). A comparable result was obtained in a second series of experiments after siRNA-mediated knock-down of KIF11 in HUVECs. Wound closure after 20h of migration was reduced by 31% compared to control cultures ($P=0.0007$; Fig. S10d).

Vascular outgrowth in the mouse aortic ring assay is inhibited by kinesin blockade

We next tested effects of Eg5 and Mklp2 inhibition in an *ex vivo* angiogenesis model where spontaneous vascular growth occurs after incubation of aortic rings in matrigel [27]. After 8 days of treatment, vascular outgrowth around rings was significantly inhibited at ispinesib doses as low as 50nM ($P<0.0001$; Fig S11a, b), whereas paprotrain-mediated inhibition was effective only around 20 μM ($P<0.001$; Fig. S11a, c).

kif11/Eg5 is required for CAM development and physiological hematopoiesis and angiogenesis in zebrafish

DMN injection into the allantoic vesicle at Hamburger&Hamilton stage 21 (HH21) embryos completely inhibited expansion of the vesicle (HH24; Fig 5b, c). Only a rudimentary tissue mass with a primitive vascular network developed. This effect was consistent in all DMN-injected embryos, control embryos showed normal growth of the allantoic vesicle (arrows, Fig. 5a).

In normal zebrafish embryos, embryonic lethality

was only observed in the ISP treatment groups, ranging from 8% at 0.1 μ M, up to 18% at 1 μ M. Analysis of live embryos revealed changes in the morphology of the posterior blood islands (PBI) as well as a reduction of circulating blood cells (Fig. 5d). This phenotype did not occur in control embryos, but up to 15% of embryos displayed these modifications at 1 μ M ($P=0.0067$) and 3 μ M ISP ($P=0.0041$), suggesting that the developing

hematopoietic system is sensitive to Eg5 inhibition.

We therefore examined expression of *kif11* in 24hpf embryos; a time point where a transient wave of hematopoiesis takes place in the PBI and circulation begins [28]. A *fil1* probe visualized cellular components of the developing blood vascular system, including the PBI. The *kif11* probe labeled various cellular components of the embryo with different intensities; strong staining

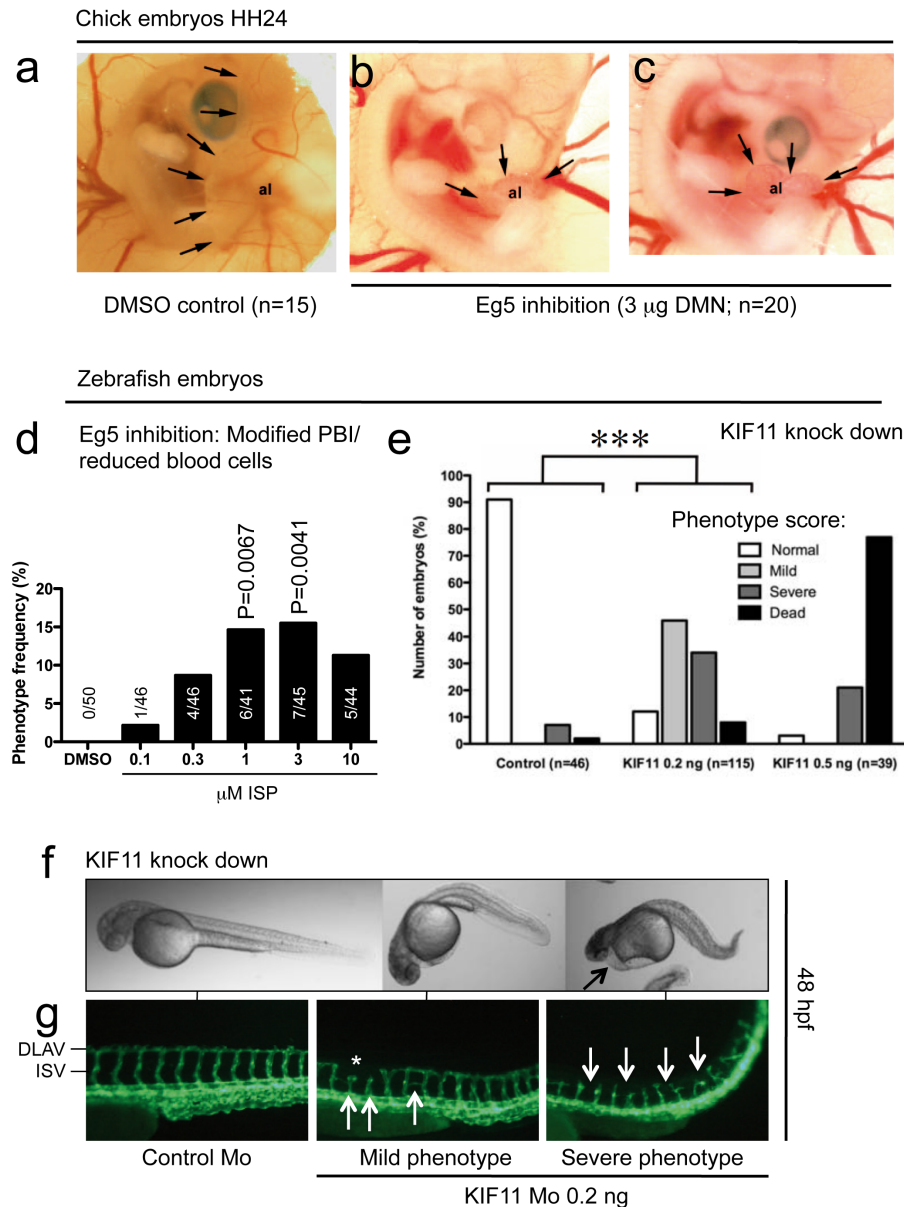
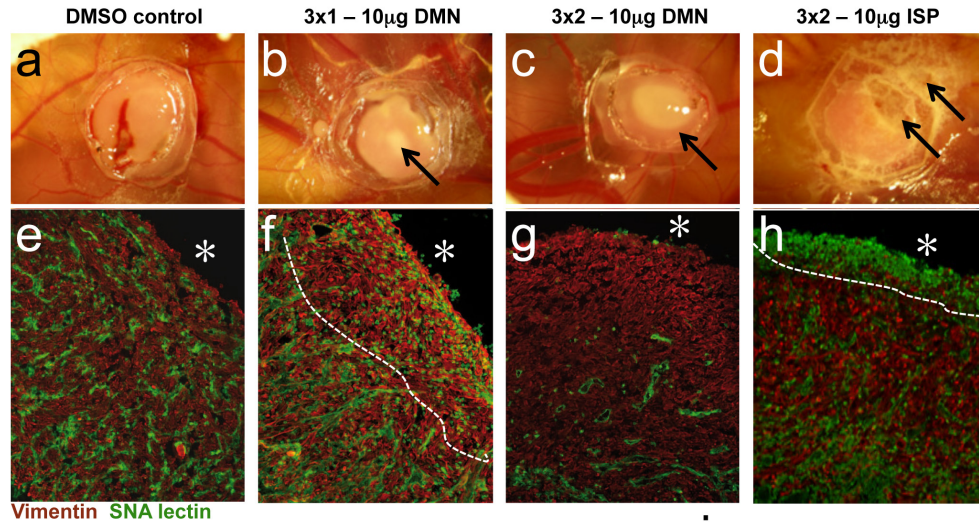


Figure 5: Effects of kinesin blockade in chick and zebrafish embryos. (a) Control chick embryos showed normal expansion of the allantoic vesicle (al) at day 4.5 (HH24). Arrows point to the border of the vesicle. (b, c) Eg5 inhibition leads to complete arrest of CAM development; only a rudimentary tissue with a primitive vascular network develops. (d) Blockade of Eg5 function using ispinesib (ISP) from 24 to 48 hpf leads to a significant increase of embryos with modification of the posterior blood islands (PBI) or reduction of blood cells at 1 and 3 μ M. (e) Phenotype-score of Tg(kdrl:EGFP)^{s843} embryos injected with indicated morpholinos (Mo) at 48 hpf. At doses higher than 0.5 ng, most embryos die and show severe edema and circulation defects. (e, f) At 0.2 ng, 46% of embryos displayed a mild phenotype with a curved and shortened tail and normal circulation, 34% had severe circulation defects, including pericardial edema (arrow), and 8% of embryos were dead (70x magnification). (g) Fluorescence micrographs of control and *kif11* morphants (115x magnification). Asterisk and arrows denote random vascular defects. DLAV = dorsal longitudinal anastomotic vessel, ISV = intersomitic vessels.

Experimental glioma model



RENCA model

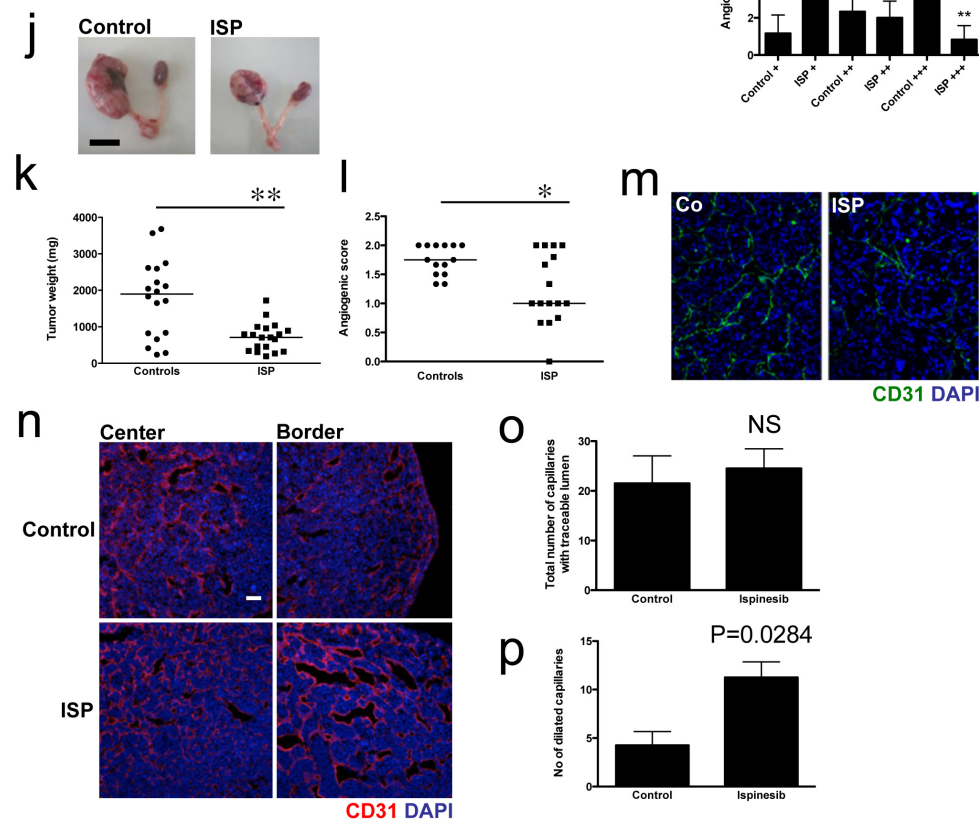


Figure 6: Eg5 inhibition reduces tumor angiogenesis in experimental tumor models. (a-d) U87-derived gliomas on the CAM were treated with indicated doses of Eg5 inhibitors. Biomicroscopy images were taken at day 4 of tumor development. Note visible induction of necrosis (arrows in b-d) at the tumor surface after Eg5 inhibition. (e-f) Immunohistological examination of experimental glioma. A dense vascular network occurred in control tumors, whereas Eg5 inhibition leads to reduced tumor angiogenesis underneath the tumor surface (asterisk), denoted by the dashed line (f), especially at two treatments of DMN (g) or ISP (h) per day. (i) A significantly higher number of poorly vascularized tumors (+) was within the ISP-treated group, whereas few tumors treated with ISP appeared highly vascularized (+++). (j) Ispinesib also reduced tumor size (representative tumors are shown); (k) weight ($P=0.0037$) and (l) vascular density ($P=0.0184$) in an orthotopic renal cell carcinoma model. (m). Short-term treatment (48h) with ispinesib lead to a significant increase of dilated capillaries ($P=0.0284$; n, p) whereas overall vascular density remained unchanged (NS; o).

was evident in the PBI and PCV (posterior cardinal vein), where a partial co-localisation with the *fli1* signal was observed (Fig. S12a).

Morpholino-mediated knock down of the *kif11* gene in the transgenic Tg(kdrl:EGFP)^{s843} line had severe effects on embryonic morphology and survival (Fig. 5e). Whereas almost all control morpholino embryos developed normally, the number of dead and affected embryos increased even at a morpholino dose of 0.2 ng ($P < 0.005$; 0.2 ng vs. controls). At 0.5 ng, effects were even more severe and 70% of embryos were dead. At the lower dose, embryos appeared curved and severe phenotypes had pericardial edema (Fig. 5f, arrow). Various morphological defects occurred in the developing vasculature, ranging from shortened inter-somitic vessel (ISV) sprouts (Fig. 5g; first two arrows), discontinuity of the dorsal longitudinal anastomotic vessel (DLAV) (asterisk, mild phenotype) and branching defects (third arrow). Embryos with severe phenotypes had complete absence of the DLAV and shortened and distorted ISV sprouts (arrows; more examples are shown in Fig. S12b).

These results – together with the high expression levels of KIF11 in hematopoietic and endothelial cells – suggest that Eg5/KIF11 might be a novel target for anti-angiogenic therapy in pathological settings.

Interfering with KIF11/Eg5 function reduces tumor angiogenesis

Experimental gliomas grown on the chicken CAM are accessible to topical treatment with chemical tyrosine kinase inhibitors such as imatinib mesylate or PTK787 [23]. During the three-day anti-Eg5 treatment period, no measurable tumor size reduction occurred. However, biomicroscopic observation of the tumors at day 4 showed increasing whitish areas at the tumor surface (Fig. 6a-d). These areas contain necrotic cells, as confirmed by subsequent histology (Fig. 6f-h). Immunohistological analysis of the tumors showed reduced numbers of angiogenic capillaries after treatment with a single dose of DMN per day (Fig. 6f). This effect was much stronger after two DMN doses; the tumors were almost completely devoid of blood vessels, whereas tumor cells apart from the necrotic areas appeared normal (Fig. 6g). Tumor cell morphology evidenced by vimentin staining was not altered by DMN treatment, even at the highest doses. Two treatments of ispinesib caused widespread destruction of cellular components of the tumor as evidenced by non-specific staining of dead cells for *sambucus nigra* agglutinin (SNA lectin), clearly visible below the surface (Fig. 6h). A significantly higher number of ispinesib-treated tumors were found in the poorly vascularized group ($P < 0.005$) and accordingly, only a small number of ispinesib-treated tumors were classified in the highly vascularized group ($P < 0.005$; Fig 6i).

In a murine tumor model, RENCA cells implanted orthotopically in kidneys give rise to highly aggressive and fast growing tumors with tumor weights of up to 4 g after a 3-weeks period (median 1.9 g; Fig. 6j, k). Twice-weekly treatment with ispinesib potently reduces tumor weight (median 708 mg; $P = 0.0037$) and tumor angiogenesis ($P = 0.0184$; Fig. 6l, m).

When established tumors were treated for 48h with ispinesib, no growth reduction or effect on vessel density was observed (Fig. 6n, o). However, tumor vessel in treated animals appeared more dilated and had a significantly higher number of dilated vessels (Fig 6p; $P = 0.0284$).

DISCUSSION

It is widely accepted that the secreted growth factor VEGF-A and its transmembrane receptors, are key regulators of embryonic and pathologic angiogenesis [2]. The angiogenic switch is a key event during tumor progression [1] and there has been much hope that anti-VEGF-A therapies may inhibit tumor growth significantly. In practice, anti-VEGF strategies have their limitations, due to a limited number of therapy responders, severe side effects of the VEGF-targeting antibody Avastin and raising concerns about the high costs of such treatment [3]. However, VEGF-A is a major proangiogenic factor *in vivo*, and therefore, it is of crucial importance to identify new druggable targets, which are associated with its downstream functions.

We chose the chick embryonic day-13 chorio-allantoic membrane (CAM), since human VEGF-A specifically induces angiogenesis in this tissue [4]. A global analysis of regulated angiogenesis genes *in vivo* is more reliable than *in vitro* transcriptome analysis of angiogenic endothelial cells, since major molecular differences have been found when endothelial cells are studied separated from their normal tissue context [29, 30].

Numerous genes up-regulated by VEGF-A have not yet been studied in the context of angiogenesis such as members of the kinesin family of motor proteins. We investigated the effects of kinesin inhibition on the angiogenic process *in vitro* and *in vivo*, focusing on Eg5/KIF11 and Mklp2/KIF20A.

Our bioinformatics analysis and immunostaining results of normal human foreskin (Fig. 2) show that KIF11/Eg5 is strongly expressed in blood and lymphatic vascular ECs. Human foreskin ECs also express VEGFR-2, a marker of angiogenic capillaries [31]. Only cells from the hematopoietic lineage (normal or neoplastic), together with CD34⁺ and CD105⁺ endothelial cells also displayed high levels of KIF11 and KIF20A kinesins (Fig. S7). An observation in line with these results is the strong expression of *kif11* in the posterior blood islands of zebrafish embryos. In addition, inhibition of Eg5 function

by ispinesib in this model leads to modification of this structure or reduced number of blood cells. In humans, neutropenia is a frequent side effect of anti-kinesin therapy [32], suggesting that Eg5 function is also required for generation and maintenance of immune cells.

Morpholino-mediated knock-down of *kif11* results in vascular pattern defects in the trunk vasculature (Figure 5 e-g, Fig. S12b). These results point to an important function of KIF11/Eg5 in the endothelial cell lineage.

Besides endothelial cell proliferation, other biological processes such as chord formation also require Eg5 and Mklp2. Recent insight from genetic studies further support the notion that KIF11 is required for development of normal retinal and lymphatic vessels, since KIF11 mutations cause autosomal-dominant microcephaly associated with lymphedema and/or chorioretinopathy [33].

Cell adhesion, spreading and migration that are critical for vascular chord formation are strongly perturbed by Eg5 and Mklp2 inhibition (Figs. S9, S10). We observed a modification of the cytoskeleton in cells treated with ispinesib, with an increase of cortical actin and strong reduction of stress fibers. These changes in the cytoskeleton are most likely responsible for the reduced migratory and adhesive capacity after Eg5 inhibition. Just recently, it has been shown that Eg5 also has a function in normal and malignant cell migration [14, 15]. There is evidence from the literature that DMN is highly specific for Eg5 kinesin, it binds to a region of the protein composed of loop 5, helix $\alpha 2$ and $\alpha 3$, which is not conserved in other kinesins [34, 35]. ISP, the second inhibitor we used ISP has been shown to be more than 70.000-times more selective for Eg5 than for other kinesins [36]. Further, siRNA-mediated knockdown of the KIF11 gene reduced cell migration comparable to chemical inhibition.

Interestingly, all five kinesins induced by VEGF-A are also present in the highly significant 67-gene signature termed CINSARC (complexity index in sarcomas), which is associated with poor clinical outcome in several cancer types [37]. It is tempting to speculate that VEGF-A-induced kinesins contributes to bad prognosis in human cancers or reflects the state of an activated tumor endothelium. Significant co-expression of these five kinesins has also been evidenced by bioinformatic analysis in various malignant tumors, especially in brain tumors (Fig. S5). In hepatocellular carcinoma (HCC), increasing kinesin (co-) expression is furthermore associated with the vascular status of the tumors (Fig. S6). Another group has just recently confirmed overexpression of KIF20A in HCC [38].

As expected, Eg5 inhibition stops glioblastoma cell growth [39]. Eg5 inhibitors not only block proliferation of adult tumor cell lines, but also those derived from childhood tumors. In the progressed stage 4 neuroblastoma, the 5-year survival rate is only 20 – 30%

[40] and high vascular density is characteristic for the progressed neuroblastomas [41]. Further studies should investigate the efficacy of anti-kinesin treatment in this kind of malignancy.

In the light of our *in vitro* results on Eg5/KIF11 inhibition of endothelial cells, it can be expected that Eg5 inhibition might have a dual effect as it affects both malignant cells and tumor vasculature. Inhibition of tumor angiogenesis in the short-term experimental glioma model [23] was the predominant effect observed, suggesting that the endothelium constitutes an important target for this inhibitor.

Oncomine expression data show that KIF11 transcripts are not overexpressed in kidney cancer, however, we have found Eg5 protein expression in capillaries of RCC and just recently, Eg5 immunoreactivity has been evidenced in a large study using 164 patient RCC tumors, with higher expression predicting poor disease outcome [42]. Eg5 inhibition significantly reduces experimental kidney cancer growth and angiogenesis. Short-term anti-Eg5 treatment did not alter tumor vessel density or led to regression of vessels, but changed vascular morphology. Tumor capillaries were significantly more dilated in the treatment group, suggesting a vascular remodelisation effect of ispinesib. Even though classical anti-VEGF agents generally causes vascular “normalization” including reduction of vessel diameter [43], dilatation of tumor capillaries after different anti-angiogenic treatments has recently described in animal models as well in human tumors [44, 45]. Different treatment durations and drug combinations may account for these differences; however, our results show that the tumor vasculature is affected by Eg5 inhibition.

This may open up new therapeutic perspectives such as targeting kinesin inhibitors to the tumor endothelium and stroma [46] to enhance the therapeutic efficacy.

Furthermore, combination of small-molecule Eg5 inhibitors with anti-angiogenic agents may reduce side effects or increase the number of responders to anti-angiogenesis treatment. Eg5 blockade not only inhibits VEGF-A-induced cell proliferation, but also FGF-2 stimulated proliferation and thus has a more broad-range effect than specific VEGF inhibitors (Fig. 3e). It is therefore tempting to speculate that Eg5 inhibition might render endothelial cells refractory to growth stimuli secreted by tumor cells, thereby maintaining a potent anti-angiogenic environment.

Even though single anti-angiogenic treatment works well in animal models, combination with standard chemotherapy is needed for most tumor types to obtain results in patients. A special emphasis should be given to the fact that cells from the hematopoietic lineage overexpress Eg5 (and Mklp2). Patients suffering from these highly proliferative malignancies might benefit from kinesin inhibition due to its dual anti-proliferative and anti-angiogenic effect. Since a frequent side effect

of Eg5 inhibitors is neutropenia, efforts should be made to develop specific cell and tumor targeting kinesin-inhibition strategies to enhance their efficacy.

Evidence is emerging that over expression of KIF4A and KIF18A may play roles in tumor progression [47, 48]. Furthermore, knock-down of the KIF23 gene has been shown to abrogate glioma cell proliferation and tumor growth in vivo [49]. This opens the perspective that other kinesins may serve as druggable targets for anti-cancer therapy.

Taken together, our results provide evidence that kinesins, which lay downstream of angiogenic growth factors signaling, mediate essential processes important for physiological and pathological vascular growth and may constitute a potential therapeutic target for anti-vascular tumor therapy.

MATERIAL AND METHODS

Detailed protocols are in the supplemental data section.

Identification of genes regulated by VEGF-A on the CAM

Chick embryos were handled as described [18]. RNA was extracted from three CAMs treated each with 3 μ g of recombinant human VEGF-A and compared individually to pooled equivalent quantities of RNA from three normal CAMs. Affymetrix chicken microarrays were processed as published [19]. Bioinformatic analyses of kinesin expression are detailed in the supplemental data section.

Semi-quantitative PCR

To verify microarray data, semi-quantitative PCR was performed on the same material used for microarray hybridization using efficient primers against VEGFR1, VEGFR2, KIF4A, KIF11, KIF15, KIF20A and KIF23, normalized to HNRPH1, which shows no changes during normal CAM development [19] and which is not induced by VEGF (Supplemental Table S1, last line).

Chemical inhibitors

Indirubin-3'-monoxime (IRO, CDK/GSK-3 β inhibitor) [20] was purchased from Sigma, dimethylenastron (DMN, Eg5 inhibitor) was from Sigma or Chemstep Molexplorer (Martillac, France), ispinesib mesylate (ISP, Eg5 inhibitor) was from Selleck Chemicals (Houston, Tx, USA). (Z)-2-(1H-indol-3-yl)-3-(pyridin-3-yl)acrylonitrile (paprotrain = PAssenger PROteins TRANsport INhibitor, MKLP2 inhibitor) [21] was

synthesized by Chemstep Molexplorer.

Cell culture and proliferation assays

Vascular endothelial cells (HUVECs, BAEs, hCMEC/D3 and tumor cell lines (U87, T98G, GL261, CHP134, GIMEN, Kelly, IMR5 and SHEP) were cultured using routine cell culture conditions.

Endothelial cell adhesion, spreading, migration and tubulogenesis assays

These assays were performed with HUVECs using standard protocols (see supplemental methods).

Mouse aortic ring assays

Vascular outgrowth in this assay was evaluated using freshly isolated mouse aortic ring fragments (for details see supplemental methods).

Chemical inhibition of Eg5 in chick embryos

Chick embryos were injected with 3 μ l of dimethylenastron (1 μ g/ μ l) at Hamburger & Hamilton (HH) stage 21 (3.5 days) into the allantoic vesicle (n=20 embryos). Control embryos (n=15) received equal volume of solvent (DMSO). Embryos were examined under a biomicroscope the following day at stage HH24.

Zebrafish experiments

All zebrafish experiments were carried out using standard procedures (described in supplemental material and methods). In brief, Tg(kdrl:EGFP)^{s843} embryos [22] were microinjected at the 1-2 cell stage with 0.2-1 ng *kif11* morpholino (MO) (CTGGTACTTGATGATGCCATGTT; Gene Tools, USA) or standard control MO (CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA; Gene Tools, USA). Higher *kif11* MO doses were lethal and did not allow further analysis. At 48 hours post-fertilization (hpf), embryos were phenotype-scored and photographed. For chemical Eg5 inhibition, normal zebrafish embryos were treated with indicated doses of ispinesib at 24 hpf and phenotype-scored at 48 hpf.

Experimental tumor models

U87 glioma cells were implanted on the CAM as described [23] and treated once or twice daily with DMN or ISP, at indicated doses. Control tumors received solvent

(DMSO). Tumors were photographed *in vivo* and blind-scored by seven investigators familiar with the model for degree of vascularization [24], and processed for histology. The orthotopic renal carcinoma model is detailed in the supplemental data section.

Histology, immunohistology and fluorescence in situ hybridization

Unfixed human foreskin from healthy donors was used for Eg5 (polyclonal rabbit anti-human, Abcam ab37009) co-localization studies with lymphatic (mouse-anti-human podoplanin, ReliaTech, Germany) and vascular endothelium (mouse anti human CD31; BD clone WM59). For analysis of experimental glioma, anti-vimentin (clone V9, Neomarkers) was used. Chick blood vessels were stained with *sambucus nigra* lectin (SNA, Vector Labs), and nuclei counterstained with DAPI. For *in situ* hybridization, fluorescent zebrafish probes *kif11* and *fil1* were used on whole embryos. Human tumor sections were analyzed for Eg5 expression by standard immunohistochemistry (www.proteinatlas.org) and for KIF20A expression using QuantiViewRNA hybridization (Panomics-Affymetrix), details are in the supplemental methods section.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the ANR (grant no. JCJC06060 to M.H.), ARC (grant no 1062 and SFI20111203975 to M.H.) and La Ligue Régionale Contre le Cancer, Comité Aquitaine-Charentes (to S.J.). N.P. was a postdoctoral fellowship recipient from INSERM. P.E. was supported by a grant from the Aquitaine region / INSERM and ARC (Association de la Recherche contre le Cancer). The University Hospital Bordeaux and Cancéropôle Grand Sud-Ouest tumor bank provided glioblastoma tumor samples for immunostaining.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS AND DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

P.E. performed most in vitro assays, tumor xenograft assays (together with R.P.) and histological analysis. S.J., M.H., M.W., O.N. and S.O. performed the zebrafish experiments. B.W. and J.B. and J.W. performed in vitro proliferation studies, immunohistological stainings and *in vivo* experiments in chick embryos. N.Pu. performed RENCA tumor experiments, immunostainings and confocal image acquisition. M.H., N.Pl. and S.J. realized VEGF-induction experiments on the CAM. M.H., S.J. and J.H. carried out bioinformatics analysis including microarrays. V.G. and S.J. performed in-situ hybridization and expression studies. Dr Patrick Auguste (Univ

Bordeaux 1) performed RENCA tumor angiogenesis quantification. N.Pl. and M.F. performed quantitative real time-PCR and molecular cloning experiments. M.H. and J.W. designed the experiments and M.H. wrote the paper. All authors read and discussed the paper. The authors declare no conflicts of interests.

REFERENCE

1. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1):57-70.
2. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*. 1999; 13(1):9-22.
3. Tanne JH. FDA cancels approval for bevacizumab in advanced breast cancer. *BMJ*. 2011; 343:d7684.
4. Wilting J, Christ B and Weich HA. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB. *Anatomy and embryology*. 1992; 186(3):251-257.
5. Sarli V and Giannis A. Inhibitors of mitotic kinesins: next-generation antimetotics. *ChemMedChem*. 2006; 1(3):293-298.
6. Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger AK, Drechsel D, Fischer S, Konstantinova I, Habermann B, Grabner H, Yaspo ML, Himmelbauer H, Korn B, Neugebauer K, Pisabarro MT and Buchholz F. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature*. 2004; 432(7020):1036-1040.
7. Castillo A and Justice MJ. The kinesin related motor protein, Eg5, is essential for maintenance of pre-implantation embryogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007; 357(3):694-699.
8. Chauviere M, Kress C and Kress M. Disruption of the mitotic kinesin Eg5 gene (*Kns11*) results in early embryonic lethality. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008; 372(4):513-519.
9. Hill E, Clarke M and Barr FA. The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J*. 2000; 19(21):5711-5719.
10. Sakowicz R, Finer JT, Beraud C, Crompton A, Lewis E, Fritsch A, Lee Y, Mak J, Moody R, Turincio R, Chabala JC, Gonzales P, Roth S, Weitman S and Wood KW. Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer research*. 2004; 64(9):3276-3280.
11. Basso AD, Liu M, Dai C, Gray K, Nale L, Tevar S, Lee S, Liang L, Ponery A, Yaremko B, Smith E, Tang H, Sheth PR, Siddiqui MA, Hicklin DJ and Kirschmeier P. SCH 2047069, a novel oral kinesin spindle protein inhibitor, shows single-agent antitumor activity and enhances the efficacy of chemotherapeutics. *Molecular cancer therapeutics*. 2010; 9(11):2993-3002.
12. Rath O and Kozielski F. Kinesins and cancer. *Nat Rev*

- Cancer. 2012; 12(8):527-539.
13. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H and Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 2003; 22(47):7280-7295.
 14. Falnikar A, Tole S and Baas PW. Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration. *Molecular biology of the cell*. 2011.
 15. Sun XD, Shi XJ, Sun XO, Luo YG, Wu XJ, Yao CF, Yu HY, Li DW, Liu M and Zhou J. Dimethylenastron suppresses human pancreatic cancer cell migration and invasion in vitro via allosteric inhibition of mitotic kinesin Eg5. *Acta pharmacologica Sinica*. 2011; 32(12):1543-1548.
 16. Bartoli KM, Jakovljevic J, Woolford JL, Jr. and Saunders WS. Kinesin Molecular Motor Eg5 Functions during Polypeptide Synthesis. *Molecular biology of the cell*. 2011.
 17. Midorikawa R, Takei Y and Hirokawa N. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell*. 2006; 125(2):371-383.
 18. Hagedorn M, Balke M, Schmidt A, Bloch W, Kurz H, Javerzat S, Rousseau B, Wilting J and Bikfalvi A. VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis. *Dev Dyn*. 2004; 230(1):23-33.
 19. Javerzat S, Franco M, Herbert J, Platonova N, Peille AL, Pantesco V, De Vos J, Assou S, Bicknell R, Bikfalvi A and Hagedorn M. Correlating global gene regulation to angiogenesis in the developing chick extra-embryonic vascular system. *PLoS One*. 2009; 4(11):e7856.
 20. Tran TC, Sneed B, Haider J, Blavo D, White A, Aiyekorun T, Baranowski TC, Rubinstein AL, Doan TN, Dingleline R and Sandberg EM. Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer research*. 2007; 67(23):11386-11392.
 21. Tcherniuk S, Skoufias DA, Labriere C, Rath O, Gueritte F, Guillou C and Kozielski F. Relocation of Aurora B and survivin from centromeres to the central spindle impaired by a kinesin-specific MKLP-2 inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010; 49(44):8228-8231.
 22. Jin SW, Beis D, Mitchell T, Chen JN and Stainier DY. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*. 2005; 132(23):5199-5209.
 23. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A and Bikfalvi A. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(5):1643-1648.
 24. Auf G, Jabouille A, Guerit S, Pineau R, Delugin M, Bouche-careilh M, Magnin N, Favereaux A, Maitre M, Gaiser T, von Deimling A, Czabanka M, Vajkoczy P, Chevet E, Bikfalvi A and Moenner M. Inositol-requiring enzyme I α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(35):15553-15558.
 25. Herbert JM, Stekel D, Sanderson S, Heath VL and Bicknell R. A novel method of differential gene expression analysis using multiple cDNA libraries applied to the identification of tumour endothelial genes. *BMC Genomics*. 2008; 9:153.
 26. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, Hodge CL, Haase J, Janes J, Huss JW, 3rd and Su AI. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome biology*. 2009; 10(11):R130.
 27. Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, Jones DT, Vojnovic B and Hodivala-Dilke K. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature protocols*. 2012; 7(1):89-104.
 28. Chen AT and Zon LI. Zebrafish blood stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2009; 108(1):35-42.
 29. Wick N, Saharinen P, Saharinen J, Gurnhofer E, Steiner CW, Raab I, Stokic D, Giovanoli P, Buchsbaum S, Burchard A, Thurner S, Alitalo K and Kerjaschki D. Transcriptomal comparison of human dermal lymphatic endothelial cells ex vivo and in vitro. *Physiol Genomics*. 2007; 28(2):179-192.
 30. Amatschek S, Kriehuber E, Bauer W, Reininger B, Meraner P, Wolpl A, Schweifer N, Haslinger C, Stingl G and Maurer D. Blood and lymphatic endothelial cell-specific differentiation programs are stringently controlled by the tissue environment. *Blood*. 2007; 109(11):4777-4785.
 31. Pavlakovic H, Becker J, Albuquerque R, Wilting J and Ambati J. Soluble VEGFR-2: an antilymphangiogenic variant of VEGF receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1207 Suppl 1:E7-15.
 32. Holen KD, Belani CP, Wilding G, Ramalingam S, Volkman JL, Ramanathan RK, Vasist LS, Bowen CJ, Hodge JP, Dar MM and Ho PT. A first in human study of SB-743921, a kinesin spindle protein inhibitor, to determine pharmacokinetics, biologic effects and establish a recommended phase II dose. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011; 67(2):447-454.
 33. Ostergaard P, Simpson MA, Mendola A, Vasudevan P, Connell FC, van Impel A, Moore AT, Loeys BL, Ghalamkarpour A, Onoufriadis A, Martinez-Corral I, Devery S, Leroy JG, van Laer L, Singer A, Bialer MG, et al. Mutations in KIF11 cause autosomal-dominant microcephaly variably associated with congenital lymphedema and chorioretinopathy. *American journal of human genetics*. 2012; 90(2):356-362.
 34. Maliga Z and Mitchison TJ. Small-molecule and mutational analysis of allosteric Eg5 inhibition by monastrol. *BMC chemical biology*. 2006; 6:2.
 35. Kaan HY, Ulaganathan V, Rath O, Prokopcova H, Dallinger D, Kappe CO and Kozielski F. Structural basis for inhibition of Eg5 by dihydropyrimidines: stereoselectivity of antimitotic inhibitors enastron, dimethylenastron and fluorastrol. *J Med Chem*. 2010; 53(15):5676-5683.

36. Jackson JR, Gilmartin A, Dhanak D, Knight S, Luo L, Sutton D, Caulder E, Diamond M, Giardiniere M, Zhang S, Huang P, Bergnes G, McDonald A, Lee Y, Sakowicz R and Wood KW. (2006). A second generation KSP inhibitor, SB-743921, is a highly potent and effective therapeutic in preclinical models of cancer. First AACR International Conference on Molecular Diagnostics in Cancer Therapeutic Development (<http://aacrmeetingabstracts.org/cgi/content/abstract/2006/2/B11>): American Association for Cancer Research).
37. Chibon F, Lagarde P, Salas S, Perot G, Brouste V, Tirode F, Lucchesi C, de Reynies A, Kauffmann A, Bui B, Terrier P, Bonvalot S, Le Cesne A, Vince-Ranchere D, Blay JY, Collin F, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nature medicine*. 2010; 16(7):781-787.
38. Gasnereau I, Boissan M, Margall-Ducos G, Couchy G, Wendum D, Bourgain-Guglielmetti F, Desdouets C, Lacombe ML, Zucman-Rossi J and Sobczak-Thepot J. KIF20A and Its Gene Product MKlp2 Are Increased During Hepatocyte Proliferation and Hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*. 2011.
39. Muller C, Gross D, Sarli V, Gartner M, Giannis A, Bernhardt G and Buschauer A. Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of monastrol analogues against human glioblastoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2007; 59(2):157-164.
40. Park JR, Eggert A and Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatric clinics of North America*. 2008; 55(1):97-120, x.
41. Rössler J, Taylor M, Geoerger B, Farace F, Lagodny J, Peschka-Suss R, Niemeyer CM and Vassal G. Angiogenesis as a target in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2008; 44(12):1645-1656.
42. Sun D, Lu J, Ding K, Bi D, Niu Z, Cao Q, Zhang J and Ding S. The expression of Eg5 predicts a poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Med Oncol*. 2013; 30(1):476.
43. Ellis LM and Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(8):579-591.
44. Weisshardt P, Trarbach T, Durig J, Paul A, Reis H, Tilki D, Miroschnik I, Ergun S and Klein D. Tumor vessel stabilization and remodeling by anti-angiogenic therapy with bevacizumab. *Histochemistry and cell biology*. 2012; 137(3):391-401.
45. Zhang Q, Bindokas V, Shen J, Fan H, Hoffman RM and Xing HR. Time-course imaging of therapeutic functional tumor vascular normalization by antiangiogenic agents. *Molecular cancer therapeutics*. 2011; 10(7):1173-1184.
46. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR and Ruoslahti E. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*. 2010; 328(5981):1031-1035.
47. Zhang C, Zhu C, Chen H, Li L, Guo L, Jiang W and Lu SH. Kif18A is involved in human breast carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010.
48. Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y and Daigo Y. Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(22 Pt 1):6624-6631.
49. Takahashi S, Fusaki N, Ohta S, Iwahori Y, Iizuka Y, Inagawa K, Kawakami Y, Yoshida K and Toda M. Downregulation of KIF23 suppresses glioma proliferation. *Journal of neuro-oncology*. 2011.

Supplemental Methods

Molecular biology experiments

Microarray hybridization

Microarray experiments were carried out using standard Affymetrix protocols. To identify genes, which were regulated by VEGF-A with reasonable reproducibility, we applied the following selection criteria: a gene had to be regulated in at least two of the three comparisons more than 2-times and had to be found “present” in the VEGF-A group (if up-regulated by VEGF-A). 317 probe sets detected up regulated transcripts by VEGF-A using these criteria. Within this group were 80 probes, which were regulated more than 2-times in all three comparisons. To evidence consistency of VEGF-A-induced gene expression between the three different biological replicas compared to pooled control CAMs, we performed Spearman correlation analysis after log-transformation of fold-change expression. Original data sets are deposited at GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with following identifiers: GSM364860, GSM364862, GSM364863, GSM364864.

Bioinformatic analysis of microarray data

To extract biological themes associated with VEGF-A-induced genes, we used Gene Ontology through the DAVID interface (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [1, 2].

To focus on human ortholog genes with preferential expression in the endothelium, we analyzed the 317 genes by a recently developed, validated approach [3, 4]. In brief, genes were submitted to an automated BLAST pipeline to assign orthologs. Only orthologs were

then compared to endothelial and non-endothelial expressed sequence tags (ESTs) pools, followed by FDR-based statistics. The ratio of the number of corresponding ESTs gives an estimate of EC or non-EC specificity. In a similar manner, all kinesins identifiable by a KIFxx gene symbol were analyzed by this method and EC or non-EC enrichment was assigned. For expression and co-regulation studies in human tumors, Oncomine™ (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI) was used for analysis and visualization. Data of the following studies were included in our analysis: Hou_Lung, Detwiller_sarcoma, Sun_brain, Murat_brain, TCGA_brain, French_brain, Freje_brain and Wurmbach_liver (Identification of datasets: Oncomine nomenclature, references about each study are on <http://oncomine.com>).

Real-time RT-PCR (microarray verification)

mRNA used for microarray hybridization was used to verify fold-changes of indicated genes. 10 μ l SYBR Green (ABGene) were mixed with 6 μ l ddH₂O and 2 μ l primers and 2 μ l cDNA diluted 1/5th. 42 cycles were run on a Stragene thermocycler. Fold-change was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct-method. Validated chick-specific primer sequences were as followed:

KIF4A	F	AGGGTGGTTTTGTCCCCTAC
	R	GGGCTTACACAGGCAATCAT
KIF11	F	GGAACAACCTGAGGCAGAAGC
	R	AGCAGGTCCTCATCTGCATT
KIF15	F	TATCGGGATTCCAAGCTCAC
	R	TGGATCCTGGATGGACATTT
KIF20A	F	CAGCCAATTTACCAGCCATT
	R	CTCCTGTGGTGCTGAGTGAA
KIF23	F	CAACGTCAGGCTTCTGACAA
	R	CAGCTGCTTTGCTGCTACAC
HNRPH1	F	GATTCGGTCTTGGTGTTCG
	R	TAACTCGTGGCAGACACAGC

KIF11 siRNA knock down

HUVECs (20.000 cellules/100 μ L) were seeded in 96-well plates (Essen Bioscience). After 5h they were transfected overnight with 50nM of siRNA KIF11 (Reference HSS105842, Fisher Scientific, Illkirch) or non-target siRNA using RNAimax as indicated by the manufacturer. Transfection medium was replaced by 1% normal medium and the scratch wound assay was performed as described below in the cell culture section. Migration data after 20h from 4 independent experiments were pooled and efficacy of siRNA KIF11 vs non-target siRNA was evaluated using Mann-Whitneys U-test.

Cell culture experiments

Cell cultures

hCMEC/D3 cells [5] were a kind gift of Dr. P. O. Couraud (Institut Cochin, Paris) and cultured as described [3]. HUVECs were purchased (Promocell) and cultured as indicated by the manufacturer or isolated freshly from healthy donors using standard protocols. LECs were isolated from 2 healthy donors according to a published protocol [6]. Tumor cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Cergy Pointoise Cedex, France) with 10% fetal bovine serum, antibiotics and L-glutamine.

Proliferation assays (time course)

Cells (HUVECs, LECs and fibroblasts) were harvested, re-suspended in culture medium to a concentration of 10^4 cells/100 μ l and seeded into wells of 96-well culture plates (100 μ l/per

well). Neuroblastoma cell-lines (IMR5, SHEP, SKIN, Chp134, Gimen, Kelly) were used in a concentration of 5×10^3 cells/200 μ l. For each condition and time point, 6-8 replicate wells were measured. At indicated time points, cells were fixed with 5% glutaraldehyde. After incubation for 20 minutes, the glutaraldehyde-containing medium was removed and plates were washed twice with deionized water. The plates were allowed to dry and 100 μ l crystal violet solution (0.1% in deionized water) was added to each well. After 20 minutes, the dye was removed; the plates were washed thrice with deionized water and dried again. The dye was resolved in 100 μ l of 10% acetic acid and absorption at 570 nm was determined using a micro plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Proliferation assays (at 72h)

Cells were seeded after 6 h serum starvation in 500 μ l full culture medium at indicated densities in 24-well cell culture flasks (LEC: 2.5×10^4 , HUAEC: 2.5×10^4 , HUVEC: 2×10^4 , hCMEC/D3: 2×10^4 , BAE: 2×10^4 , U87: 1.5×10^4 , T98G: 1×10^4 , GI261: 7.5×10^3). Cells were treated with inhibitor at indicated doses and after 72h, cells were trypsinized and counted on a Beckman Coulter counter. DMSO at the highest inhibitor concentration served as control treatment.

Adhesion assays

HUVEC were pre-treated for 14h with solvent or Eg5 or Mklp2 inhibitors at indicated concentrations. 8000 HUVECs were seeded on 96-well culture dishes coated with indicated ECM proteins: collagen (100 μ g/ml BD Biosciences), fibronectin (0.5 μ g/ml, Sigma), laminin (5 μ g/ml, Sigma) and vitronectin (0.5 μ g/ml, Sigma). One hour later, cells were washed,

stained with Coomassie Blue and photographed at 20x magnification. Statistical analysis of the percentage of normally spread cells was done using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

Scratch wound assay

HUVECs (2.5×10^4 cells/well) were seeded in 96-well plates (Essen Imagelock™; essenbioscience.com) coated with collagen (BD Biosciences) and allowed to adhere for 6 hours. Confluent cells were starved overnight in Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg, Germany) without growth factors and serum. The 96-pin WoundMaker (Essen) was used to create simultaneously precise and reproducible wounds in all wells. Non-adherent cells are removed with reduced medium. HUVEC were treated with inhibitors at indicated concentrations and the plate was placed in IncuCyte™. Wound images were acquired automatically at 2 hours intervals. Statistical analysis of the wound closure area was performed at the 18h time point using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

In vitro angiogenesis

4000 HUVECs were placed in μ -slide angiogenesis tissue culture plates coated with growth factor-reduced Matrigel (Ibidi, Biovalley, France) and covered with medium containing solvent or different inhibitors. After 14h, photos were taken at 4-fold magnification using an inverted light microscope. Digital images were uploaded to the WIMASIS image analysis platform and analyzed in an automated fashion (<http://wimasis.com>). The parameters “number of chords”, “number of loops”, “isolated chords” and “branching points” were determined from two independent experiments and compared using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. For videomicroscopy, cultures were placed at controlled cell culture

conditions under a motorized Nikon Ti-E Inverted MEA53100 Microscope coupled to a Hamamatsu ORCA-R2 camera and photos were taken every ten minutes over a 14h time period. Indirubin-3'-monoxime (IRO) [7], which has been shown to inhibit angiogenesis in zebrafish embryos as well as tube formation, was used as positive control for evaluating the results with the automated blinded WIMASIS tube formation analysis platform. IRO treatment significantly reduced the number of branching points (45.4% of controls, $P=0.0003$), increased the number of independent (fragmented) chords (215.2% over controls, $P=0.0004$) and reduced loop formation (30.9% of controls, $P=0.0077$).

Mouse aortic ring assays

C57Bl6 mice were sacrificed by cervical dislocation. Aortas were isolated and transferred to petri dishes containing complete endothelial basal medium (EBM2, Promocell) with antibiotics. Connective tissue and fat tissue surrounding the vessel was carefully omitted and rings were cut using a scalpel. Rings were placed in 48-well dishes, covered with growth factor-reduced matrigel (BD Bioscience) and after polymerization at 37°C, 300µl EBM2 medium were added per well. Medium with drugs is replaced every two days, starting from the third day of incubation. Photos were taking using a macroscope (Nikon AZ 100M) and vascular outgrowth area was quantified using Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Statistical analysis of treated vs. control cultures were performed at the 8th day after first treatment.

Histology, in situ hybridizations and Western Blots

Immunofluorescence (cell spreading assay)

HUVECs are seeded for 1h on coverslips coated with 100 μ g/ml of collagen (BD Biosciences). After rinsing with PBS fixation with PAF 4% they were permeabilized with PBS-triton, blocked with BSA and incubated with mouse monoclonal anti α -tubulin (1:1000, Sigma T5168) for 2h at room temperature. Cells are rinsed and incubated with goat anti mouse antibody coupled with Alexa 488 (Molecular Probes), phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate conjugate (1:1000, P1951 Sigma) and counterstained with DAPI (Invitrogen).

Immunofluorescence (in vitro angiogenesis assays)

In vitro angiogenesis cultures are directly fixed by adding 10 μ L of PAF 4% to each well and rinsed with PBS. Cell nuclei are stained with DAPI and cultures are mounted in fluoromounting medium (Electron Microscopy Science). For assessment of cell proliferation during tubulogenesis, HUVEC are treated for 14h with BrdU (Invitrogen) at 1 μ M and seeded on reduced matrigel. BrDu incorporation is revealed with a FITC-coupled monoclonal anti-BrdU antibody (Becton Dickinson) and cultures are mounted as described above.

Immunofluorescence (human foreskin)

Foreskin of 2 – 3 year-old boys (3 specimens) were taken directly from the operating room. Specimens were rinsed in PBS, incubated in 15% and 30% sucrose and embedded in tissue freeze medium (Neg50; Richard-Allan Scientific, US) without any fixation. Cryosections of 16 - 20 μ m thickness were prepared. Non-specific binding of antibodies was blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) for 10 min. Primary antibodies were rabbit-anti-human CD31

(1:100; Abcam, Cambridge, UK), mouse-anti-human podoplanin (1:100; ReliaTech, Wolfenbüttel, Germany) and rabbit-ant-human Eg5 (1:500; Abcam ab37009). Secondary antibodies (1:200) were Alexa 588-conjugated donkey-anti-rabbit and Alexa 594-conjugated goat-anti-mouse (Molecular Probes / Invitrogen, Darmstadt, Germany). Nuclei were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Immunodetection of Eg5 and Mklp2 (human protein atlas)

We queried the protein atlas [8] for expression of Eg5 and Mklp2. Images were retrieved from the following protein atlas samples: glioblastoma (patient ID 3092, Eg5 antibody HPA006916; patient ID 2726, Eg5 antibody HPA010568; patient ID 1537, Eg5 antibody CAB017617; ID 3022 and 2527, Mklp2 antibody HPA36909), renal cell carcinoma (patient ID 3061, antibody Eg5 HPA006916; patient ID 1722, Eg5 antibody CAB017617, patient ID 1901, Eg5 antibody CAB017617), normal heart (patient ID 2278, Mklp2 antibody HPA036909), placenta (patient ID 2515, Mklp2 antibody HPA036909), endometrium (patient ID 2175, Mklp2 antibody HPA036909) and oral mucosa (patient ID 1505, Mklp2 antibody HPA036909). Original images were downloaded and assembled in Adobe Photoshop CS4.

Evaluation of vascular parameters after Eg5 inhibition using CD31 immunoreactivity (RENCA tumor model)

Vessel density was evaluated on frozen section of RENCA tumors. Primary antibody was anti-CD31 (1:100; Pharmigen), secondary antibody (1:400; goat anti-rabbit Alexa 488, Interchim) and sections were mounted in DAPI-containing mounting medium (Fluoroprobes). Given the heterogeneous nature of tumor angiogenesis in this model, we relied on a qualitative quantification method. In brief, one to five sections per tumor (ISP, n=16 tumors,

controls; n=14 tumors) were photographed at 20x magnification using the same acquisition parameters (Nikon NIS Elements software). Digital images were opened in Adobe Photoshop CS4 and overall vascularity was classified per field from 0 to 3 by an experienced investigator (Dr Patrick Auguste, University Bordeaux) in a blinded fashion. The scores of the two groups were compared using the Mann Whitney's U-test (GraphPad Prism). To further characterize Eg5 inhibition effects on tumor vasculature, we treated mice bearing RENCA tumors with below-mentioned doses of ispinesib (n=4) or solvent (n=4) on day 11 and 12 after tumor cell injection and harvested tumors 24h later for histological analysis. For vessel diameter measurements, the visible interior surface of capillaries in five sections per tumor was determined using NIS elements software. An arbitrary cut off value of 300 square pixels was applied and number of capillaries above that value counted in the two groups and evaluated using the Mann-Whitney's U-test. The tumor mouse model protocol was authorized by the animal ethics commission of Bordeaux (No.: 50120003A).

In situ hybridization (human tumor sections)

In situ hybridization using QuantiViewRNA reagents was performed as recommended by the supplier (Panomics-Affymetrix). The use of branched DNA signal amplification is expected to provide up to a 500-fold amplification for low abundance mRNAs. Probe sets were designed by Panomics-Affymetrix from human CD31 NM_000442 or KIF20A NM_005733. Each probe set consists of 10 or more nucleotide sequence pairs. The oligonucleotide probe pairs are designed to hybridize to adjacent segments on the target RNA allowing the hybridization of a preamplification probe, which spans the hybridized probe pair. This signal is further amplified by bDNA and detected by label probes.

Formalin fixed paraffin embedded human glioblastoma biopsies were provided by the Regional University Hospital of Bordeaux. Five μm sections were collected on positively charged Superfrost slides and dried at 60°C for 30 min, then post fixed in 10% formaldehyde for 1 hour at room temperature. Slides were washed briefly in PBS twice before being air-dried. For deparaffinization, slides were incubated at 80°C for 3 minutes followed by submersion in 200 mL of Histo-Clear[®] reagent (National Diagnostics, USA) for 10 minutes at room temperature with frequent shaking. Residual Histo-Clear reagent was removed by washing in 95 percent ethanol. Sections were circled with a Hydrophobic Pen (Vector Laboratories, USA) then subjected to boiling pretreatment (Panomics) for 10 min. Slides were submerged in distilled water twice, then incubated with a protease solution (Panomics) at 40°C for 10 min. After three washes, the slides were transferred into 4% formaldehyde for 5 minutes followed by rinsing once in 1x PBS. Preamplification and amplification steps were performed following Panomics-Affymetrix instructions. After incubation with the label probe, slides were washed and 200 μL of the AP-enhancer solution was added to the section and incubated at room temperature for 5 to 10 minutes. Fast Red was added to the tissue section for 30 minutes at 40°C in the dark. Slides were then rinsed in 1x PBS. To fix, slides were incubated in 4% formaldehyde for 5 minutes at room temperature then washed in 1x PBS and counterstained with Gill's hematoxylin before being mounted using Dako[®]Ultramount medium (Dako, USA). Results were viewed under bright field for CD31 (high rate expression per endothelial cell) or epifluorescence for KIF20A (low abundance mRNA per cell).

Fluorescent whole mount *in situ* hybridizations and imaging (zebrafish embryos)

Experiments were carried out as described, with minor modifications [9]. Double fluorescent *in situ* hybridizations have been performed as described [10]. The different antisense riboprobes were labeled either with digoxigenin labeling mix (Roche) or DNP-11-UTP

ribonucleotides (Roche). Hybridizations were subsequently performed using the TSAi Plus system kit (Perkin Elmer). Briefly, after permeabilization, hybridization and washes, embryos were blocked in TNT buffer with 0.5% Blocking Reagent, and then with an anti-DNP peroxidase-conjugated pre-absorbed antibody (1:200). Revelation was sequential: first, the green color was developed with tyramide-FITC. Then, after inactivation of the first antibody with H₂O₂, the embryos were incubated with an anti-DIG peroxidase-conjugated preabsorbed antibody (1:200) and the red colour was developed with tyramide-Cy3. Embryos were then extensively washed in TNT buffer and then refixed in 1% paraformaldehyde until analysis. Antisense riboprobes were made by transcribing linearized cDNA clones with SP6, T7, or T3 polymerase using digoxigenin (DIG) or DNP labelling mix (Roche), according to manufacturer's instructions. They were subsequently purified on NucAway spin columns (Ambion) and ethanol-precipitated. The *kif11* probe was cloned from zebrafish embryos using the PCR2.1-TOPO cloning kit (Invitrogen) using the primers 5-AAGGAGCAGAGCCAAAACA and 5-TAGCTTCATCGCACCACTTG according to the manufacturers indications. The *fli1* probe was synthesized as described [11].

Confocal imaging was performed using a Leica TCS SP2 confocal microscope. Digitized images were acquired using a DRY HC PL FLUOTAR 10× (NA 0.3) at 1024 × 1024 pixel resolution. For multicolor imaging, FITC was excited with a 488-nm laser line and the emission light was recorded between 500 to 535 nm. Cy3 was excited with a 561-nm laser line and the emission light was recorded between 570 to 715 nm. Sequential scan acquisition mode between lines was used to avoid cross talk and a 2-frames average mode was performed to reduce background noise. Series of 20 optical sections were carried out to analyze the spatial distribution of fluorescence, and for each embryo, they were recorded with a Z-step at 1.3 μm (20x magnification) and 2.4 μm (10x magnification). Image processing, including maximum projection of Z-stacks, was performed with the Leica LCS software (version 2.5).

Western Blot analysis

Cells are treated with 10ng/mL of human recombinant VEGF-A (PeproTech France) in medium 0.2% SVF during 24h. Cells were solubilized at 1×10^7 cells/mL in lysis buffer (1% NP-40, 20Mm Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2mM EDTA and protease inhibitors; Roche). The lysates were rocked gently at 4°C for 30 minutes then centrifuged at 14000 g for 5 minutes. The supernatants containing proteins are dosed using the Bradford assay. 50 μ g of protein from each treatment were deposited and detected by anti-Eg5 antibody (Abcam, Ab61199, 1:500). Membranes were scanned and pixel density quantified using a LICOR Odyssey Infrared Imaging System. Control density was set to “1” for graphical presentation.

Zebrafish experiments

Fish strains and maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) kdr:EGFP strains [12] were obtained from Zebrafish International Resource Center, Oregon University, USA (grant P40 RR12546 from the NIH-NCRR) and then reared by the GIGA Zebrafish Platform, Liege University, <http://www.giga.ulg.ac.be>, in recirculating system (Techniplast, Italy) at a maximal density of 7 fish/L. The water characteristics were as follows: pH = 7.4, conductivity = 500 μ Scm⁻¹, temperature = 27°C. The light cycle was controlled (14h light, 10h dark). Fish were fed twice daily with dry powder (ZM Ltd, UK) with size adapted to the age, and once with fresh nauplii from *Artemia salina* (INVE Aquaculture, Belgium). Larvae aged less than 14 days were also fed twice daily with a live paramecia culture.

Breeding

The day before breeding, 2 males and 2 females were placed in breeding tanks out of the recirculating system, with an internal divider to prevent unwanted mating. On the day of breeding, fish were placed in fresh aquarium water and the divider was removed to allow mating. Eggs were collected every 30 minutes.

Morpholino injection and phenotype analysis

KIF11 zebrafish morpholino and control morpholino were purchased from GeneTools Inc. (Philomath, OR, USA) and used as recommended by manufacturer. Tg(kdrl:EGFP)^{s843} transgenic zebrafish were injected at the 1-2 cell stage with 0.2, 0.5 or 1 ng of KIF11 morpholino containing rhodamine dextran. Non-injected, damaged and non-fertilized embryos were sorted out directly after microinjection. At 24 hpf (hours post-fecundation) embryos were de-chorionated and treated with 1-phenyl 2-thiourea (PTU) to prevent pigmentation. At 48 hpf, embryos were anaesthetized using tricaine and phenotype-scored using the following criteria: class 1 = normal circulation, class 2 = normal circulation, affected tail and spasm, class 3 = affected circulation (reduced or absent) but heart beating, class 4 = dead or necrotic embryo. Embryos were analyzed using a Nikon SMZ 1500 and Leica MZ16F microscopes and images acquired by NIS Elements BR 2.30 or Leica Application suite 3.5.0 software.

Ispinesib treatment of zebrafish embryos

Normal zebrafish embryos (n=25 per dose; two independent experiments) were exposed to increasing doses of the specific Eg5 inhibitor ispinesib mesylate (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μ M),

from 24 to 48 hpf. Controls were treated with DMSO as used for the highest ispinesib dose. Dead embryos were counted; phenotype scoring of living embryos was done under a light microscope and blood flow and PBI (posterior blood island) morphology were scored as normal (=0) or reduced/modified (=1). As an additional morphological criterion number of blood cells was evaluated in a qualitative manner (0=normal, 1=reduced) and combined with the latter phenotype. Values of both experiments were pooled and analyzed using the Fishers Exact test with 99% interval of confidence.

Orthotopic renal cell carcinoma model (RENCA model)

10^5 RENCA cells (mouse origin) were implanted in the subcapsular region of the left kidney of Balb/C mice (n=10 per group). Animals were observed and weighed twice weekly. Mice were treated with ispinesib mesylate (5 mg/kg) or solvent control (80% D5W, 10% ethanol, 10% Cremophore-El) twice weekly by subcutaneous injection. Animals were sacrificed when a >20% weigh loss occurred or when they presented other signs of suffering. Animals were sacrificed by cervical dislocation and the urogenital apparatus was prepared for tumor size and weight evaluation and CD31 immunohistochemistry. Comparison of tumor weight was done using the Mann Whitney's U-test after pooling of two independent experiments.

Supplemental References

1. Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009; 4(1):44-57.
2. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC and Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome biology*. 2003; 4(5):P3.
3. Javerzat S, Franco M, Herbert J, Platonova N, Peille AL, Pantesco V, De Vos J, Assou S, Bicknell R, Bikfalvi A and Hagedorn M. Correlating global gene regulation to angiogenesis in the developing chick extra-embryonic vascular system. *PLoS One*. 2009; 4(11):e7856.
4. Herbert JM, Stekel D, Sanderson S, Heath VL and Bicknell R. A novel method of differential gene expression analysis using multiple cDNA libraries applied to the identification of tumour endothelial genes. *BMC Genomics*. 2008; 9:153.
5. Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA and Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb J*. 2005; 19(13):1872-1874.
6. Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, Baffi JZ, Yamada K, Kaneko H, Green MG, Chappell J, Wilting J, Weich HA, Yamagami S, Amano S, Mizuki N, et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nature medicine*. 2009; 15(9):1023-1030.
7. Tran TC, Sneed B, Haider J, Blavo D, White A, Aiyejorun T, Baranowski TC, Rubinstein AL, Doan TN, Dingleline R and Sandberg EM. Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer research*. 2007; 67(23):11386-11392.
8. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Bjorling L and Ponten F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature biotechnology*. 2010; 28(12):1248-1250.
9. Thisse C, Thisse B, Schilling TF and Postlethwait JH. Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development (Cambridge, England)*. 1993; 119(4):1203-1215.
10. Pendeville H, Winandy M, Manfroid I, Nivelles O, Motte P, Pasque V, Peers B, Struman I, Martial JA and Voz ML. Zebrafish *Sox7* and *Sox18* function together to control arterial-venous identity. *Developmental biology*. 2008; 317(2):405-416.
11. Brown LA, Rodaway AR, Schilling TF, Jowett T, Ingham PW, Patient RK and Sharrocks AD. Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETS-domain transcription factor *Fli-1* in wild-type and mutant zebrafish embryos. *Mechanisms of development*. 2000; 90(2):237-252.
12. Jin SW, Beis D, Mitchell T, Chen JN and Stainier DY. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*. 2005; 132(23):5199-5209.

Table S1

Complete list of 317 CAM genes induced by VEGF

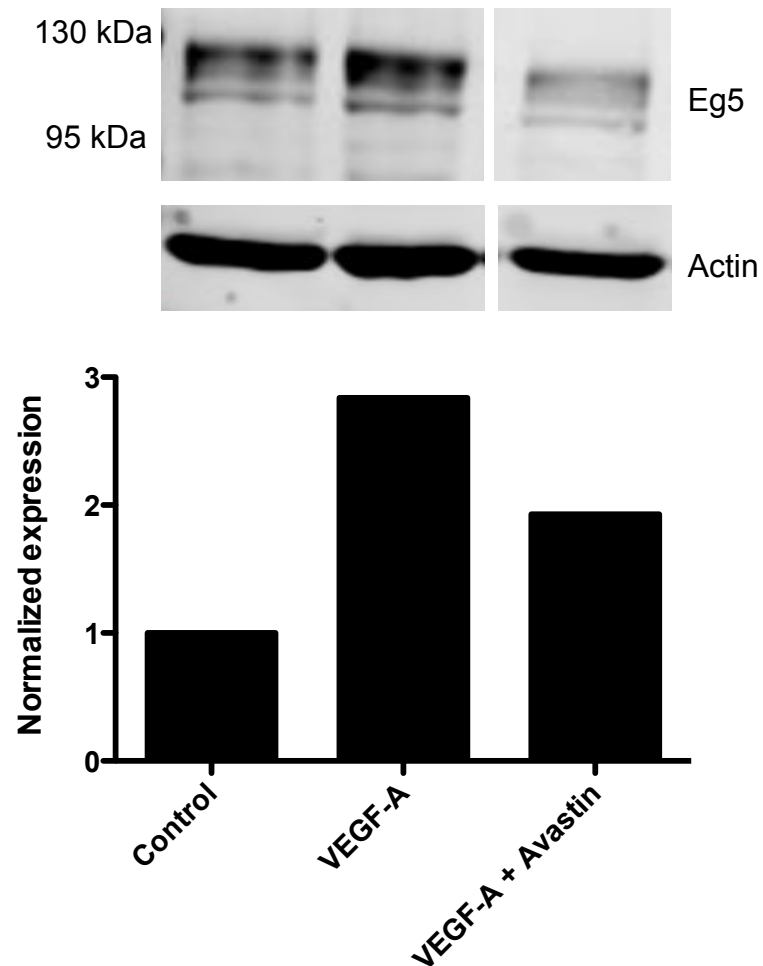


(provided as Microsoft Excel file)

The table contains the list of 317 probe sets detecting significantly up regulated transcripts in at least two out of three biological replicates. The five kinesins motor protein encoding genes are marked in red (KIF4A, KIF11, KIF15, KIF20A and KIF23).
I = Increased.

Figure S1

Expression of Eg5 protein in endothelial cells is stimulated by VEGF-A *in vitro* and inhibited by Avastin



HUVECs were treated with 10 ng/ml recombinant human VEGF-A for 24 h and Eg5 protein expression is analyzed by Western Blot. Note that co-treatment with VEGF-A blocking antibody Avastin abolishes Eg5 expression.

Table S2

Biological themes significantly enriched in genes up regulated by VEGF

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 11.6															
Category	Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR					
SP_PIR_KEYWORDS	mitosis	22	10.68	5.37E-16	KIF23, KIF11, CDC2, NUF2, NUSAP1, NDC80, CENPE, CDC20, SMC2, SMC4, NCAPD2, FAM83D, NCAPH, CCNB2, PLK1, NCAPG, NCAPG2, BUB1, BUB1B, CCNA2, HELLS, CDCA3	206	183	19235	11.22526	1.68E-13	1.68E-13	7.44E-13					
GOTERM_BP_FAT	GO:0048285~organelle fission	25	12.136	1.53E-15	KIF23, FAM83D, NCAPH, NCAPG2, NCAPG, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, MSH6, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, SMC2, NCAPD2, SMC4, CCNB2, PLK1, BUB1B	174	229	13528	8.487678	2.64E-12	2.64E-12	2.62E-12					
GOTERM_BP_FAT	GO:0000280~nuclear division	24	11.65	6.74E-15	KIF23, KIF11, CDC2, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, NDC80, CENPE, CDC20, SMC2, SMC4, NCAPD2, FAM83D, NCAPH, CCNB2, PLK1, NCAPG, NCAPG2, BUB1, BUB1B, CCNA2, HELLS, CDCA3	174	220	13528	8.481505	1.15E-11	5.74E-12	1.14E-11					
GOTERM_BP_FAT	GO:0007067~mitosis	24	11.65	6.74E-15	KIF23, KIF11, CDC2, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, NDC80, CENPE, CDC20, SMC2, SMC4, NCAPD2, FAM83D, NCAPH, CCNB2, PLK1, NCAPG, NCAPG2, BUB1, BUB1B, CCNA2, HELLS, CDCA3	174	220	13528	8.481505	1.15E-11	5.74E-12	1.14E-11					
GOTERM_BP_FAT	GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle	24	11.65	9.98E-15	KIF23, KIF11, CDC2, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, NDC80, CENPE, CDC20, SMC2, SMC4, NCAPD2, FAM83D, NCAPH, CCNB2, PLK1, NCAPG, NCAPG2, BUB1, BUB1B, CCNA2, HELLS, CDCA3	174	224	13528	8.330049	1.69E-11	5.65E-12	1.69E-11					
SP_PIR_KEYWORDS	cell cycle	30	14.563	1.36E-14	KIF23, E2F1, FAM83D, NCAPH, CDC45L, NCAPG2, NCAPG, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, CKAP2, RBBP4, KIF11, CDC2, NUF2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, MCM2, SMC2, SMC4, GAK, MCM6, NCAPD2, CCNB2, RGS2, PLK1, BUB1B	206	461	19235	6.076385	4.10E-12	2.05E-12	1.81E-11					
GOTERM_BP_FAT	GO:0000279~M phase	27	13.107	8.52E-14	KIF23, FAM83D, NCAPH, NCAPG2, NCAPG, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, MSH6, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, SMC2, SMC4, RAD51, NCAPD2, CCNB2, PLK1, TOP3A, BUB1B	174	329	13528	6.380463	1.44E-10	3.61E-11	1.44E-10					
SP_PIR_KEYWORDS	cell division	23	11.165	9.44E-14	KIF23, KIF11, CDC2, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, NDC80, CENPE, CDC20, SMC2, MCM5, SMC4, NCAPD2, FAM83D, NCAPH, CCNB2, PLK1, NCAPG, NCAPG2, BUB1, BUB1B, CCNA2, HELLS, CDCA3	206	264	19235	8.134837	2.86E-11	7.15E-12	1.26E-10					
GOTERM_BP_FAT	GO:0007049~cell cycle	39	18.932	4.48E-13	KIF23, E2F1, FAM83D, NCAPH, CDC45L, NCAPG2, NCAPG, PSMD1, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, CKAP2, RBBP4, KIF11, CDC2, NUF2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, SMC2, SMC4, RAD51, MCM6, CCNB2, RGS2, PLK1, TOP3A, BUB1B, BARD1	174	776	13528	3.907394	7.60E-10	1.52E-10	7.56E-10					
GOTERM_BP_FAT	GO:0022403~cell cycle phase	28	13.592	2.69E-12	KIF23, E2F1, FAM83D, NCAPH, NCAPG2, NCAPG, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, MSH6, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, SMC2, SMC4, RAD51, NCAPD2, CCNB2, PLK1, TOP3A, BUB1B	174	414	13528	5.25826	4.56E-09	7.60E-10	4.53E-09					
GOTERM_BP_FAT	GO:0000278~mitotic cell cycle	26	12.621	8.72E-12	KIF23, E2F1, FAM83D, NCAPH, NCAPG2, NCAPG, PSMD1, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, SMC2, NCAPD2, SMC4, CCNB2, PLK1, BUB1B	174	370	13528	5.463312	1.48E-08	2.11E-09	1.47E-08					
GOTERM_BP_FAT	GO:0051301~cell division	23	11.165	2.54E-11	KIF23, KIF11, CDC2, NUF2, NUSAP1, NDC80, CENPE, CDC20, SMC2, MCM5, SMC4, NCAPD2, FAM83D, NCAPH, CCNB2, PLK1, NCAPG, NCAPG2, BUB1, BUB1B, CCNA2, HELLS, CDCA3	174	295	13528	6.06164	4.31E-08	5.39E-09	4.29E-08					
GOTERM_BP_FAT	GO:0022402~cell cycle process	30	14.563	1.33E-10	KIF23, E2F1, FAM83D, NCAPH, NCAPG2, NCAPG, PSMD1, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, MSH6, KIF11, CDC2, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, SMC2, SMC4, RAD51, NCAPD2, CCNB2, PLK1, TOP3A, BUB1B, BARD1	174	565	13528	4.128166	2.26E-07	2.51E-08	2.24E-07					
GOTERM_CC_FAT	GO:0000793~condensed chromosome	13	6.3107	6.76E-08	NUF2, NDC80, CENPE, SMC2, RAD51, NCAPD2, SMC4, NCAPH, BAZ1B, NCAPG, CENPC1, BUB1, BUB1B	160	129	12782	8.050678	1.99E-05	9.93E-06	9.00E-05					
GOTERM_CC_FAT	GO:0005819~spindle	13	6.3107	2.86E-07	CKAP2, KIF23, KIF11, CDC2, KIF15, TPX2, NUSAP1, CDC20, CENPE, FAM83D, PLK1, BUB1, BUB1B	160	147	12782	7.064881	8.40E-05	2.80E-05	3.80E-04					
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 8.2															
Category	Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR					
GOTERM_BP_FAT	GO:0000279~M phase	27	13.107	8.52E-14	KIF23, FAM83D, NCAPH, NCAPG2, NCAPG, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, MSH6, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, SMC2, SMC4, RAD51, NCAPD2, CCNB2, PLK1, TOP3A, BUB1B	174	329	13528	6.380463	1.44E-10	3.61E-11	1.44E-10					
GOTERM_BP_FAT	GO:0007049~cell cycle	39	18.932	4.48E-13	KIF23, E2F1, FAM83D, NCAPH, CDC45L, NCAPG2, NCAPG, PSMD1, BUB1, CCNA2, HELLS, CDCA3, CKAP2, RBBP4, KIF11, CDC2, NUF2, NUSAP1, CENPE, NDC80, CDC20, SMC2, SMC4, RAD51, MCM6, CCNB2, RGS2, PLK1, TOP3A, BUB1B, BARD1	174	776	13528	3.907394	7.60E-10	1.52E-10	7.56E-10					
GOTERM_CC_FAT	GO:0005694~chromosome	23	11.165	5.67E-08	NUF2, NDC80, CENPE, SMC2, RAD51, NCAPD2, SMC4, NCAPH, BAZ1B, NCAPG, CENPC1, BUB1, BUB1B	160	460	12782	3.994375	1.67E-05	1.67E-05	7.56E-05					

(table continues on next page)

Table S2

Biological themes significantly enriched in genes up regulated by VEGF

Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 6.7										
Category	Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:ATP	35	16.99	7.84E-10	KIF23, FES, MYO9A, N4BP2, LONP1, TEK, BUB1, TOP2A, NSF, HELLS, SYK, MSH6, KIF11, FLT1, UPF1, MYO1C, LYN, CDC2, KIF15, CENPE, MCM2, SMC2, MCM4, MCM5, SMC4, ABCG2, RAD51, MCM6, KDR, PLK1, HIPK2, BMP2K, BUB1B, JAK2, KIF20A	206	962	19113	3.375628	6.53E-07	6.53E-07	1.21E-06
SP_PIR_KEYWORDS	atp-binding	40	19.417	5.88E-09	KIF23, FES, MYO9A, N4BP2, LONP1, TEK, BUB1, TOP2A, NSF, HELLS, SYK, MSH6, KIF11, FLT1, UPF1, MYO1C, LYN, CDC2, KIF15, CENPE, MCM2, SMC2, MCM4, MCM5, SMC4, ABCG2, RAD51, MCM6, BAZ1B, PLK1, HIPK2, RAB22A, RRM1, BMP2K, TOP3A, BUB1B, JAK2, KIF20A	206	1326	19235	2.816705	1.78E-06	3.56E-07	7.87E-06
SP_PIR_KEYWORDS	nucleotide-binding	45	21.845	1.91E-08	KIF23, GNAI2, FES, MYO9A, N4BP2, LONP1, TEK, LSG1, BUB1, RAPGEF3, TOP2A, NSF, HELLS, SYK, MSH6, KIF11, FLT1, UPF1, OPB1, MYO1C, LYN, CDC2, KIF15, RBKS, CENPE, MCM2, MCM4, SMC2, MCM5, SMC4, GAK, KDR, ABCG2, RAD51, MCM6, BAZ1B, PLK1, HIPK2, RAB22A, RRM1, BMP2K, TOP3A, BUB1B, JAK2, KIF20A	206	1686	19235	2.492183	5.79E-06	9.65E-07	2.56E-05
GOTERM_MF_FAT	GO:0030554~adenyl nucleotide binding	44	21.359	1.59E-07	KIF23, STEAP4, FES, MYO9A, N4BP2, LONP1, TEK, BUB1, RAPGEF3, TOP2A, NSF, HELLS, DUS3L, SYK, MSH6, KIF11, FLT1, UPF1, MYO1C, LYN, CDC2, KIF15, TPX2, CENPE, RBKS, MCM2, MCM4, SMC2, MCM5, SMC4, GAK, KDR, ABCG2, RAD51, MCM6, BAZ1B, PLK1, HIPK2, RRM1, BMP2K, TOP3A, BUB1B, JAK2, KIF20A	158	1577	12983	2.292656	5.93E-05	5.93E-05	2.20E-04
GOTERM_MF_FAT	GO:0001883~purine nucleoside binding	44	21.359	2.44E-07	KIF23, STEAP4, FES, MYO9A, N4BP2, LONP1, TEK, BUB1, RAPGEF3, TOP2A, NSF, HELLS, DUS3L, SYK, MSH6, KIF11, FLT1, UPF1, MYO1C, LYN, CDC2, KIF15, TPX2, CENPE, RBKS, MCM2, MCM4, SMC2, MCM5, SMC4, GAK, KDR, ABCG2, RAD51, MCM6, BAZ1B, PLK1, HIPK2, RRM1, BMP2K, TOP3A, BUB1B, JAK2, KIF20A	158	1601	12983	2.258288	9.09E-05	4.54E-05	3.36E-04
GOTERM_MF_FAT	GO:0001882~nucleoside binding	44	21.359	2.95E-07	KIF23, STEAP4, FES, MYO9A, N4BP2, LONP1, TEK, BUB1, RAPGEF3, TOP2A, NSF, HELLS, DUS3L, SYK, MSH6, KIF11, FLT1, UPF1, MYO1C, LYN, CDC2, KIF15, TPX2, CENPE, RBKS, MCM2, MCM4, SMC2, MCM5, SMC4, GAK, KDR, ABCG2, RAD51, MCM6, BAZ1B, PLK1, HIPK2, RRM1, BMP2K, TOP3A, BUB1B, JAK2, KIF20A	158	1612	12983	2.242878	1.10E-04	3.67E-05	4.08E-04
GOTERM_MF_FAT	GO:0032559~adenyl ribonucleotide binding	42	20.388	3.03E-07	KIF23, FES, MYO9A, N4BP2, LONP1, TEK, BUB1, RAPGEF3, TOP2A, NSF, HELLS, SYK, MSH6, KIF11, FLT1, UPF1, MYO1C, LYN, CDC2, KIF15, TPX2, CENPE, RBKS, MCM2, MCM4, SMC2, MCM5, SMC4, GAK, KDR, ABCG2, RAD51, MCM6, BAZ1B, PLK1, HIPK2, RRM1, BMP2K, TOP3A, BUB1B, JAK2, KIF20A	158	1497	12983	2.305396	1.13E-04	2.83E-05	4.19E-04
GOTERM_MF_FAT	GO:0005524~ATP binding	41	19.903	5.95E-07	KIF23, FES, MYO9A, N4BP2, LONP1, TEK, BUB1, TOP2A, NSF, HELLS, SYK, MSH6, KIF11, FLT1, UPF1, MYO1C, LYN, CDC2, KIF15, TPX2, CENPE, RBKS, MCM2, MCM4, SMC2, MCM5, SMC4, GAK, KDR, ABCG2, RAD51, MCM6, BAZ1B, PLK1, HIPK2, RRM1, BMP2K, TOP3A, BUB1B, JAK2, KIF20A	158	1477	12983	2.280979	2.22E-04	4.44E-05	8.22E-04
Annotation Cluster 4		Enrichment Score: 5.5										
Category	Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM_BP_FAT	GO:0001568~blood vessel development	17	8.2524	9.84E-08	CCM2, FLT1, LMO2, COL3A1, ELK3, PROX1, GJA5, CDH5, KDR, CDH13, MEQX2, NARG1, ID1, FOXC2, SOX18, COL1A1, SOX17	174	245	13528	5.394699	1.67E-04	1.52E-05	1.66E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0001944~vasculature development	17	8.2524	1.38E-07	CCM2, FLT1, LMO2, COL3A1, ELK3, PROX1, GJA5, CDH5, KDR, CDH13, MEQX2, NARG1, ID1, FOXC2, SOX18, COL1A1, SOX17	174	251	13528	5.265742	2.34E-04	1.95E-05	2.32E-04
Annotation Cluster 5		Enrichment Score: 5.4										
Category	Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM_BP_FAT	GO:0030261~chromosome condensation	8	3.8835	1.96E-08	NCAPH, NCAPG2, NCAPG, NUSAP1, TOP2A, SMC2, NCAPD2, SMC4	174	25	13528	24.87908	3.33E-05	3.33E-06	3.31E-05
GOTERM_CC_FAT	GO:0005694~chromosome	23	11.165	5.67E-08	NCAPH, NCAPG, CENPE, UPF1, NDC80, CENPE, MCM2, SMC2, SMC4, RAD51, NCAPD2, NCAPH, BAZ1B, NCAPG, CENPC1, HISTH2B, TOP2A, BUB1, BUB1B, BCL6, TOP2A, NUF2, NDC80, CENPE, SMC2, RAD51, NCAPD2, SMC4, NCAPH, BAZ1B, NCAPG, CENPC1, BUB1, BUB1B	160	460	12782	3.994375	1.67E-05	1.67E-05	7.56E-05
GOTERM_CC_FAT	GO:0000793~condensed chromosome	13	6.3107	6.76E-08	NCAPH, BAZ1B, NCAPG, CENPC1, BUB1, BUB1B	160	129	12782	8.050678	1.99E-05	9.93E-06	9.00E-05
SP_PIR_KEYWORDS	dna condensation	6	2.9126	9.76E-08	NCAPH, NCAPG2, NCAPG, SMC2, NCAPD2, SMC4	206	12	19235	46.68689	2.96E-05	4.22E-06	1.31E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0000070~mitotic sister chromatid segregation	8	3.8835	3.02E-07	NCAPH, NCAPG, NUSAP1, CENPE, NDC80, SMC2, NCAPD2, SMC4	174	36	13528	17.27714	5.13E-04	3.95E-05	5.10E-04
GOTERM_CC_FAT	GO:0000796~condensin complex	5	2.4272	3.39E-07	NCAPH, NCAPG, SMC2, NCAPD2, SMC4	160	6	12782	66.57292	9.97E-05	2.49E-05	4.52E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0000819~sister chromatid segregation	8	3.8835	3.69E-07	NCAPH, NCAPG, NUSAP1, CENPE, NDC80, SMC2, NCAPD2, SMC4	174	37	13528	16.81019	6.26E-04	4.47E-05	6.22E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0007076~mitotic chromosome condensation	6	2.9126	3.82E-07	NCAPH, NCAPG, NUSAP1, SMC2, NCAPD2, SMC4	174	13	13528	35.88329	6.48E-04	4.32E-05	6.45E-04

Out of the 317 probe sets, which detected up regulated transcripts in VEGF-treated CAMs, 206 unique orthologs were submitted to gene ontology analysis. Note that significantly enriched GO-terms identify cell proliferation and blood vessel development as main biological processes (>5-fold enrichment, FDR<0.001).

Table S3

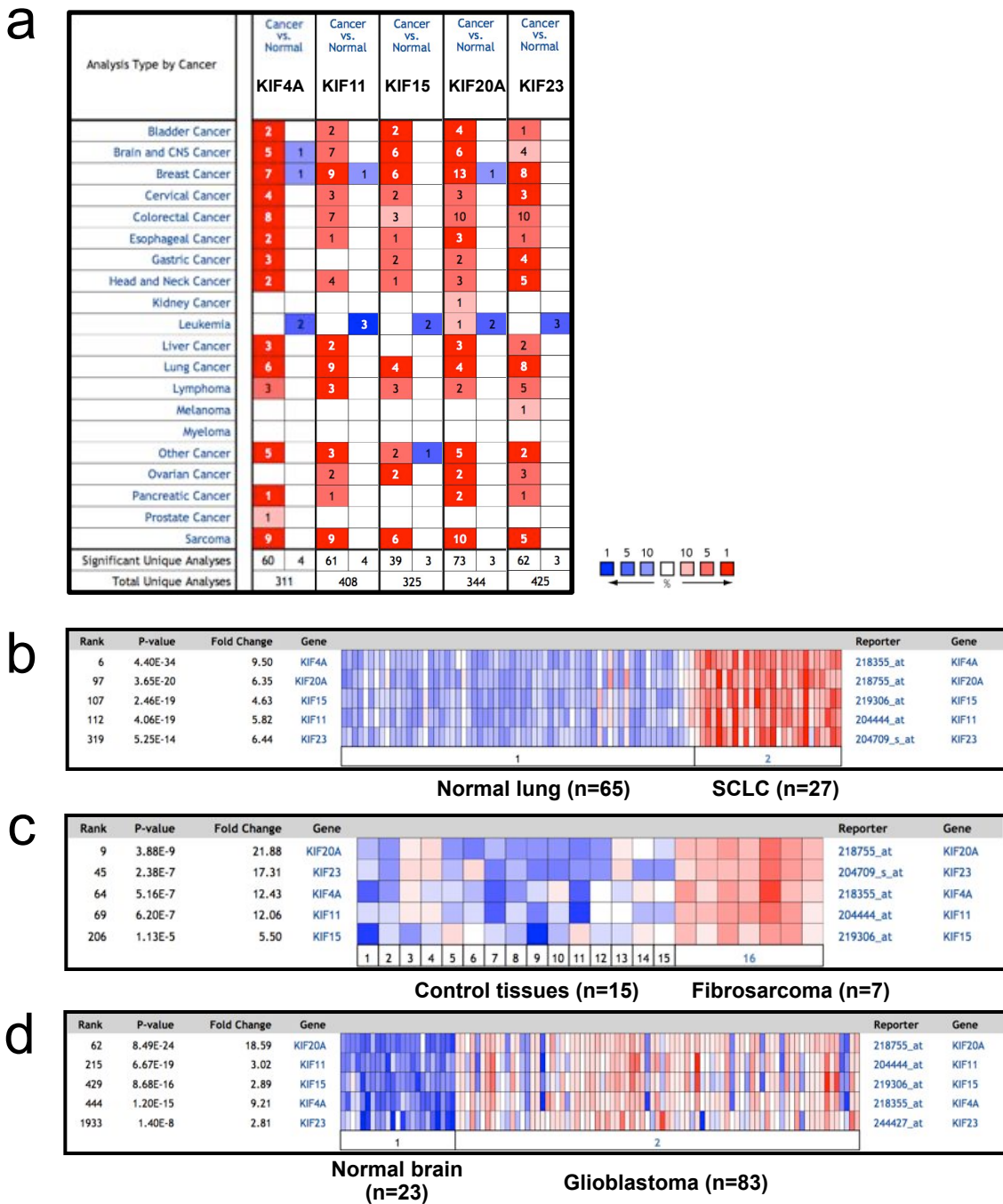
In silico prediction of endothelial versus non-endothelial enrichment of human kinesin family members

Gene symbol	Gene name	No. EC-EST	No. Non EC-EST	Enrichment EC-EST/Non EC-EST	FDR q-value	
KIF11	kinesin family member 11	2	0	-	0.10	Endothelial
KIF13B	kinesin family member 13B	3	2	6.59	0.26	
KIF18A	kinesin family member 18A	2	2	4.39	0.44	
KIF9	kinesin family member 9	1	1	4.39	0.57	
KIF15	kinesin family member 15	1	1	4.39	0.57	
KIF20A	kinesin family member 20A	5	6	3.66	0.26	
KIF2C	kinesin family member 2C	3	6	2.20	0.57	
KIF13A	kinesin family member 13A	1	2	2.20	0.62	
KIF1B	kinesin family member 1B	2	5	1.76	0.62	
KIF5B	kinesin family member 5B	3	8	1.65	0.62	
KIF3A	kinesin family member 3A	1	3	1.46	0.81	
KIF1C	kinesin family member 1C	1	4	1.10	0.94	
KIF22	kinesin family member 22	2	14	1.59	0.62	
KIF12	kinesin family member 12	0	3	-	0.53	
KIF17	kinesin family member 17	0	1	-	0.62	
KIF1A	kinesin family member 1A	0	3	-	0.53	
KIF21A	kinesin family member 21A	0	2	-	0.57	
KIF21B	kinesin family member 21B	0	4	-	0.49	
KIF23	kinesin family member 23	0	1	-	0.62	
KIF24	kinesin family member 24	0	1	-	0.62	
KIF27	kinesin family member 27	0	1	-	0.62	
KIF3B	kinesin family member 3B	0	7	-	0.33	
KIF3C	kinesin family member 3C	0	4	-	0.49	
KIF4A	kinesin family member 4A	0	3	-	0.53	
KIF5C	kinesin family member 5C	0	9	-	0.29	
KIFC1	kinesin family member C1	0	2	-	0.57	
KIFC2	kinesin family member C2	0	2	-	0.57	
KIFC3	kinesin family member C3	0	8	-	0.29	
				(no restriction for q-value)		

Genes encoding for kinesins were extracted from the Affymetrix chicken GeneChip by their gene symbol (KIFxx), subjected to ortholog screen and *in silico* assignment of endothelial vs. non-endothelial enrichment. Out of 36 unique kinesin genes, 12 showed preferential endothelial expression, whereas 16 were enriched in non-endothelial cells.

Figure S2

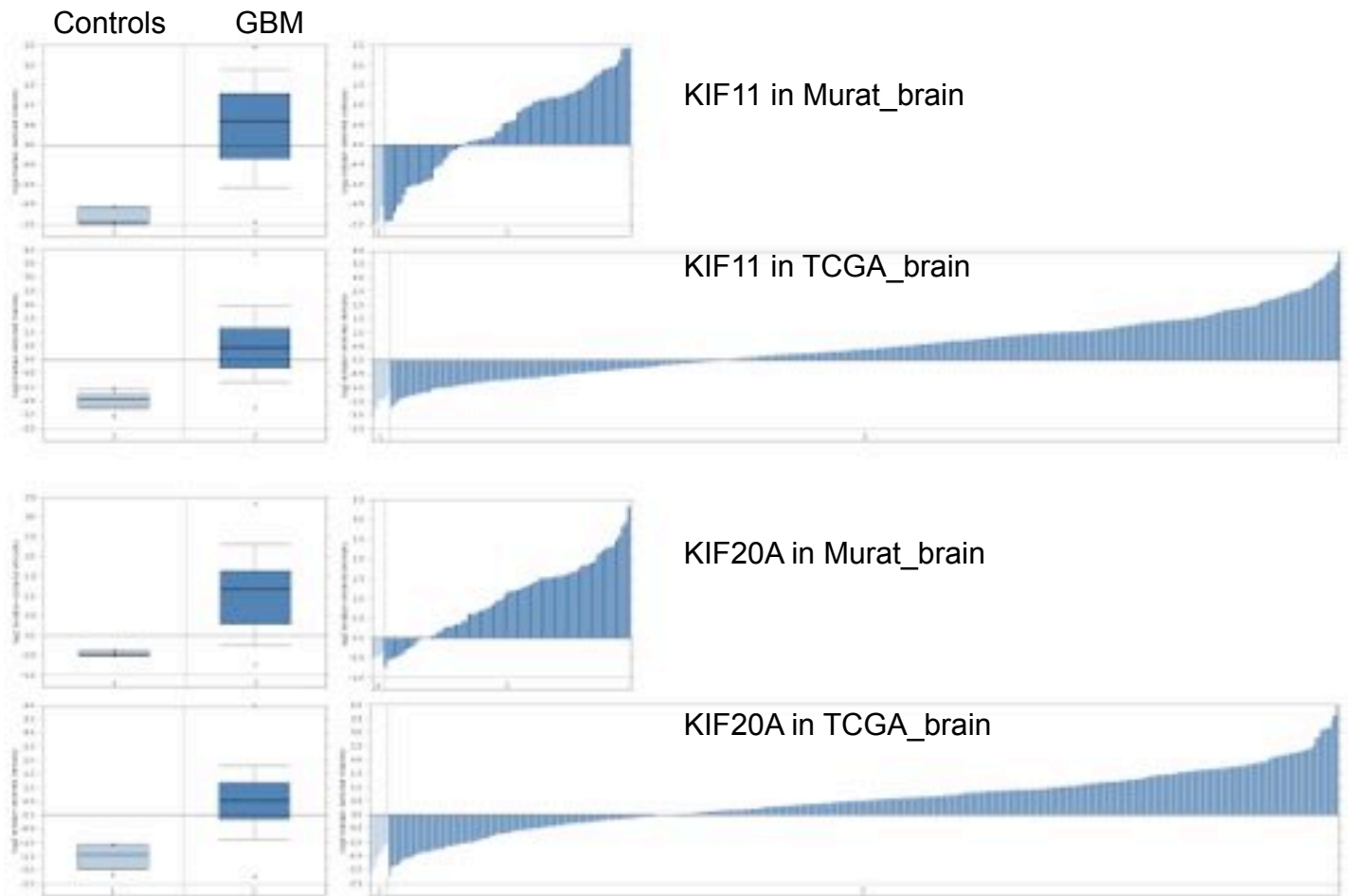
Expression and co-expression analysis of five VEGF-induced kinesins in various human tumors



(a) Oncomine database was queried for expression of indicated kinesins in human malignancies compared to normal tissue. The numbers in the cases indicated in how many different studies significant over expression was found. Intensity of the red and blue colour indicates rank-order of the gene by over expression and under expression in cancer versus normal tissue (eg. top 1%, 5% and 10%). Co-expression of five VEGF-induced kinesins was observed in three different cancer types. In all cases, kinesins were significantly over expressed in cancer tissues. (b) SCLC = squamous cell lung carcinoma; Hou_Lung study. (c) Fibrosarcoma; Detwiller_sarcoma study. (d) Glioblastoma; Sun_Brain study.

Figure S3

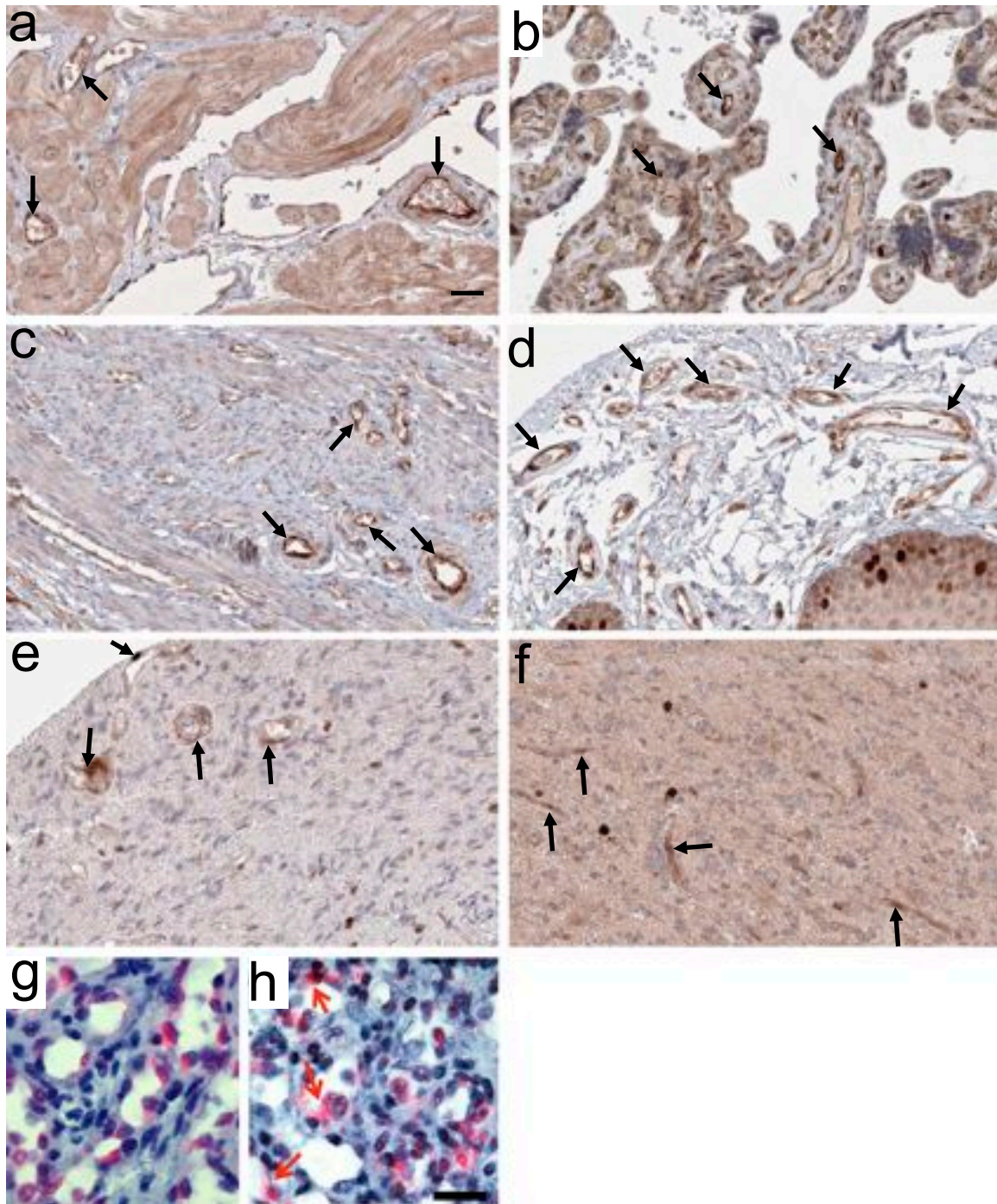
Heterogeneous expression of KIF11 and KIF20A in glioblastoma



Even though over expression of KIF11 and KIF20A seems obvious from box plot presentation, visualization of the whole dataset (expression per patient) shows heterogeneity of expression in two independent glioblastoma studies (Murat_brain: 4 controls, 80 GBMs; TCGA_brain: 10 controls, 515 GBMs) with approximately two-thirds of patients over expressing.

Figure S4

Vascular expression of KIF20A/Mklp2 in normal tissues and glioblastoma



Mklp2 protein is expressed with varying intensities in endothelial cells (black arrows) in several normal tissues: (a) heart, (b) placenta, (c) endometrium and oral mucosa (d). In glioblastoma (e, f) a diffuse background signal is found in all cells, but several tumor capillaries can be recognized by stronger Mklp2 expression in the endothelium (black arrows). (g) Endothelial cells in tumor capillaries can be identified by in situ hybridization using a PECAM1 probe (in red). (h) KIF20A transcripts exhibit a very similar expression pattern in tumor capillaries in glioblastoma (in red, arrows point to endothelial cells). Serial sections are shown (a-f: bar = 30 μm; g, h: bar = 30 μm).

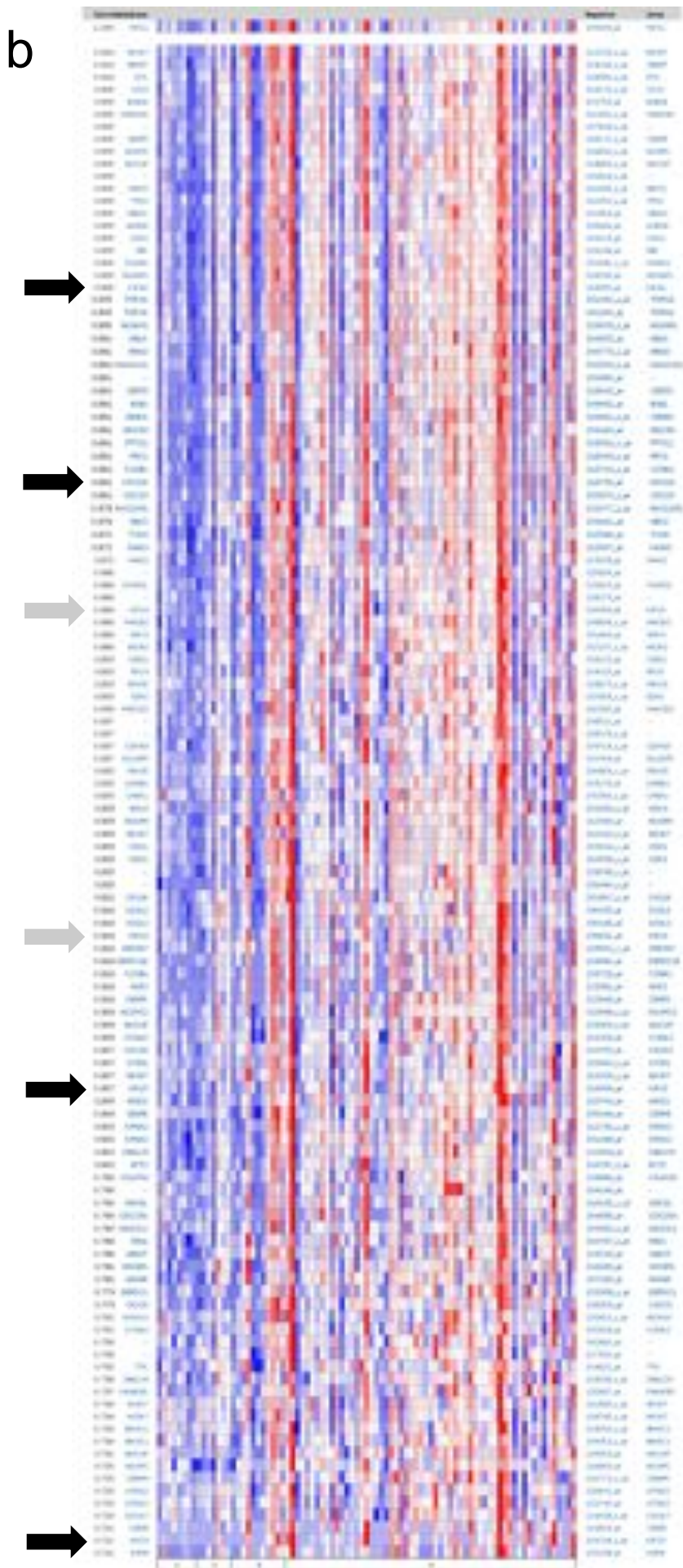
Figure S5 (cont'd)

Co-expression of VEGF-induced kinesins in brain tumors

(a) French_brain study. Note that all kinesins induced by VEGF are highly co-expressed (KIF11 as a bait), with correlation values ranging from 0.903 for KIF4A to 0.872 for KIF15 (black arrows). Other kinesins such as KIF14 and KIF18B also show co-regulation (grey arrows). Legend: 0: Normal brain (n=6), 1: Anaplastic Oligoastrocytoma (n=4), 2: Anaplastic Oligodendroglioma (n=23).

Figure S5 (cont'd)

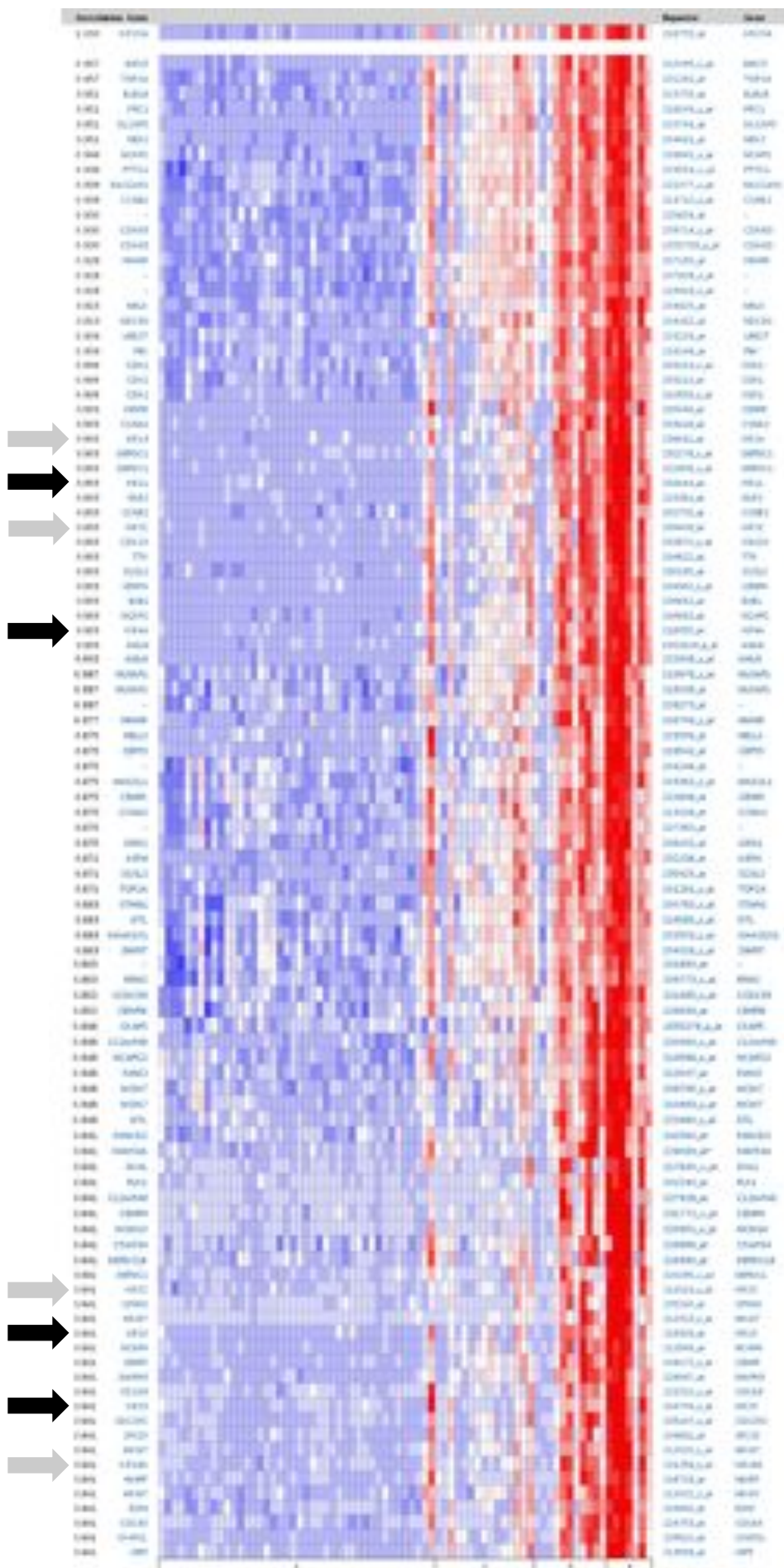
Co-expression of VEGF-induced kinesins in brain tumors



(b) Freje_brain study: Correlation ranges from 0.905 for KIF4A to 0.71 for KIF23 (black arrows). Again, KIF14 was also co-regulated (grey arrows). Legend: 1: Anaplastic Astrocytoma (n=8), 2: Anaplastic Oligoastrocytoma (n=7), 3: Anaplastic Oligodendroglioma (n=11), 4: Glioblastoma (n=59).

Figure S6

Expression of VEGF-induced kinesins depends on the vascularization status in hepatocellular carcinoma (HCC)



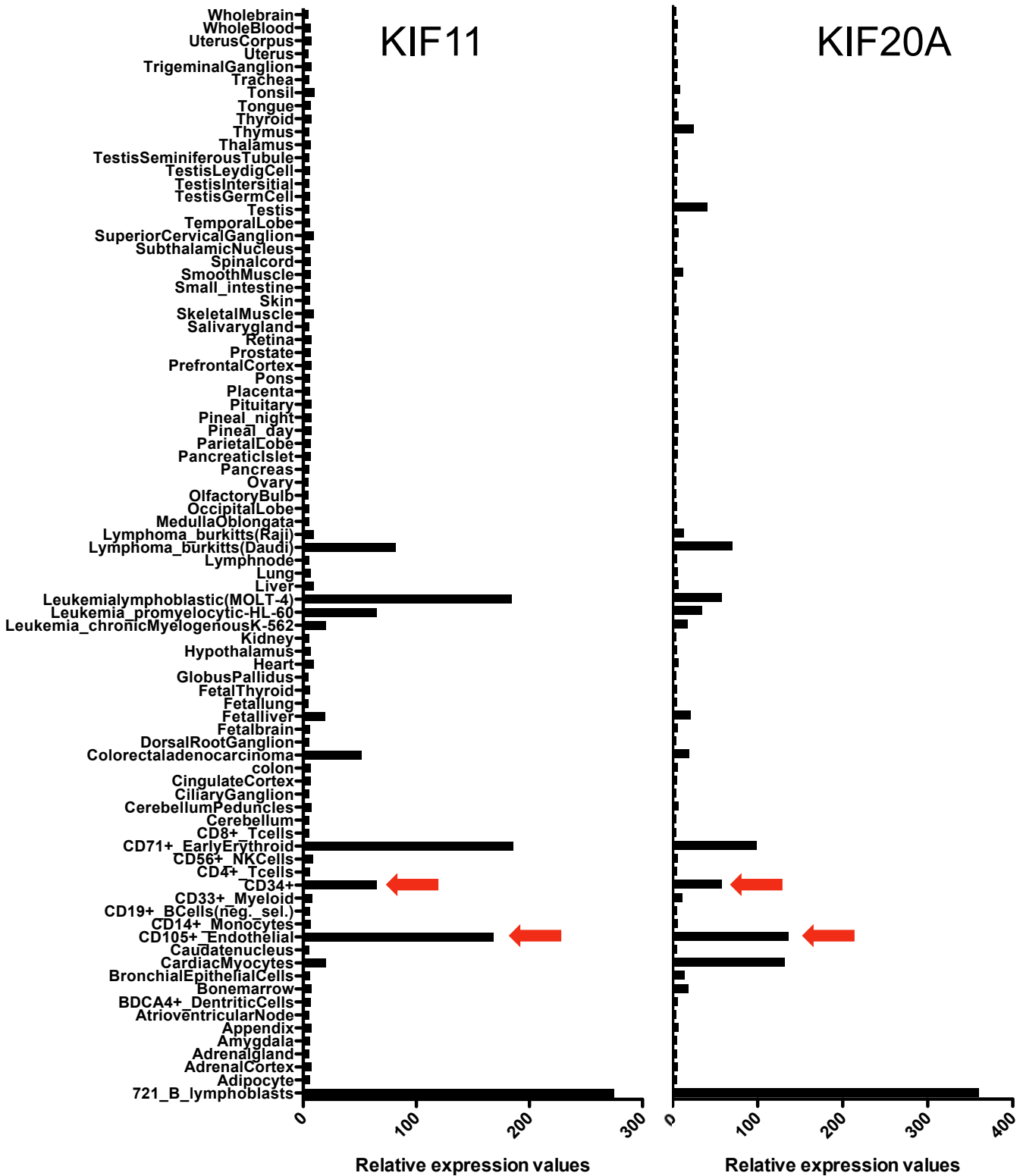
KIF11 (0.903), KIF4A (0.903) and KIF15 (0.841) expression correlates with KIF20A expression (data from the Wurmbach_liver study). Notably, these kinesins are over expressed in highly vascularized HCC samples, compared to controls.

Legend: 0: normal liver (n=42), 1: No visible vascular invasion (n=15), 2: microscopic vascular invasion (n=11); macroscopic vascular invasion (n=7).



Figure S7

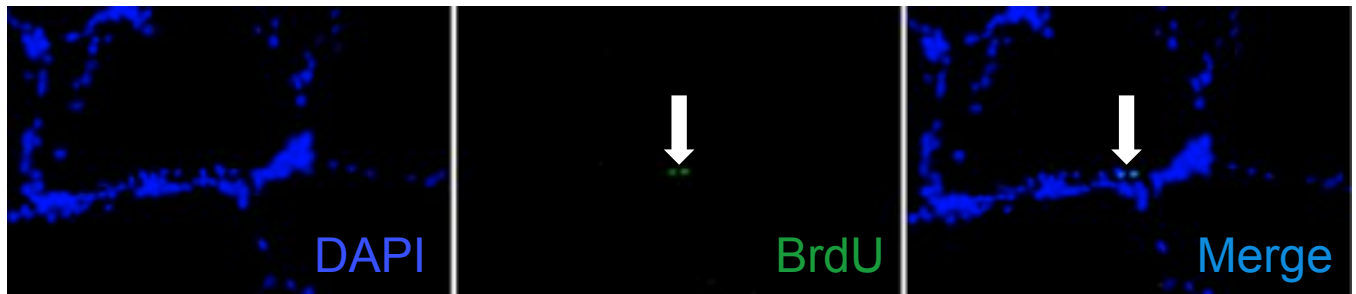
Relative expression levels of KIF11 and KIF20A transcripts in 84 human tissue and cell lines



High levels of KIF11 and KIF20A transcripts were essentially found in malignant lymphoma cells and CD105+ / CD34+ endothelial cells (red arrows). There is a high correlation of KIF11 and KIF20A expression levels throughout all tissues (Spearman $r=0.84$, $P<0.0001$). Data were obtained using the BioGPS project.

Figure S8

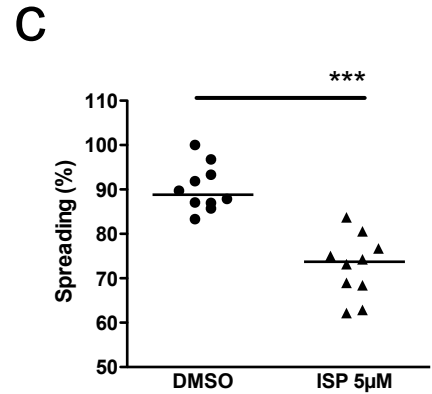
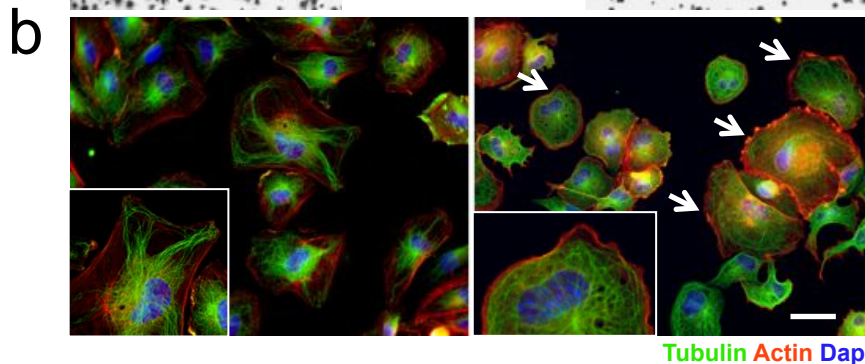
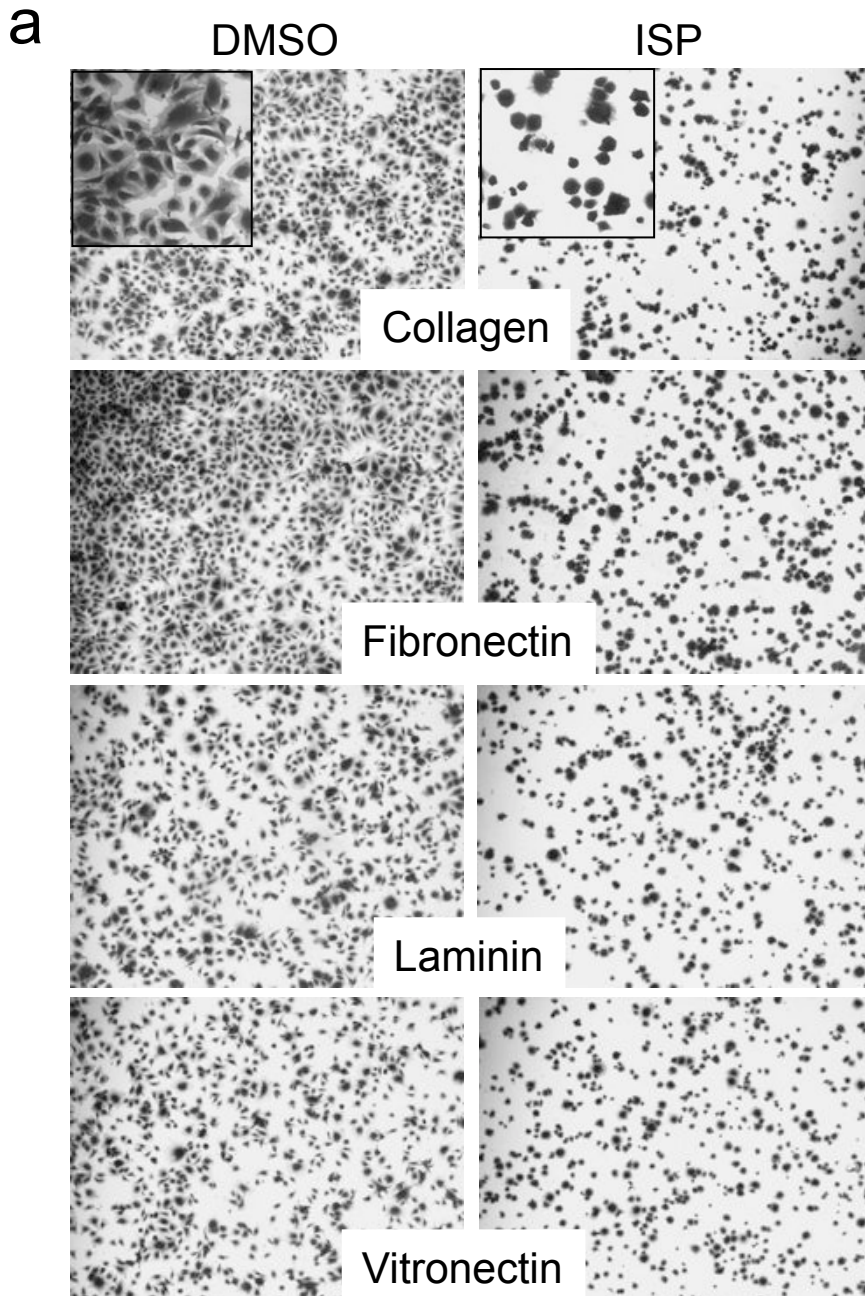
Cell proliferation is a rare occurrence in the tubulogenesis assay



To exclude that endothelial cell proliferation occurs in our assay conditions, cells were incubated with BrdU and allowed to form tubes on matrigel for 14h30. Anti-BrdU antibody (in green) rarely detected BrdU signal in cells, one example is shown (arrows).

Figure S9

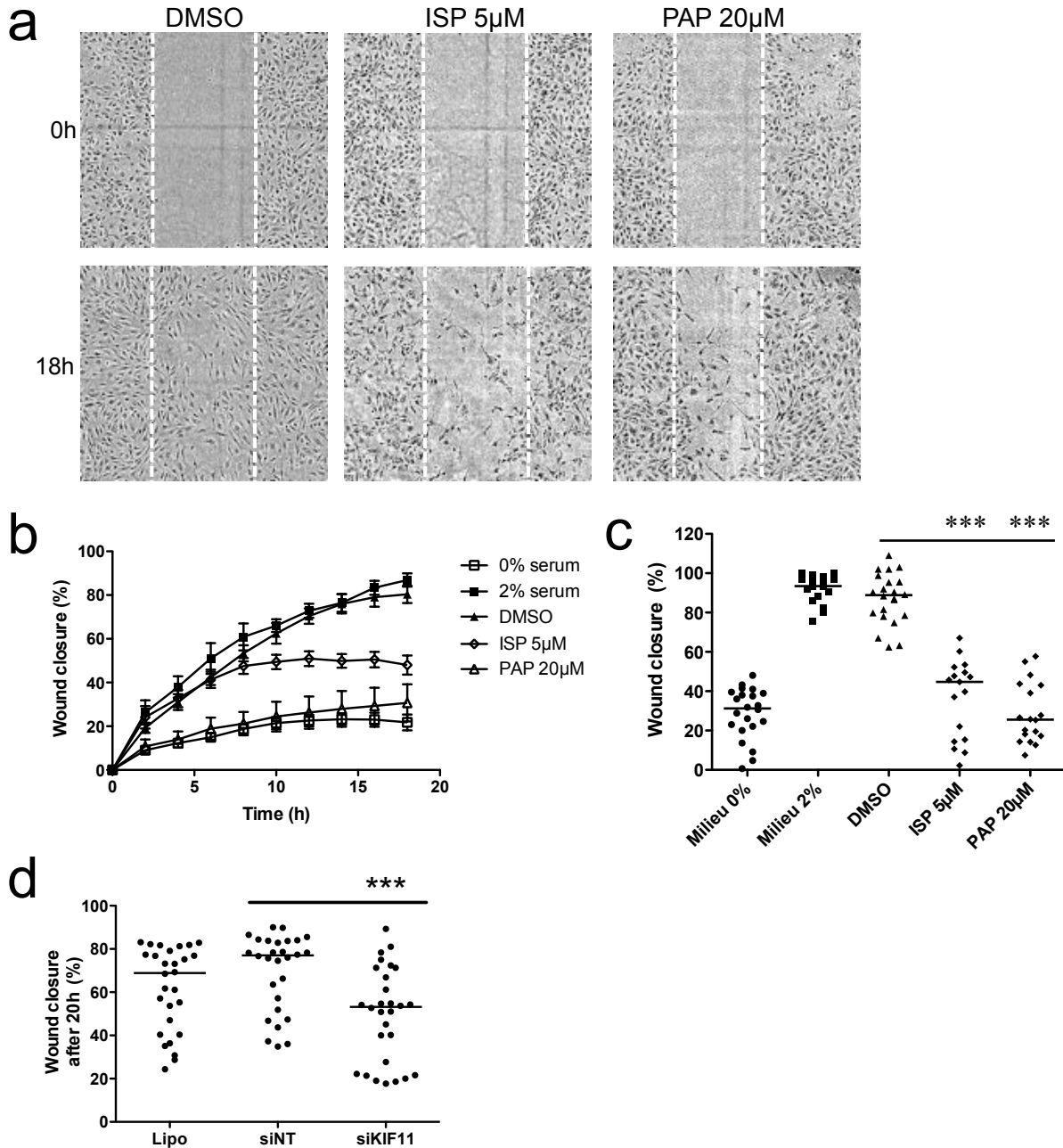
Eg5 inhibition impairs endothelial cell adhesion and spreading



a) Inhibition of Eg5 by ispinesib reduces cell adhesion of endothelial cells plated on indicated matrix proteins b) Reorganization of the actin cytoskeleton: appearance of cortical actin and strong reduction of stress fibers (arrows and insert; bar in b=50µM) c) Cell spreading is reduced significantly after Eg5 blockade ($p > 0.0001$).

Figure S10

Kinesin inhibition impairs migration of HUVECs

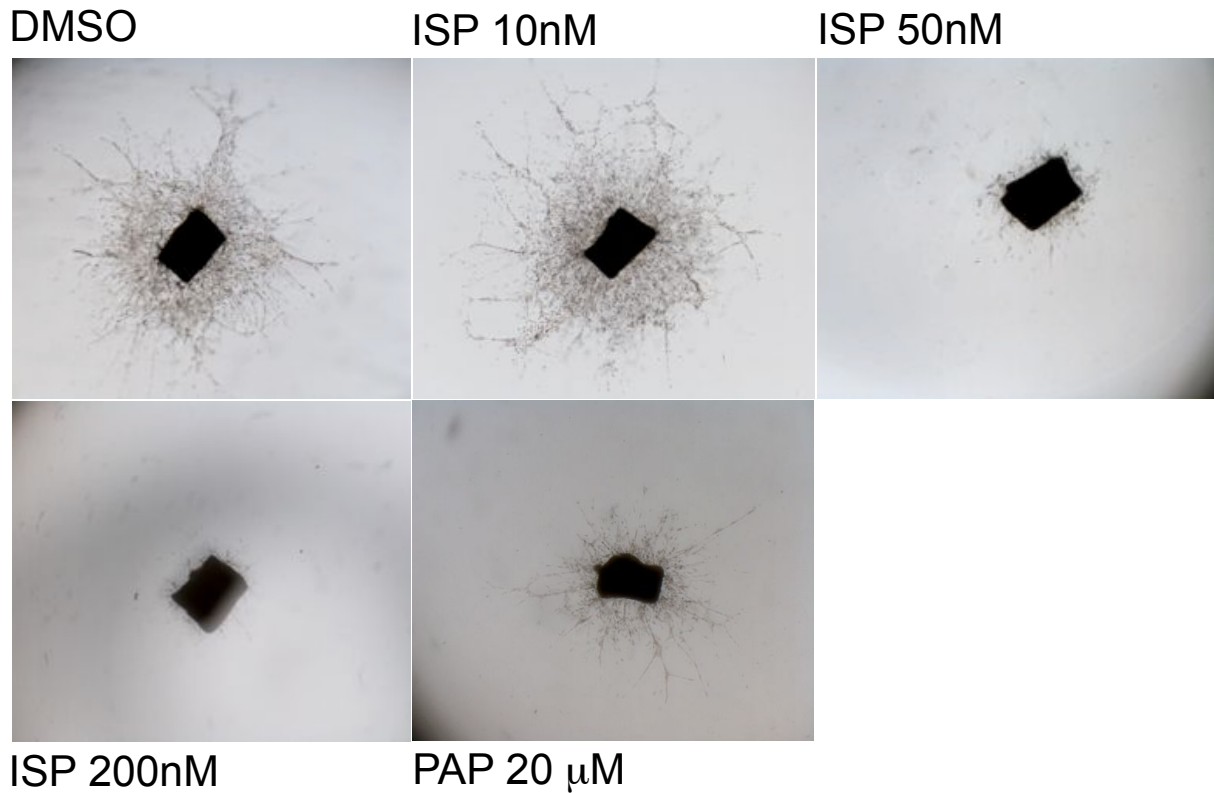


a) Representative pictures of HUVEC migration treated with indicated drugs at 0h and 18h after wounding. b) Quantification of cell migration into the wounded area over time. Percentage is indicated as mean \pm SEM. Note strong inhibition of EC migration by ISP and PAP. c) For statistical analysis, four experiments were pooled and percentages of wound closure at the last time point were compared. ISP and PAP significantly block EC migration ($P < 0.0001$). d) siRNA-mediated knock down of KIF11 also led to a significant reduction of endothelial cell migration ($P = 0.0007$).

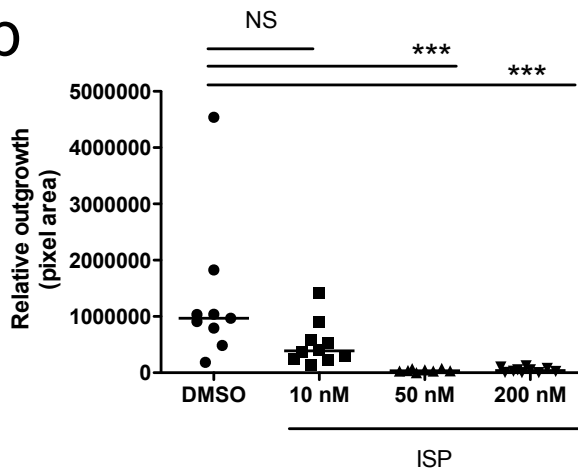
Figure S11

Eg5 and Mklp2 blockade inhibits angiogenic sprouting in the mouse aortic ring assay

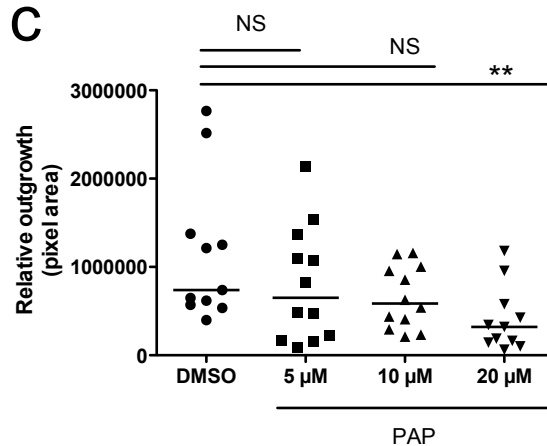
a



b



c



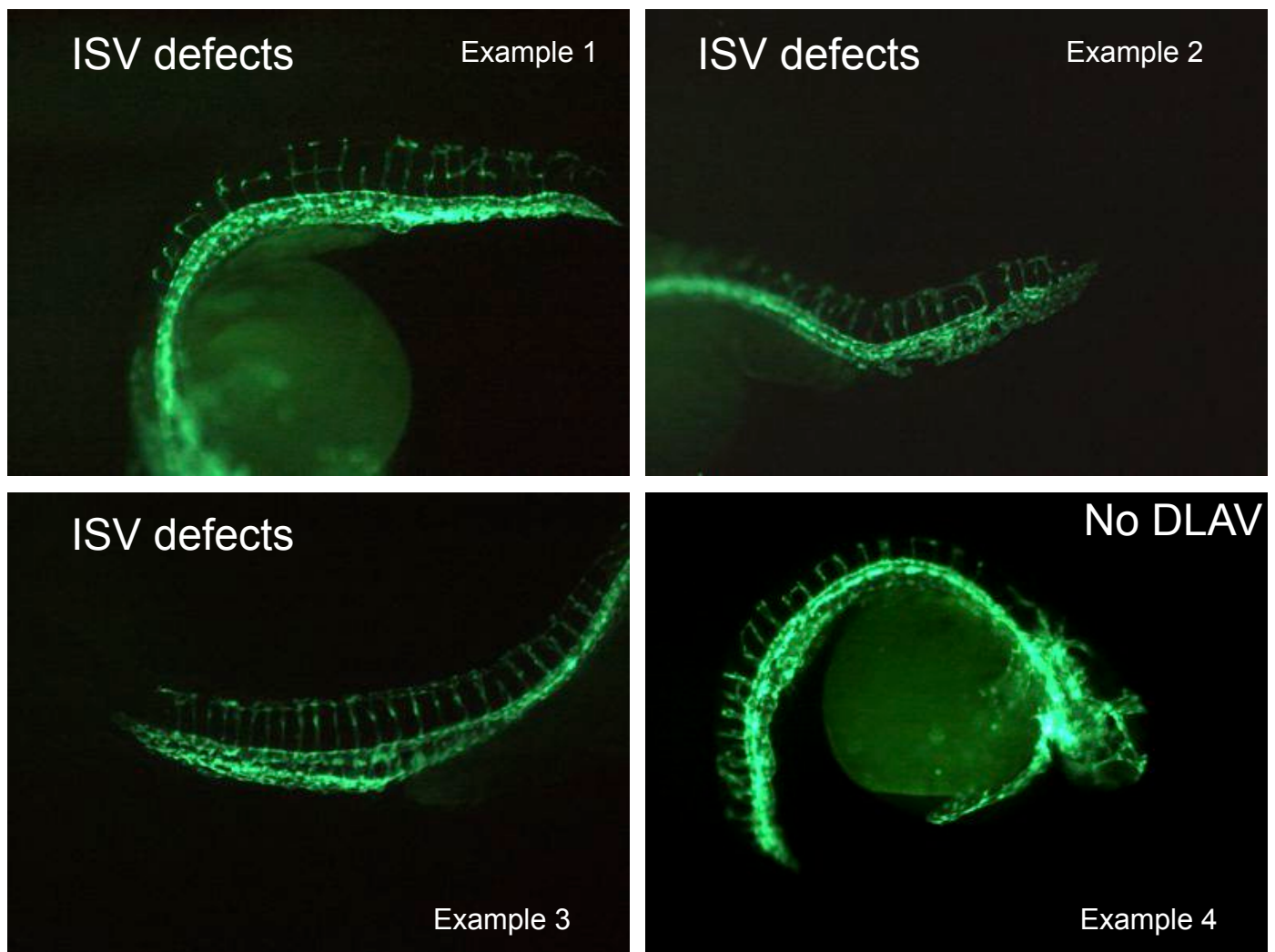
a) Representative pictures of mouse aortic rings in culture after 8 days. b) Quantification of cellular outgrowth around the aortic rings revealed significant reduction at doses around 50 nm for ispinesib and 20 μM for paprotrain.

Figure S12

a Fluorescence *in situ* hybridization; 24 hpf



b Vascular defects in *kif11* Tg(kdrl:EGFP)^{s843} morphants (48 hpf)



a) Zebrafish embryos at 24 hpf were hybridized with probes for the vascular/hematopoietic reporter transcript *fli1* (in red) or *kif11* mRNA (in green). Note that co-localisation occurs in the PBI and PCV. b) *kif11* knock-down embryos exhibited variable degrees of vascular malformation, mainly in the ISVs or the DLAV. Shown are four embryos with typical defects. Magnification x115.

Annexe 2: Combining Tocilizumab (Actemra) with Bevacizumab (Avastin) does not prevent cooption-dependent tumor growth in mouse models of glioblastome.

Virginie Godard^{1,2,*}, Nathalène Truffaux^{1,2,*}, Pascal Bardeau^{1,2}, Raphaël Pineau¹, Martin Hagedorn^{1,2}, Véronique Quillien³, Andreas Bikfalvi^{1,2}, Sophie Javerzat^{1,2}

➤ Ce papier est en cours d'écriture et présente les résultats obtenus dans les modèles de GBM U87 et GSC suite aux traitements Avastin et Actemra, présentés, en partie, dans le paragraphe III.B. Ce papier sera soumis dans International Journal of Cancer.

Short Report

Combining Tocilizumab (Actemra) with Bevacizumab (Avastin) does not prevent cooption-dependent tumor growth in mouse models of glioblastoma

Virginie Godard^{1,2,*}, Nathalie Truffaux^{1,2,*}, Pascal Bardeau^{1,2}, Raphaël Pineau¹, Martin Hagedorn^{1,2}, Véronique Quillien³, Andreas Bikfalvi^{1,2}, Sophie Javerzat^{1,2}

Affiliations of authors:

1. Univ. Bordeaux, LAMC, UMR 1029, F-33 400 Talence, France
2. INSERM, LAMC, UMR 1029, F-33 400 Talence, France
3. Centre Eugène Marquis, F-35 000 Rennes, France

* These authors contributed equally to the work

Grant support: This work was supported by La Ligue Contre le Cancer, comité d'Aquitaine and Roche (EPPA149175).

Correspondence to: S. Javerzat, INSERM U1029, Université Bordeaux 1, Bât. B2, Av. des Facultés, Talence, F-33405 CEDEX, France

e-mail: s.javerzat@angio.u-bordeaux1.fr,

Phone, +33-(0)5-4000-8702, FAX: +33-(0)5-4000-8705

Short title: Combining Actemra and Avastin for glioma therapy

Acknowledgements :

We thank Dr. Stéphane Pédeboscq for assistance with treatment, Aurélia Coronas and Maylis Delugin for help with histology, Prof. Kishimoto and Dr. Kawamura (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd) for providing Actemra, Roche for support and providing commercialized forms of Avastin and Actemra.

LONG SUMMARY

Glioblastoma (GBM) is characterized by highly malignant features and is mostly lethal one year after initial diagnosis despite resection and radio- and/or chemotherapy. Since glioblastoma is particularly angiogenic, bevacizumab (Avastin™), a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor (VEGF) has been evaluated in combination to standard chemotherapy (temozolomide, irinotecan) and is now widely proposed to patients with recurring tumors. Despite important reduction in MRI contrast enhancement and edema, this regimen does not significantly improve overall survival duration. Two recent clinical trials AVAglio and RTOG 0825, aimed at evaluating the benefit of upfront use of Avastin in addition to conventional radiochemotherapy. Both trials show that although the progression-free survival is improved by Avastin, overall survival remains unchanged. It may still be possible that specific tumor profiles significantly benefit of the upfront anti-angiogenic treatment and additional targeting molecules may improve the therapeutic effect further by controlling invasiveness frequently associated with the response.

We and others have observed a proinvasive effect of anti-VEGF treatment in experimental models of glioblastoma. For instance, RNA interference towards VEGF results in invasive behavior and proinvasive gene signature of tumors grown on the chick chorioallantoic membrane (CAM). Likewise, in mice intracranially xenografted with U87 cells, Avastin treatment enhances infiltration from the edge of the primary tumor giving rise to detached active nodules. Interestingly, de Groot and coworkers have shown that infiltrative profiles of such models compare well to histopathologic observations from human cases treated with Avastin, with markers such as factor VIII and MMP2 strongly expressed in response to treatment.

What additive therapy can be foreseen to try and control the infiltrative behavior of Avastin-treated glioblastoma? Interleukin 6 appears a good candidate. Transcriptomic database query (Oncomine™, Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI, <http://www.oncomine.org>) shows it is specifically and highly overexpressed in glioblastoma compared to healthy brain tissue (mean fold value: 5.168: p-value: 2.89. 10⁻¹⁵). Two independent studies showed IL6, the gene encoding interleukin 6, amplified and/or overexpressed in GBM patients with short survival. We have found

IL6 also upregulated during the aggressive phase of glioma growth on the CAM as well as in patients with grade IV glioma (GBM) compared to grade II. Moreover, IL6 has been shown essential for glioma progression in a transgenic mouse model. All of these observations put forward interleukin 6 as a prospective therapeutic target for glioma. We previously investigated the effect of RNA interference directed against IL6 on the growth of experimental glioma both on the CAM and xenografted mice. We showed that IL6 inhibition reduces tumor growth and vascularization with an efficacy comparable to VEGF knockdown but also results in an increased invasive behavior of the tumor cells. By contrast, combined knockdown of both IL6 and VEGF abrogates both tumor development and infiltration of residual tumor cells. These results suggested that glioma patients could benefit of an association of anti-VEGF and anti-IL6 therapeutic molecules. Indeed, invasion is the key process of recurrence under Avastin therapy and IL6 is likely implicated as it is able to strongly induce MMP-2 and fascin-1 in cultured GBM cells .

In this paper, we evaluated the effect of Tocilizumab (Actemra, Roche), a humanized antibody targeting IL6 receptor recently approved for treatment of rheumatoid arthritis. This drug was tested alone or in combination with Avastin in the highly angiogenic glioblastoma model resulting from U87 cells grafting in the brain of immunodeficient mice. We show that Actemra alone is not sufficient to significantly affect tumor development whereas combined with Avastin, it succeeds in preventing tumor angiogenesis and growth as well as infiltration better than Avastin alone. More, we find that transdifferentiation of tumor cells into functional endothelium that is induced by Avastin alone is inhibited when tumors are cotreated with Avastin and Actemra. Next, we challenged a second GBM model raised by grafting GBM patient cells with stem cells properties. The resulting tumors grow independently of angiogenesis by massively co-opting brain capillaries. In this model, neither Avastin, nor Actemra alone or combined to Avastin have a measurable effect on tumor growth and vascularization. We conclude that although Actemra seems to counteract the invasive response that occurs after anti-angiogenic stress, it is inefficient at inhibiting prevailing co-option, suggesting that this combination is likely to be inefficacious in the clinic.

Annexe 3 : Balancing risks and benefits of antiangiogenic drugs for malignant glioma

Sophie Javerzat^{1,2}, **Virginie Godard**^{1,2} & Andreas Bikfalvi*^{1,2}

- Revue publiée dans Future Medicine en mars 2013.

Balancing risks and benefits of anti-angiogenic drugs for malignant glioma

Sophie Javerzat^{1,2}, Virginie Godard^{1,2} & Andreas Bikfalvi^{*1,2}

¹University of Bordeaux, Laboratoire de l'Angiogenèse et du Microenvironnement des Cancers, Unités Mixte de Recherche 1029, F-33400 Talence, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Laboratoire de l'Angiogenèse et du Microenvironnement des Cancers, Unités Mixte de Recherche 1029, F-33400 Talence, France

*Author for correspondence: Tel.: +33 5 4000 8703 ■ Fax: +33 5 4000 8705 ■ a.bikfalvi@angio.u-bordeaux1.fr

Angiogenesis is a delicate process that has been programmed over the time of evolution of vertebrates to provide optimized quantities of oxygen and nutrients to the developing embryo and the growing newborn. Similarly, angiogenesis induction pathways are used during tumor development. Angiogenesis and tumor cell invasion are closely linked. Anti-angiogenesis treatment strategies have entered the clinic and show some promising results. However, recent research using preclinical models have pointed to possible harmful effects, including evasive resistance and increase in tumor cell invasion when VEGF activity is inhibited. This has been corroborated by observations in treated glioblastoma patients. However, the meaning of these observations is still in question. The results of Phase III clinical trials that are ongoing will certainly provide more definitive answers with regard to evasive resistance in glioblastoma treated with anti-angiogenic drugs.

The formation of new blood vessels (angiogenesis) is essential for embryonic development, postnatal growth and wound healing. It also contributes significantly to pathological conditions. Insufficient angiogenesis leads to tissue ischemia (e.g., ischemic heart disease or stroke), whereas excessive vascular growth promotes cancer, chronic inflammatory disorders (e.g., arthritis or psoriasis) or ocular neovascular diseases [1]. In the 1970s, Folkman suggested, for the first time, that blocking the blood supply of a tumor might represent a novel strategy for treating solid tumors [2]. Over the subsequent decades, researchers have gained essential insight into the biological and molecular mechanisms of angiogenic vessel growth. In this context, significant progress has been made to determine how proliferating 'angiogenic' endothelial cells differ from their nonproliferating 'quiescent' counterparts and how their survival, growth and remodeling is controlled. This has led to the development of a number of therapies aimed at modulating vessel growth in patients with angiogenesis-related diseases.

Angiogenesis inhibition has generated positive results in a number of clinical trials. VEGF itself has emerged as a critical driver of tumor angiogenesis and this pathway has become a target of choice for developing novel therapies. Several strategies targeting this pathway have been investigated in clinical studies. Agents including the small kinase inhibitors sunitinib

(SutentTM, Pfizer, NY, USA), sorafenib (NexavarTM, Bayer, Leverkusen, Germany and Onyx Pharmaceuticals, CA, USA) and the humanized monoclonal antibody bevacizumab (AvastinTM, Roche, Basel, Switzerland), which directly inhibits VEGF, have shown significant anti-tumor activity, provided survival benefits in randomized clinical trials and have become standard in several types of cancers [3].

Brain tumors are highly angiogenic and are therefore a target of choice for anti-angiogenic therapy. Among brain tumors, those belonging to the WHO grade IV gliomas – glioblastoma (GBM) – have the worst prognosis. GBM is characterized by highly malignant features and is mostly lethal 1 year after initial diagnosis despite resection and radio- and/or chemo-therapy [4]. Since GBM is particularly angiogenic, Avastin has been re-evaluated in combination with standard chemotherapy (i.e., temozolomide and irinotecan) and is now widely prescribed to patients with recurring tumors [5,6]. The results of Phase III clinical trials should be available this year and will provide definitive answers on the efficacy and safety of this therapy in GBM treatment.

In this article, the authors aim to provide a balanced discussion on the current situation of anti-angiogenic therapy in malignant glioma, from the point of view of experimental science and the impact on the clinic. The authors will review the particular features of the glioma

Keywords

- AvastinTM ■ bevacizumab
- glioblastoma ■ invasion
- multimodal therapy
- resistance ■ VEGF

vasculature, discuss the interactive relationship between angiogenesis and tumor cell invasion then describe the results derived from (anti-) angiogenesis studies in experimental models and potential mechanisms of the effects of anti-angiogenic therapy. The authors will finally review recent results from clinical studies and discuss strategies to overcome potential harmful effects of anti-angiogenesis therapy.

Angiogenesis in malignant glioma

The brain is highly vascularized and thus initially provides the tumor with abundant functional blood vessels [7].

Quantification of tumor vessel density in brain tumors in comparison with the healthy surrounding tissue has not revealed much difference, even though the morphology and functionality of tumor blood vessels is actually very different. The glioma vasculature is composed of four different classes of vessels: ‘mother vessels’, which are leaky and destabilized,

vessels with septa (ongoing intussusception), glomeruloid structures (hot spots of proliferating vessels) and vascular malformations (FIGURE 1) [8]. At the functional level, the blood–brain barrier is systematically disrupted by malignant tumors. The tortuous vessels typical of GBM are highly permeable as opposed to normal brain vessels, and are characterized by a disorganized pericyte coverage as well as an abnormal endothelial wall and basement membrane [9]. This results in heterogeneous leakiness, which in turn causes an abnormally increased blood flow rate within the tumor.

A mechanism called co-option has been described to occur in the brain at the beginning of tumor development (FIGURE 1) [10]. Normal vessels are intimately surrounded, co-opted by tumor cells, and no sprouts of neovessels are observed. Co-opted endothelial cells synthesize Ang2 and its receptor Tie-2. Ang2 binds to its receptor, present at the endothelial cell surface, induces dissociation of the mural cells from

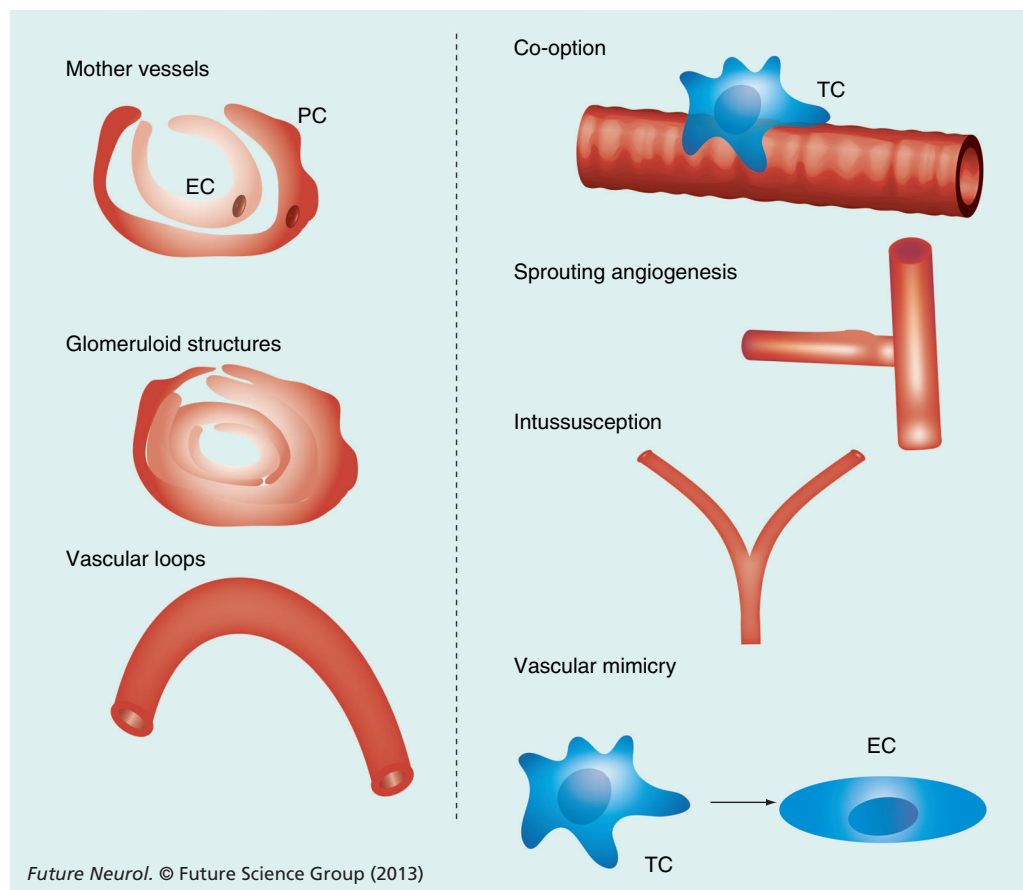


Figure 1. Type of vessels found in glioblastoma and mechanisms of vascularization. Different types of vessels are found in glioblastoma including ‘mother vessels’ that are leaky, glomeruloid structures and vascular loops. The interaction of tumor cells with the vasculature leads to co-option, sprouting angiogenesis or intussusception (vessel splitting). Furthermore, vascular mimicry and transdifferentiation of glioma cells into endothelial cells have been reported. EC: Endothelial cell; PC: Pericyte; TC: Tumor cell.

endothelial cells, inhibits Ang1 activity and increases apoptosis. Ang2 activity results in a large decrease in tumor vessel number and an increase in vessel diameter. The lack of vessels leads to hypoxia, which upregulates VEGF-A expression in tumor cells. As a consequence, strong angiogenesis develops mainly at the tumor periphery. In the tumor center, cells are organized in cuffs of pseudopalisades around the few surviving vessels [11].

In contrast to initiation of glioma growth by vascular co-option, others have described neoangiogenesis from the very beginning of tumor expansion (FIGURE 1). Tumor cells or spheroids that are injected into the brain may develop vascularization immediately by angiogenic sprouting with loss of the blood–brain barrier [12]. Ang2, as well as VEGF receptor (VEGFR) 2, is increased in a subset of endothelial cells but no vessel regression is observed. Tumor cells are organized in cuffs of pseudopalisading cells around VEGFR2-positive vessels, and they use them to invade other brain areas. Migration is facilitated by the binding of tumor cells to a basement membrane rich in laminin, collagen IV and tenascin. The enrichment in collagen allows glioma to be specifically graded by a new imaging approach, namely Fourier-transformed infrared imaging, recently developed by Petibois and coworkers [13]. This technique allows accurate identification of small blood capillaries and quantification of the extravascular diffusion [14]. Performed in xenografted mice at the onset of tumor development, it identified angiogenic processes a few days after tumor cell implantation. Winkler and his collaborators have used dynamic multiphoton laser scanning microscopy and demonstrated that tumor cells induced intussusceptive microvascular growth and capillary loop formation, specifically at the microvascular site that they had reached [15]. The fact that single invasive tumor cells are able to induce these vascular changes is quite remarkable.

Taken together, these observations indicate that gliomas are able to develop by a combination of co-option, angiogenesis and intussusception, and this occurs at an early stage of tumor development. Other mechanisms of vascularization have also been reported and include vasculogenesis, vascular mimicry and transdifferentiation from glioma cells (FIGURE 1) [16]. These latter mechanisms have only been identified recently. Vascular mimicry in GBM has been proposed by Sanson's team when they observed for the first time nonendothelial lining of human GBM blood vessels [17]. More

recently, it was reported that those mural-like tumor cells that mimic vascular tubes strongly express VEGFR2. Specific blockade of VEGFR2 impairs vascular mimicry both *in vitro* and in xenografted glioma models. Avastin has no effect, suggesting that these structures are formed by activation of VEGF intracellular signaling but independently of VEGF itself [18]. Vascular transdifferentiation from glioma stem cells was further reported in three articles in which the authors convincingly showed that a CD133⁺ subpopulation of glioma cells is capable of forming endothelial-like cells both *in vitro* and *in vivo* in experimental models [19–21]. In human GBM, tumor cells that may functionally participate in the vessel lining are detected on only rare occasions, as reported recently [22]. However, because the process seems greatly enhanced by hypoxia, at least *in vitro*, it raises the question of its possible promotion by therapeutic anti-angiogenic agents in patients. Both vascular mimicry and/or transdifferentiation may be elicited by the hypoxic stress, taking advantage of the extreme genetic instability, heterogeneity, plasticity and adaptation potential of GBM cells. Whether this phenomenon may contribute to the recurrence of GBM after Avastin treatment and to its further acquired resistance to VEGF targeting remains to be investigated. Indeed, the tumor-derived endothelial-like cells that contribute to tumor vasculature in some experimental models are devoid of VEGFR, while expressing significant amounts of FGFR1 [21].

As the authors will review below, the specificities of the brain tumor vascularization have led to paradoxical observations in animal models, such as an increase in tumor development when critical angiogenesis regulators are inhibited (e.g., HIF-1). Furthermore, this may also account for the intriguing observation that glioma cell invasion seems to be increased under anti-angiogenesis treatment (see the 'Anti-angiogenesis in experimental models of brain tumors' section).

Lessons from tumor models & live imaging

Different implantation models have been used to gain insights into tumor angiogenesis and invasion. Cell lines have been implanted in syngenic (mouse lines, e.g., GL261) or immunodeficient (human lines, e.g., U87) backgrounds. These studies have provided some insights on the natural history of tumor development and angiogenesis. For instance, the early vascular remodeling and angiogenic induction shown by Winkler's

team (as described above) has been demonstrated using orthotopically implanted GL261 cells and follow-up by multiphoton laser scanning microscopy [15]. GL261 cells expressing red fluorescent protein were tracked *in vivo* over several days in relation to the vasculature. Peri- and intravascular migration of tumor cells was observed. Invasion and migration was found to be much faster when cells moved on the abluminal side of blood vessels. Cells that invaded perivascularly were frequently found next to multiple capillary structures where microvessels run parallel to each other, capillary loops, glomeruloid-like bodies or dilated capillaries [15].

Grafting cell lines that have been maintained in adherent cell cultures have limitations because the resulting cell population contains mainly differentiated cells rather than stem and progenitor cells. In turn, the plasticity of the tumor cell population may be less substantial than in patient tumors. This may well explain why these experimental GBMs are more sensitive to anti-angiogenic drugs compared with human tumors. The Bjerkvig laboratory has recently demonstrated that highly infiltrative brain tumors with a stem-like phenotype can be established by xenotransplantation of human GBMs into immunodeficient nude rats [23]. The model consists of the implantation of spheroids from human glioma patient tumors. These tumors co-opt the host vasculature and show an aggressive infiltrative growth pattern without signs of angiogenesis. The malignant cells express several markers of neural progenitor cells and reflect the migratory behavior of human neural stem cells. Serial passages in animals gradually transform the tumors into a more aggressive angiogenesis-dependent phenotype with VEGF expression and a reduction in tumor cell migration. The described angiogenesis-independent tumor growth, represented by the stem-like cancer cells, and the uncoupling of invasion and angiogenesis, indicate two independent mechanisms that drive GBM progression. One mechanism is characterized by an extensive infiltration of tumor cells co-opting the existing vasculature, whereas the other is characterized by extensive cell proliferation and reduced invasion.

In line with these observations, the authors' laboratory has shown that IRE1, one of the three proximal sensors of the unfolded protein response, participates in the switch from an angiogenic to invasive phenotype [24]. Blockade of IRE1 signaling was achieved by overexpressing a dominant-negative form of IRE1 in U87 cells

that were subsequently grafted into the brain of immunocompromised mice. Gene profiling demonstrated that this resulted in downregulation of prevalent proangiogenic factors such as VEGF-A, IL-1 β , IL-6 and IL-8. Significant upregulation of several anti-angiogenic gene transcripts was also apparent, which included SPARC, decorin and thrombospondin-1. Abrogating the activity of the central sensor IRE1 strongly inhibits tumor angiogenesis, but also increases the invasive behavior of glioma cells in the normal brain parenchyma. This phenotype resembles that of the cellular response of anti-angiogenesis-resistant tumors.

Another very interesting approach to study glioma regulators is the use of the replication-competent avian leukosis virus long terminal repeat splice acceptor (RCAS)/tumor virus A (TVA) vectorology system, which utilizes a viral vector, RCAS, derived from the avian leukosis virus. The receptor for subgroup A-avian leukosis virus is encoded by the *TVA* gene and is normally expressed in avian cells. Expression of *TVA* in cells that are normally resistant to infection by avian leukosis virus confers susceptibility to infection by recombinant RCAS. Transgenic mice are now available that express TVA specifically under control of the nestin or GFAP promoters [25], therefore allowing the selective overexpression of oncogenes in specific brain cell types (neuronal cells, astrocytes and so on). Holland and his collaborators have used this system to express PDGF-BB or -A in the brain tissue [26]. Retroviral PDGF-BB overexpression led to the development of GBM-type tumors, whereas PDGF-A led to a low-grade oligodendroglioma phenotype. Interestingly, overexpressing PDGF-A on an Arf-/p53- background gives rise to full GBM. It is of note that the vessel structure for PDGF-BB or -A overexpressing tumors look very different. Vessels in PDGF-B mice are much better organized with better pericyte coverage of the vasculature. PDGF- β receptors, which bind to PDGF-BB, are expressed on pericytes in the vasculature, whereas the PDGF- α receptor that binds both PDGF-BB and -A is restricted to glioma cells. Thus, PDGF-BB seems essential to GBM growth by activating both tumor cell proliferation and angiogenesis [27].

Important players in glioma angiogenesis & invasion

Glioma uses many similar mechanisms to those contributing to physiological angiogenesis. On the other hand, invasion of tumor cells requires the action of a number of players,

including extracellular matrix proteins, matrix metalloproteinases (MMPs), the plasminogen activator system, adhesion receptors and rearrangements of the cytoskeleton network. Major drivers of these processes are discussed below (FIGURE 2).

VEGF & VEGFRs

The role of VEGF in GBM angiogenesis has been extensively reviewed [28]. More recent work by the Bergers laboratory elegantly demonstrated that while promoting tumor angiogenesis, VEGF also acts as a strong inhibitor of tumor cell invasion [29]. In this study, VEGF was shown to provoke the dephosphorylation of MET in the MET/VEGFR2 complex by PTP1B. Conversely, VEGF inhibition favors MET HGH-dependent phosphorylation, thereby inducing mesenchymal transition. The implication of this piece of work

for improved therapy is major, as combining VEGF and MET inhibition in models of GBM should result in significant survival benefit.

c-Met

The HGF/c-Met receptor is overexpressed in GBM. It is an interesting target because inhibition of the c-Met receptor function blocks tumor development and invasion [30]. Using a transgenic mouse model of neuroendocrine tumors (RIP tag model), McDonald *et al.* have documented that c-Met is highly overexpressed in tumor cells that exhibit a highly invasive behavior, which is efficiently limited by c-Met inhibitors [31].

It seems that c-Met is amplified and activated in a selective fashion in specific subpopulations of glioma cells. Other receptor tyrosine kinases (e.g., EGFR and PDGFRA) exhibit the same

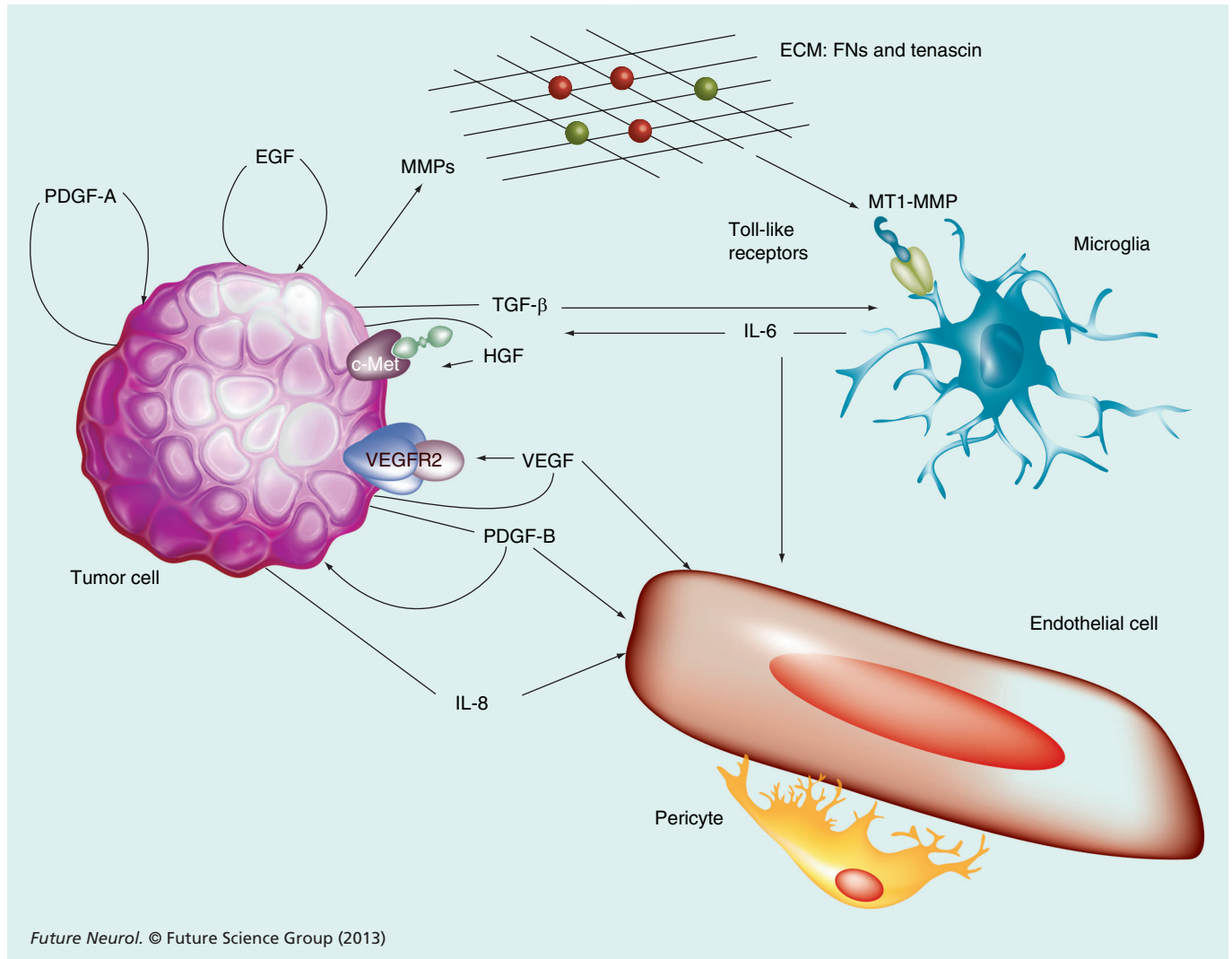


Figure 2. Major drivers of glioma invasion and angiogenesis.

c-Met: HGF receptor; ECM: Extracellular matrix; FN: Fibronectin; MMP: Matrix metalloproteinase; MT1-MMP: Membrane-type-1 matrix metalloproteinase.

feature [32]. This indicates a stable coexistence of different clones within a tumor, which may have implication for anti-tumor therapy.

Furthermore, it has been shown that c-Met is activated and functional in neurospheres enriched for GBM tumor-initiating stem cells and that c-Met expression/function correlates with stem cell marker expression and the neoplastic stem cell phenotype [33]. c-Met was found to activate the expression of reprogramming transcription factors such as Nanog, which induce stem cell properties in the neurospheres together with self-renewal.

It is assumed that stem cell-like cells exhibit features of epithelial mesenchymal transition including upregulation of many known epithelial mesenchymal transition-related genes (e.g., slug and TGF- β , among others) [34]. This again points to a more infiltrative phenotype when c-Met is activated.

Our current knowledge about c-Met and the latter data would indicate that c-Met is activated in the infiltrative phenotype and not the angiogenic phenotype observed in GBM. It has been recently reported that cultured spheroids from two human GBMs were implanted into the brains of nude rats. Growth dynamics were followed by PET using ^{11}C -methyl-L-methionine (^{11}C -MET) [35]. Surprisingly, the angiogenic growing GBM showed high uptake of ^{11}C -MET. ^{11}C -MET was an early indicator of vessel remodeling and tumor proliferation. However, infiltrative growing GBM did not accumulate ^{11}C -MET. This finding may indicate that newly synthesized c-Met is required for invasion unless the label may not reach the tumor in sufficient quantity because of a preserved blood–brain barrier.

EGF receptors

The most common genetic alteration associated with GBM is amplification or mutation of the *EGFR* gene. Interestingly, Li *et al.* showed that GBP1 is strongly upregulated by EGFR overexpressing glioma cells [36]. GBP1 is a mediator of MMP1 expression by glioma cells (while it induces MMP2 and MMP14 synthesis by endothelial cells) and all in all contributes to both invasion and angiogenesis. Another study by the same group focused on downstream effectors of the EGFR variant *EGFRvIII*. The authors identified IL-8 as the target of this specific signaling cascade involving NF- κ B and demonstrated that IL-8 is a positive regulator of angiogenesis in GBM with *EGFRvIII* mutation [37].

PDGF & receptors

PDGFs and their receptors play a determinant role in GBM initiation, growth and invasive properties. While PDGFR α is characteristic of a proneural phenotype, PDGFR β expression is correlated with stem cell properties [38,39]. PDGF-BB is also amplified in GBM of the proneural subtype [27,39]. PDGF-BB is a potent growth factor as it is able to induce GBM formation alone when overexpressed with the RCAS system [25]. As already explained in a previous section, the effect of PDGF-B is different to that of PDGF-A with regard to transformation potency and effect on the vasculature [26]. PDGF-B targets both glioma cells and the vasculature, which may explain these differences.

TGF- β receptors

TGF- β signaling is an important component in GBM development. The importance of this pathway has been recently underlined by work from the Seoane laboratory [40]. They demonstrated that stabilization of the TGF- β signaling pathway by the deubiquitinating enzyme USP15 leads to enhanced TGF- β signaling. Expression of USP15 was also amplified in subgroups of GBM patients, which conferred a poor prognosis.

The inhibition of the TGF- β pathway may also have significant consequences for therapy. In recent work, convincing evidence was provided that blocking TGF- β signaling potentiates radiation effect on GBM [41]. LY2109761, a selective inhibitor of the TGF β R-I kinase, significantly prolonged survival by inhibiting tumor invasion promoted by radiation in mice xenografted with GBM. Tumor microvessel density was strongly reduced and mesenchymal transition was attenuated. Together, these results indicate that TGF β R kinase inhibitors may be considered as radiosensitizers for GBM treatment in patients.

Fibronectin

Fibronectin (FN) is an extracellular matrix protein that plays an important role in developmental biology processes, including development of the cardiovascular system and neural crest cell migration [42]. It is known to function as a solid-phase ligand for cell surface receptors. FN also constitutes a fibrillar scaffold for the assembly of many matrix proteins such as collagens and fibrillins. In GBM, FN knock-down delays tumor growth [43]. Furthermore, the FN-matrix assembly is critical for cohesion of GBM cells,

since its blockade favors tumor cell dispersion [44]. As far as GBM angiogenesis is concerned, FN interplaying with tenascin-C behaves as a bioavailability platform for soluble factors such as VEGF, FGF2 and TGF- β [45]. FN spliced variants, including forms with the extra-domain (ED) B, EDA and CSIII domain, generate up to five different isoforms. FN-spliced EDB, EDA and CSIII variants are all overexpressed in malignant gliomas [46]. Furthermore, the activity of transglutaminase-2, which covalently crosslinks FN and contributes to FN stability, is also increased in malignant glioma. Downregulation of transglutaminase activity in gliomas leads to an inhibition of tumor invasion [47]. Although EDB is found mainly around blood vessels, the other forms are distributed more homogeneously within tumors. EDA and the other spliced forms may be used by tumor cells for direct invasion within the extracellular matrix, whereas EDB may be used for migration on blood vessels.

Proteases & their inhibitors

Many extracellular proteases and their inhibitors are expressed in malignant brain tumors and are functionally important. Among them are the plasminogen activator system, MMPs and the ADAMs-like proteases [48]. Systemic inhibition by adenoviral gene transfer of urokinase leads to impairment of GBM grown intracranially in mice [49]. Similarly, adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP2 results in the inhibition of GBM growth by impairment of angiogenesis and tumor invasion and increase in apoptosis [50].

The increase of intracellular protease activity, such as caspases in glioma, has been a focus of research [51–53]. For example, it has been shown that the combined suppression of miR-21 and neural stem cells expressing soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand leads to a synergistic increase in caspase activity, thus significantly decreasing cell viability in human glioma cells *in vitro* and eradicating gliomas in the murine brain [52].

Microglia

Microglia are an important component in brain tumors. It has been shown that microglia together with macrophages participate in tumor development by enhancing invasiveness of glioma stem-like cells through the release of TGF- β and TGFBR2 activation, resulting in increased production of MMP-9 [54]. IL-6 synthesized by the microglia in response to CCR2 activation also appears to be a major protumoral intermediate, hence the highly

invasive phenotype of CCL2-overexpressing tumor cells. Independent observations suggest that microglial IL-6 may well act by stimulating the growth of glioma stem cells and the release of MMP2 by tumor cells [55]. In turn, glioma cells clearly have a strong immunosuppressive effect that involves the recruitment of microglial cells unable to support T-cell mediated immunity. TGF- β and other growth factors such as IL-10 may further modulate the immunosuppressive environment by suppressing the activation and proliferation of microglia [56].

Furthermore, membrane type 1 MMP is upregulated in glioma-associated microglia, but not in the glioma cells [57]. Membrane type 1 MMP upregulation is induced by Toll-like receptors found on microglial cells. These receptors may be activated through their interaction with matrix proteins.

Tissue ischemia, stress & metabolism

Ischemia is associated with tumor development and locally induces an adaptive response, which confers an enhanced survival on tumor cells and more aggressive behavior. A better knowledge of tumor responses to ischemia is required to elaborate therapeutic strategies of cell sensibilization and angiogenesis inhibition, based on the blockade of survival mechanisms. Warburg demonstrated that tumor cells had high rates of glucose consumption and lactate production despite availability of sufficient oxygen to oxidize glucose completely [58]. The ‘Warburg effect’ is taken to be a metabolic hallmark of aggressive tumors and is well documented in GBM. The key enzymes that drive the ‘Warburg effect’ in GBM are IDH1/2 mutants, HK2, PKM2 and PDK [59].

It is likely that cells with higher metabolic demand such as GBM cells with infiltrating phenotype exhibit more pronounced ‘Warburg effect’. This contention is supported by the observations of the Bjerkvig laboratory [60]. They have shown that human spheroid from human patients implanted into the rat brain and treated with Avastin exhibit a decrease in contrast enhancement in functional MRI and a reduction in blood flow. The effect on tumor size was only marginal but invasion of tumor cells into the normal brain parenchyma was strongly increased. This is accompanied by a shift from oxidative metabolism to glycolysis and an increase in lactate production.

In addition, glutamine metabolism is also altered in GBM. Glutamine is a source of reduced nitrogen for maintenance of nucleotide

biosynthesis and nonessential amino acids, and for refilling the pool of precursor molecules (anaplerosis). However, the high rate of glutamine consumption in glioma cells cannot be explained by nitrogen demand imposed by nucleotide synthesis or maintenance of nonessential amino acid pools. Rather, glutamine metabolism provides a carbon source that facilitates the cell's ability to use glucose-derived carbon and the tricarboxylic acid cycle intermediates as biosynthetic precursors [61]. Blocking glutamine synthesis by silencing glutaminase leads to a reduction in tumor cell growth and the induction of an escape mechanism by upregulating pyruvate carboxylase [62]. The latter replaces glutaminase and cells become exclusively dependent on pyruvate carboxylase.

In orthotopically grown GBMs from human patients, glutamine from the bloodstream is highly accumulated in the tumor but not catabolized, which is very different from the normal brain parenchyma [63]. Glutamine may also be produced in tumor cells from glucose-derived glutamate. When expression of glutamate synthetase is investigated in tumor specimens using tissue microarray, glutamate synthetase is highly expressed in GBM relative to low-grade gliomas and oligodendrogliomas.

The relationship of glutamate and angiogenic or invasive phenotype in GBM is not elucidated at present. It is possible that glutamine contributes more to the angiogenic phenotype. It is known that glutamine deprivation leads to a hypoxia-inducible factor-independent increase in VEGF-A mRNA; however, the corresponding protein level remains low and correlates with the inhibition of protein synthesis and activation of the GCN2/eIF2 α pathway [64]. Limitation of glutamine availability also hampers hypoxia- and hypoglycemia-induced VEGF-A protein upregulation. Thus, it is possible that the reconstitution of a glutamine pool in glioma cells will again render tumor cells responsive to hypoxia- or hypoglycemia-dependent induction of VEGF.

Anti-angiogenesis in experimental models of brain tumors

Rubenstein *et al.* and Lamszus *et al.* independently provided the first observations that VEGF blockade, while inhibiting angiogenesis as expected, increases infiltration and co-option of the host vasculature by tumor cells in the experimental orthotopic implantation GBM model [65,66].

The authors have observed that RNA interference toward VEGF results in invasive behavior and proinvasive gene signature of tumors

grown on the chick chorioallantoic membrane [67,68]. Likewise, in mice intracranially xenografted with U87 cells, Avastin treatment enhances infiltration from the edge of the primary tumor giving rise to detached active nodules [67,69]. Interestingly, de Groot *et al.* have shown that infiltrative profiles of such models compare well with histopathologic observations from human cases treated with Avastin, with markers such as factor VIII and MMP2 strongly expressed in response to treatment [69].

In 2009, Casanovas *et al.* reported that while starting to be validated in preclinical models and clinical trials, anti-angiogenics elicit adaptation and progression to stages of incurable malignancy for different cancer types involving invasiveness, and sometimes lymphatic and distant metastasis, which usually does not occur in untreated gliomas [70]. When genetically modified astrocytes with a *HIF-1 α* deletion are orthotopically injected, they give rise to tumors that phenocopy the major features of human GBM [71]. If the cells are additionally impaired in their ability to synthesize VEGF, or if the tumors are treated with a VEGFR kinase inhibitor, perivascular tumor invasion prevails largely over the single-cell infiltrative pattern. These new abilities elicited by anti-angiogenics may not only favor recurrence locally, but also metastasis spreading. Future work should aim at investigating this thread.

Different mechanisms of evasive and intrinsic resistance to anti-VEGF therapies have been proposed including upregulation and use of alternative pathways such as FGFs, selection of hypoxia-resistant cells, vascular mimicry and/or transdifferentiation of glioma cells and/or induction of genes triggering invasive programs (FIGURE 3) [72]. This has been shown in several tumor types. Interestingly, in experimental mouse models, pretreatment with anti-VEGF antibodies before tumor cell implantation will prime the host tissue to promote proinvasive programs in tumor cells, suggesting that anti-VEGF therapy may induce a systemic adaptive response in the healthy tissue favoring tumor progression [73]. In this regard, the role of bone marrow-derived cells in the acquisition of resistance to anti-VEGF treatment has been shown to promote the infiltration of tumors by CD11b⁺ myelomonocytic cells [74]. The latter observation only relates to tumors that showed *de primo* resistance to anti-VEGF treatment.

As already mentioned in a previous section, Bergers laboratory have reported that blocking VEGF in experimental GBM models in mice will increase the invasive behavior [29]. VEGF

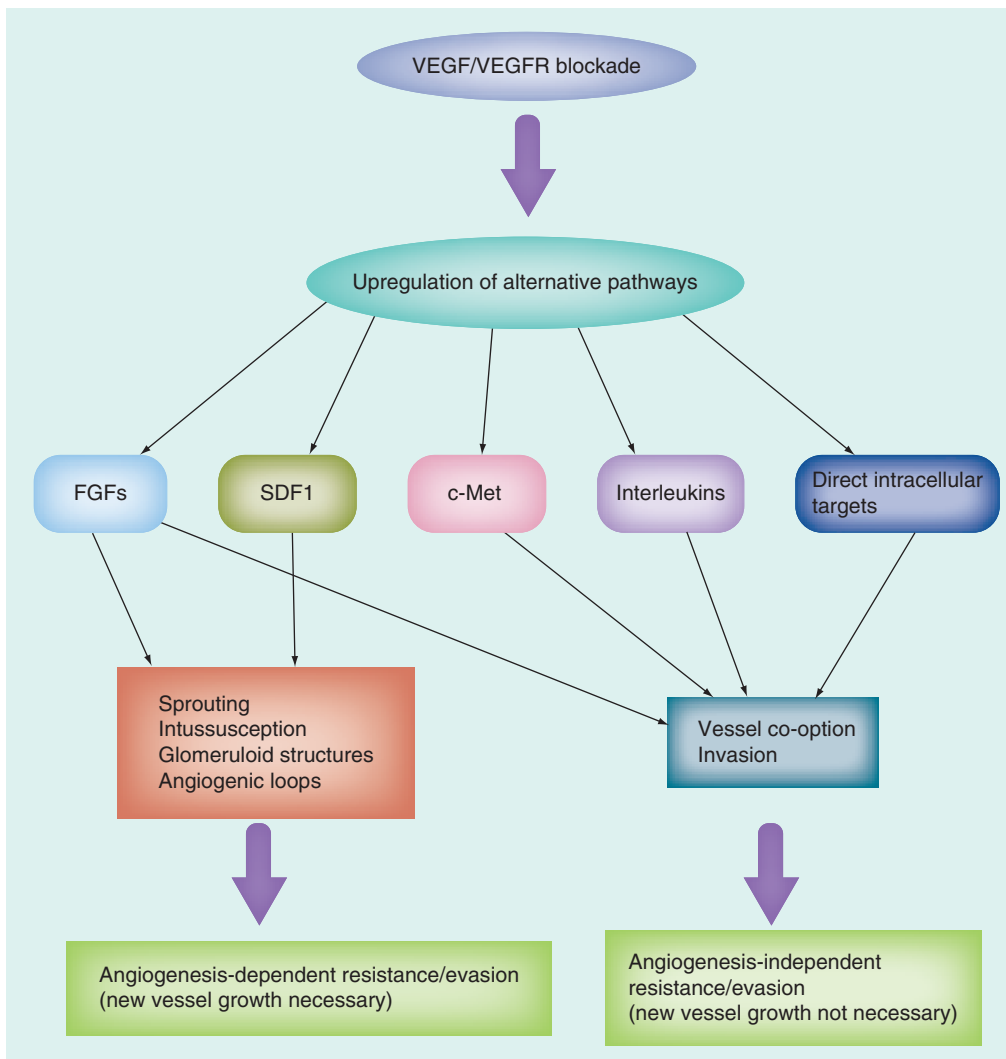


Figure 3. Potential mechanisms of resistance to anti-angiogenesis treatments. Resistance to anti-angiogenic molecules (anti-VEGF or anti-VEGF receptor) may be triggered by angiogenesis-dependent and independent mechanisms. Both require the upregulation of signaling mechanisms that ultimately will impact on the production of various mediators. Major soluble mediators are depicted. They will either promote angiogenesis by acting on sprouting, intussusception, glomeruloid structures or loop formation. On the other hand, they may also promote vessel co-option by tumor cells or directly by tumor cell invasion. An alternative mechanism is also the modulation of an intracellular signaling pathway that does not require the production of secreted mediators. Transdifferentiation of tumor cells into endothelial cells or vascular mimicry has also been proposed as an additional mechanism. VEGFR: VEGF receptor.

receptors were found to be expressed directly on glioma cells. Repression of VEGF receptor activity through ligand depletion (VEGF inhibition) will activate *c-Met* and thereby stimulates invasion. It is noteworthy that Bergers *et al.* have reported the presence of VEGFRs in samples from human patients, which makes these observations relevant to the clinic [29].

In their U87 model live-imaged by multiphoton, Winkler *et al.* did not observe increased invasive properties, although some resistant tumor cells after Avastin treatment were observed [75]. They

demonstrated that the antivasular effect of Avastin is most often paralleled by anti-tumoral effects, which supports the classical concept of tumor starvation by anti-angiogenic therapy and illustrates that Avastin does have the potency to reduce the number of cancer cells in a glioma. Some microregions within the tumor manage to escape the anti-angiogenic actions of anti-VEGF treatment and continue to grow despite disintegration of the local microvascular network. They also observed that tumor cell viability can be impaired even without concomitant changes

of the local tumor vasculature morphology, suggesting that – in addition to its antivascular properties – Avastin-based anti-VEGF therapy also modulates tumor cell biology by mechanisms independent of vascular regression. In line with the contention that Avastin may not alter the invasive properties of tumor cells, Wick *et al.* reported that the patterns of progressions are not modified in patients with GBM receiving anti-VEGF treatments [76].

Recently, Genentech Inc. (CA, USA) has evaluated the invasion-promoting effect of several anti-tumor drugs in four transgenic tumor mouse models including neuroendocrine and epithelial tumors [77]. They did observe invasion-promoting effects for tyrosine kinase inhibitors (Sutent) but not for Avastin. Unfortunately, GBM was not included in this study.

Taken together, these studies from experimental glioma models indicate that a proinvasive behavior may be induced by anti-angiogenesis therapy. However, the view that this may apply to the clinic and occurs whatever anti-angiogenic molecule is administered, needs further confirmation.

Lessons from clinical trials

Since Stupp *et al.* showed the overall survival benefit of combining radio- and chemo-therapy, standard care for newly diagnosed GBM is surgical resection, followed by adjuvant radiotherapy and concomitant adjuvant temozolomide [4]. There is an increase in progression-free survival (PFS) in patients who exhibit *MGMT* promoter methylation status. However, there is a need to further improve therapy of GBM because overall survival is not significantly improved.

There has been/is a number of clinical trials using anti-angiogenesis molecules in GBM, which lead to contrasting results (TABLE 1). Clinical observations point to efficacy (measured by significant increase of overall survival and PFS durations) of Avastin and cilengitide, but not of tyrosine kinase inhibitors (cediranib, XL-184 and enzastaurin) or decoy receptors (aflibercept ‘VEGF-trap’) in GBM patients [78]. This is surprising because cediranib and XL-184 act on a much larger spectrum of signaling molecules than Avastin does. Cediranib, for example, not only inhibits VEGFR2 but also VEGFR1, PDGF and c-Kit receptors. XL-184 will inhibit NRP1/2 and c-Met. This may be due, in part, to different pharmacokinetics because tyrosine kinase inhibitors are cleared much faster from the circulation and may not efficiently accumulate in the brain tumor tissue. Among the tyrosine kinase inhibitors, enzastaurin has a more restricted

inhibitory profile, since it primarily targets PKC- β . It is likely that PKC- β does not play a major role in driving GBM angiogenesis or invasion, which may explain the disappointing results observed in the clinical trials [79]. Aflibercept has a larger activity profile and good efficacy has been documented in preclinical studies [80]. This molecule acts as a trap (‘VEGF trap’) able to target both VEGF and PLGF with high affinity. It was expected to exhibit benefit in clinical trials. However, beside not improving survival, major toxicity was observed [81]. Thus, aflibercept is unlikely to become a member of the therapeutic arsenal for GBM treatment. It is, however, of note that most of these data were obtained from Phase II clinical trials. The only available results from Phase III studies are those obtained with cediranib versus lomustine or in combination in recurrent GBM [82] and of enzastaurin [79].

Avastin is one of the two molecules that exhibit presumed clinical benefit in Phase II clinical trials. The benefit for Avastin is, for the moment, restricted to PFS [83–85]. Addition of chemotherapy (irinotecan) did not lead to further improvement and increased side effects. The safety profile for Avastin alone was generally good and the treatment well tolerated. Two Phase III trials are ongoing at present (AVAglio and the RTOG-0825/NCT00884741) trial [86,201]. They examine the benefit of the addition of Avastin to standard temozolomide-based radiochemotherapy. From these studies, a benefit in PFS but, for the moment, not in overall survival was observed [87].

Cilengitide (EMD121974) is a synthetic arginine–glycine–asparagine penta-peptide binding to the arginine–glycine–asparagine ligand binding site on the integrin receptors AVB3 and AVB5 [88]. This will impair integrin function required for tumor angiogenesis and invasion. The clinical studies have been conducted in order to test whether cilengitide demonstrates benefit when administered in patients undergoing temozolomide and radiation therapy. Clinical data obtained at present from Phase II clinical trials demonstrated a benefit in PFS [89], although in another study this was rather modest [90]. Patients with a methylated *MGMT* promoter seemed to benefit most from the combination and cilengitide was also well tolerated [91].

A Phase III trial has been initiated on the basis of these results (CENTRIC trial/ NCT00689221) that aims to further test the benefit of cilengitide in patients with different *MGMT* methylation status [202]. Patient enrolment has now been completed. CENTRIC aims to assess the efficacy and safety of cilengitide in combination

Table 1. Efficacy and potential adverse effects of anti-angiogenesis molecules in glioblastoma trials.

Molecule	Efficacy	Type of clinical trial	Type of adverse effects and severity (%)	Ref.
Bevacizumab	PFS at 6 months (42.6% alone, 50.3% in combination with irinotecan) [83] PFS at 6 months (29%) [85] OS (9.2 months alone, 8.9 months in combination with irinotecan) [83] OS at 6 months (57%) [85]	Phase II	Hypertension (4–8) Thromboembolism (6–12.4) Retardation in wound healing (0–2.4) Bowel perforation (0–3) Proteinuria (0–3)	[83–85]
Alficercept	PFS at 6 months (7.7% for GBM, 25% for anaplastic astrocytoma) Median OS (39 weeks for GBM)	Phase II	Hypertension (10) Lymphopenia (7) Fatigue (5) Thromboembolism (3) Mucositis (3) Proteinuria (3) CNS ischemia (2–3) Hemorrhage (2) Impaired wound healing (2)	[81]
Cediranib	PFS at 6 months (25.8% in Phase II trial, 16% for Phase III trial) Median OS (227 days, Phase III)	Phase II and III	Fatigue (19) Liver test abnormalities (10–16) Hypertension (13) Diarrhea (6)	[82,96]
XL-184	PFS at 6 months (21%) ORR (8–21%) OS (NI)	Phase II	Fatigue (23) Hypophosphatemia (10) Serum lipase increase (10) Liver enzymes (9) Dose interruption/reduction observed	[97]
Enzastaurin	PFS at 6 months (6.6%) Median OS (6.6 months)	Phase III	Fatigue (6.6) Edema (5.4) Thrombocytopenia (3) Thromboembolism (2.4)	[79]
Cilengitide	PFS at 6 months 15% [89] 12% [90] Median OS (9.9 months) [89]	Phase II	Low toxicity	[89–91]

GBM: Glioblastoma; NI: No information; ORR: Overall response rate; OS: Overall survival; PFS: Progression-free survival.

with standard treatment in biomarker-defined subgroups of newly diagnosed patients with GBM. More than 500 patients have successfully been recruited into this global trial. The primary end point of the study is overall survival.

A major issue in the clinical setting is the evaluation of the response to anti-angiogenic treatment. Radiological evaluation of the treatment response may lead to false-positive results because gadolinium uptake may be reduced due to normalization of the blood–brain barrier. This may, therefore, mask the underlying tumor and explain, at least in part, the discrepancy observed between the very impressive radiological response rates and the absent, or only modest, gains in overall survival.

Anti-angiogenesis treatment in many cancers (kidney and breast, among others) has led to the observation of some side effects including hypertension, hand and foot syndrome,

thromboembolic events, gastrointestinal complications, retardation in wound healing, proteinuria or leukoencephalitis [92]. The prevalence of these effects is variable; the most frequent side effect being hypertension, fatigue, gastrointestinal disturbances and thromboembolism.

Hypertension induced by anti-VEGF treatment is due to blockade of the induction of nitrous oxide by VEGF and capillary rarefaction in the skin [93].

VEGF protects the endothelium by increasing survival and cohesion. The increase in arterial thrombotic events after Avastin treatment may be explained by disruption of endothelial cell monolayers and exposing blood to the subendothelium, which is thrombogenic. Alternatively, cell death may expose phosphatidylserines, which, by promoting antibody-dependent aggregation, also induces

thrombosis. Avastin may not only exhibit effects on the vascular endothelium, but also induce platelet activation.

Other complications include disturbance of renal function (proteinuria) [94]. This may be due to an increase in vasoconstriction in the kidney and damage to the glomeruloid structure. Furthermore, hypothyroidia, hair depigmentation and immunomodulation were observed. Hair depigmentation is most commonly observed with tyrosine kinase inhibitors.

These side effects were also observed in GBM trials albeit to various degrees (TABLE 1) [78]. Avastin was found to be relatively well tolerated in the GBM trials. Hypertension, thromboembolism, wound healing problems, bowel perforation and proteinuria were observed, but not to a higher frequency compared with other pathological situations [83–85]. Ischemic strokes and intracranial hemorrhages have been retrospectively scored in a large population of GBM patients enrolled in Phase I and II Avastin trials. This showed that each of the two side effects had occurred in less than 2% of the patients [95]. On the contrary, with aflibercept major toxicity was observed, including hypertension at a high degree, CNS ischemia, systemic bleeding, thromboembolism, proteinuria and impaired wound healing [81]. Cediranib also exhibited major side effects including hypertension to a high degree, fatigue and diarrhea [82,96]. XL-184 treatment also leads to side effects including fatigue, hypophosphatemia, serum lipase and an increase in liver enzymes. Dose interruption or reduction was also observed [97]. For enzastaurin, fatigue, edema, thrombocytopenia and thromboembolism were observed [79]. Cilengitide, on the other hand, was very well tolerated and did not lead to significant side effects [89–91].

As previously discussed, a critical question to answer is whether or not evasive resistance is observed under anti-angiogenesis treatment. Some clinical observations are pointing in this direction. For example, GBM patients treated with cediranib demonstrated a change in the growth pattern with a more pronounced infiltrative phenotype that was accompanied by increased c-Met, PDGF-C expression and myeloid infiltration [98]. A more definite answer will certainly be obtained once the Phase III clinical trial data on Avastin or cilengitide are available.

Conclusion & future perspective

Many preclinical models of GBM have pointed out an important relationship between

angiogenesis and invasion. Two opposing views are held in this respect. One view postulates that invasion is only a default mechanism that does not require additional reprogramming of tumor cells. The other view postulates that there is acquisition of an active epithelial mesenchymal transition stem cell-like phenotype within the tumor cells that will drive the infiltrative phenotype. It has been suggested from observations in cultured cells, as well as in preclinical models, that this may be induced by anti-angiogenesis.

However, the view that invasion may be increased by anti-VEGF treatment in patients is not shared by all investigators working in the field. The results of Phase III clinical trials with Avastin will be important in this regard to clearly address this issue.

Another strategy distinct from conventional anti-angiogenesis is vascular targeting. In this approach, tumor vessels are killed by targeting a specific tumor vessel antigen using monoclonal antibodies or small chemical molecules coupled to a vascular-destructive agent. For example, the L19 antibody (specific to the EDB of FN) successfully targets and destroys tumors when linked to a photosensitizer [99]. In orthotopic glioma models, Pedretti and his collaborators showed that the clinical stage immunocytokine (F16-IL2) that targets the A1 domain of tenascin-C has anti-tumor effects comparable with those elicited by Avastin in the same model [100]. It is not yet established whether resistance develops using this approach, but preclinical and clinical studies are underway to investigate this issue.

A limitation to the clinical use are adverse effects encountered with some anti-angiogenic drugs. This has led to an arrest in clinical development for aflibercept. However, Avastin is relatively well tolerated when given as monotherapy. The moderate side effects (i.e., hypertension and thromboembolism) are, however, manageable through careful follow-up, and the development of new anti-angiogenic molecules will aim at minimizing them.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

- Angiogenesis and tumor cell invasion are important features of malignant gliomas. The balance may be regulated by many different pathways.
- It has been documented experimentally that glioblastoma can undergo transition from an angiogenic to an invasive phenotype and *vice versa*.
- The invasive/infiltrative phenotype is due to the acquisition/selection of epithelial mesenchymal transition/stem cell-like features.
- It has been demonstrated that the transition from an angiogenesis to invasive phenotype can be promoted by anti-VEGF treatment in experimental models.
- The view of an active transition with acquisition of an invasive phenotype may not apply to all clinical profiles.
- Several drugs have been investigated in clinical trials in glioblastoma patients. Tyrosine kinase inhibitors or the 'VEGF trap' leads to disappointing results, while Avastin™ (Roche, Basel, Switzerland) and cilengitide have demonstrated a benefit.
- Avastin and cilengitide are relatively well tolerated in glioblastoma trials as opposed to aflibercept and cediranib.
- The results of the Phase III clinical trials will certainly provide clearer answers as to whether the transition from an angiogenic to an invasive phenotype possibly elicited by anti-angiogenic drugs is relevant to the human pathology.

References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
 - of considerable interest
1. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473(7347), 298–307 (2011).
 - **Excellent review on the tumor mechanisms of angiogenesis and its role in physiopathology.**
 2. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285(21), 1182–1186 (1971).
 - **Paradigm of the role of angiogenesis in tumor progression.**
 3. Cao Y, Arbiser J, D'Amato RJ *et al.* Forty-year journey of angiogenesis translational research. *Science Transl. Med.* 3(114), 114rv113 (2011).
 - **Historical perspective of the translation of the angiogenesis concept into the clinic.**
 4. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352(10), 987–996 (2005).
 5. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd *et al.* Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* 13(4), 1253–1259 (2007).
 6. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist* 14(11), 1131–1138 (2009).
 7. Sapieha P. Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood* 120(11), 2182–2194 (2012).
 8. Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. Tumor microenvironment and progression. *J. Surg. Oncol.* 103(6), 468–474 (2011).
 9. Plate KH, Mennel HD. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Exp. Toxicol. Pathol.* 47(2–3), 89–94 (1995).
 10. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284(5422), 1994–1998 (1999).
 - **Description of vessel co-option in gliomas driven by angiogenesis factors.**
 11. Kesari S. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Semin. Oncol.* 38(Suppl. 4), S2–S10 (2011).
 12. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A *et al.* Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J. Clin. Invest.* 109(6), 777–785 (2002).
 13. Noreen R, Moenner M, Hwu Y, Petibois C. FTIR spectro-imaging of collagens for characterization and grading of gliomas. *Biotechnol. Adv.* 30(6), 1432–1446 (2012).
 14. Noreen R, Pineau R, Chien CC *et al.* Functional histology of glioma vasculature by FTIR imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 401(3), 795–801 (2011).
 15. Winkler F, Kienast Y, Fuhrmann M *et al.* Imaging glioma cell invasion *in vivo* reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia* 57(12), 1306–1315 (2009).
 - **Live imaging of cell invasion in gliomas.**
 16. Hardee ME, Zagzag D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am. J. Pathol.* 181(4), 1126–1141 (2012).
 17. El Hallani S, Boisselier B, Peglion F *et al.* A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* 133(Pt 4), 973–982 (2010).
 18. Francescone R, Scully S, Bentley B *et al.* Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *J. Biol. Chem.* 287(29), 24821–24831 (2012).
 19. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468(7325), 829–833 (2010).
 20. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M *et al.* Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468(7325), 824–828 (2010).
 21. Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D *et al.* Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108(11), 4274–4280 (2011).
 22. Rodriguez FJ, Orr BA, Ligon KL, Eberhart CG. Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget* 3(1), 98–106 (2012).
 23. Huszthy PC, Daphu I, Niclou SP *et al.* *In vivo* models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. *Neurooncology* 14(8), 979–993 (2012).
 24. Auf G, Jabouille A, Guerit S *et al.* Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(35), 15553–15558 (2010).
 - **Description of the role of the unfolded protein response pathway in the angiogenesis/invasion transition in gliomas.**
 25. Hambardzumyan D, Amankulor NM, Helmy KY, Becher OJ, Holland EC. Modeling adult gliomas using RCAS/t-va technology. *Transl. Oncol.* 2(2), 89–95 (2009).
 - **Description of the replication-competent avian leukemia virus long terminal repeat splice acceptor technology to model glioma in mice.**
 26. Hambardzumyan D, Cheng YK, Haeno H, Holland EC, Michor F. The probable cell of origin of NF1- and PDGF-driven

- glioblastomas. *PLoS ONE* 6(9), e24454 (2011).
27. Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D *et al.* Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS ONE* 4(11), e7752 (2009).
 28. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol.* 15(4), 297–310 (2005).
 29. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA *et al.* VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* 22(1), 21–35 (2012).
 - **Interrelation and cross-talk of VEGF receptors with c-Met in gliomas during anti-angiogenesis treatment.**
 30. Martens T, Schmidt NO, Eckerich C *et al.* A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* 12(20 Pt 1), 6144–6152 (2006).
 31. You WK, Sennino B, Williamson CW *et al.* VEGF and c-Met blockade amplify angiogenesis inhibition in pancreatic islet cancer. *Cancer Res.* 71(14), 4758–4768 (2011).
 32. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP *et al.* Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* 20(6), 810–817 (2011).
 33. Li Y, Li A, Glas M *et al.* c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108(24), 9951–9956 (2011).
 - **Evidence for the relation of c-Met activation with the stem cell-like phenotype in gliomas.**
 34. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial–mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119(6), 1420–1428 (2009).
 35. Viel T, Talasila KM, Monfared P *et al.* Analysis of the growth dynamics of angiogenesis-dependent and -independent experimental glioblastomas by multimodal small-animal PET and MRI. *J. Nucl. Med.* 53(7), 1135–1145 (2012).
 36. Li M, Mukasa A, Inda M *et al.* Guanylate binding protein 1 is a novel effector of EGFR-driven invasion in glioblastoma. *J. Exp. Med.* 208(13), 2657–2673 (2011).
 37. Bonavia R, Inda MM, Vandenberg S *et al.* EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF-kappaB, interleukin-8 pathway. *Oncogene* 31(36), 4054–4066 (2011).
 38. Kim Y, Kim E, Wu Q *et al.* Platelet-derived growth factor receptors differentially inform intertumoral and intratumoral heterogeneity. *Genes Dev.* 26(11), 1247–1262 (2012).
 39. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer* 10(5), 319–331 (2010).
 - **Excellent review on the molecular pathology of glioblastomas.**
 40. Eichhorn PJ, Rodon L, Gonzalez-Junca A *et al.* USP15 stabilizes TGF-beta receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF-beta signaling in glioblastoma. *Nat. Med.* 18(3), 429–435 (2012).
 41. Zhang M, Kleber S, Rohrich M *et al.* Blockade of TGF-beta signaling by the TGFbetaR-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res.* 71(23), 7155–7167 (2011).
 42. Schwarzbauer JE, DeSimone DW. Fibronectins, their fibrillogenesis, and *in vivo* functions. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 3(7), a005041 (2011).
 43. Sengupta S, Nandi S, Hindi ES, Wainwright DA, Han Y, Lesniak MS. Short hairpin RNA-mediated fibronectin knockdown delays tumor growth in a mouse glioma model. *Neoplasia* 12(10), 837–847 (2010).
 44. Sabari J, Lax D, Connors D *et al.* Fibronectin matrix assembly suppresses dispersal of glioblastoma cells. *PLoS ONE* 6(9), e24810 (2011).
 45. Van Obberghen-Schilling E, Tucker RP, Saupé F, Gasser I, Cseh B, Orend G. Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int. J. Dev. Biol.* 55(4–5), 511–525 (2011).
 46. Wang D, Anderson JC, Gladson CL. The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors. *Brain Pathol.* 15(4), 318–326 (2005).
 47. Yuan L, Siegel M, Choi K *et al.* Transglutaminase 2 inhibitor, KCC009, disrupts fibronectin assembly in the extracellular matrix and sensitizes orthotopic glioblastomas to chemotherapy. *Oncogene* 26(18), 2563–2573 (2007).
 48. Lakka SS, Gondi CS, Rao JS. Proteases and glioma angiogenesis. *Brain Pathol.* 15(4), 327–341 (2005).
 49. Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. Intraperitoneal injection of a hairpin RNA-expressing plasmid targeting urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor and uPA retards angiogenesis and inhibits intracranial tumor growth in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 13(14), 4051–4060 (2007).
 50. Kargiotis O, Chetty C, Gondi CS *et al.* Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* in glioblastoma. *Oncogene* 27(35), 4830–4840 (2008).
 51. Gondi CS, Kandhukuri N, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. Down-regulation of uPAR and uPA activates caspase-mediated apoptosis and inhibits the PI3K/AKT pathway. *Int. J. Oncol.* 31(1), 19–27 (2007).
 52. Gondi CS, Talluri L, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. RNAi-mediated downregulation of MMP-2 activates the extrinsic apoptotic pathway in human glioma xenograft cells. *Int. J. Oncol.* 35(4), 851–859 (2009).
 53. Gondi CS, Gogineni VR, Chetty C *et al.* Induction of apoptosis in glioma cells requires cell-to-cell contact with human umbilical cord blood stem cells. *Int. J. Oncol.* 36(5), 1165–1173 (2010).
 54. Ye XZ, Xu SL, Xin YH *et al.* Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway. *J. Immunol.* 189(1), 444–453 (2012).
 - **Interrelation of microglial cells, TGF-β and glioma invasion.**
 55. Iwama S, Sugimura Y, Suzuki H *et al.* Time-dependent changes in proinflammatory and neurotrophic responses of microglia and astrocytes in a rat model of osmotic demyelination syndrome. *Glia* 59(3), 452–462 (2011).
 56. Spittau B, Wullkopf L, Zhou X, Rilka J, Pfeifer D, Kriegelstein K. Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia *in vitro*. *Glia* 61(2), 287–300 (2012).
 57. Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S *et al.* Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106(30), 12530–12535 (2009).
 58. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124(3215), 269–270 (1956).
 - **Original article by Otto Warburg on the ‘Warburg’ effect.**
 59. Wolf A, Agnihotri S, Guha A. Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 1(7), 552–562 (2010).
 60. Keunen O, Johansson M, Oudin A *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108(9), 3749–3754 (2011).
 - **Description of the inter-relation of the Warburg effect and the invasive phenotype**

- in glioblastomas and the effect of anti-angiogenic therapy.**
61. Deberardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E *et al.* Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(49), 19345–19350 (2007).
62. Cheng T, Sudderth J, Yang C *et al.* Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108(21), 8674–8679 (2011).
- **Role of glutamate metabolism in glioblastoma.**
63. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T *et al.* Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain *in vivo*. *Cell Metabol.* 15(6), 827–837 (2012).
- **Mapping of metabolic pathways in genetically diverse glioblastoma.**
64. Drogat B, Auguste P, Nguyen DT *et al.* IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* 67(14), 6700–6707 (2007).
65. Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T *et al.* Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia* 2(4), 306–314 (2000).
66. Lamszus K, Kunkel P, Westphal M. Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir. Suppl.* 88, 169–177 (2003).
67. Saidi A, Hagedorn M, Allain N *et al.* Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. *Int. J. Cancer* 125(5), 1054–1064 (2009).
68. Saidi A, Javerzat S, Bellahcene A *et al.* Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma. *Int. J. Cancer* 122(10), 2187–2198 (2008).
69. de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ *et al.* Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neurooncology* 12(3), 233–242 (2010).
- **Description of the effects of bevacizumab on tumor invasion in glioblastoma.**
70. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J *et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15(3), 220–231 (2009).
- **Description of evasive resistance during anti-angiogenic treatment.**
71. Blouw B, Song H, Tihan T *et al.* The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4(2), 133–146 (2003).
72. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8(4), 299–309 (2005).
- **Description of evasive resistance during anti-angiogenic treatment.**
73. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15(3), 232–239 (2009).
- **Description of evasive resistance during anti-angiogenic treatment.**
74. Ferrara N. Role of myeloid cells in vascular endothelial growth factor-independent tumor angiogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* 17(3), 219–224 (2010).
75. von Baumgarten L, Brucker D, Tirniceru A *et al.* Bevacizumab has differential and dose-dependent effects on glioma blood vessels and tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 17(19), 6192–6205 (2011).
76. Wick W, Wick A, Weiler M, Weller M. Patterns of progression in malignant glioma following anti-VEGF therapy: perceptions and evidence. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 11(3), 305–312 (2011).
77. Singh M, Couto SS, Forrest WF *et al.* Anti-VEGF antibody therapy does not promote metastasis in genetically engineered mouse tumour models. *J. Pathol.* 227(4), 417–430 (2012).
- **Lack of evidence of proinvasive effects of anti-VEGF antibodies in various transgenic tumor models. Glioblastoma was not tested.**
78. Seystahl K, Weller M. Is there a world beyond bevacizumab in targeting angiogenesis in glioblastoma? *Expert Opin. Investig. Drugs* 21(5), 605–617 (2012).
- **Nice review on the current status of clinical trials on anti-angiogenesis drugs in glioblastoma.**
79. Wick W, Puduvali VK, Chamberlain MC *et al.* Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 28(7), 1168–1174 (2010).
- **Lack of efficacy in glioma Phase III trial for enzastaurin.**
80. Stewart MW. Aflibercept (VEGF-TRAP): the next anti-VEGF drug. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 10(6), 497–508 (2011).
81. De Groot JF, Lamborn KR, Chang SM *et al.* Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *J. Clin. Oncol.* 29(19), 2689–2695 (2011).
- **Lack of efficacy and presence of major side effects with aflibercept in glioma Phase II trial.**
82. Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B *et al.* The efficacy of cediranib as monotherapy and in combination with lomustine compared to lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma: a Phase III randomized study. *Neurooncology* 12(Suppl. 4), 69–78 (2010).
- **Lack of efficacy in glioma Phase III trial for cediranib.**
83. Friedman HS, Prados MD, Wen PY *et al.* Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 27(28), 4733–4740 (2009).
- **Results of a Phase II clinical trial with bevacizumab.**
84. Prados M, Cloughesy T, Samant M *et al.* Response as a predictor of survival in patients with recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. *Neurooncology* 13(1), 143–151 (2011).
- **Results of a Phase II clinical trial with bevacizumab.**
85. Kreisl TN, Zhang W, Oda Y *et al.* A phase II trial of single-agent bevacizumab in patients with recurrent anaplastic glioma. *Neurooncology* 13(10), 1143–1150 (2011).
- **Results of a Phase II clinical trial with bevacizumab.**
86. Chinot OL, De La Motte Rouge T, Moore N *et al.* AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv. Ther.* 28(4), 334–340 (2011).
87. Chinot *et al.* Phase III trial of bevacizumab added to standard radiotherapy and temozolomide for newly-diagnosed glioblastoma: mature progression-free survival and preliminary overall survival results in AVAglio. *The Society of Neuro-Oncology, 17 Annual Meeting.* Washington, DC, USA, 15–18 November 2012 (Abstract OT-03).
88. Reardon DA, Cheresch D. Cilengitide: a prototypic integrin inhibitor for the treatment of glioblastoma and other malignancies. *Genes Cancer* 2(12), 1159–1165 (2011).
- **Nice review on cilengitide and its use in cancer treatment.**
89. Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T *et al.* Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic

- acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* 26(34), 5610–5617 (2008).
- **Encouraging results in a Phase II cilengitide trial.**
90. Gilbert MR, Kuhn J, Lamborn KR *et al.* Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03–02, a phase II trial with measures of treatment delivery. *J. Neurooncol.* 106(1), 147–153 (2012).
- **Encouraging results in a Phase II cilengitide trial.**
91. Nabors LB, Mikkelsen T, Hegi ME *et al.* A safety run-in and randomized Phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer* 118(22), 5601–5607 (2012).
- **Encouraging results in a Phase II cilengitide trial.**
92. Shamloo BK, Chhabra P, Freedman AN, Potosky A, Malin J, Weiss Smith S. Novel adverse events of bevacizumab in the US FDA adverse event reporting system database: a disproportionality analysis. *Drug Saf.* 35(6), 507–518 (2012).
93. Mourad JJ, Des Guetz G, Debbabi H, Levy BI. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation. *Ann. Oncol.* 19(5), 927–934 (2008).
- **Capillary rarefaction as a cause of hypertension in bevacizumab-treated patients.**
94. Hayman SR, Leung N, Grande JP, Garovic VD. VEGF inhibition, hypertension, and renal toxicity. *Curr. Oncol. Rep.* 14(4), 285–294 (2012).
95. Fraum TJ, Kreisl TN, Sul J, Fine HA, Iwamoto FM. Ischemic stroke and intracranial hemorrhage in glioma patients on antiangiogenic therapy. *J. Neurooncol.* 105(2), 281–289 (2011).
96. Batchelor TT, Duda DG, Di Tomaso E *et al.* Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 28(17), 2817–2823 (2010).
97. Wen PY, Prados M, Schiff D *et al.* Phase II study of XL184 (BMS 907351), an inhibitor of MET, VEGFR2, and RET, in patients with progressive glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 28, 15s (2010).
98. di Tomaso E, Snuderl M, Kamoun WS *et al.* Glioblastoma recurrence after cediranib therapy in patients: lack of ‘rebound’ revascularization as mode of escape. *Cancer Res.* 71(1), 19–28 (2011).
99. Palumbo A, Hauler F, Dziunycz P *et al.* A chemically modified antibody mediates complete eradication of tumours by selective disruption of tumour blood vessels. *Br. J. Cancer* 104(7), 1106–1115 (2011).
- **Efficacy of vascular targeting to eradicate tumor vessels.**
100. Pedretti M, Verpelli C, Marland J *et al.* Combination of temozolomide with immunocytokine F16-IL2 for the treatment of glioblastoma. *Br. J. Cancer* 103(6), 827–836 (2010).

Websites

201. Temozolomide and Radiation Therapy With or Without Bevacizumab in Treating Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00884741>
202. Cilengitide, Temozolomide, and Radiation Therapy in Treating Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma and Methylated Gene Promoter Status (CENTRIC). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00689221?term=Glioblastoma+Centric+trial&rank=1>

Nouveaux marqueurs des glioblastomes : valeur pronostique, profil d'expression, implication dans la vascularisation et la résistance aux anti-angiogéniques.

L'angiogénèse est une composante majeure de l'agressivité des tumeurs malignes comme le glioblastome (GBM). Pourtant le traitement des patients par l'Avastin, un anticorps bloquant du VEGF, ne leur confère qu'une augmentation limitée de la durée de survie sans progression. Les mécanismes de récurrence tumorale sont extrêmement complexes. Les glioblastomes sont en effet des tumeurs particulièrement hétérogènes sur le plan génétique, il existe très peu de marqueurs moléculaires d'expression fiables. La contribution à la récurrence des potentiels angiogéniques, infiltrants, et souches est difficile à modéliser. Notre laboratoire s'intéresse à la caractérisation de nouveaux modulateurs de l'angiogénèse, dont certains pourraient contribuer à la croissance tumorale, indépendamment ou en aval du VEGF chez les patients traités par l'Avastin. Nous avons étudié l'expression de deux gènes candidats, surexprimés de façon significative dans les GBM et dont l'expression semble liée à l'angiogénèse tumorale : DPY19L1 et KIF20A. Nous avons identifié DPY19L1 comme marqueur pronostique du GBM. Ce gène est exprimé dans les cellules musculaires lisses, où il pourrait participer à la résistance de la tumeur aux anti-angiogéniques, en interagissant avec la voie thrombospondine/TGF β . KIF20A, quant à lui, est exprimé dans les cellules souches tumorales et semble impliqué dans la vascularisation et la résistance tumorale. Dans un second temps, nous avons étudié la façon dont les GBM échappent aux traitements anti-angiogéniques, tels que l'Avastin, par la mise en place d'un système d'étude *in vitro* et *in vivo*, basé sur l'utilisation de cellules de patients atteints de GBM, ayant la capacité de pousser sous forme de neurosphères. Les cellules xénogreffées chez la souris immunodéficiente permettent le développement d'une tumeur très invasive, co-optive et insensible aux traitements anti-angiogéniques. Ces tumeurs vont donc permettre d'étudier ce mode de vascularisation, participant activement à la récurrence de la tumeur chez les patients traités avec l'Avastin, afin de développer des traitements contrecarrant ce mécanisme. Dans ce modèle, l'un des gènes candidats définis au début de ce travail, DPY19L1, semble participer à la croissance tumorale et marquer spécifiquement les cellules tumorales capables de transdifférenciation et de co-optio.

Mots clés : vascularisation, glioblastome, anti-angiogénèse, résistance/récurrence aux traitements, DPY19L1, KIF20A/MKlp2, cellules souches tumorales.

Two new markers of glioblastomas : prognosis value, expression profile, involvement in the vasculature and resistance to the angiogenesis inhibitors.

Angiogenesis is a major element driving malignancy of tumors like glioblastoma (GBM). However, Avastin, a neutralizing antibody directed against VEGF, provides only a limited therapeutical benefit in terms of progression free survival. The mechanisms of recurrence are complex due to extreme heterogeneity of glioblastoma at the genetic and tissular levels. There is a lack of diagnosis and prognosis markers for GBM. The relative contribution of the angiogenic, infiltrative, and stem potentials to tumor relapse is difficult to model. Our laboratory aims at characterizing new modulators of tumor vascularization, some of which could contribute to the tumor growth and resistance, independently or downstream VEGF in patients treated with Avastin. We have studied the expression of two candidate genes, significantly overexpressed in GBM and which expression seems to be linked to tumor vascularization: DPY19L1 and KIF20A. We identified DPY19L1 as a prognosis marker of GBM. This gene is expressed in smooth muscle cells specifically in tumoral tissue, where it could participate to tumor resistance to anti-angiogenics, by interacting with the thrombospondin/TGF β pathway. KIF20A is expressed in glioma stem cells and seems to be implicated in the vascularization and tumor resistance. Next, we have studied the way by which GBM resist to anti-angiogenics such as Avastin, by the development of an *in vitro* and *in vivo* model system, based on GBM cells cultured as neurospheres. When xenografted in immunodeficient mice, these cells induce the growth of very invasive, co-optive tumors which are insensitive to angiogenesis inhibitors. These tumors will allow investigating alternative modes of vascularization which are actively involved in tumor recurrence in patients treated with Avastin, namely co-optio and transdifferentiation and their molecular regulation. In this model, one of the candidate genes defined at the beginning of this study, DPY19L1, seems to be implied in tumor growth and specifically labels tumor cells with co-optive and transdifferentiating properties.

Key words : vascularization, glioblastoma, anti-angiogenesis, resistance/recurrence to treatments, DPY19L1, KIF20A/MKlp2, glioma stem cells.