

Physiopathologie de cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes primitifs et évaluation pré-clinique de molécules "tête de série" par une approche de biologie et de chimie médicinale

Jihu Dong

▶ To cite this version:

Jihu Dong. Physiopathologie de cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes primitifs et évaluation pré-clinique de molécules "tête de série" par une approche de biologie et de chimie médicinale. Cancer. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ036 . tel-01364267

HAL Id: tel-01364267 https://theses.hal.science/tel-01364267

Submitted on 12 Sep 2016 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la vie et de la santé (ED414) Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200)

THÈSE

présentée par : Jihu DONG

soutenue le : 15 septembre 2015

pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Sciences du Vivant,

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Physiopathologie de cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes primitifs et évaluation pré-clinique de molécules « tête de série » par une approche de biologie et de chimie médicinale

THÈSE dirigée par : Pr KILHOFFER Marie-Claude	Professeur, Université de Strasbourg
RAPPORTEURS : Dr ROMAN-ROMAN Sergio	Chef du département de recherche translationnelle, Institut Curie, Paris
Dr VIROLLE Thierry	Directeur de recherches, Institut de Biologie Valrose, Nice
AUTRES MEMBRES DU JURY :	
Dr GUENOT Dominique	Directeur de recherche, Université de Strasbourg, Examinateur Interne
Dr JUNIER Marie-Pierre	Directeur de recherche, Neuroscience Paris Seine
Dr ZENIOU Maria	Maître de conférences, Université de Strasbourg

"Fortunate are those who have learned to see, in the wild things of nature, something to be loved, something to be wondered at, something to be reverenced, for they will have found the key to a never-failing source of recreation and refreshment."

Hugh B. Cott

A ma famille

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres de mon jury, Dr Sergio ROMAN-ROMAN, Dr Thierry VIROLLE, Dr Dominique GUENOT, Dr Marie-Pierre JUNIER et Dr Maria ZENIOU. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ma thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier Pr Marie-Claude KILHOFFER. Je vous remercie d'avoir dirigé mon travail de thèse avec rigueur, tout en m'inspirant et m'encourageant à émettre des hypothèses scientifiques, à mettre en place des expériences pour tester ces hypothèses. Cette aventure de quatre ans auprès de vous était une expérience tellement enrichissante pour moi, qui n'est bien sûr pas limitée sur le plan scientifique. Je souhaite à remercier aussi Pr Jacques HAIECH d'avoir clarifié l'importance de la réflexion dans la recherche dès mon arrivée au laboratoire. J'en ai beaucoup profité durant ma thèse et j'en profiterai pour la suite de ma carrière.

Je voudrais remercier nos chères collègues dans l'équipe, Dr Maria ZENIOU, Dr Marie FEVE, Dr Emilie AUDRAN, Wanyin CHEN, Vanessa NEVES CARVALHO SANTOS et Aude DELEAU pour leur aide, leurs conseils et l'agréable ambiance qu'elles font régner au sein de l'équipe. Je souhaite particulièrement remercier Dr Nelly FROSSARD et Dr François DAUBEUF de leur aide technique précieuse pour les expériences d'histologie. Je voudrais remercier Dr Oliver NOTE de l'Université de Yaoundé et Pr Annelise LOBSTEIN de notre agréable et fructueuse collaboration. Je tiens aussi à remercier Pr Marcel HIBERT et autres membres dans l'UMR 7200, Dr Frédéric BIHEL, Dr Christophe SALOME et Dr Songlin NIU de notre collaboration agréable.

Je voudrais remercier également nos collaborateurs à Paris, Dr Hervé CHNEIWEISS et Dr Marie-Pierre JUNIER, de leur générosité d'avoir mis à notre disposition les précieuses cellules pour nos études et de nous avoir prodigué leurs conseils. Je remercie aussi à Dr Suzana ASSAD-KAHN, Dr Luiz Gustavo DUBOIS et Dr Elias A. EL-HABR de leur soutien dans la réalisation des études d'immunocytochimie et des études sur les modèles d'animal in vivo.

Je souhaite exprimer mes remerciements à tous les membres de l'équipe PCBIS (Plate-forme de Chimie Biologie Intégrative de Strasbourg), Pascal VILLA, Christel VALENCIA, Sophie GIORIA et Adeline OBRECHT, pour leur soutien technique et leurs conseils précieux.

Toutes mes excuses à ceux que je n'ai pas cités. C'était un grand plaisir de vous avoir rencontré.

Enfin, je voudrais remercier infiniment mes parents et ma sœur. Mes études en France auraient été impossibles sans votre soutien et vos encouragements. Je suis désolé pour mon absence durant les sept dernières années.

Abréviations

- **ABC** : ATP-binding cassette transporter
- **bFGF** : basic fibroblast growth factor
- BSA : albumine de sérum bovin
- CA : anhydrase carbonique
- CDKN2A : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
- CHK1/2 : checkpoint kinase 1/2
- **CMC** : carboxyméthycellulose
- **CSC** : cellule souche cancéreuse
- CSG : cellule souche cancéreuse de glioblastome
- CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
- DAB: 3,3'-diaminobenzidine
- DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
- DDPM : 4,4'-dihydroxydiphenyl-2-pyridyl-methane
- EdU : éthynyl desoxyuridine
- EGFR : epidermal growth factor receptor
- FACS : fluorescence-activated cell sorting
- FBS : sérum de veau fœtal
- FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
- FGFR : fibroblast growth factor receptor

G-CIMP : glioma-CpG island methylator phenotype

GFAP : glial fibrillary acid protein

GLUT1/3 : glucose transporter type 1/3

HIF : hypoxia-inducible factor

HREs : hypoxia-responsive elements

IDH1 : isocitrate déshydrogénase 1

LDHA : lactate déshydrogénase A

MAPKs : mitogen activated protein kinases

MCTs : monocarboxylate transporters

MET : microscopie électronique de transmission

MGMT : O6-méthylguaninie-ADN méthyltransférase

MMP : matrix metalloproteinase, métalloprotéase matricielle

mTOR : mechanistic/mammalian target of rapamycin

NBC : Na⁺/HCO⁻ co-transporter

NF-kB : nuclear factor-kappa b

NHE1 : Na⁺/H⁺ exchanger 1

OLIG2 : oligodendrocyte transcription factor 2

OSR1 : oxidative stress-responsive kinase 1

PBS : phosphate buffered saline, tampon phosphate salin

PD-1 : programmed cell death 1

PDGFRA : platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide

PDH : pyruvate déshydrogénase

- **PFA** : paraformaldéhyde
- PHD : prolyl hydroxylases-domain protein
- PI3K : phosphoinositide 3-kinase
- **PTEN** : phosphatase and tensin homolog
- **RB** : protéine du rétinoblastome
- **RIN** : RNA Integrity Number
- ROS : reactive oxygen species, dérivés réactifs de l'oxygène
- **RTK** : receptor tyrosine kinase
- SDF-1 : stromal cell-derived factor 1
- **SHH** : sonic hedgehog
- SPAK : SPS1-related proline/alanine-rich kinase
- **TCGA** : The Cancer Genome Atlas
- TERT : telomerase reverse transcriptase
- $TGF-\beta$: transforming growth factor-beta
- TMZ : témozolomide
- **TNF** : tumor necrosis factor
- TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
- VEGF : vascular endothelial growth factor
- WNK1 : with no lysine (K) kinase-1

Table des matières

1. Introc	duction	3
1.1	. Glioblastomes	3
	1.1.1. Gliomes et glioblastomes	3
	1.1.2. Taux d'incidence et pronostic	7
	1.1.3. Glioblastomes primaires et secondaires	7
	1.1.4. Facteurs de risque	8
	1.1.4.1. Facteurs de risque intrinsèques	8
	1.1.4.2. Facteurs de risque environnementaux	8
	1.1.5. Symptômes et diagnostic	9
	1.1.6. Traitements actuels	9
	1.1.6.1. Traitements symptomatiques	9
	1.1.6.2. Traitements spécifiques de première ligne	10
	1.1.6.3. Traitements pour glioblastomes récurrents	11
	1.1.7. Caractérisation moléculaire des glioblastomes	11
	1.1.7.1. Voies de signalisations altérées dans les glioblaston	nes 11
	1.1.7.2. Classification moléculaire des glioblastomes	13
	1.1.8. Traitements émergents	15
	1.1.8.1. Thérapies ciblant les voies de signalisation altérées	15
	1.1.8.2. Thérapies anti-angiogéniques	16
	1.1.8.3. Immunothérapie	17
	1.1.8.4. Optimisation des essais cliniques	18
1.2	. Glioblastomes et Cellules souches cancéreuses	18
	1.2.1. Hétérogénéité tumorale	18

1.2.1.1. Modèle stochastique et Evolution clonale
1.2.1.2. Modèle hiérarchique et Cellule souche cancéreuse20
1.2.1.3. La découverte des CSCs20
1.2.2. Cellules souches cancéreuses de glioblastome (CSGs)21
1.2.2.1. Identification des CSGs21
1.2.2.2. Propriétés des CSGs22
1.2.2.3. Marqueurs des CSGs23
1.2.2.4. Voies de signalisation24
1.2.2.4.1. Notch24
1.2.2.4.2. Sonic Hedgehog25
1.2.2.4.3. Wnt/β-caténine26
1.2.2.4.4. TGF-β27
1.2.2.5. CSGs et résistance aux traitements27
1.2.2.5.1. Radiorésistance27
1.2.2.5.2. Chimiorésistance28
1.3. Microenvironnement tumoral, Glioblastome, Implication thérapeutique
1.3.1. Définition du microenvironnement tumoral29
1.3.2. Hypoxie
1.3.2.1. Hypoxie dans le glioblastome
1.3.2.2. Niche vasculaire et Niche hypoxique des CSGs31
1.3.2.3. Hypoxie et état souche34
1.3.2.4. Hypoxie, angiogenèse et invasion
1.3.2.5. Hypoxie et radio/chimiorésistance
1.3.2.5.1. Radiorésistance35
1.3.2.5.2. Chimiorésistance

1.3.3. Acidité tumorale	36
1.3.3.1. Acidité et Métabolisme tumoral : effet Warburg et autr	es
	36
1.3.3.2. Acidité et invasion tumorale	38
1.3.3.3. Acidité et plasticité cellulaire	39
1.3.3.4. Acidité et immunosuppression	39
1.3.3.5. Acidité et résistance aux traitements	40
2. Matériels et méthodes	45
2.1. Culture cellulaire	45
2.1.1. Les cellules TG1 et OB1	45
2.1.1.1. Conditions de culture cellulaire	45
2.1.1.2. Mise en quiescence des cellules	46
2.1.1.3. Congélation et décongélation des cellules	46
2.1.2. Les cellules U87-MG	46
2.1.3. Les astrocytes humains	47
2.2. Evaluation de l'état de la prolifération des cellules TG1 et OB1	47
2.2.1. Test d'incorporation d'EdU	48
2.2.2. Analyse du cycle cellulaire et de l'expression de ki67	48
2.3. Test de senescence	48
2.4. Evaluation de l'expression des marqueurs de surface des CSGs	49
2.4.1. Détection de CD133 par cytométrie en flux	49
2.4.2. Détection de CD56 et CXCR4 par immunofluorescence	49
2.5. Test de clonalité	50
2.6. Différenciation des CSGs in vitro	50
2.7. Evaluation de la capacité tumorigène in vivo des CSGs	50
2.8. Extraction et contrôle de la qualité des ARN. PCR quantitative	51

2.9. Expression des marqueurs de pluripotence et de différenciation dar les CSGs	าร 51
2.10. Evaluation de l'activité cytotoxique du bisacodyl / DDPM sur les cellules TG1 et OB1	53
2.11. Préparation du milieu NS34 à différents pH	54
2.12. Détection de la fragmentation d'ADN par la méthode TUNEL	54
2.13. Microscope électronique en transmission	54
2.14. Analyse des protéines phosphorylées à l'aide de la puce «Human Phospho-Kinase Array»	55
2.15. Analyse de la kinase WNK par Western blot	56
2.16. Génération des macrosphères clonales	56
2.17. Caractérisation des macrosphères	57
2.17.1. Immunohistochimie	57
2.17.2. Détection de l'hypoxie	57
2.18. Pharmacocinétique, bio-distribution	58
2.18.1. Pharmacocinétique	58
2.18.2. Bio-distribution	58
2.19. Effet du bisacodyl sur la capacité d'initiation de tumeur des CSGs	59
Résultats sur l'étude du bisacodyl / DDPM	63
3.1. Caractérisation de la quiescence des CSGs	63
3.1.1. La mise en quiescence des CSGs	63
3.1.2. Quiescence et viabilité cellulaire	64
3.1.3. Expression du marqueur de prolifération Ki67 et analyse du cycle cellulaire lors de la mise en quiescence des cellules	66
3.1.4. Mesure de la senescence des cellules	68
3.1.5. Réversibilité de l'état quiescent	68
3.1.6. Maintien des propriétés des CSGs dans l'état quiescent	69

3.

3.1.6.1. Evaluation de l'expression des marqueurs CSGs70
3.1.6.1.1. Marqueurs de pluripotence et de différenciation 70
3.1.6.1.2. Marqueurs de surface71
3.1.6.2. Evaluation de la capacité d'auto-renouvellement par le test de clonalité72
3.1.6.3. Evaluation de la capacité de différenciation73
3.1.6.4. Evaluation de la capacité tumorigène in vivo75
3.2. Mode d'action du bisacodyl sur les CSGs isolées78
3.2.1. Impact du milieu de culture sur l'activité du bisacodyl / DDPM
3.2.2. Rôle du pH80
3.2.3. Type de mort cellulaire induite par le bisacodyl/DDPM83
3.2.4. Etudes des voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire induite par le DDPM87
3.3. Etude des relations structure-activité du bisacodyl90
3.3.1. Importance des groupements hydroxyphenyles
3.3.2. Importance du cycle pyridine97
3.3.3. Synthèse des dérivés du DDPM avec des espaceurs98
3.4. Effet du bisacodyl / DDPM sur des modèles <i>in vitro</i> de tumeurs par culture de CSGs en 3 dimensions99
3.4.1. Obtention de macro-sphères clonales de CSGs
3.4.2. Hétérogénéité structurale et cellulaire des macrosphères101
3.4.3. Effet du bisacodyl/DDPM sur les CSGs cultivées en macrosphères
3.5. Evaluation de l'activité antitumorale du bisacodyl <i>in vivo</i> chez l'animal
3.5.1. Etudes de la pharmacocinétique et de la biodistribution 113

3.5.1.1. Pharmacocinétique	. 113
3.5.1.2. Biodistribution. Détection de bisacodyl / DDPM dans cerveau	le 114
3.5.2. Effet du bisacodyl sur des animaux xénogreffés avec des C	SGs 116
3.5.2.1. Xénogreffes ectopiques de CSGs prétraitées avec d bisacodyl	u 116
3.5.2.2. Xénogreffes orthotopiques de CSGs	. 117
4. Discussion sur le travail réalisé avec le bisacodyl / DDPM	.123
4.1. Bisacodyl et reprofilage de médicaments	.123
4.1.1. Définition	.123
4.1.2. Histoire du reprofilage de médicaments	.123
4.1.3. Avantages et limites du reprofilage de médicaments	.124
4.1.4. Exemples et situation actuelle	.125
4.1.5. Conclusion sur le reprofilage	.126
4.2. Cibler les CSGs en quiescence	.127
4.2.1. Quiescence des CSGs et résistance aux traitements	.127
4.2.2. Caractérisation de la quiescence des CSGs	.128
4.3. Mode d'action du bisacodyl/DDPM	.130
4.3.1. Mécanisme d'action décrit dans la littérature	.130
4.3.2. Rôle de l'acidité et de l'état de quiescence dans l'activité cytotoxique du bisacodyl / DDPM	.131
4.3.3. Modification de l'état de phosphorylation	.132
4.4. Modèle de macro-sphère de CSGs	.134
4.4.1. Modèle 3D dans la recherche sur le cancer	.134
4.4.1.1. Avantages des modèles 3D	.134
4.4.1.2. Classification des modèles en 3D	135

4.4.1.2.1. Sphéroïdes de tumeur multicellulaires136
4.4.1.2.2. Tumorosphères137
4.4.1.2.3. Sphères dérivées du tissu tumoral
4.4.1.2.4. Sphéroïdes organotypiques multicellulaires138
4.4.2. Caractérisation des macro-sphères de CSGs TG1 et OB1 139
4.4.2.1. Cinétique de croissance et hétérogénéité des sphères 139
4.4.3. Action du bisacodyl/DDPM sur les macro-sphères de CSGs141
4.5. Ciblage du microenvironnement tumoral144
4.5.1. Microenvironnement et plasticité des cellules tumorales144
4.5.2. Stratégies thérapeutiques ciblant le microenvironnement tumoral145
5. Conclusions et perspectives sur le bisacodyl / DDPM comme agent antitumoral potentiel149
6. Etude bio-guidée et isolement d'une molécule active sur le CSGs à partir d' <i>Albizia lebbeck</i>
7. Bibliographie159
8. Annexe
8.1. Annexe I Articles parus192
8.1.1. Annexe I.1 Chemical library screening and structure-function relationship studies identify bisacodyl as a potent and selective cytotoxic agent towards quiescent human glioblastoma tumor stem-like cells
8.1.2. Annexe I.2 Triterpenoid saponins from <i>Albizia lebbeck</i> (L.) Benth and their inhibitory effect on the survival of high grade human brain tumor cells
8.1.3. Annexe I.3 Triterpenoid saponins from <i>Albizia boromoensis</i> Aubre´v. & Pellegr237

8.1.4. Annexe I.4 Comparative Expression Study of the Endo-G	
Protein Coupled Receptor (GPCR) Repertoire in Human	
Glioblastoma Cancer Stem-like Cells, U87-MG Cells and Non	
Malignant Cells of Neural Origin Unveils New Potential	
Therapeutic Targets24	.3
8.2. Annexe II Articles en cours de rédaction26	4
8.2.1. Annexe II.1 Bisacodyl and its cytotoxic activity on glioblastoma	a
stem-like cells in vivo and in vitro in a tumor-like	
microenvironment26	4
8.2.2. Annexe II.2 Proteomic cell surface immunophenotyping of	
Glioblastoma Cancer Stem-like cells reveals CD205 and	
CD109 as differential biomarker26	6

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition du milieu de culture NS34	.45
Tableau 2. Liste des gènes dans les puces TaqMan Human Stem Cell	
Pluripotency (Applied Biosystems, Life Technologies).	.52
Tableau 3. Effet des dérivés (GSC-X) du bisacodyl sur les cellules TG1	en
prolifération (P) et en quiescence (Q)	.96
Tableau 4. Concentration plasmatique du bisacodyl et du DDPM à	
différents temps après injection i.p. de bisacodyl.	113
Tableau 5. Concentration du bisacodyl et du DDPM dans le cerveau de	S
souris après injection i.p	116

Liste des figures

Figure 1. Distribution des gliomes du cerveau et du CNS par sous-types histologiques4
Figure 2. Les 3 principales voies de signalisation altérées dans les glioblastomes primaires13
Figure 3. Classification de glioblastomes en fonction de leur profil moléculaire
Figure 4. Initiation et développement des tumeurs19
Figure 5. Schéma simplifié de la voie Notch24
Figure 6. Schéma simplifié de la voie Sonic Hedgehog (SHH)25
Figure 7. Schéma simplifié de la voie Wnt/β-caténine
Figure 8. Coupe d'une tumeur de glioblastome avec la coloration Hématoxyline & Eosine
Figure 9. Niche vasculaire et hypoxique des CSGs
Figure 10. Régulation du pH intracellulaire (pHi.) dans les cellules cancéreuses
Figure 11. Images en contraste de phase des CSGs TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence
Figure 12. Incorporation de l'EdU dans les CSGs TG1 et OB1 en fonction du nombre de jours en culture sans renouvellement de milieu64
Figure 13. Viabilité des cellules TG1 en fonction du nombre de jours en culture sans renouvellement de milieu65
Figure 14. Cycle cellulaire et expression du marqueur de prolifération Ki67 des CSGs TG1 et OB1 dans différentes conditions de culture.67
Figure 15. Test de senescence dans les CSGs en quiescence
Figure 16. Suivi par mesure de l'incorporation d'EdU de l'entrée puis de la sortie des CSGs de l'état de quiescence
Figure 17. Expression des gènes associés à la pluripotence et à la

différenciation dans les CSGs en prolifération et en quiescence71
Figure 18. Expression des marqueurs de surface dans les CSGs en prolifération et en quiescence
Figure 19. Evaluation de l'auto-renouvellement des CSGs en prolifération et en quiescence par le test de clonalité
Figure 20. Changements morphologiques des cultures de CSGs TG1 et OB1 en absence et en présence de sérum74
Figure 21. Capacité de différenciation des CSGs en prolifération et en quiescence évaluée par l'expression de marqueurs75
Figure 22. Capacité tumorigène <i>in vivo</i> des CSGs en prolifération et en quiescence
Figure 23. Structure du bisacodyl et du 4,4'-dihydroxydiphenyl-2- pyridyl-methane (DDPM)
Figure 24. Effet du DDPM sur les cellules TG1 et OB179
Figure 25. Impact du milieu de culture sur l'effet du DDPM80
Figure 26. Suivi du pH du milieu de culture et de l'incorporation d'EdU lors de la mise en quiescence des cellules TG181
Figure 27. Impact du pH sur l'effet du DDPM82
Figure 28. Impact de l'inhibiteur de caspase Z-VAD sur l'activité du bisacodyl
Figure 29. Etudes de la fragmentation d'ADN par analyse du cycle cellulaire
Figure 30. Etudes de la fragmentation d'ADN par la technique TUNEL85
Figure 31. Images de microscopie électronique à transmission (MET) de cellules OB1 en absence ou présence de DDPM
Figure 32. Etude des modifications de phosphorylation de protéines sous l'effet du DDPM
Figure 33. Expression et phosphorylation de la kinase WNK1 dans les cellules OB1

Figure 34. Effet d'inhibiteurs de transporteurs ioniques sur les CSG TG1.
Figure 35. Fixation d'une molécule avec un groupe amine sur les billes de sepharose activés par le bromure de cyanogène (CNBr)
Figure 36. Formation des macrosphères clonales à partir d'une cellule TG1 et OB1
Figure 37. Suivi de la croissance des macrosphères clonales de cellules TG1 et OB1
Figure 38. Coloration à l'hématoxyline / éosine d'une coupe de macrosphère formée à partir d'une cellule TG1102
Figure 39. Etat de la prolifération des cellules dans les macrosphères.
Figure 40. Gradient d'oxygène dans les macrosphères clonales de CSG.
Figure 41. Expression des transporteurs de glucose dans les macrosphères
Figure 42. Schéma représentatif du modèle <i>in vitro</i> de CSGs cultivées en 3D
Figure 43. Effet du DDPM sur les macrosphères de CSGs108
Figure 44. Activité sélective du DDPM sur les cellules à l'intérieur de la macrosphère
Figure 45. Importance du gradient à travers de la macrosphère dans l'activité du DDPM
Figure 46. Effet protecteur du composé S0859 vis-à-vis de l'activité cytotoxique du DDPM sur les macrosphères de CSGs
Figure 47. Effet du TMZ sur les macrosphères de CSGs
Figure 48. Concentration plasmatique du DDPM après injection de bisacodyl à des souris
Figure 49. Détection du bisacodyl et du DDPM dans le cerveau de souris.

	115	
Figure 50. Effet du pré-traitement au bisacodyl sur la capacité des C	SGs	
à initier des tumeurs <i>in vivo</i>	117	
Figure 51. Représentation schématique du protocole de traitement o	des	
souris par le bisacodyl	118	
Figure 52. Effet du bisacodyl <i>in vivo</i> .	119	
Figure 53. Préparation des modèles en 3D.	136	
Figure 54. Comparaison de sphère de CSG à la tumeur de glioblastome.		
	140	
Figure 55. Albizzia lebbeck (L.) Benth.	156	
Figure 56. Structure des lebbeckosides.	157	

1. Introduction

1. Introduction

1.1. Glioblastomes

1.1.1. Gliomes et glioblastomes

Les gliomes sont des tumeurs d'origine gliale. Ils représentent 28% des tumeurs primaires et 80% des tumeurs malignes du cerveau et du système nerveux central [1].

Selon leurs caractéristiques histologiques et leur degré de malignité, les gliomes sont classés en 4 grades par l'OMS [2].

Les gliomes de grade I sont considérés comme des tumeurs bénignes. La résection chirurgicale est curative. Les gliomes de grade II sont souvent désignés « bas-grade ». Les patients atteints de gliomes de grade II nécessitent une surveillance par l'IRM pour la récurrence de la tumeur. Les gliomes malins sont les gliomes de grade III et de grade IV. Les gliomes de grade III sont caractérisés par des atypies nucléaires et une activité mitotique importante. Ils peuvent progresser vers des gliomes de grade IV. Les glioblastomes sont des gliomes de grade IV qui correspondent à la forme la plus maligne de gliome. Ils sont caractérisés par une activité mitotique importante, la prolifération microvasculaire et la nécrose.

Les glioblastomes représentent 54,7% des gliomes (**Figure 1**) et 45,6% (la forme la plus fréquente) de toutes les tumeurs primaires malignes du cerveau.



Figure 1. Distribution des gliomes du cerveau et du CNS par sous-types histologiques. D'après le rapport du CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States), 2007-2011 [1].

Cependant, cette classification des gliomes basée sur leurs profils histopathologiques et leur grade n'est pas satisfaisante car il existe une discordance inter-observateurs conduisant à un manque de reproductibilité.

En 2010, les GBM des patients adultes ont été classés par Verhaak et coll. et le consortium TCGA (The Cancer Genome Atlas) sur la base de leurs signatures transcriptomiques en 4 classes : Proneural, Neural, Mésenchymateux et Classique [3]. En 2012, Sturm et coll. [4] montrèrent que la classification précédente pouvait être affinée en prenant en compte les profils épigénétiques et définissaient 6 sous-groupes biologiques de GBM incluant les GBM pédiatriques et adultes. Ces 6 groupes sont corrélés avec le statut mutationnel, les aberrations dans le nombre de copies d'ADN (CNAs), les signatures transcriptomiques et les 6 clusters de méthylation trouvés par les auteurs. Ces 6 sous-groupes sont notés : « IDH », « K27 », « G34 », « RTK I (PDGFRA) », « Mésenchymateux » et « RTK II (Classic) ». Le groupe IDH présente des mutations du gène codant l'isocitrate déshydrogénase (*IDH1* plus particulièrement) et une hypermétylation globale. Le groupe G34 présente une substitution d'acides aminés dans l'histone H3 (variant

H3.3 codé par le gène H3F3A) et correspond à des tumeurs présentant une hypométhylation globale, mais particulièrement prononcée dans les régions sub-télomériques. Cette mutation caractérise plus particulièrement le jeune adulte, alors que le mutation K27 de l'histone H3 est caractéristique des GBM pédiatriques. Les tumeurs du groupe RTK I présente généralement une amplification de PDGFRA alors que dans le groupe RTK II on observe avec une fréquence élevée l'amplification de l'ensemble du chromosome 7, la perte totale du chromosome 10, la délétion homozygote de CDKN2A et l'amplification de EGFR. Le groupe mésenchymateux a un profil de méthylation se rapprochant de celui du tissu sain, ne présente pas les CNAs caractéristiques des GBMs, rencontrés dans les GBM, présente généralement moins de variations dans le nombre de copies et pas de mutations caractéristiques. En prenant en compte les signatures transcriptomiques des 6 sous-groupes définis dans cette étude, un rapprochement a pu être établi avec les 4 sous-groupes définis par Verhaak et coll. [3].Les sous-groupes IDH, K27 et RTK I ont des profils transcriptomiques se rapprochant du groupe « Neural », RTK II se rapproche du groupe « Classique », G32 à un profil mixte. Les tumeurs avec des signatures transcriptomiques de type « Mésenchymateux » se retrouvent majoritairement dans un seul sous-groupe de méthylation et constituent dans cette étude de Sturm et coll. le sous groupe « Mésenchymateux ».

Des études récentes suggèrent qu'il est possible de classer les différentes formes de gliomes selon leurs profils moléculaires et que cette classification moléculaire est plus performante que la classification histopathologique pour capturer les caractéristiques biologiques des gliomes.

Une étude publiée en 2015 [5] montre que les gliomes diffus de grade II, III et IV peuvent être classés en 5 groupes moléculaires en fonction de leurs profils pour 3 altérations moléculaires à savoir la co-délétion chromosomique 1p/19q, des mutations dans *IDH1/2* (isocitrate dehydrogenase1/2) et des mutations dans le promoteur de *TERT* (telomerase reverse transcriptase). Ces 3 altérations ont été retenues en raison de leur apparition précoce dans le développement des gliomes, leur prévalence dans les gliomes ou leur forte association à la survie globale des patients. La co-délétion 1p/19q est associée à une histologie de type oligodendroglial et à une sensibilité aux agents alkylants. Les mutations dans *IDH1/2* ne sont pas associées à un groupe histopathologique particulier, mais conduisent à des altérations métaboliques. Les mutations dans le promoteur de *TERT* induisent une augmentation de l'activité télomérasique cellulaire et une

augmentation de la longueur des télomères.

En considérant ces 3 altérations moléculaires, les gliomes ont été classés en 5 groupes :

- groupe des « triple-positifs » (présence de toutes les 3 altérations),
- groupe des « triple-négatifs »,
- groupe avec des mutations dans TERT et IDH,
- groupe avec des mutations dans IDH,
- groupe avec des mutations dans le promoteur de TERT.

Ces groupes moléculaires peuvent être associés de manière pertinente à l'âge du patient au moment du diagnostic, à la survie, à des profils de mutations génétiques acquises ainsi qu'à des variants génétiques.

Les groupes « triple négatif » et « mutations dans *TERT* » couvrent 97% des gliomes analysés.

Parmi les 472 gliomes de grade IV analysés, moins de 1% étaient « triple positifs », 2% présentaient des mutations dans *TERT* et *IDH*, 7% uniquement des mutations *IDH*, 17% étaient « triple-négatifs » et 74% avaient uniquement des mutations dans le promoteur de *TERT*. De plus, la mutation *TERT* uniquement est corrélée avec l'âge moyen de diagnostic le plus élevé (59 ans), alors que la mutation *IDH* uniquement est corrélée à l'âge moyen de diagnostic le plus faible (37 ans).

Dans une autre étude similaire [6], les gliomes diffus de grade II et grade III sont classés en 3 groupes moléculaires : mutations dans *IDH* plus co-délétion chromosomique 1p/19q, mutation dans *IDH* sans co-délétion 1p/19q, *IDH* intact.

L'ensemble des études montre que les caractéristiques cliniques des tumeurs sont mieux prédites par la classification moléculaire que par la classification traditionnelle d'histopathologie. L'utilisation de ces tests devraient permettre de mieux définir les caractéristiques des tumeurs, leur localisation intracérébrale et/ou leur caractère infiltrant et par conséquent les protocoles thérapeutiques. La classification pourrait probablement encore être affinée par utilisation d'autres altérations et notamment celles présentes dans *ATRX*, *TP53*, *EGFR*, ou *PTEN*.

Toutes ces classifications ont pour but de mieux caractériser les tumeurs et permettre une stratification des patients afin d'améliorer les thérapies. La

classification récente de Eckel-Passow et coll. [5] repose sur 3 cibles majeures laissant envisager des tests cliniques plus facilement transposables en clinique. Les classifications de Verhaak et coll. en 2010 [3] et Sturm et coll. en 2012 [4] nécessitent l'étude de signatures transcriptomiques et des profils de méthylation, respectivement. Dans les années à venir il sera également nécessaire de s'intéresser plus spécifiquement aux caractéristiques des cellules souches cancéreuses présentes dans les tumeurs, connues pour leur rôle dans l'alimentation et l'entretien de ces dernières, pour affiner la classification des GBM et trouver des agents thérapeutiques plus efficaces.

1.1.2. Taux d'incidence et pronostic

Le taux d'incidence des glioblastomes est de 3,19 nouveaux cas par an par 100 000 habitants aux Etats-Unis (3,79 en France [7]). Les glioblastomes sont plus fréquents chez les personnes âgées. L'âge médian lors du diagnostic est 64 ans. Le taux d'incidence est plus élevé chez les hommes que chez les femmes (3,98 vs 2,52).

Malgré leur taux d'incidence relativement faible, le pronostic des glioblastomes est très mauvais. Avec le traitement standard (protocole de Stupp, présenté dans la section 1.1.6.2), la médiane de survie est de 14,6 mois [8]. Le taux de survie est de 36,5% à 1 an et de 5,0% à 5 ans [1]. Ce mauvais pronostic est dû à une récidive des tumeurs rapide après le traitement. La médiane de survie sans progression est de 6,9 mois [8].

1.1.3. Glioblastomes primaires et secondaires

Les glioblastomes peuvent être divisés en deux sous-types principaux : les glioblastomes primaires ou *de novo* et les glioblastomes secondaires, qui se développent progressivement à partir des astrocytomes de bas grade ou des astrocytomes anaplasiques (grade 3).

Les glioblastomes primaires sont beaucoup plus fréquents (95% de cas) que les glioblastomes secondaires [9, 10]. Les glioblastomes secondaires sont observés chez des patients plus jeunes (âge médiane : 45 ans) que les glioblastomes primaires (âge médiane : 64 ans). Morphologiquement les deux sous-types de glioblastome sont indiscernables et répondent au traitement standard de manière similaire. Mais au point de vue moléculaire, leur différence

génétique suggère une différence d'étiologie. Les glioblastomes primaires sont caractérisés par une amplification et/ou des mutations du gène *EGFR* (epidermal growth factor receptor) et des mutations du gène *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) alors que les glioblastomes secondaires sont caractérisés par des mutations du gène *TP53* et les altérations du gène *PDGFRA* (platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide) [11].

1.1.4. Facteurs de risque

Le développement des glioblastomes est un processus multi-étapes concernant les altérations génétiques séquentielles et cumulatives qui sont liées aux différents facteurs intrinsèques et environnementaux.

1.1.4.1. Facteurs de risque intrinsèques

Il existe des syndromes rares héréditaires qui sont associés à un risque élevé de développement des gliomes, notamment les syndromes de Cowden, Turcot, Li-Fraumeni, la neurofibromatose de type 1 et 2, la sclérose tubéreuse et la schwannomatose familiale [12, 13]. Une histoire familiale de gliome est rarement observée mais, lorsqu'elle est présente, elle est associée à une augmentation de 2 fois du risque de développer les gliomes. Des études d'association génomique ont identifié certains variants de susceptibilité situés en 20q13.33 (*RTEL1* (regulator of telomere elongation helicase 1)), 5p15.33 (*TERT* (telomerase reverse transcriptase)), 9p21.3 (*CDKN2B-AS1* (CDKN2B antisense RNA 1)), 7p11.2 (*EGFR*), 8q24.21 (*CCDC26* (CCDC26 long non-coding RNA)), et 11q23.3 (*PHLDB1* (pleckstrin homology-like domain, family B, member 1)). Mais cette association reste très faible [14, 15]. Certaines maladies atopiques, telles que l'asthme, l'eczéma, le rhume des foins, sont inversement associées aux gliomes [16].

1.1.4.2. Facteurs de risque environnementaux

Les rayonnements ionisants sont un facteur de risque établi pour le développement des gliomes. Cette association a été montrée dans les études d' enfants recevant la radiothérapie crânienne pour traiter la teigne, ainsi que dans les cas d'individus exposés aux bombes atomiques et aux essais d'armes nucléaires [17]. En revanche, la plupart des études sur les rayonnements pour le diagnostic ne trouvent aucun risque lié au développement de gliomes. D'autres facteurs

environnementaux, tels que l'exposition au téléphone portable et à d'autres champs électromagnétiques, les blessures à la tête, les aliments contenant des composés N-nitrosés, les pesticides, n'augmentent pas le risque de développer des gliomes.

1.1.5. Symptômes et diagnostic

Les patients atteints de glioblastome peuvent présenter une variété de symptômes, y compris des maux de tête, des nausées et des vomissements, des crises d'épilepsie, des déficits neurologiques focaux, la confusion, le déséquilibre à la marche, la perte de mémoire et le changement de personnalité.

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est la modalité de diagnostic de premier choix lorsqu'une tumeur cérébrale est soupçonnée. La tomodensitométrie est réservée pour les patients qui ne peuvent pas être soumis à l'IRM, comme ceux qui portent un stimulateur cardiaque. En présence d'agent de contraste à base de gadolinium, les tumeurs de glioblastome présentent typiquement un renforcement de contraste hétérogène entouré par un œdème et des zones centrales de nécrose. Les tumeurs sont souvent unifocales mais peuvent être multifocales.

1.1.6. Traitements actuels

1.1.6.1. Traitements symptomatiques

Une gestion médicale générale est nécessaire pour alléger les symptômes des patients atteints de glioblastome. Les patients présentant des crises d'épilepsie doivent être traités par les antiépileptiques et notamment le lévétiracétam qui est souvent préféré car il a un profil de toxicité favorable et il ne montre pas d'interaction médicamenteuse avec des agents de chimiothérapie. Les corticostéroïdes comme la dexaméthasone sont souvent utilisés pour alléger temporairement les symptômes causés par l'œdème péritumoral. L'utilisation à long terme des corticostéroïdes augmente le risque de certaines complications telles que la pneumonie, l'ostéoporose et les fractures par compression, ce qui nécessite l'utilisation préventive des antibiotiques, de vitamine D et de suppléments calciques. Les anticoagulants sont aussi utilisés pour traiter la thromboembolie veineuse de certains patients atteints de glioblastome.

1.1.6.2. Traitements spécifiques de première ligne

Le traitement standard actuel pour les glioblastomes, nommé protocole de Stupp [8], consiste en une chirurgie de résection la plus large possible suivie par la radiothérapie et la chimiothérapie.

Les tumeurs de glioblastome ne peuvent pas être éliminées complétement par la chirurgie à cause de leur nature infiltrante. Néanmoins, après diagnostic par les techniques d'imagerie, les patients doivent être soumis à une résection chirurgicale maximale quand celle-ci est possible. L'élimination de la tumeur par la chirurgie réduit les symptômes induits par la masse tumorale. La chirurgie fournit aussi les tissus tumoraux pour le diagnostic histologique et les études moléculaires. La biopsie stéréotaxique doit être effectuée uniquement chez les patients portant des tumeurs inopérables situées dans les zones critiques.

Après la chirurgie, la radiothérapie combinée avec la chimiothérapie doivent être considérées chez tous les patients. La radiothérapie est administrée à une dose de 60 Gy divisée en 30 fractions sur une période de 6 semaines. L'agent alkylant témozolomide (TMZ) est administré par voie orale, concomitamment avec la radiothérapie, à une dose journalière de 75 mg par m² de surface corporelle pendant 6 semaines, suivi par un traitement adjuvant qui commence 4 semaines après la radiothérapie, à une dose de 150 mg/m²/jour du jour 1 au jour 5 dans un premier cycle de 28 jours, suivi par une dose de 200 mg/m²/jour du jour 1 au jour 5 dans les cycles de 28 jours suivants, si le premier cycle est bien toléré. Ce régime repose sur une étude montrant que comparé à la radiothérapie seule, l'ajout de TMZ augmente la médiane de survie de 12 mois à 15 mois ainsi que le taux de survie à 2 ans de 10% à 25% [8]. La méthylation dans le promoteur du gène *MGMT* (O6-méthylguaninie-ADN méthyltransférase) prédit une meilleure réponse au traitement avec témozolomide [18, 19].

L'autre agent autorisé aux Etats-Unis pour le traitement des glioblastomes est le Gliadel, qui est constitué de polymères biodégradables contenant de la carmustine, implantés dans la cavité après la résection chirurgicale. Des études de phase 3 [20, 21] montrent une meilleure survie des patients ayant reçu les implants Gliadel comparés aux patients qui ont reçu des implants placebo. Cependant une comparaison directe avec le TMZ est manquante.

Le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF (Vascular endothelial

growth factor) ciblant l'angiogenèse, a reçu l'autorisation en 2009 pour les glioblastomes récurrents aux Etats-Unis, supportée par deux études de phase 2 [22, 23]. Mais deux études de phase 3 plus récentes [24, 25] montrent que la combinaison de bevacizumab avec la radiothérapie et la chimiothérapie ne change pas la survie globale, malgré une amélioration de la survie sans progression.

1.1.6.3. Traitements pour glioblastomes récurrents

Après les traitements de première ligne, on observe une progression de la pathologie chez pratiquement tous les patients atteints de glioblastome, après une période médiane de 7 à 10 mois. Il n'existe pas actuellement de traitements montrant une amélioration claire de survie.

La résection chirurgicale permet d'alléger l'effet de masse et réaliser les caractérisations histologiques et moléculaires de tumeur, bien que le bénéfice de survie ne soit pas clair. Pour la plupart de patients, la résection n'est pas effectuée, en raison de la location de tumeur ou du mauvais état physique des patients.

Les options pour la chimiothérapie de rattrapage incluent le bevacizumab, le TMZ, d'autres agents alkylants comme les nitrosourées (lomustine, carmustine) et le carboplatine. Le bevacizumab est fréquemment utilisé pour les glioblastomes récurrents. Sa cible, le VEGF, est un facteur pro-angiogénique impliqué dans la progression tumorale. Le VEGF augmente également la perméabilité vasculaire. Ainsi, le bevacizumab peut ainsi induire une diminution rapide de l'œdème péritumoral et alléger les symptômes associés. Dans une étude de phase 2 [26], la combinaison de bevacizumab et de lomustine montre une amélioration de survie des patients, alors que chaque agent seul n'a pas d'effet positif sur la survie. Une étude de phase 3 avec une cohorte plus importante de patients de glioblastomes récurrents est en cours pour confirmer l'efficacité de cette combinaison.

1.1.7. Caractérisation moléculaire des glioblastomes

1.1.7.1. Voies de signalisations altérées dans les glioblastomes

Reconnus pour leur complexité et leur hétérogénéité moléculaire, les

glioblastomes primaires sont les premières tumeurs solides soumises dans le cadre du programme TCGA (The Cancer Genome Atlas) à des analyses compréhensives associant génomique, épigénétique, transcriptomique et protéomique. Les altérations génétiques les plus fréquemment identifiées dans les glioblastomes primaires concernent principalement trois voies de signalisation (**Figure 2**) : i) la voie des kinases RTK (receptor tyrosine kinase) et MAPKs (mitogen activated protein kinases), ii) la voie impliquant le gène suppresseur de tumeur *TP53* et iii) la voie impliquant le gène suppresseur de tumeur *RB* (protéine du rétinoblastome) [3, 27, 28].

Dans 67,3% de glioblastomes, au moins un des récepteurs RTK est altéré dans : *EGFR* (57,4%), *PDGFRA* (13,1%), *MET* (MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase) (1,6%) et *FGFR* (fibroblast growth factor receptors) (3,2%). 89,6% de glioblastomes possèdent au moins une altération dans la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et 39% en présentent deux ou plus. Les mutations dans le gène *PI3K* sont présentes dans 25,1% de glioblastomes. Une exclusion mutuelle entre les mutations dans *PI3K* et les mutations/délétions dans *PTEN* (41%) a été observée.

La voie p53 est altérée dans 85,3% de tumeurs, suite à des mutations/délétions dans *TP53* (27,9%), à des amplifications dans *MDM1/2/4* (mouse double minute 1/2/4 homolog) (15,1%) et à la délétion dans *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (57,8%). Les altérations dans le gène *TP53* d'une part et les *MDM* et *CDKN2A* d'autre part sont mutuellement exclusives.

78,9% de glioblastomes possèdent au moins une altération affectant la voie du rétinoblastome : mutations/délétions dans le gène *RB1*, amplification du gène *CDK4/6* et délétion du gène *CDKN2A*.



Figure 2. Les 3 principales voies de signalisation altérées dans les glioblastomes primaires. La fréquence d'altération générale pour chaque voie de signalisation ainsi que la fréquence d'altération de chaque élément dans ces 3 voies dans les glioblastomes sont présentées dans l'image. D'après Brennan et al. [28].

1.1.7.2. Classification moléculaire des glioblastomes

Sur la base de leurs profils d'expression génique, les glioblastomes sont classés en 4 sous-groupes transcriptomiques : proneural, neural, classique et mésenchymateux (**Figure 3**).


Figure 3. Classification de glioblastomes en fonction de leur profil moléculaire. Une vue intégrative de l'expression des gènes et des altérations génomiques de 202 tumeurs de glioblastome (dont 116 sont présentées) classées en 4 sous-groupes en fonction de leur profil moléculaire. mut, mutation; EG, expression du gène; NC, nombre de copie. D'après Verhaak et al. [3].

Le sous-type proneural est associé à une amplification du gène PDGFRA et à la mutation dans le gène IDH1 (isocitrate déshydrogénase 1). En fait, la plupart des mutations dans le gène IDH1 et TP53 sont observées dans ce groupe de glioblastome. Il est également associé à une surexpression des gènes impliqués dans le développement oligodendrocytaire tels que NKX2-2 (NK2 homeobox 2), OLIG2 (oligodendrocyte transcription factor 2). En fonction du profil de méthylation dans les promoteurs des gènes, le groupe proneural peut être encore divisé en 2 sous-classes : G-CIMP (glioma-CpG island methylator phenotype) (hyperméthylation) et non G-CIMP [29]. Le phénotype G-CIMP est associé à des mutations dans le gène IDH1 et à un meilleur pronostic que le phénotype non G-CIMP.

Le sous-type neural est caractérisé par une surexpression des marqueurs neuraux tels que *NEFL* (neurofilament, light polypeptide), *GABRA1* (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1), *SYT1* (synaptotagmin I) et *SLC12A5* (solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 5).

Le sous-type classique est caractérisé par le gain du chromosome 7 couplé avec la perte du chromosome 10. Le gène *EGFR* est amplifié ou muté dans la plupart des cas. Alors que le gène *TP53* (fréquence de mutation : 28%) est parmi les gènes les plus fréquemment mutés dans les glioblastomes, il reste intact dans le groupe classique. Ce groupe est aussi associé avec une délétion homozygote de 9p21.3, couvrant le gène *CDKN2A*.

Le sous-type mésenchymateux est associé à une surexpression des marqueurs mésenchymateux tels que *CHI3L1* (chitinase 3-like 1) et *MET*, et à une diminution de l'expression de neurofibromine 1 due à la délétion ou à la mutation du gène *NF1* (neurofibromine 1). Les gènes impliqués dans la voie TNF (tumor necrosis factor) et NF-kB (nuclear factor-kappa b) tels que *TNFRSF1A* (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A), *TRADD* (TNFRSF1A-associated via death domain) et *RELB* (v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B) sont surexprimés, probablement à cause de la nécrose et de l'inflammation associées à ce type de glioblastome.

1.1.8. Traitements émergents

Depuis l'ajout de TMZ au traitement standard en 2005, le pronostic de glioblastome ne s'est pas amélioré. Après la rechute, il n'existe pas d'option thérapeutique. On a donc un vrai besoin médical pour traiter les glioblastomes. Les progrès récents dans la compréhension de la biologie moléculaire et cellulaire des glioblastomes ont conduits rapidement à des essais cliniques innovants. Ces thérapies ciblent principalement les voies de signalisation altérées, l'angiogenèse et la modulation d'immunité.

1.1.8.1. Thérapies ciblant les voies de signalisation altérées

Les voies de signalisation RTK sont des cibles thérapeutiques très attractives parce que les altérations génétiques dans ces voies sont communes (90%) dans les glioblastomes et elles sont relativement bien connues. En plus, il existe déjà des agents thérapeutiques ciblant les voies RTK dans d'autres types de cancer. Les inhibiteurs sont souvent de petites molécules qui se fixent sur le site de liaison de l'ATP dans le récepteur et ainsi bloquent l'activation du récepteur. Malheureusement, les essais cliniques avec les inhibiteurs des RTKs (EGFR, PDGFR, mTOR (mechanistic target of rapamycin), Akt et PI3K) chez les patients atteints de glioblastome ont montré des résultats décevants [30]. Cet échec pourrait avoir plusieurs causes. D'abord, dans la plupart des essais cliniques, il n'existe pas une pré-sélection des patients en fonction de leurs altérations génétiques, qui pourrait être essentielle au succès des thérapies ciblées. L'existence de voies de signalisation redondantes pourrait également contribuer à une résistance intrinsèque. L'autre possibilité est l'acquisition des mutations dans les cellules tumorales qui leur confèrent une résistance au traitement. Pour surmonter ces obstacles, les nouveaux essais cliniques en cours utilisent des inhibiteurs plus efficaces et plus sélectifs ou combinent plusieurs inhibiteurs ciblant différentes voies de signalisation altérées, en se basant sur une pré-sélection plus stricte des patients [31].

Des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *TP53* ou des altérations affectant la fonction du p53 sont présentes dans 85% des tumeurs de glioblastome [28]. L'activation du p53 induit l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. L'inactivation du p53 dans les tumeurs peut résulter de l'amplification des inhibiteurs du p53 (*MDM2*, *MDM4*), de la délétion du gène codant p14/ARF le stabilisateur de p53, ou des mutations dans le gène *TP53*. Des stratégies visant à restaurer la fonction de p53 par la thérapie génique ou par l'inhibition de MDM2 sont en cours d'évaluation [32, 33].

1.1.8.2. Thérapies anti-angiogéniques

Les glioblastomes sont des tumeurs hypervascularisées [34]. Différentes stratégies anti-angiogéniques ont été développées pour traiter les glioblastomes. L'exemple le plus connu est le bevacizumab, anticorps monoclonal ciblant VEGF, développé par Roche. Malheureusement, l'ajout de bevacizumab dans le traitement standard n'a pas changé la survie globale des patients atteints de glioblastomes, malgré une survie sans progression améliorée. La combinaison de bevacizumab avec d'autres agents thérapeutiques est également en cours d'évaluation chez les patients. Le résultat n'est pas très prometteur pour l'instant [35, 36], à part dans le cas d'une étude associant le bevacizumab avec la lomustine dans les glioblastomes récurrents [26].

Dans une étude de phase 2, en ajoutant l'inhibiteur de VEGFR cediranib au traitement standard, les chercheurs ont observé une perfusion et une oxygénation

améliorée des tumeurs dans 50% des patients, des caractéristiques associées à une meilleure survie [37]. Le mécanisme qui sous-tend cette observation n'est pas clair et pourrait être lié à une normalisation de la vascularisation et à une meilleure distribution du TMZ dans la tumeur.

Les agents anti-angiogéniques ciblent la vascularisation tumorale anormale. Mais leur mécanisme d'action reste mal compris. Plus d'études sont nécessaires pour comprendre les observations chez les patients traités par les agents anti-angiogéniques, afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique et d'optimiser l'incorporation de cette stratégie aux protocoles de traitements actuels.

1.1.8.3. Immunothérapie

L'immunothérapie a été depuis longtemps une stratégie anti-tumorale intéressante, basée sur l'idée d'exploiter le système immunitaire du patient pour stimuler une réponse anti-tumorale [38].

Une des caractéristiques des tumeurs malignes est leur capacité d'échapper à la surveillance du système immunitaire [38]. Deux médiateurs importants impliqués dans ce processus sont CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) et PD-1 (programmed cell death 1), des molécules de co-stimulation inhibitrice (MCI) qui régulent l'immunité adaptative. La fixation par PD-1 de son ligand PD-L1 inhibe l'activation des lymphocytes T et induit l'apoptose des lymphocytes T activées [39]. De manière similaire, CTLA-4 inhibe l'activation des lymphocytes T. Nivolumab et ipilimumab sont deux anticorps monoclonaux (Mabs) qui inhibent PD-1 et CTLA-4, respectivement. Des effets thérapeutiques remarquables de ces deux Mabs ont été montré chez les patients atteints de mélanomes [40–43]. Des essais cliniques avec ces deux anticorps dans les glioblastomes sont en cours.

Les vaccins contre les glioblastomes représentent l'autre possibilité pour déclencher une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses chez les patients. Il existe actuellement deux types de vaccins pour le glioblastome : les vaccins basés sur les peptides et les vaccins basés sur les cellules. Un exemple de ce premier groupe est rindopepimut (CDX-110), un peptide de 14 acides aminés (14-mer) du récepteur EGFRvIII conjugé à une protéine porteuse. EGFRvIII, le variant d'EGFR codant une forme du récepteur EGFR tronquée dans le domaine extracellulaire et constitutivement activé, est présent dans environ 30% des glioblastomes primaires. Il est associé à un mauvais pronostic. Le rindopepimut

induit une réponse immunitaire contre EGFRvIII et améliore la survie des patients portant ce variant [44]. Le composé a reçu l'autorisation en 2015 aux Etats-Unis pour traiter les patients atteints de glioblastomes exprimant le variant EGFRvIII.

Les vaccins basés sur les cellules utilisent les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont d'abord collectées dans le sang périphérique de patients, puis exposées aux antigènes de tumeur *in vitro*. Ces cellules sont ensuite amplifiées et réinjectées aux patients [45]. Les cellules dendritiques sont souvent incubées avec le lysat de tumeur qui est enlevée lors de la résection chirurgicale. Des résultats encourageants ont été observés dans des études cliniques avec les vaccins de cellule dendritique. Ces vaccins peuvent induire une réponse immunitaire significative chez les patients et prolonger la survie des patients atteints de glioblastome [46–48]. D'autres études sont également en cours pour améliorer l'efficacité de ces vaccins et augmenter la réponse immunitaire. Dans une étude récente, le prétraitement des cellules dendritiques avec l'anatoxine tétanique avant l'exposition aux antigènes, a augmenté l'efficacité du vaccin et la survie des patients [48].

1.1.8.4. Optimisation des essais cliniques

Les glioblastomes sont des tumeurs très hétérogènes, ce qui a été souligné par des études récentes sur la biologie moléculaire de glioblastomes. Les essais cliniques deviennent donc de plus en plus sophistiqués, avec le développement des nouvelles thérapies plus ciblées. Une pré-sélection des patients en fonction de leurs altérations génétiques est essentielle pour évaluer les nouvelles thérapies ciblant des altérations spécifiques. Un exemple est l'évaluation de rindopepimut, vaccin ciblant le variant EGFRvIII présenté dans la section 1.1.8.3. Les mêmes stratégies de sélection des patients doivent être appliquées aux essais cliniques pour les autres thérapies ciblées.

1.2. Glioblastomes et Cellules souches cancéreuses

1.2.1. Hétérogénéité tumorale

Malgré les progrès dans le traitement du cancer, de nombreux patients

connaissent toujours l'échec thérapeutique, menant à la progression et la récurrence de la maladie. Historiquement, beaucoup d'études ont été consacrées à la compréhension des mécanismes génétiques et biochimiques provoquant la résistance des tumeurs aux traitements.

A l'heure actuelle, les tumeurs sont reconnues comme des organoïdes dont la complexité ressemble à celle des tissus sains normaux. Vue sous cette angle, la biologie d'une tumeur ne peut être comprise qu'en étudiant les différents types de cellules spécialisées qui la composent ainsi que le microenvironnement tumoral construit lors de la tumorigenèse. Il devient de plus en plus évident que l'hétérogénéité tumorale contribue à l'échec de la thérapie et la progression de la maladie [38].

Il existe actuellement deux théories principales pour expliquer l'hétérogénéité tumorale : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique (**Figure 4**).



Figure 4. Initiation et développement des tumeurs. Deux modèles alternatifs ont été proposés pour expliquer l'initiation et le développement des tumeurs. Le modèle stochastique (A) propose que les cellules tumorales sont hétérogènes. L'hétérogénéité venant de mutations différentes. Mais pratiquement toutes les cellules tumorales ont le potentiel de s'auto-renouveler et d'initier la tumeur. Le modèle hiérarchique (B) suggère que seule une petite population des cellules tumorales est capable de s'auto-renouveler et d'induire l'initiation et le maintien des tumeurs. D'après Vescovi et al. [49].

1.2.1.1. Modèle stochastique et Evolution clonale

Le cancer est une maladie génétique somatique. Les altérations génétiques conduisent les cellules à ignorer les signaux de contrôle de croissance et à former la tumeur. Il a été suggéré que 4 à 7 mutations génétiques indépendantes dans une cellule somatique normale sont nécessaires pour qu'elle acquière un potentiel de prolifération illimité et incontrôlé [50]. Avec ce point de vue, l'hypothèse classique de la tumorigenèse est basée sur le modèle stochastique qui considère le développement du cancer comme un processus évolutif dans lequel la sélection naturelle a lieu. Les clones les mieux adaptés survivent et sont responsables de la croissance de la tumeur. Dans cette optique, l'hétérogénéité tumorale est considérée comme provenant de l'évolution clonale, dans laquelle l'acquisition et l'expansion des mutations lors de la progression tumorale augmentent la variabilité génétique et l'hétérogénéité tumorale [51]. Le modèle stochastique prédit que toutes les cellules dans une tumeur possèdent un potentiel de tumorigenèse similaire et chaque cellule tumorale peut fonctionner comme une cellule initiatrice de tumeur.

1.2.1.2. Modèle hiérarchique et Cellule souche cancéreuse

L'autre modèle alternatif, le modèle hiérarchique, encouragé par des données expérimentales récentes, considère qu'il existe une hiérarchie cellulaire dans la tumeur. Les tumeurs malignes sont initiées et maintenues par une petite population de cellules tumorales possédant des propriétés des cellules souches. Ces cellules, appelées cellules souches cancéreuses (CSCs), sont définies comme des cellules au sein d'une tumeur possédant la capacité d'auto-renouvellement et pouvant engendrer les lignées hétérogènes de cellules constituant la tumeur [52]. Cette hypothèse postule que les CSCs se trouvent au sommet de la hiérarchie de différenciation au sein de la tumeur et peuvent générer des cellules tumorales plus différenciées possédant un potentiel de prolifération limité [53, 54].

Pourtant, il est important de noter que le modèle hiérarchique et le modèle stochastique ne sont pas mutuellement exclusifs. De multiples clones de CSCs avec différents altérations génétiques peuvent coexister dans la même tumeur [55] et ces CSCs subissent eux-mêmes la sélection naturelle et donc une évolution clonale [56–59].

1.2.1.3. La découverte des CSCs

Bien que l'idée que le cancer conserve des aspects du développement embryonnaire ait été proposée il y a plus de 150 ans par le pathologiste allemand Rudolf Virchow, l'idée moderne que les programmes de développement puissent fonctionner dans le cancer a commencé à partir des années 1960 dans les tératocarcinomes [60], les carcinomes pulmonaires à petites cellules [61] et les carcinomes mammaires [62, 63]. Il a été suggéré que de nombreuses cellules tumorales sont bien différenciées et que ces cellules différenciées sont générées par des cellules « souches » tumorales, qui ressemblent aux cellules souches dans les tissus normaux. Ainsi, les tumeurs peuvent être considérées comme des caricatures de l'embryogenèse ou du renouvellement des tissus normaux.

La première preuve de l'existence des cellules souches cancéreuses dans les tumeurs n'a été rapportée qu'en 1997 dans la leucémie myéloïde aiguë [64]. Il a été montré par Bonnet et Dick que la leucémie myéloïde aiguë était organisée comme une hiérarchie avec les cellules CD34⁺/CD38⁻ au sommet de cette hiérarchie. Ces cellules CD34⁺/CD38⁻ ont été identifiées comme des cellules initiatrices de leucémie myéloïde aiguë qui pouvaient générer la leucémie dans les souris NOD/SCID alors que les cellules CD34⁺/CD38⁺ ou CD34⁻ n'avaient pas cette capacité tumorigène.

Dans le cas des tumeurs solides, les cellules souches cancéreuses ont été identifiées pour la première fois dans le cancer du sein en 2003 [65]. Une population de cellules tumorales CD44⁺/CD24⁻ ont été isolées et montrées comme les seules cellules responsables de la genèse et du maintien des tumeurs dans les souris immuno-déficients. Les cellules CD44⁺/CD24⁻ pouvaient être isolées de nouveau à partir des xénogreffes et régénérer des tumeurs dans les souris.

Depuis la découverte des CSCs dans le cancer du sein, les CSCs ont été également identifiées dans d'autres tumeurs solides, telles que le cancer du cerveau [66], le cancer de la tête et du cou [67], le cancer du pancréas [68, 69], le cancer du poumon [70], le cancer du prostate [71, 72], le cancer du colon [73, 74] et les sarcomes [75].

1.2.2. Cellules souches cancéreuses de glioblastome (CSGs)

1.2.2.1. Identification des CSGs

Les premières études qui ont montré l'existence des cellules tumorales de

glioblastome possédant les caractéristiques de cellule souche datent de 2002 [76]. En utilisant les conditions de culture optimisées initialement pour l'isolement des cellules souches neurales, c'est-à-dire utiliser le milieu de culture sans sérum et contenant les facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor) et bFGF (basic fibroblast growth factor), les auteurs ont pu isoler des cellules clonogéniques qui forment des neurosphères à partir des biopsies des patients atteints de glioblastome. Ces cellules expriment le marqueur neuronal βIII-tubuline/Tuj1 et le marqueur astroglial GFAP (glial fibrillary acid protein) après l'induction de la différenciation.

En 2004, deux équipes indépendantes ont rapporté l'isolement de cellules souches cancéreuses *bona fide* à partir des tumeurs de glioblastome [66, 77]. En plus de leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation, un petit nombre de ces cellules pouvait générer des tumeurs ressemblant aux tumeurs d'origine lorsqu'elles étaient injectées dans le cerveau de souris immuno-déficientes. Des cellules souches cancéreuses pouvaient être isolées de nouveau à partir des xénogreffes et régénérer des tumeurs dans les souris. Une de ces études [66] a également identifié CD133 comme un marqueur potentiel de cellule souche cancéreuse de glioblastome. Ce marqueur a également permis d'isoler des cellules tumorales qui ont des propriétés de cellule souche dans les tumeurs de médulloblastome.

1.2.2.2. Propriétés des CSGs

Contrairement aux lignées cellulaires classiques de glioblastomes, les CSGs sont mises en culture dans du milieu sans sérum et avec les facteurs de croissance EGF et bFGF. Les CSGs montrent des similitudes remarquables avec les cellules souches neurales. Ainsi, les CSGs:

- possèdent une capacité d'auto-renouvellement à long terme *in vitro* et *in vivo*. L'auto-renouvellement des CSGs *in vitro* est évalué avec le test de clonalité, où les CSGs sont mises en culture à faible densité clonale et leur capacité de formation des neurosphères est évaluée pendant plusieurs passages, alors que l'auto-renouvellement *in vivo* est évalué avec les expériences de xénogreffe en série dans les animaux immuno-déficients.

- expriment des marqueurs des cellules souches/progénitrices neurales tels que la nestine, Sox2 et Olig2. - sont capables de se différencier. En présence de sérum par exemple, elles se différencient en cellules exprimant des marqueurs neuronaux comme Tuj1 et gliaux comme GFAP.

Cependant, les CSGs ont accumulé de nombreuses altérations génétiques conduisant à leur malignité. Une des caractéristiques fondamentales de ces cellules est leur capacité de former des tumeurs qui récapitulent les caractéristiques des tumeurs d'origine quand elles sont injectées, en petit nombre dans le cerveau des souris immuno-déficients [49].

1.2.2.3. Marqueurs des CSGs

Les études dans le domaine des cellules souches cancéreuses ont été initiées par l'étude des cancers hématopoïétiques, où les cellules en suspension peuvent être isolées et triées par la technique FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) en fonction de leur expression des marqueurs membranaires. Ceci a permis d'enrichir et étudier les sous-populations des cellules cancéreuses et de montrer que les cellules CD34⁺/CD38⁻ (correspondant à des cellules souches hématopoïétiques) présentaient un potentiel élevé de propagation du cancer d'origine chez l'animal [64]. Malheureusement, pour les tumeurs solides, les études n'ont pas permis de révéler de manière aussi nette les marqueurs associés aux des cellules souches cancéreuses.

Initialement, CD133 (prominine-1), une glycoprotéine membranaire exprimée par les cellules souches neurales, a été utilisé par Singh et al. pour identifier les cellules de glioblastome ayant des propriétés de cellule souche [66]. Cependant, les études subséquentes ont suggéré que CD133 n'était pas un marqueur fiable et universel des CSGs. Plusieurs équipes indépendantes ont pu identifier et isoler des CSGs *bona fide* qui n'expriment pas CD133 [78–80]. Il a été également montré que les cellules CD133⁻ pouvaient générer les cellules CD133⁺ [53]. Etant donné que le glioblastome est une maladie hétérogène et qu'il existe plusieurs sous-types moléculaires de glioblastome, il n'est peut-être pas surprenant d'observer des différences pour le marqueur CD133.

D'autres marqueurs de CSGs ont été également proposés au cours de la dernière décennie, tels la Nestine [81, 82], Nanog [83, 84], LICAM/CD171 [85], CD15/SSEA1 [86], CD44 [87], Oct4 [83, 84, 88], Musashi [89] et Sox2 [83, 90, 91]. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueur universel des CSGs.

1.2.2.4. Voies de signalisation

En plus des voies de signalisation souvent altérées dans le glioblastome (RTK/PI3K, Rb, p53), celles régulant l'auto-renouvellement et la différenciation des CSGs ont récemment beaucoup attiré l'attention des scientifiques avec l'espoir que leur manipulation permettra de dégager de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les voies de signalisation plus particulièrement étudiées concernent :



1.2.2.4.1. Notch

Figure 5. Schéma simplifié de la voie Notch. La liaison des ligands tels que Dll-1 (Delta-like-1) ou Jagged-1 sur le récepteur Notch entraine le clivage du domaine extracellulaire de Notch (NECD) par le complexe α-sécrétase puis le clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) par le complexe γ-sécrétase. Le NICD clivé se déplace ensuite dans le noyau, où il interagit avec des facteurs de transcription, tels que CSL, MAML1 et CBP/p300, induisant l'expression des gènes cibles du Notch. CSL, CBF1/Su(h)/Lag-1; MAML1, Mastermind-like 1; CBP, CREB-binding protein; HES-1, hairy and enhancer of split; HEY-1, hairy and enhancer of split with YRPW. Figure réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Lors du développement du système nerveux central, la voie Notch (**Figure 5**) favorise la survie et l'auto-renouvellement des cellules souches neurales [92]. Elle joue également un rôle dans la plasticité cérébrale chez les adultes [93]. La voie Notch est activée dans le glioblastome [94, 95]. Il a été montré que l'activation de cette voie dans les CSGs contribuait à leur radiorésistance [96]. Le blocage de la

voie Notch dans les CSGs par l'inhibiteur de la γ-sécrétase induit une diminution de l'auto-renouvellement et de la prolifération des CSGs, diminue la croissance des xénogreffes et induit la différenciation des CSGs [97]. En plus, dans un modèle de souris transgénique de glioblastome, l'activation de Notch (en présence de Kras) augmente l'expression de Nestine [98], suggérant un rôle de la voie Notch dans le caractère souche des cellules de glioblastomes.



1.2.2.4.2. Sonic Hedgehog

Figure 6. Schéma simplifié de la voie Sonic Hedgehog (SHH). La liaison du ligand Hedgehog (Hh) sur le récepteur Patched (PTCH1) enlève son inhibition sur le récepteur Smoothened (Smo), ce qui favorise la génération de l'activateur de transcription Gli A. Gli A se déplace ensuite dans le noyau et active l'expression des gènes cibles du SHH. Figure réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

La voie Sonic Hedgehog (SHH) (**Figure 6**), connue pour son implication dans le développement embryonnaire et dans le développement du système nerveux central [99], est aussi suractivée dans le glioblastome [100]. Dans les CSGs, l'activation de la voie Sonic Hedgehog augmente l'expression des marqueurs des CSGs (CD133, Olig2, Oct4, Nanog, Sox2) et renforce l'auto-renouvellement des CSGs [101, 102]. L'inhibition de cette voie en utilisant la cyclopamine ou siRNA/shRNA induit l'apoptose, la suppression de l'auto-renouvellement et de la migration des CSGs, sensibilise les CSGs au traitement avec le TMZ et retarde la

formation de tumeurs dans les souris [101, 103, 104].



1.2.2.4.3. Wnt/β-caténine

Figure 7. Schéma simplifié de la voie Wnt/β-caténine. En absence du ligand Wnt, la β-caténine forme un complexe avec l'Axine, APC (*adenomatous polyposis coli* gene product) et GSK3 (glycogen synthase kinase 3), ce qui induit la dégradation de la β-caténine par le système ubiquitine-protéasome. Suite à la liaison du ligand Wnt sur le récepteur Frizzled et le récepteur LRP5/6 (LDL receptor-related protein 5/6), Frizzled recrute Dvl (Dishevelled), ce qui induit le recrutement de l'axine par le récepteur LRP5/6. La β-caténine est ainsi stabilisée et se déplace dans le noyau pour activer l'expression des gènes cibles après la formation d'un complexe avec TCF (T cell factor) et LEF (lymphoid enhancer factor). Figure réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Très conservée dans nombreux organismes, la voie Wnt/ β -caténine (**Figure 7**) est impliquée dans le développement embryonnaire. Elle régule également la maintenance des cellules souches normales et cancéreuses [105–107]. Dans le glioblastome, la β -caténine est un marqueur du mauvais pronostique, qui est plus prédictif que Ki67 et EGFR [108]. Les ligands Wnt1 et Wnt3a sont surexprimés dans les CSGs. L'inhibition de la voie Wnt par la diminution d'expression de Wnt1 et Wnt3a induit une diminution de la prolifération, de la migration et de la résistance aux thérapies des CSGs [109]. FoxM1, qui favorise la localisation nucléaire de β -caténine, serait également critique pour la maintien des CSGs et la tumorigenèse [110].

1.2.2.4.4. TGF-β

TGF-β (Transforming growth factor-beta) est une cytokine multifonctionnelle secrétée par différents types de cellules et régulant la prolifération, la différenciation et l'homéostasie des tissus [111]. La voie TGF-β a été identifiée comme un médiateur dans l'initiation et la progression de gliome par son effet sur la prolifération cellulaire, l'invasion tumorale, l'angiogenèse et l'immunosuppression [112]. Cette voie est également impliquée dans le maintien des CSGs. Il a été montré que TGF-β induisait directement l'expression de Sox4, qui augmentait ensuite l'expression de Sox2, un factor de transcription essentiel à la pluripotence [113]. L'inhibition de la voie TGF-β dans les CSGs diminue leur capacité de formation de tumeurs. Ainsi, l'inhibition de la voie TGF-β en utilisant un inhibiteur du récepteur de TGF-β (LY2109761) dans une population de CSGs CD44^{high}/Id1^{high} (Id1, inhibitor of DNA binding 1) situées dans une niche péri-vasculaire, diminuait cette population ainsi que leur capacité à initier des tumeurs *in vivo* [87].

1.2.2.5. CSGs et résistance aux traitements

Après le traitement standard qui combine la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, pratiquement tous les patients atteints de glioblastome connaissent une récurrence de la maladie, située souvent dans la zone de résection chirurgicale [114], ce qui suggère l'existence des cellules résistantes à la chimio- et à la radio thérapie. De nombreuses études récentes suggèrent que la résistance des CSGs à la radiothérapie et la chimiothérapie contribue à la récurrence et la progression de glioblastome.

1.2.2.5.1. Radiorésistance

La radiothérapie induit la mort des cellules cancéreuses en produisant des lésions de l'ADN, *via* des radicaux libres. Plusieurs études ont montré que les CSGs, en raison de leur capacité de réparation de l'ADN renforcée étaient plus résistantes à la radiothérapie que les autres cellules tumorales.

Dans une étude de 2006, il a été montré que les cellules tumorales de glioblastome CD133⁺ étaient plus résistantes à la radiothérapie que les cellules CD133⁻ [115]. De plus, un enrichissement des cellules CD133⁺ a été observé après la radiation. Cette résistance des CSGs à la radiothérapie est liée une activité de

réparation de l'ADN augmentée dans les CSGs impliquant la voie CHK1/CHK2 (checkpoint kinase 1/2).

Dans une autre étude, Cheng et al. [116] ont montré que L1CAM/CD171, un marqueur potentiel de CSG, renforçait la réparation d'ADN et augmentait la radiorésistance des CSGs. L1CAM régule l'expression de NBS1, un membre du complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1), qui active la kinase ATM et la réparation de l'ADN. La diminution d'expression de L1CAM par shARN diminuait la réparation d'ADN et sensibilisait les CSGs à la radiation.

Un mécanisme supplémentaire de la radiorésistance *via* la réparation d'ADN impliquant BMI1, une protéine enrichie dans les CSGs a été rapporté [117]. Après irradiation, BMI1 était redistribué à la chromatine et colocalisait avec des protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. L'inactivation de BMI1 par shARN altérait le recrutement de la machinerie de la réparation de l'ADN à la chromatine et sensibilisait les cellules de glioblastome à la radiation.

1.2.2.5.2. Chimiorésistance

Le témozolomide (TMZ), agent de chimiothérapie utilisé actuellement en clinique, induit les altérations de l'ADN et notamment la méthylation des guanines sur l'hydroxyle en position 6 (O⁶) dans l'ADN, conduisant à la mort des cellules cancéreuses. La sensibilité relative des CSGs au TMZ reste un sujet de controverses. Certaines études montrent une activité cytotoxique spécifique du TMZ sur les CSGs [118] dans la tumeur de glioblastome, alors que d'autres études suggèrent une résistance relative des CSGs au TMZ [119–122].

En comparant l'expression de différents gènes dans les cellules de glioblastome CD133⁺ et CD133⁻, Liu et al. ont montré que les cellules CD133⁺ sur-exprimaient l'enzyme O6-méthylguanine-DNA-méthyltransférase (MGMT), ce qui limitait l'efficacité thérapeutique du TMZ [121].

Dans un modèle de souris génétiquement modifié (surexpression du PDGF/délétion du PTEN) de glioblastome, le traitement avec le TMZ n'inhibait pas l'auto-renouvellement des CSGs et augmentait la proportion des CSGs [123]. Un mécanisme potentiel de cette résistance est que les CSGs sur-expriment les transporteurs ABC (ATP-binding cassette transporter) tels que ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) pour exporter les agents de

chimiothérapie comme le TMZ [123, 124]. Il a été montré dans cette étude que la surexpression de ABCG2 était liée à l'activation de la voie PI3K/AKT.

L'autre mécanisme de la chimiorésistance est l'existence des CSGs dans un état de quiescence, qui les protège de l'action antiproliférative des agents de chimiothérapie comme le TMZ. Dans une étude publiée en 2012 [119], en introduisant le transgène Nes-ATK-GFP dans le modèle de souris transgénique *Mut7* (par délétion p53, NF1, Pten) qui développait spontanément le glioblastome, les auteurs ont pu marguer les CSGs exprimant la Nestine par la protéine fluorescente GFP. Ils ont montré que la plupart des cellules GFP⁺ n'exprimaient pas le marqueur de prolifération Ki67, ce qui suggère que, dans ce modèle de glioblastome, les CSGs étaient dans un état relativement quiescent. Il a été également montré que le traitement avec le TMZ éliminait de manière sélective les cellules GFP⁻ en prolifération, et que le retour des cellules CSGs GFP⁺ dans le cycle cellulaire était responsable de la récurrence des tumeurs après le traitement TMZ. Dans une autre étude publiée en 2014 [125], par le séquençage d'ARN dans 430 cellules individuelles provenant de 5 glioblastomes primaires, Patel et al. ont montré une corrélation inverse entre la signature transcriptomique de cellule souche et la signature du cycle cellulaire, ce qui suggérait également que les cellules tumorales possédant des propriétés de cellule souche dans le glioblastome sont dans un état relativement quiescent.

1.3. Microenvironnement tumoral, Glioblastome, Implication thérapeutique

1.3.1. Définition du microenvironnement tumoral

Outre les facteurs génétiques et épigénétiques, il est devenu de plus en plus clair que les facteurs du microenvironnement tumoral contribuent également à l'hétérogénéité tumorale et influencent la réponse thérapeutique [57, 126].

Le microenvironnement tumoral est l'ensemble des facteurs environnementaux dans les tumeurs. Il est la conséquence de l'activité des cellules cancéreuses et des cellules stromales [127, 128]. Le microenvironnement tumoral est dynamique d'un point de vue spatial et temporel, évoluant constamment lors de la croissance tumorale [129]. De manière générale, on peut diviser les différents facteurs du microenvironnement tumoral en deux catégories : les facteurs liés au stroma et les facteurs physico-chimiques.

Les cellules cancéreuses secrètent de nombreux facteurs de croissance lors du développement de la tumeur. Ces facteurs non seulement supportent la prolifération des cellules cancéreuses, mais aussi attirent et stimulent les cellules stromales, qui à leur tour émettent des signaux de croissance et de mobilité aux cellules cancéreuses. Ainsi, la progression de tumeur est une conséquence de l'interaction entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales [38, 130]. La composition exacte du stroma tumoral varie considérablement, mais généralement inclut : les fibroblastes associés au cancer; les cellules endothéliales; les péricytes; les macrophages associés à la tumeur; les astrocytes dans le cas du glioblastome.

Les caractéristiques physico-chimiques du microenvironnement tumoral sont aussi très variables dans les différents types de cancers. Néanmoins, les propriétés typiques peuvent inclure l'hypoxie, l'acidité, la concentration élevée de lactate, la faible quantité de glucose, d'ATP et de nutriments [128, 129, 131, 132]. Parmi ces facteurs physico-chimiques, l'hypoxie et l'acidité ont récemment attiré beaucoup d'attention dans le domaine du cancer et sont les facteurs les plus étudiés.

1.3.2. Hypoxie

1.3.2.1. Hypoxie dans le glioblastome

Une des caractéristiques microenvironnementales les plus étudiées dans les tumeurs solides est la présence des zones hypoxiques, qui est due à un déséquilibre entre la croissance rapide des cellules cancéreuses et la vascularisation relativement inefficace [34, 133–136].

La concentration d'oxygène dans les tissus sains cérébraux varie entre 2,5% et 12,5% alors que les masses tumorales de glioblastome montrent une hypoxie modérée ou sévère avec une concentration d'oxygène de 0,5 à 2,5% [137, 138]. Une des caractéristiques histologiques du glioblastome, à savoir un centre nécrotique entouré par une structure en « pseudo-palissade » (**Figure 8**), est également liée à l'hypoxie tumorale [139, 140].



Figure 8. Coupe d'une tumeur de glioblastome avec la coloration Hématoxyline & Eosine. Une zone nécrotique (N) entourée par la structure en pseudo-palissade (P). Image de Brat et al. [139].

L'hypoxie tumorale peut influencer la physiologie ainsi que la réponse thérapeutique des tumeurs. Chez les patients atteints de glioblastome, l'hypoxie est associée à l'agressivité de tumeur et à un mauvais pronostic [141, 142].

L'hypoxie agit sur les cellules principalement *via* les facteurs de transcription HIF1-3 (Hypoxia-inducible Factor 1-3) qui sont des hétérodimères constitués de sous-unités α et β . La sous-unité β est exprimée de manière constitutive alors que l'expression de la sous-unité α est régulée au niveau post-traductionnel. En condition normoxique, la sous-unité α est hydroxylée par les enzymes PHD (Prolyl Hydroxylases-Domain protein) puis liée par la protéine suppresseur de tumeur VHL (von Hippel-Lindau) qui la soumet à la dégradation par le système Ubiquitine-Protéasome. En condition hypoxique, la sous-unité α n'est plus dégradée et s'accumule dans les cellules. Elle s'associe à la sous-unité β pour former le facteur de transcription hétérodimérique qui se lie à des éléments de réponse HREs (Hypoxia-Responsive Elements) dans le promoteur de nombreux gènes cibles et affecte les différentes fonctions cellulaires couvrant la reprogrammation métabolique, l'angiogenèse, l'invasion, la pluripotence et la résistance aux traitements [143].

1.3.2.2. Niche vasculaire et Niche hypoxique des CSGs

Il est bien connu que les cellules souches neurales résident dans les zones

anatomiques spécifiques du cerveau : la zone sous-ventriculaire bordant les ventricules cérébraux et la couche sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe [144]. Dans ces zones, les cellules spécifiques telles que les cellules endothéliales et les cellules épendymaires forment une niche qui nourrit les cellules souches neurales et maintient leur auto-renouvellement [145].

Comme les cellules souches neurales, les CSGs CD133⁺ et Nestine⁺ ont également été identifiées dans une niche vasculaire [146]. La co-culture des CSGs avec les cellules endothéliales renforce leur prolifération *in vitro*. La co-injection des CSGs avec les cellules endothéliales accélère la croissance de la tumeur dans un modèle orthotopique [146]. Pourtant il existe un « paradoxe de l'œuf et de la poule » concernant cette hypothèse de « niche vasculaire », parce que les CSGs elles-mêmes peuvent montrer les effets pro-angiogéniques en sécrétant des facteurs tels que SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) et VEGF-A [147, 148]. De plus, il a également été montré que les CSGs pouvaient se trans-différencier en cellules endothéliales [149, 150], ce qui complique encore la question qui est de savoir si la niche vasculaire est nécessaire au maintien des CSGs [56]. Néanmoins, toutes ces études suggérèrent que l'interaction entre les CSGs et la niche vasculaire est plutôt bidirectionnelle [151].

L'autre hypothèse concernant la localisation des CSGs dans la tumeur suggère que les CSGs sont situées dans une niche hypoxique. Il est bien connu que la condition hypoxique facilite l'auto-renouvellement des NSCs et des CSGs *in vitro* [152, 153]. HIF-2α régule la capacité tumorigénique des CSGs. Son expression est corrélée à un mauvais pronostic des patients [153]. Les cellules tumorales CD133⁺ ont également été observées dans la zone en pseudo-palissade qui entoure le centre nécrotique des glioblastomes, dont la formation pourrait être liée à une hypoxie sévère dans la tumeur [154]. Plus récemment, Patel et al. [125] ont séquencé l'ARN total de 430 cellules individuelles provenant de 5 tumeurs de glioblastome primaires dans le but d'établir le profil d'expression des gènes dans chaque cellule tumorale. Ils ont observé un gradient de la signature de transcription « état souche » dans chaque tumeur (une différence d'expression des gènes de la signature dans les différentes cellules tumorales) et cette signature était corrélée à la signature « hypoxie ». De manière intéressante, la signature « état souche » était également corrélée avec la signature « quiescence ».

Pourtant, ces deux hypothèses de niche des CSGs ne sont pas

nécessairement contradictoires. Les deux niches pour les CSGs peuvent coexister dans les tumeurs de glioblastome (**Figure 9**), étant donné que l'hypoxie favorise la migration des CSGs et que ces CSGs dans les zones hypoxiques peuvent migrer vers les niches vasculaires ou bien les GSCs elles-mêmes induisent la vascularisation en recrutant les cellules endothéliales par la production les facteurs tels que SDF-1 et VEGF-A ou en se différenciant en cellules endothéliales [56]. La source de nutriment établie active ensuite les CSGs en quiescence et favorise la formation de nouvelles colonies, ce qui pourrait créer de nouveau un environnement hypoxique.



Figure 9. Niche vasculaire et hypoxique des CSGs. Les niches vasculaires sont importantes pour l'auto-renouvellement des CSGs et la croissance des tumeurs, probablement à cause des facteurs sécrétés par les cellules endothéliales et aux nutriments venants des vaisseaux sanguins. D'autre part, les CSGs infiltrantes maintiennent leur état souche *via* l'activation des voies de signalisation liées à l'hypoxie. En même temps, ces CSGs peuvent recruter les cellules endothéliales par la sécrétion des facteurs angiogéniques ou se différencier en cellules endothéliales, ce qui supporte la croissance des tumeurs. EC, cellule endothéliale; PC, péricyte. D'après Chen et al. [56].

1.3.2.3. Hypoxie et état souche

L'hypoxie joue un rôle important dans la maintien de la pluripotence des cellules souches normales [155–157]. L'hypoxie peut aussi réguler la pluripotence des cellules tumorales de glioblastome, *via* le facteur de transcription HIF-2 α . HIF-2 α peut se lier au promoteur et induire l'expression d'Oct-4, qui est un facteur de transcription essentiel pour maintenir les cellules souches embryonnaires dans un état indifférencié [158].

Li et al ont observé que HIF-2 α était exprimé spécifiquement dans les CSGs alors que HIF-1 α était exprimé dans les CSGs et les cellules non-souches de glioblastome [153]. Dans les biopsies de glioblastome, HIF-2 α co-localisait avec les marqueurs de CSGs. Il a été également montré que la condition hypoxique pouvait reprogrammer les cellules non-souches de glioblastome vers un phénotype de CSGs. Cela était accompagné par une surexpression de HIF-2 α ainsi que les marqueurs de pluripotence Oct-4, Nanog et c-Myc. L'importance de HIF-2 α dans la reprogrammation a été montré par l'expérience où l'introduction d'une construction non-dégradable de HIF-2 α dans les lignés cellulaires de glioblastome induisait l'expression des marqueurs de pluripotence dans les cellules et augmentait leur capacité tumorigène [159]. Dans une étude similaire, l'hypoxie régulait l'expression des marqueurs de CSGs. La surexpression de HIF-2 α mais non celle de HIF-1 α induisait une augmentation de l'expression de ces marqueurs [160].

1.3.2.4. Hypoxie, angiogenèse et invasion

Les glioblastomes sont parmi les tumeurs humaines les plus vascularisées [34]. Le stimulus pro-angiogénique le plus puissant dans le glioblastome est l'hypoxie. Cet effet pro-angiogénique de l'hypoxie est médié par HIF-1a, qui fonctionne comme un senseur du niveau d'oxygénation dans les tissus. La principale voie de signalisation impliquée dans ce processus est la voie HIF-1/VEGF-A. Après sa fixation sur le promoteur du gène codant VEGF-A, HIF-1 peut induire directement l'expression de VEGF-A [161], un facteur pro-angiogénique surexprimé dans le glioblastome qui induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales [34]. HIF-1 contrôle aussi l'expression d'autres facteurs angiogéniques tels que PGF factor), PDGFβ (platelet-derived (placenta growth growth factor β), angiopoïétine-1/2 [162].

Dans les tumeurs de glioblastome, la structure en pseudo-palissade qui entoure le centre nécrotique est constituée de cellules tumorales qui sont en train de migrer vers la périphérie de la tumeur [139, 140, 163]. Il a été suggéré que ces cellules se trouvaient dans une zone hypoxique à cause d'une diffusion d'oxygène limitée et migraient vers les vaisseaux sanguins fonctionnels [139]. Ceci a été supporté par la découverte que HIF-1α favorise l'invasion des cellules tumorales régulation de l'expression de cathepsine D, MMP-2 par la (matrix metalloproteinase-2), uPAR (urokinase plasminogen activator receptor), fibronectine. Il a été aussi montré que HIF-1a était exprimé dans le bord invasif dans le glioblastome [163].

1.3.2.5. Hypoxie et radio/chimiorésistance

1.3.2.5.1. Radiorésistance

Il a été bien établi que les cellules tumorales hypoxiques sont plus résistantes à la radiothérapie que les cellules normoxiques [164, 165]. Le mécanisme derrière cette résistance est multifactoriel.

Les radiations ionisantes induisent la mort des cellules cancéreuses principalement par la génération de lésions au niveau de l'ADN, *via* la formation des radicaux libres. La présence d'oxygène dans les tumeurs peut renforcer cet effet destructeur en générant des radicaux libres d'oxygène (ROS), un phénomène appelé « effet de renforcement par oxygène ». Il a été montré que pour atteindre le même effet biologique, il fallait une dose de radiation trois fois plus élevée en absence d'oxygène qu'en présence d'oxygène [164, 165].

D'ailleurs, il existe des preuves qui suggèrent que le changement au niveau protéomique et génomique induit par l'hypoxie peut aussi avoir un impact sur la radiorésistance en modulant l'expression des protéines impliquées dans la réponse aux stress et à l'apoptose [166–168].

La modulation de l'hypoxie dans les tumeurs est devenue une stratégie émergente pour sensibiliser les cellules tumorales à la radiothérapie. Dans une étude récente, avec un modèle de souris orthotopique de glioblastome, Clarke et al. [169] ont montré qu'un prétraitement hyperoxique (100% oxygène pendant 25 min) des souris avec une masque sensibilisait les cellules tumorales à la radiation, ralentissait la croissance des tumeurs et prolongeait la survie des souris. Une sensibilisation similaire à la radiothérapie a été aussi observée *in vitro* sur les cellules tumorales de glioblastome prétraitées dans la condition hyperoxique. La surexpression de HIF-1α dans les cellules tumorales diminuait cette sensibilisation.

1.3.2.5.2. Chimiorésistance

L'hypoxie tumorale est aussi corrélée avec la résistance aux agents de chimiothérapie dans le glioblastome. Cette résistance peut être expliquée par deux mécanismes différents induits par l'hypoxie : induction de l'état souche et l'induction des marqueurs de chimiorésistance [170].

Dans deux études indépendantes, une augmentation de l'expression des marqueurs des CSGs et des marqueurs liés à la chimiorésistance a été observée dans les cellules de glioblastome en hypoxie [171, 172]. Dans les biopsies de tumeurs de glioblastome, Pistollato et al. ont montré que les cellules dans les zones hypoxiques exprimaient le marqueur de CSGs CD133 ainsi que la méthyl guanine méthyl transférase (MGMT), l'enzyme impliquée dans la réparation d'ADN, et liée à la résistance au TMZ, composé de référence utilisé dans le traitement de glioblastome [171]. Il a été aussi montré que les cellules tumorales dérivées des zones hypoxiques étaient plus résistantes au TMZ que les cellules dérivées des zones normoxiques.

1.3.3. Acidité tumorale

1.3.3.1. Acidité et Métabolisme tumoral : effet Warburg et autres

L'autre caractéristique bien connue actuellement du microenvironnement tumoral est une acidification extracellulaire, qui est observée dans une variété de tumeurs solides [135, 173–176]. Le pH peut être très varié au sein de la même tumeur, avec des zones acides localisées. Les mesures du pH à l'aide d'électrodes ont montré que le pH pouvait atteindre 5,9 dans les tumeurs cérébrales, avec une valeur moyenne à environ 6,8 alors que le pH dans le tissu cérébral normal se situe autour de 7,1 [135].

Il existe plusieurs explications à cette acidité tumorale. Premièrement, comme cela a été observé par Otto Warburg dans les années 1950, les cellules

cancéreuses montrent un profil métabolique bien spécifique. Au lieu d'utiliser la phosphorylation oxydative, les cellules cancéreuses utilisent la glycolyse pour la production d'énergie, produisant ainsi du lactate qui sera libéré avec les protons dans le milieu extracellulaire, même dans des conditions non hypoxiques, un phénomène appelé aussi « l'effet Warburg » ou « la glycolyse aérobie » [177].

Ce phénomène semblait initialement contre-intuitif car d'un point de vue énergétique, la glycolyse (2 ATP par glucose) est beaucoup moins efficace que la phosphorylation oxydative (jusqu'à 38 ATP par glucose). Cependant, les études durant la dernière décennie sur le métabolisme des cellules cancéreuses ont permis de progresser dans la compréhension de ce phénomène [178-183]. Brièvement, pour supporter la prolifération et garantir l'homéostasie cellulaire, les cellules tumorales ont besoin non seulement d'ATP, mais aussi de matière (blocs élémentaires source de carbone, d'azote, et autres éléments) permettant de soutenir l'activité anabolique, bioénergétique et la signalisation cellulaire. En augmentant l'absorption du glucose et en diminuant la phosphorylation oxydative, les cellules tumorales renforcent le flux glycolytique et accumulent des intermédiaires pour la synthèse de la biomasse, mais aussi de NADPH/H⁺ pour maintenir le potentiel Redox dans la cellule. Néanmoins, il est bien accepté maintenant que la reprogrammation métabolique du cancer est loin d'être limitée à l'effet Warburg [184]. Le métabolisme des cellules cancéreuses peut être hétérogène spatialement et temporellement dans une même tumeur [183].

D'ailleurs, l'hypoxie tumorale peut encore aggraver ce phénomène en favorisant la glycolyse. Ainsi, pour faire face à la production excessive de lactate, de protons et de CO₂, les cellules cancéreuses mettent en place de nombreux mécanismes pour exporter le proton et garder le pH intracellulaire dans une limite physiologique (**Figure 10**) [185]. La production excessive et l'exportation du proton par les cellules cancéreuses, combinées à une perfusion inefficace due à la vascularisation tumorale chaotique, induisent une acidification extracellulaire dans les tumeurs.



Figure 10. Régulation du pH intracellulaire (pH_i**) dans les cellules cancéreuses.** Les cellules cancéreuses survivent dans un environnement acide en coordonnant la fonction des protéines régulant le pH, telles que NHE1 (Na⁺/H⁺ exchanger 1), CAs (carbonic anhydrase), NBC (Na⁺/HCO⁻ co-transporter), AE1 (anion exchange protein 1), MCTs (monocarboxylate transporters) et V-ATPase. L'hypoxie tumorale favorise l'expression de certaines protéines impliquées dans la régulation du métabolisme et du pH_i *via* le facteur de transcription HIF. GLUT1, glucose transporter type 1; LAT1, L-type amino acid transporter 1; LDHA, lactate dehydrogenase A; PDH, pyruvate dehydrogenase. D'après Pouysségur et al. [185].

1.3.3.2. Acidité et invasion tumorale

Une des caractéristiques du glioblastome est l'infiltration des cellules tumorales dans les tissus normaux du cerveau, ce qui empêche la résection totale de la tumeur, à l'origine des récurrences du glioblastome.

Il a été bien établi que l'acidité extracellulaire jouait un rôle important dans le processus d'invasion tumorale [186]. L'acidité favorise l'invasion tumorale par deux principaux mécanismes : d'une part l'acidité induit une toxicité sur les cellules normales alors que les cellules tumorales sont résistantes au stress acide; d'autre part l'acidité induit la dégradation de la matrice extracellulaire, *via* la libération et l'activation des protéases telles que le cathépsine B [187, 188], MMP2 (Matrix Métallopeptidase 2), MMP9 [189, 190]. Dans un modèle de xénogreffe avec les

cellules du cancer du sein et du colon, Estrella et al. [191] ont observé une corrélation entre l'acidité et l'invasion tumorale. Dans les tumeurs, les zones avec le plus d'invasion correspondaient aux zones avec le pH le plus bas. De manière intéressante, le traitement systématique avec du bicarbonate de sodium diminuait le gradient du proton dans la tumeur et empêchait l'invasion tumorale.

1.3.3.3. Acidité et plasticité cellulaire

Bien que le rôle de l'acidité extracellulaire dans la régulation de l'état souche des cellules cancéreuses soit moins caractérisé que celui de l'hypoxie, il existe quelques études sur la régulation de la plasticité cellulaire par l'acidité. Néanmoins, dans le contexte du microenvironnement tumoral, il est difficile de séparer l'hypoxie et l'acidité, qui sont souvent intimement liées.

Dans une étude publiée en 2011, il a été montré que la condition acide favorisait l'état souche des CSGs [192]. L'exposition des CSGs à un milieu de culture acide (pH 6,5) augmentait l'expression des marqueurs de cellules souches (Olig2, Oct4 et Nanog), augmentait leur capacité de tumorigenèse dans les souris immuno-déficients. Les auteurs ont également montré une induction de l'expression de HIF-2 α par l'acidité, ce qui suggérait que l'acidité favorisait le maintien de l'état souche des CSGs par la voie de signalisation HIF-2 α .

1.3.3.4. Acidité et immunosuppression

Lors de leur développement, les tumeurs malignes sont capables d'échapper à la réponse du système immunitaire [38]. Des études récentes ont montré que la réponse immunitaire anti-tumorale était modulée par le microenvironnement tumoral, y compris l'acidité [193].

L'acide lactique produit par les cellules tumorales inhibe la prolifération et la production des cytokines des lymphocytes T cytotoxiques *in vitro* [194]. La raison serait que les lymphocytes T activés dont le métabolisme repose également sur la glycolyse exportent plus difficilement le lactate produit dans l'environnement tumoral déjà riche en ce métabolite. La perturbation métabolique qui en résulte altèrerait leur fonctionnement. Dans une autre étude, un traitement par l'inhibiteur de la pompe à proton ésoméprazole, en allégeant l'acidité tumorale a permis de restaurer le fonctionnement des lymphocytes T [195].

1.3.3.5. Acidité et résistance aux traitements

La membrane cytoplasmique fonctionne comme une barrière physique semi-perméable qui sépare l'environnement intracellulaire et extracellulaire. Des petites molécules non-chargées peuvent diffuser facilement à travers la membrane alors que le passage pour les molécules chargées est relativement plus difficile. La diffusion d'agents chimiothérapiques ionisables peut ainsi être altérée par des modifications du pH de l'environnement tumoral. Ainsi pour des molécules légèrement basiques telles que la doxorubicine, l'acidité extracellulaire que l'on peut trouver dans le microenvironnement tumoral peut limiter leur passage à travers la membrane des cellules cancéreuses compromettant leur efficacité anti-tumorale. Ceci a été montré dans des études *in vitro* et *in vivo* [174, 196–200].

L'acidité extracellulaire peut également jouer un rôle dans la résistance aux médicaments en augmentant l'activité de la glycoprotéine P, impliquée dans l'efflux des médicaments [201–204]. L'activation de la voie de signalisation p38 MAP Kinase par l'acidité est impliquée dans l'activation de la glycoprotéine P. L'inhibition de la voie p38 restaure la sensibilité des cellules tumorales aux agents de chimiothérapie [203].

Contexte du travail de thèse

Contexte du travail de thèse

Le but de l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse est d'utiliser une approche de chimie biologie intégrative pour étudier la pathophysiologie des cellules souches cancéreuses de glioblastome (CSGs) et trouver des molécules capables d'interférer avec la viabilité de ces cellules ou d'induire leur différenciation. Un criblage différentiel de la chimiothèque Prestwick sur les cellules CSGs en prolifération et en quiescence a permis d'identifier le bisacodyl appartenant à la classe des laxatifs stimulants comme une molécule présentant une activité cytotoxique spécifique sur les CSGs en quiescence. En tant que médicament, la molécule ne présente pas de toxicité particulière et elle est inactive sur des lignées cellulaires de glioblatomes en culture (U87-MG) ou des cultures de cellules non cancéreuses telles les cellules souches neurales fœtales humaines, les astrocytes humains et les cellules HEK [205].

Les études réalisées dans le cadre de ma thèse ont pour objectifs de :

- comprendre le mode d'action du bisacodyl sur les CSGs en quiescence
- réaliser une étude de relation structure-activité du bisacodyl, afin d'optimiser la molécule et de créer des outils pharmacologiques et/ou des candidats médicaments
- développer un modèle cellulaire tridimensionnel de CSGs pour tester l'activité des composés
- réaliser des études de pharmacocinétique et de biodistribution du bisacodyl chez l'animal
- étudier l'activité du bisacodyl dans un modèle animal
- chercher d'autres molécules actives sur les CSGs.

2. Matériels et Méthodes

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Les cellules TG1 et OB1

2.1.1.1. Conditions de culture cellulaire

Les cellules TG1 et OB1 sont des CSGs isolées et caractérisées dans le laboratoire de Dr Hervé Chneiweiss (Neuroscience Paris Seine, UPMC, Paris) [78]. Ces cellules sont cultivées dans un milieu de culture NS34 composé de DMEM/F12, glucose, GlutaMAX, HEPES, sodium bicarbonate, pénicilline/streptomycine, complété avec les suppléments B27, N2 et G5. Tous ces éléments sont fournis par Invitrogen. Le supplément G5 contient les facteurs de croissance EGF et bFGF. La composition du milieu est donnée dans le **Tableau 1**.

Elément	Référence/Invitrogen	Quantité
DMEM	31600091	1x
F12	21700018	1x
D-glucose anhydre	15023021	0,6%
GlutaMAX-I	35050038	1x
Tampon HEPES	15630056	5 mM
Sodium Bicarbonate	25080060	0,1%
Pénicilline/Streptomycine	15140148	10 unités/mL, 10 μg/mL
Supplément N2	17502048	1x
Supplément G5	17503012	1x
Supplément B27	17504044	0,5x

Tableau 1. Composition du milieu de culture NS34.

Les cellules sont passées deux fois par semaine. Lors du passage, les cellules

sont récoltées par une centrifugation à 218 g pendant 5 min. Les cellules sont ensuite dissociées mécaniquement par 100 allers-retours avec une pipette P1000 dans 1 mL de milieu conditionné. Le nombre de cellules vivantes et mortes est déterminé avec un comptage au bleu de Trypan. Les cellules dissociées sont ensemencées dans le milieu renouvelé à une densité à 2,5 x 10⁵ cellules/mL. Le milieu renouvelé est composé de 90% de milieu NS34 frais et 10% de milieu conditionné. Les cellules sont incubées à 37 °C, 5% CO₂ sous atmosphère humide et à l'obscurité.

2.1.1.2. Mise en quiescence des cellules

Pour obtenir les cellules TG1 et OB1 en quiescence, les cellules sont laissées dans l'incubateur pendant 9 jours sans renouvellement du milieu après un passage normal. Le jour du passage est considéré comme le jour J0. La quiescence des cellules au jour 9 est vérifiée avec le test d'incorporation d'EdU.

2.1.1.3. Congélation et décongélation des cellules

Les cellules sont récoltées par centrifugation à 218 g pendant 5 min à 4 C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans un mélange de 90% FBS (Invitrogen) et 10% DMSO (Sigma Aldrich) à une densité d'environ 3 x 10⁶ cellules/mL. La suspension cellulaire est aliquotée rapidement en fractions de 1 mL dans les cryotubes de 1,5 mL. Les tubes des cellules sont ensuite placées à -80 C pendant une semaine et puis transférées dans un container d'azote liquide.

Pour la décongélation, 1 mL de milieu NS34 chauffé à 37 °C est ajouté dans le cryotube contenant les cellules congelées. On transfère ce qui est décongelé dans 30 mL de milieu NS34 chauffé à 37 °C dans un Falcon de 50 mL. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de cellules dans le cryotube. Les cellules sont ensuite centrifugées à 218 g pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire repris dans 10 mL de milieu NS34. Les cellules sont mises en culture dans une flasque T75 à 37 °C, 5% C O₂ sous atmosphère humide et à l'obscurité.

2.1.2. Les cellules U87-MG

Les cellules U87-MG (catalogue HTB-14, ATTC) sont une lignée cellulaire issue de glioblastome. Elles sont cultivées sous forme adhérente dans le milieu

EMEM (ATTC) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Invitrogen) et pénicilline (50 unités/mL)/streptomycine (50 µg/mL) (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

Les cellules U87-MG sont passées 1 à 2 fois par semaine lorsqu'elles arrivent à environ 90% de confluence. Lors du passage, les cellules sont rincées avec du PBS puis détachées par une incubation de 2-3 min avec la trypsine-EDTA (Invitrogen) dans l'incubateur. La trypsine est neutralisée avec le milieu de culture et les cellules sont récoltées par une centrifugation à 218 g pendant 5 min. Les cellules sont ensuite ensemencées dans le milieu de culture frais à une dilution de 2 à 5 fois et cultivées à 37 °C, 5% CO 2 sous atmosphère humide et à l'obscurité.

2.1.3. Les astrocytes humains

Les astrocytes humains (catalogue 1800, ScienCell Research Laboratories) sont des cellules primaires isolées de cerveau humain. Ces cellules poussent sous forme adhérente dans les flasques recouvertes préalablement de poly-L-Lysine (ScienCell). Les cellules sont cultivées dans le milieu Astrocyte Medium (ScienCell) constitué de milieu basal, Astrocyte Supplement, FBS et pénicilline/streptomycine selon les recommandations du fournisseur.

Les astrocytes humains sont divisés lorsque la culture atteint environ 80% de confluence. Après un rinçage avec du PBS, les cellules sont détachées avec la trypsine-EDTA (Invitrogen) et récoltées par centrifugation à 218 g pendant 5 min. Les cellules sont ensuite comptées au bleu de Trypan, puis ensemencées à une densité de 5000 cellules/cm². Les cellules sont incubées à 37 °C, 5% CO₂ sous atmosphère humide et à l'obscurité. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours jusqu'à ce que les cellules soient à 50% de confluence, puis tous les jours jusqu'à 80% de confluence.

2.2. Evaluation de l'état de la prolifération des cellules TG1 et OB1

L'état de la prolifération des cellules TG1 et OB1 est évalué par le test d'incorporation d'EdU, l'analyse de l'expression de Ki67 et l'analyse du cycle cellulaire.

2.2.1. Test d'incorporation d'EdU

La synthèse d'ADN est mesurée par l'incorporation d'EdU (5-ethynyl 2-desoxyuridine) dans les cellules TG1 et OB1 à l'aide de l'essai Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit (catalogue C10632, Life Technologies) suivant le protocole du fournisseur.

L'EdU à la concentration de 10µM est ajoutée dans la culture cellulaire la veille. Après une incubation pendant la nuit, les cellules sont fixées avec une solution contenant du paraformaldéhyde puis perméabilisées avec une solution contenant de la saponine (les solutions sont fournies dans l'essai). Les cellules sont ensuite incubées dans un mélange réactionnel contenant l'azide couplé à l'Alexa 488 pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules qui ont incorporé l'EdU sont marquées par l'Alexa 488.

Les cellules sont analysées avec le cytomètre en flux BD FACSCalibur (BD Biosciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

2.2.2. Analyse du cycle cellulaire et de l'expression de ki67

Les cellules TG1 et OB1 dissociées (1 x 10⁶ cellules) sont perméabilisées et fixées par une incubation dans 500 µL de solution à 70% éthanol dans l'eau à -20 °C pendant 2h. Après un lavage dans 3 mL de sol ution à 1% BSA dans du PBS, les cellules sont reprises dans 500 µL de solution à 1% BSA/PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec 5 µL de l'anticorps anti-Ki67 conjugué au FITC (MHKI6701, Life technologies) ou avec 5 µL de l'anticorps contrôle (isotype IgG1 conjugué au FITC (MG101, Life technologies)) à température ambiante pendant 30 min. Les cellules sont lavées dans 1 mL de solution à 1% BSA/PBS et reprises dans 500 µL de solution à 1% BSA/PBS. Après un traitement avec 10 µg/mL de RNase A (Sigma Aldrich) et 20 µg/mL d'iodure de propidium (Sigma Aldrich) à température ambiante pendant 30 min, les cellules sont analysées avec le cytomètre en flux BD FACSCalibur (BD Biosciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

2.3. Test de senescence

L'activité de la β -galactosidase associée à la senescence est examinée avec

le kit commercial Cellular Senescence Assay Kit (KAA002, Merck Millipore) en suivant le protocole du fournisseur. Brièvement, les cellules sont d'abord fixées dans une solution de fixation contenant du paraformaldéhyde (PFA) à température ambiante pendant 10 min puis incubées avec la solution SA- β -gal Detection Solution à 37 °C pendant la nuit. Les cellules sont ensuite examinées sous microscope à fond clair. Les cellules U87-MG traitées avec 100 μ M de témozolomide pendant 5 jours sont utilisées comme contrôle positif.

2.4. Evaluation de l'expression des marqueurs de surface des CSGs

2.4.1. Détection de CD133 par cytométrie en flux

Après une dissociation mécanique, 1×10^6 cellules sont reprises dans 100 µL de solution à 0,5% BSA dans du PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec 10 µL d'anticorps anti-CD133 conjugué au FITC (130-105-226, Miltenyi Biotec) ou 10 µL d'isotype contrôle conjugué au FITC (130-104-562, Miltenyi Biotec) à l'abri de la lumière dans le réfrigérateur pendant 10 min. Les cellules sont ensuite lavées dans 2 mL de solution à 0,5% BSA dans du PBS, reprises dans 0,5 mL de cette même solution, puis analysées avec le cytomètre en flux BD FACSCalibur (BD Biosciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

2.4.2. Détection de CD56 et CXCR4 par immunofluorescence

Les cellules sont dissociées mécaniquement puis centrifugées sur les lames avec la centrifugeuse Shandon Cytospin (Thermo Scientific). L'auto-fluorescence cellulaire est bloquée par une incubation avec 0,06% KMnO₄ dans du PBS à température ambiante pendant 10 min. Après un blocage avec une solution à 1% BSA dans du PBS, les lames sont incubées avec l'anticorps anti-CXCR4 (Merck Millipore, AB1847, 1:50) ou l'anticorps anti-CD56 (BioLegend, 304601, 1:25) à 4 °C pendant la nuit. Les lames sont ensuite lavées avec le PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à l'Alexa 488 (Jackson Immuno Research, 1:250) à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 20 min. Le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) est utilisé pour la contre-coloration des noyaux
avant l'observation au microscope.

2.5. Test de clonalité

Les cellules TG1/OB1 en prolifération et en quiescence sont dissociées mécaniquement. Après un comptage au bleu de Trypan, les cellules sont ensemencées dans la plaque à 96 puits (655090 Greiner) à différente densité (1, 2, 5, 10, 20 et 50 cellules par puits dans 200 μ L de milieu NS34 frais). 50 μ L de milieu NS34 frais est ajouté dans chaque puits toutes les semaines. Le nombre de puits contenant au moins une sphère ainsi que le nombre de sphères formées dans chaque puits est déterminé 3 semaines après l'ensemencement des cellules.

2.6. Différenciation des CSGs in vitro

Les cellules TG1/OB1 en prolifération et en quiescence sont dissociées et mises en culture dans le milieu NS34 dont les suppléments sont remplacés par 10% FBS (Invitrogen). Le milieu de culture est renouvelé 2 fois par semaine. Au bout de 14 jours, les cellules sont récoltées à l'aide des grattoirs de cellules. L'ARN total des cellules avant et après l'induction de la différenciation est extrait, purifié, caractérisé et rétro-transcrit en ADNc selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes, section 2.8. L'expression des marqueurs de pluripotence et de différenciation (Sonic Hedgehog (SHH): Hs 00179843-m1, β3 tubulin (TUBB3): Hs 00801390-S1 and glial fibrillary acid protein (GFAP): Hs00909233-m1) est déterminée avec les essais individuels TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Life Technologies), selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes, section 2.8.

2.7. Evaluation de la capacité tumorigène *in vivo* des CSGs

Les souris (NMRI Nude, Janvier) sont anesthésiées par inhalation de l'isoflurane. 10^5 cellules OB1 en prolifération ou en quiescence sont injectées dans le striatum gauche de souris (4 souris par condition) en utilisant un système stéréotaxique avec une seringue Hamilton de 10 µL. L'aiguille est maintenue en place pendant 5 min après l'injection puis retirée avec précaution.

8 semaines après l'injection, les souris sont anesthésiées avec la xylazine et

perfusées avec une solution de PBS contenant 4% de formaldéhyde. Les cerveaux des souris sont fixés dans la même solution, inclus dans la paraffine et coupés en sections de 10 µm. Les cellules humaines sont identifiées par marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-vimentine humaine (clone V9, Dako) selon le protocole décrit dans Patru et al. [78]. Les cellules en prolifération sont identifiées avec l'anticorps anti-Ki67 (clone MIB-1, Dako), selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes, section 2.17.1.

2.8. Extraction et contrôle de la qualité des ARN. PCR quantitative.

L'ARN total est isolé à partir de 5 à 10 x 10⁶ cellules TG1 et OB1 en utilisant le TRI Reagent (Euromedex) selon le protocole du fournisseur. Le protocole RNeasy mini kit (QIAGEN) est utilisé pour la purification des échantillons d'ARN. La pureté des échantillons est examinée par des analyses du spectre d'absorption à l'aide du NanoDrop ND-1000 (Labtech). Les rapports des absorbances A260/A280 et A260/A230 sont déterminés. Seuls les ARN présentant des rapports d'absorbance entre 1,8 et 2,1 sont retenus. La concentration d'ARN est déterminée avec l'essai Quant-it RNA Assay Kit (Invitrogen) en utilisant le fluorimètre Qubit. L'intégrité de l'ARN est évaluée avec le Bioanalyzer Agilent 2100 et les puces RNA 6000 LabChip. Les échantillons d'ARN avec une valeur RIN (RNA Integrity Number) (2100 expert software, Agilent Technologies) supérieure à 9 sont acceptés.

L'ARN total (1 µg) est rétro-transcrit en ADNc simple brin en utilisant le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Life Technologies). La PCR en temps réel est réalisée avec les essais individuels de TaqMan sur l'appareil ABI Prism 7000HT (Applied Biosystems, Life Technologies). Les résultats sont normalisés en utilisant l'ARN ribosomique 18S ARN comme gène de référence.

2.9. Expression des marqueurs de pluripotence et de différenciation dans les CSGs

L'expression des ARNm codant des marqueurs de pluripotence et de différenciation a été évaluée en utilisant les puces TaqMan Human Stem Cell

Pluripotency (Applied Biosystems, Life Technologies) basées sur la PCR quantitative en suivant le protocole du fournisseur (**Tableau 2**).

Groupe	Nombre	Gènes
Gène exprimé dans cellules indifférenciées	6	NANOG, POU5F1, TDGF1, DNMT3B, GABRB3, GDF3
Gène lié à pluripotence	3	NANOG, POU5F1, SOX2
Gène lié à état souche	33	BRIX, CD9, COMMD3, CRABP2, EBAF, FGF4, FGF5, FOXD3, GAL, GBX2, GRB7, IFITM1, IFITM2, IL6ST, IMP2, KIT, LEFTB, LIFR, LIN28, NODAL, NOG, NR5A2, NR6A1, PODXL, PTEN, REST, SEMA3A, SFRP2, TERT, TFCP2L1, UTF1, Xist, ZFP42
Marqueur de différenciation	50	ACTC, AFP, CD34, CDH5, CDX2, CGB, COL1A1, COL2A1, DDX4, DES, EOMES, FLT1, FN1, FOXA2, GATA4, GATA6, GCG, GCM1, GFAP, HBB, HBZ, HLXB9, IAPP, INS, IPF1, ISL1, KRT1, LAMA1, LAMB1, LAMC1, MYF5, MYOD1, NES, NEUROD1, NPPA, OLIG-2, PAX4, PAX6, PECAM1, PTF1A, RUNX2, SERPINA1, SOX17, SST, SYCP3, SYP, T, TAT, TH, WT1
Contrôle	6	ACTB, RAF1, CTNNB1, GAPD, EEF1A1, 18S

Tableau 2. Liste des gènes dans les puces TaqMan Human Stem Cell Pluripotency (Applied Biosystems, Life Technologies).

Les protocoles pour l'extraction, le contrôle de la qualité de l'ARN, la rétrotranscription et la PCR quantitative sont décrits dans Matériels et Méthodes, section 2.8.

2.10. Evaluation de l'activité cytotoxique du bisacodyl/DDPM sur les cellules TG1 et OB1

Les cellules TG1/OB1 en prolifération (3 x 10^4 cellules par puits) et en quiescence (4 x 10^4 cellules par puits) sont dissociées et ensemencées dans les plaques à 96 puits (655090 Greiner) dans un volume de 50 µL. Les composés à tester sont ajoutés à la concentration finale indiquée (avec 1% DMSO) dans un volume de 50 µL. Les puits du contrôle négatif contiennent les cellules traitées avec 1% DMSO.

Le taux d'ATP est mesuré 24h après le traitement avec l'essai CellTiter-Glo (Promega) en suivant le protocole du fournisseur. La luminescence dans chaque puits est mesurée sur l'appareil Envision (Perkin Elmer). Le taux d'ATP relatif à chaque condition est calculé en divisant le signal mesuré dans les puits par le signal dans les puits correspondant au contrôle négatif. Les courbes dose-réponse sont ajustées avec l'équation d'Hill :

$$S_{Théo} = \frac{S_{max} + S_{min} \times ([composé] \times \frac{1}{EC_{50}})^n}{1 + ([composé] \times \frac{1}{EC_{50}})^n}$$

 $S_{Théo}$: le signal théorique calculé d'après l'équation

Smax : le signal maximum obtenu (en théorie : 100%)

 S_{min} : le signal minimum obtenu (0% dans la majorité des cas, mais toujours positif)

[composé] : la concentration du composé testé

*EC*₅₀ : concentration à laquelle le composé testé produit 50% de la réponse maximale

n : coefficient de Hill

2.11. Préparation du milieu NS34 à différents pH

Afin d'augmenter le pouvoir tampon du milieu NS34, le tampon HEPES (Invitrogen) et le tampon BisTris (Sigma Aldrich) sont ajoutés dans le milieu pour avoir une concentration finale de 20 mM de chaque élément.

Le pH est ajusté avec 1M HCI (Sigma Aldrich). Le milieu de culture au pH choisi est ensuite mis dans l'incubateur à 37 °C, 5 % CO₂ pendant 1h. Le pH du milieu est mesuré et réajusté si nécessaire. Le milieu est passé sur un filtre à 0,22 μ m avant d'être utilisé.

2.12. Détection de la fragmentation d'ADN par la méthode TUNEL

Les cellules TG1 en quiescence sont traitées avec 10 μ M bisacodyl ou DMSO pendant 24h. La staurosporine à 1 μ M est utilisée comme contrôle positif. La détection de la fragmentation d'ADN est réalisée avec l'essai DeadEnd fluometric TUNEL (Promega) en suivant le protocole du fournisseur.

Brièvement, les cellules sont lavées au PBS après le traitement. Elles sont ensuite fixées et perméabilisées avec 1% PFA et 0,2% Triton X-100 dans du PBS, respectivement. Les cellules sont incubées avec les réactifs pendant 1h à 37 °C à l'abri de la lumière. Après une incubation avec l'iodure de propidium/RNase A de 30 min à température ambiante, le signal TUNEL et la quantité d'ADN sont analysés avec le cytomètre en flux BD FACSCalibur (BD Biosciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

2.13. Microscope électronique en transmission

Les cellules OB1 en prolifération dans le milieu NS34 frais à pH 7,4 ou à pH 6,2, ainsi que les cellules OB1 en quiescence dans le milieu conditionné sont traitées avec 50 µM DDPM ou 1% DMSO pendant 24h. Les cellules traitées sont fixées dans 2,5% glutaraldéhyde and 2,5% PFA dans le tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4). Après un lavage dans le tampon cacodylate pendant 30 min, les cellules

sont post-fixées dans 1% de tétroxyde d'osmium dans le tampon cacodylate à 4 pendant 1h, contrastées avec l'acétate d'uranyle à 4 pendant 2h, déshydratées dans l'éthanol aux différentes concentrations (50%, 70%, 90%, 100%) et l'oxyde de propylène pendant 30 min.

Après les étapes de fixation et de déshydratation, les cellules sont incluses dans l'Epon 812. Les sections semi-fines sont coupées à 2 µm et colorées au bleu de toluidine. Les sections ultrafines sont coupées à 70 nm et contrastées avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Les sections ultrafines sont ensuite examinées avec le microscope électronique (Morgagni 268D). Les images sont capturées avec une caméra Mega View III (Soft Imaging System).

2.14. Analyse des protéines phosphorylées à l'aide de la puce «Human Phospho-Kinase Array»

L'état de phosphorylation de 45 protéines (dont 43 kinases) dans les cellules OB1 en quiescence est examiné en utilisant la puce Human Phospho-Kinase Array (R&D Systems) en suivant le protocole du fournisseur.

Les cellules OB1 (3,5 x 10⁶ cellules) en quiescence sont traitées avec 10 μ M de DDPM ou 1% DMSO pendant 2h. Les cellules traitées sont lysées avec le tampon de lyse (fourni dans le kit). Après une centrifugation à 14000g à 4 °C pendant 5min, le surnageant est récupéré. La quantité de protéine dans le surnageant est déterminée par la méthode de Bradford (Protein Assay de Bio-Rad).

Les membranes contenant les différents anticorps sont traitées avec le tampon de blocage fourni dans le kit, puis incubées avec le lysat de cellules OB1 (200 µg de protéines) à 4 °C pendant une nuit. Après 3 lava ges avec le tampon de lavage (fourni dans le kit), les membranes sont incubées avec le cocktail d'anticorps secondaires à température ambiante pendant 2h, puis avec la solution de Streptavidine couplée à la peroxydase (streptavidine-HRP) à température ambiante pendant 30 min. Le signal émis après application de la solution de révélation est détecté avec la caméra ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel ImageJ.

2.15. Analyse de la kinase WNK par Western blot

Les cellules OB1 en quiescence sont traitées avec 10 μ M DDPM pendant 10 min, 30 min et 2h. Après le traitement, les cellules sont lavées une fois dans du PBS froid et récoltées par une centrifugation à 218 g pendant 5 min à 4 °C. Les cellules sont ensuite reprises dans le tampon RIPA complet (250 μ L de tampon pour 5 x 10⁶ cellules) et laissées sur la glace pendant 1h. Pour préparer le tampon RIPA complet, il faut ajouter 10 μ L de sodium orthovanadate, 10-20 μ L de cocktail de inhibiteurs de protéases dans 1 mL de tampon RIPA (RIPA Lysis Buffer system, Santa Cruz Biotechnology). Après une centrifugation à 20 000 g pendant 15 min à 4 °C, le surnageant (extrait protéique) est prélevé et soumis à la quantification. La quantification est effectuée à l'aide de l'essai DC Protein Assay (Bio-Rad).

Les protéines (20 µg) sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (6%-8%) SDS-PAGE (migration pendant 1,5h, 70V) puis transférées sur des membranes de nitrocellulose (transfert pendant 2h, 70V). Les membranes sont bloquées dans une solution de 0,1% Tween20 et 5% de lait écrémé dans du TBS 1X pendant 1h à température ambiante, lavées et ensuite incubées avec les anticorps primaires (anti-WNK1 (Cell signaling, 1 : 1000) et anti-phospho-WNK1 (Thr60, Cell signaling, 1 : 1000), anti-GAPDH (Cell signaling, 1/5000)) pendant la nuit à 4 °C sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps secondaires conjugués à l'HRP (Cell signaling, 1 : 1000) pendant 1h à température ambiante.

L'interaction est révélée avec le réactif de détection Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) et le signal détecté avec une caméra ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel ImageJ.

2.16. Génération des macrosphères clonales

Les cellules TG1 et OB1 sont dissociées mécaniquement et comptées au bleu de Trypan. Elles sont ensuite ensemencées dans les plaques à 96 puits (655090 Greiner) à densité clonale (5 à 20 cellules par puits dans 200 µL de milieu NS34).

50 µL de milieu est ajouté dans chaque puits toutes les semaines. Les sphères clonales formées à 4 semaines sont transférées dans les plaques à 24 puits (662160 Greiner). Pour éviter l'agrégation des sphères, nous mettons une seule sphère dans chaque puits dans 1mL de milieu NS34. Le milieu de culture est renouvelé chaque semaine. Les sphères de grande taille avec un diamètre d'environ 1 mm sont obtenues 7 à 8 semaines après l'ensemencement des cellules.

2.17. Caractérisation des macrosphères

2.17.1. Immunohistochimie

Les sphères clonales de grande taille sont fixées dans 4% de PFA puis incluses dans la paraffine. Les sphères sont ensuite coupées en section de 5 μ m. Avant le marquage immunohistochimique, les lames sont déparaffinées dans des bains successifs de xylène, éthanol et eau. Le démasquage antigénique est réalisé en incubant les lames dans le tampon citrate (10 mM sodium de citrate, 0,05% Tween 20, pH 6,0) à 95 °C pendant 40 min.

Les lames sont ensuite bloquées avec 0,3% H₂O₂ pendant 20 min puis avec une solution à 1% BSA dans du PBS pendant 10 min à température ambiante. Les sections sont incubées avec les anticorps anti-Ki67 (Dako, clone MIB-1, 1 : 50), anti-GLUT1 (Thermo Fisher Scientific, 1 : 150), GLUT3 (Thermo Fisher Scientific, 1 : 50) à température ambiante pendant 1h. Après l'incubation avec les anticorps primaires, les lames sont mises en contact avec les anticorps secondaires correspondants conjugués à la biotine (Jackson ImmunoResearch Labs, 1 : 500) à température ambiante pendant 20 min et ensuite incubées avec de l'avidine conjuguée à la peroxydase (ExtrAvidin-Peroxidase Sigma Aldrich, 1: 500) pendant 20min à température ambiante. La révélation est réalisée en utilisant le substrat 3,3' Diaminobenzidine (DAB) (BD Biosciences). Les noyaux cellulaires sont contre-colorés avec l'hématoxyline.

2.17.2. Détection de l'hypoxie

La détection des zones hypoxiques dans les sphères de grande taille est réalisée avec l'essai Hypoxyprobe-1 (Hypoxyprobe, Inc.).

Les sphères sont incubées dans le milieu NS34 contenant 100 µM

pimonidazole (fourni dans le kit) pendant 2h à 37 °C. Les sections des sphères sont obtenues en suivant le protocole d'immunohistochimie décrit dans le paragraphe 2.17.1. Les adduits de pimonidazole formés dans les zones hypoxiques des sphères sont détectés avec l'anticorps MAb1 qui est fourni dans le kit (1 : 50).

2.18. Pharmacocinétique, bio-distribution

Les études de pharmacocinétique et bio-distribution du bisacodyl ont été réalisées par la plateforme TechMedILL.

2.18.1. Pharmacocinétique

Le bisacodyl est administré à des souris CD1 en injection intra-péritonéale (i.p.) en suspension dans du PBS en présence de 0,2% carboxyméthycellulose (CMC) et 0,2% Tween 80 (3 souris par condition). Les souris sont sacrifiées 0,5h, 1,5h, 3h, 6h, 12h, et 24h après l'injection.

Le sang est prélevé et le plasma est séparé par centrifugation. Les échantillons sont conservés à -80 $\$ avant les analyses. 400 μ L de chaque échantillon de plasma sont mélangés avec 1 mL d'acétonitrile pour précipiter les protéines et extraire le composé.

Les échantillons sont agités à l'aide d'un vortex pendant 3 min, placés dans un sonicateur pendant 3 min puis agités une fois de plus au vortex pendant 3 min. Les protéines précipitées sont sédimentées par centrifugation à 15000 g pendant 5 min. Les surnageants sont prélevées et analysés en LC-MS/MS avec un protocole mis au point précédemment par la plateforme.

2.18.2. Bio-distribution

Le bisacodyl en suspension dans du PBS en présence de 0,2% carboxyméthycellulose et 0,2% Tween 80 est administrée en i.p. à des souris CD-1 à la dose de 300 mg/kg (2 souris par condition). 3 injections à intervalle de 24h sont réalisées sur chaque souris. Les souris sont sacrifiées 15 min, 30 min, 1,5h, 6h, 10h, 24h et 48h après la troisième injection.

Le cerveau est prélevé en prenant soin de perfuser l'animal avec 40 mL de sérum physiologique. Chaque cerveau est ensuite broyé dans 400 µL de sérum physiologique. 1 mL d'acétonitrile est ajouté pour précipiter les protéines et extraire

le composé.

La quantification du bisacodyl/DDPM est effectuée en LC-MS/MS comme ce qui est décrit dans la section 2.18.1.

2.19. Effet du bisacodyl sur la capacité d'initiation de tumeur des CSGs

Les cellules OB1 sont traitées avec 50 μ M bisacodyl pendant 12h dans le milieu de culture NS34 dont le pH est ajusté à 6,2. Les cellules OB1 dans le groupe contrôle sont incubées dans le même milieu sans bisacodyl pendant 12h. Après le traitement, le même nombre de cellules vivantes (4 x 10⁶ cellules) sont mélangées avec 40 μ L PBS et 160 μ L Matrigel (BD Biosciences). Les cellules sont ensuite injectées dans chaque flan des souris Nude (Charles River) (4 souris par condition).

Les souris sont sacrifiées 21 jours après l'injection. Les inserts de matrigel sont retirés, fixées dans 4% PFA puis incluses dans la paraffine. Après coupe en sections de 8 µm des inserts, les cellules tumorales humaines sont identifiées par marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-vimentine (clone V9, Dako).

3. Résultats sur l'étude du bisacodyl / DDPM

3. Résultats sur l'étude du bisacodyl / DDPM

3.1. Caractérisation de la quiescence des CSGs

3.1.1. La mise en quiescence des CSGs

Les CSGs utilisées dans nos études, les cellules TG1 et les cellules OB1, ont été isolées à partir de deux tumeurs de glioblastome primaires dans le laboratoire de Dr Chneiweiss [78]. Ces cellules ont été caractérisées précédemment et possèdent les caractéristiques des CSGs, notamment la capacité d'auto-renouvellement, d'induire des tumeurs chez l'animal après injection d'un faible nombre de cellules et de différenciation [78].

Afin de comprendre l'action spécifique du bisacodyl sur les CSGs en quiescence, il est essentiel de caractériser cet état de quiescence. Dans notre laboratoire, la mise en quiescence des CSGs *in vitro* a été réalisée en laissant les cellules sans changement du milieu de culture NS34 (milieu défini sans sérum mais contenant des facteurs de croissance EGF et b-FGF) pendant 9 à 16 jours après le dernier passage alors que pour les cellules en prolifération le milieu est renouvelé deux fois par semaine. Les CSGs en quiescence sont morphologiquement similaires aux CSGs en prolifération (**Figure 11**). Elles forment des neurosphères qui sont légèrement plus grandes que celles qui sont formées dans les conditions de prolifération.



Figure 11. Images en contraste de phase des CSGs TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence. Les conditions de quiescence correspondent ici à un non-renouvellement du milieu de culture NS34 pendant 9 jours. Echelle : 100 μm.



3.1.2. Quiescence et viabilité cellulaire

Figure 12. Incorporation de l'EdU dans les CSGs TG1 et OB1 en fonction du nombre de jours en culture sans renouvellement de milieu. Le taux d'incorporation d'EdU est mesuré chaque jour jusqu'au jour 14 après un passage de cellule normal, en utilisant l'essai Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit.

L'entrée en quiescence des CSGs a été caractérisée par le test d'incorporation de l'éthynyl desoxyuridine (EdU) qui mesure la synthèse d'ADN (**Figure 12**). Une diminution progressive du taux d'incorporation d'EdU est observée dans les cellules TG1 et OB1 à partir du 4^e jour de non renouvellement du milieu. Le taux d'incorporation devient très faible à partir du 9^e jour (de l'ordre de 5% pour les cellules TG1 et 10% pour les cellules OB1) et n'évolue guère au-delà de 9 jours.

Parallèlement nous avons mesuré la viabilité des CSGs lors de l'entrée en quiescence (**Figure 13**). Pendant les dix premiers jours après un passage normal des cellules, le pourcentage des cellules vivantes (TG1) reste relativement stable (de l'ordre de 80%). A partir du 11^e jour, une chute brutale de la viabilité cellulaire est observée. Le pourcentage des cellules vivantes reste de l'ordre de 50% entre le 11^e et le 16^e jour.



Figure 13. Viabilité des cellules TG1 en fonction du nombre de jours en culture sans renouvellement de milieu. Le pourcentage des cellules TG1 vivantes est déterminé avec le bleu de Trypan chaque jour jusqu'au jour 14 après un passage de cellule normal.

Les résultats ci-dessus nous ont amené à choisir le 9^e jour de non-renouvellement du milieu comme condition optimale pour étudier les cellules en quiescence. En effet, au 9^e jour de non-renouvellement du milieu, la synthèse d'ADN par les cellules TG1 et OB1 est quasi-nulle sans que la viabilité cellulaire soit affectée. Sauf indication contraire, cette condition sera utilisée pour la quiescence dans ce travail.

3.1.3. Expression du marqueur de prolifération Ki67 et analyse du cycle cellulaire lors de la mise en quiescence des cellules

La caractérisation de la quiescence des cellules a été poursuivie par l'étude de l'expression du marqueur de prolifération Ki67, ainsi que du cycle cellulaire (**Figure 14**).

L'expression de Ki67 a été étudiée dans les cellules TG1 et OB1 en prolifération (Figure 14A-J1) et après 9 jours sans renouvellement du milieu (Figure 14A-Q(J9). Pour les deux types cellulaires, l'expression de Ki67 diminue lors de leur entrée en quiescence. Concernant le cycle cellulaire, une redistribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est observée (Figure 14 B, D). Lors de l'entrée en quiescence des cellules, la proportion des cellules en phase G1 et phase S diminue progressivement alors que la proportion des cellules en phase G0 augmente. Cela suggère un arrêt de la synthèse de l'ADN ainsi que la sortie des cellules du cycle cellulaire, ce qui correspond aux résultats obtenus avec le test d'incorporation d'EdU.

Les résultats ci-dessus indiquent que la méthode que nous avons utilisée pour induire la quiescence des cellules *in vitro* induisait l'arrêt de la synthèse d'ADN et l'entrée dans la phase G0 des cellules TG1 et OB1.



Figure 14. Cycle cellulaire et expression du marqueur de prolifération Ki67 des CSGs TG1 et OB1 dans différentes conditions de culture. (A) Les cellules TG1 et OB1 en prolifération (J1) et en quiescence (Q(J9) ainsi que les cellules quiescentes à Q(J9) remises dans le milieu frais pendant 5 jours (Q+J5). Les cellules perméabilisées ont été marquées avec l'anticorps Ki67 marqué au FITC et avec l'iodure de propidium puis analysées par cytométrie en flux. (B-E) Histogrammes représentant le pourcentage des cellules TG1 (B, C) et OB1 (D, E) dans les différentes phases du cycle cellulaire et le pourcentage des cellules en apoptose (sub-G1). Les analyses ont été effectués sur les cellules TG1 (B) et OB1 (D) laissées sans renouvellement du milieu pendant 1-14 jours,

ainsi que sur les cellules TG1 (C) et OB1 (E) quiescentes (Q9) remises dans le milieu frais pendant 1-5 jours (Q+1, Q+2, Q+3, Q+4, Q+5). Le niveau d'expression de Ki67 est utilisé pour distinguer les cellules en G0 et les cellules en G1.

3.1.4. Mesure de la senescence des cellules

Pour voir si cet état de quiescence est réversible, nous avons regardé d'abord si ces cellules sont entrées en senescence après avoir été mises en quiescence. Dans les cellules TG1 et OB1 en quiescence, nous n'avons pas détecté une activité de la β-galactosidase associée à la senescence (**Figure 15**). Il ne s'agit donc pas de la senescence lorsque les CSGs entrent en quiescence *via* notre méthode.



Figure 15. Test de senescence dans les CSGs en quiescence. L'activité de la β-galactosidase associée à la senescence a été mesurée dans les cellules TG1 (A) et OB1 (B) en quiescence. Les cellules U87-MG (C) traitées avec le témozolomide à 100 μM pendant 5 jours ont été utilisées comme contrôle positif. Echelle : 100 μm.

3.1.5. Réversibilité de l'état quiescent

Afin de déterminer l'aptitude des cellules à ressortir de l'état quiescent, le milieu de culture des cellules TG1 et OB1 quiescentes (Q9) a été renouvelé. Puis

un suivi de l'incorporation d'EdU, de l'expression de Ki67 et du cycle cellulaire a été ensuite réalisé. Le renouvellement du milieu de culture induit une augmentation du taux d'incorporation d'EdU dans les cellules TG1 et OB1 (**Figure 16**). 3 à 4 jours suivant le changement du milieu, le taux d'incorporation d'EdU atteint un niveau comparable à celui des cellules en prolifération, suggérant une sortie des CSGs de l'état de quiescence après leur remise en contact avec le milieu NS34 frais. Ceci a été confirmé par l'analyse de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 et du cycle cellulaire (**Figure 14**). Après le renouvellement du milieu de culture, on observe en effet une augmentation de l'expression de Ki67 dans les cellules TG1 et OB1 ainsi qu'un passage de la phase G0/G1 à la phase S des CSGs.



Figure 16. Suivi par mesure de l'incorporation d'EdU de l'entrée puis de la sortie des CSGs de l'état de quiescence. Après passage des cellules, les cellules TG1 et OB1 sont laissées dans les flasques sans renouvellement du milieu pendant 9 jours. Ces mêmes cellules sont ensuite remises dans du milieu frais qui est renouvelé tous les 3 jours. (Dans l'expérience il y a eu un renouvellement du milieu au jour 13). Le taux d'incorporation d'EdU a été mesuré chaque jour.

Ainsi l'état de quiescence induit par notre méthode n'est pas irréversible. Suite à un stimulus tel que le renouvellement du milieu de culture, les CSGs en quiescence sont capables de sortir de l'état quiescent et de se remettre à proliférer.

3.1.6. Maintien des propriétés des CSGs dans l'état quiescent

Les cellules TG1 et OB1 mises dans la condition de culture proliférative ont été caractérisées précédemment. Elles possèdent les propriétés des CSGs [78]. Afin

de savoir si la quiescence induite par nos conditions de culture perturbe l'état souche des CSGs, nous avons évalué les différentes propriétés des CSGs dans les cellules TG1 et OB1 en quiescence.

3.1.6.1. Evaluation de l'expression des marqueurs CSGs

3.1.6.1.1. Marqueurs de pluripotence et de différenciation

L'expression de l'ARNm de 90 gènes impliqués dans la régulation de la pluripotence et de la différenciation a été examinée dans les cellules TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence, en utilisant les puces TaqMan Human Stem Cell Pluripotency Arrays qui sont basées sur la PCR quantitative (après transcription inverse) qui mesure un signal de fluorescence à chaque cycle d'amplification.

Le niveau d'expression des gènes est mesuré en utilisant la valeur du Ct (Cycle threshold) qui correspond au cycle de PCR à partir duquel le signal de fluorescence sort du bruit de fond. La valeur du Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ARN (ou d'ADN complémentaire) présent au départ. Les valeurs Ct pour chaque gène ont été normalisées avec la valeur Ct de l'ARNr 18S utilisé comme gène de ménage. On obtient ainsi la valeur Δ Ct (Δ Ct = Ct_{gène} – Ct _{ARNr 18S}). Dans nos expériences, seuls les gènes avec une valeur Δ Ct \leq 21 sont pris en compte. Les gènes avec une valeur Δ Ct > 21 correspondent à des gènes faiblement ou non-exprimés. Parmi les 90 gènes examinés, 23 gènes correspondent à des gènes exprimés de manière significative (**Figure 17**).

Pour comparer le niveau d'expression de ces 23 gènes entre les cellules en prolifération et les cellules en quiescence, les valeurs Δ Ct pour chaque gène des cellules en quiescence ont été ensuite normalisées avec celles des cellules en prolifération ($\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct $_{Q}$ – Δ Ct $_{P}$). La plupart de ces 23 gènes (sauf GBX2, IFITM1 et LAMC1 (uniquement dans les cellules OB1)) n'ont pas montré une différence d'expression significative entre les cellules en prolifération et les cellules en quiescence (**Figure 17**). Plus particulièrement, l'expression de Sox2 et Nanog, deux marqueurs bien définis des CSGs, n'a pas changé de manière significative entre l'état prolifératif et l'état quiescent dans les cellules TG1 et OB1. Ceci a été confirmé en réalisant la Q-PCR avec des essais Taqman individuels (résultats non-présentés).



Figure 17. Expression des gènes associés à la pluripotence et à la différenciation dans les CSGs en prolifération et en quiescence. Niveau d'expression de l'ARNm des 23 gènes inclus dans les puces TaqMan Human Stem Cell Pluripotency Array dans les cellules TG1 (A) et OB1 (B) en prolifération et en quiescence.

3.1.6.1.2. Marqueurs de surface

Concernant les marqueurs de surface des CSGs, nous avons évalué l'expression de CD133, CD56 et CXCR4, marqueurs de surface des CSGs très étudiés, dans les cellules TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence (**Figure 18**). Dans les études précédentes de caractérisation des cellules TG1 et OB1, il a été montré que ces cellules n'exprimaient pas CD133 [78]. Par cytométrie en flux, nous avons confirmé que CD133 n'était pas exprimé dans les cellules TG1 et OB1 en prolifération et montré qu'il ne l'était pas non plus dans les cellules TG1 et OB1 en quiescence. Les deux autres marqueurs de surface, CD56 et CXCR4 ont été détectés par immuno-marquage dans les CSGs TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence.



Figure 18. Expression des marqueurs de surface dans les CSGs en prolifération et en quiescence. (A) Expression de CD133 dans les cellules TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence évaluée par cytomètrie en flux. (B-C) Marquage par immunocytochimie des cellules TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence avec l'anticorps anti-CXCR4 (B) et anti-CD56 (C). Les noyaux ont été colorés avec le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole). Echelle : 20 µm.

3.1.6.2. Evaluation de la capacité d'auto-renouvellement par le test de clonalité

La capacité d'auto-renouvellement *in vitro* des cellules TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence a été évaluée par le test de clonalité (**Figure 19**). Des quantités différentes de cellules (à densité clonale) ont été ensemencées dans les plaques à 96 puits. Le nombre des neurosphères formées dans chaque puits a été déterminé 3 semaines après l'ensemencement.

Après la remise en contact avec le milieu de culture frais, les CSGs en quiescence étaient capables de former des neuropshères clonales ayant une taille similaire aux neurosphères formées avec les cellules en prolifération. D'ailleurs, nous avons montré qu'avec un nombre de cellules défini au début, le nombre des neurosphères formées avec les cellules quiescentes était similaire à celui des neurosphères formées avec les cellules proliférantes, ce qui suggère que la fréquence des cellules ayant une propriété d'auto-renouvellement dans la population des cellules TG1 et OB1 *in vitro* n'a pas été altérée lors de la quiescence.



Figure 19. Evaluation de l'auto-renouvellement des CSGs en prolifération et en quiescence par le test de clonalité. (A) Test de clonalité réalisé avec les cellules TG1 en prolifération (—) et en quiescence (▲). Le graphe représente le nombre de sphères formées après 3 semaines en fonction du nombre des cellules au début dans chaque puits. (B) Test de clonalité réalisé avec les cellules OB1 en prolifération (—) et en quiescence (▲). Les inserts correspondent à des images de contraste de phase de sphères clonales obtenues après 3 semaines à partir d'une cellule au départ. Les expériences ont été réalisées selon le protocole décrit dans la section Matériels et Méthodes.

3.1.6.3. Evaluation de la capacité de différenciation

Les cellules souches cancéreuses ont la capacité de se différencier. Pour les CSGs, la différenciation peut être obtenue en cultivant les cellules en présence de sérum [78]. Nous avons comparé les capacités de différenciation des CSGs TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence. Après mise en contact avec 10% de sérum de veau fœtal, les cellules qui dans le milieu NS34 poussent sous forme de sphères en suspension adhèrent en émettant des prolongements (**Figure 20**). Aucune différence n'est observée que les cellules soient au départ en prolifération ou en quiescence.



Figure 20. Changements morphologiques des cultures de CSGs TG1 et OB1 en absence et en présence de sérum. Les images en contraste de phase des cellules TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence (dissociées) cultivées (J0) dans du milieu défini sans sérum (NS34) et (J14) en présence de 10% de sérum (FBS) pendant 14 jours. Echelle : 100 μm.

Le changement morphologique était aussi accompagné par des changements dans l'expression de certains marqueurs de cellule souche et de différenciation (**Figure 21**). Par exemple, l'expression de SHH (Sonic Hedgehog), un gène associé à l'état souche, diminue dans les cellules TG1 proliférantes et quiescentes et les cellules OB1 proliférantes. Une augmentation remarquable de l'expression du GFAP, un marqueur des astrocytes, a été observée dans les cellules TG1 proliférantes/quiescentes et les cellules OB1 proliférantes. Un changement dans l'expression d'un marqueur neuronal β3 tubuline a été observé uniquement dans les cellules TG1 et OB1 en quiescence.



Figure 21. Capacité de différenciation des CSGs en prolifération et en quiescence évaluée par l'expression de marqueurs. Niveau d'expression de l'ARNm de SHH (sonic hedgehog), β 3- tubuline (TUBB3) et GFAP (glial fibrillary acid protein) dans les cellules TG1 (A, B) et OB1 (C, D) en prolifération et en quiescence avant (d0) et après (d14) avoir été exposées au milieu de culture contenant 10% sérum (FBS). Les valeurs de Ct pour chaque gène ont été normalisées avec la valeur Ct de l'ARNr 18S. En ordonnée le niveau de changement mesuré par 2^{A- $\Delta\Delta$ Ct}. $\Delta\Delta$ Ct correspond à la différence entre le Δ Ct du gène dans l'échantillon et le Δ Ct du même gène dans l'échantillon calibrateur (ici les CSGs dans le milieu NS34).

Ces résultats suggèrent que les cellules TG1 et OB1 mises en quiescence *in vitro* gardent leur capacité de différenciation lorsqu'elles sont exposées au milieu de culture avec du sérum, ce qui est une propriété essentielle des CSGs.

3.1.6.4. Evaluation de la capacité tumorigène in vivo

Le dernier point que nous avons évalué concernant les propriétés des CSGs est leur capacité tumorigène *in vivo*. Cette propriété des cellules TG1 et OB1 a été déjà montrée dans les études précédentes effectuées par l'équipe du Dr Chneiweiss [78].

Pour évaluer la capacité tumorigène des cellules en quiescence, des cellules OB1 en prolifération et en quiescence ont été injectées dans le striatum de souris immuno-déficientes. 8 semaines après l'injection, les cerveaux ont été prélevés, fixés, inclus dans la paraffine puis coupés en sections pour des analyses histologiques. La présence de cellules humaines a été mise en évidence en immunohistochimie en utilisant des anticorps spécifiques de la vimentine humaine. (**Figure 22**). La prise de la xénogreffe, évaluée par le nombre de cellules présentes est équivalente que les cellules injectées soient en prolifération ou quiescentes. L'apparition de tumeurs qui peut être observée 5 à 6 mois après l'injection, n'a pas été évaluée dans le cadre de cette expérience. L'expression du marqueur de prolifération Ki67, montre la présence de cellules en prolifération quel que soit l'état des cellules xénogreffées (en prolifération ou en quiescence) suggérant que l'état de quiescence induit *in vitro* est réversible *in vivo*.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus suggère que l'état de quiescence peut être induit *in vitro* dans les CSGs. Ces cellules quiescentes gardent les propriétés des CSGs telles que l'expression des marqueurs des CSGs, l'auto-renouvellement, la capacité de différenciation et la capacité tumorigène *in vivo*.



Figure 22. Capacité tumorigène *in vivo* des CSGs en prolifération et en quiescence. (A-B) Les cellules OB1 en prolifération (A) et en quiescence (B) ont été injectées dans le striatum de souris Nude. 8 semaines après l'injection, les souris ont été sacrifiées. Les cellules humaines ont été identifiées dans les sections de cerveau par immuno-marquage avec l'anticorps anti-vimentine humaine. Echelle : 100 µm. Echelle dans l'insert : 500 µm. (C-D) Les cellules d'origine humaine en prolifération dans le cerveau des souris ont été identifiées avec l'anticorps anti-ki67. Echelle : 100 µm.

3.2. Mode d'action du bisacodyl sur les CSGs isolées

Le bisacodyl (4,4'-diacetoxydiphenyl-2-pyridyl-methane) a été découvert précédemment dans le laboratoire par un criblage différentiel de la chimiothèque Prestwick sur les CSGs en prolifération et en quiescence. Le bisacodyl a montré un effet cytotoxique spécifique sur les CSGs en quiescence [205].

Des études de stabilité ont également montré que dans les conditions expérimentales de mise en quiescence des cellules, le bisacodyl s'hydrolysait en 4,4'-dihydroxydiphenyl-2-pyridyl-methane (DDPM), connu comme étant le métabolite actif du bisacodyl lorsque ce dernier est utilisé comme médicament. (Figure 23). L'activité et la cytotoxicité du DDPM *vis à vis* des CSGs en quiescence est identique à celle du bisacodyl (Figure 24).



Figure 23. Structure du bisacodyl et du 4,4'-dihydroxydiphenyl-2-pyridylmethane (DDPM).



Figure 24. Effet du DDPM sur les cellules TG1 et OB1. (A, B) Les courbes dose-réponse du DDPM sur les cellules TG1 (A) et OB1 (B) en prolifération (P) et en quiescence (Q). La viabilité cellulaire a été mesurée avec le kit CellTiter-Glo qui mesure le taux ATP dans les cellules. (C, D) La viabilité cellulaire a été aussi évaluée avec le bleu de Trypan. Les cellules TG1 (C) et OB1 (D) en prolifération et en quiescence ont été traitées avec 1% DMSO (contrôle négatif) ou 10 µM DDPM pendant 24h.

Un des principaux objectifs de ma thèse a été de comprendre la spécificité de l'activité du bisacodyl/DDPM sur les CSGs en quiescence et de caractériser le mode d'action de la molécule.

3.2.1. Impact du milieu de culture sur l'activité du bisacodyl / DDPM

Comme il a été décrit dans la partie 3.1.1, les cellules TG1 et OB1 ont été mises en quiescence en les laissant dans les flasques sans changement du milieu de culture pendant 9 jours suite à un passage normal. Lors du criblage, les cellules TG1 et OB1 en prolifération ont été traitées avec les molécules dans le milieu de culture frais alors que les cellules en quiescence ont été traitées dans le milieu de culture conditionné pour garder leur état de quiescence car un renouvellement du

milieu conduit les cellules quiescentes à retourner vers l'état de prolifération.

Pour savoir si cette différence du milieu de culture a un impact sur l'activité et la spécificité du bisacodyl/DDPM, nous avons réalisé des tests de viabilité en échangeant les milieux de culture. L'effet du DDPM a été testé sur des cellules TG1 en prolifération placées dans le milieu conditionné des cellules en quiescence et sur des cellules quiescentes placées dans du milieu NS34 frais. La durée de l'expérience est de 24 h. Les résultats sont présentés dans la **Figure 25**. L'effet du DDPM est plus marqué sur les cellules en quiescence et moins marqué sur les cellules en quiescence l'effet du DDPM. A l'inverse un traitement des cellules quiescentes dans du milieu frais induit une perte rapide de leur sensibilité au bisacodyl. Des paramètres liés à la composition du milieu en contact avec les cellules semblent jouer un rôle dans la spécificité d'action du bisacodyl/DDPM sur les CSGs.



Figure 25. Impact du milieu de culture sur l'effet du DDPM. Courbes dose-réponse du DDPM sur les cellules TG1 en prolifération (A) et en quiescence (B) dans les différents milieux. Les courbes bleues correspondent aux tests réalisés dans le milieu de culture NS34 frais. Les courbes rouges correspondent aux tests réalisés dans le milieu conditionné des cellules quiescentes. L'effet du DDPM est mesuré par le taux relatif d'ATP dans les cellules traitées au DDPM par rapport aux cellules non traitées.

3.2.2. Rôle du pH

Les résultats présentés dans la **Figure 25** suggèrent l'existence d'un ou plusieurs facteurs dans le milieu de culture des cellules en quiescence qui conditionnent l'activité du bisacodyl/DDPM.

De nombreux facteurs peuvent être impliqués. Cependant, une des différences les plus visibles entre le milieu frais et le milieu conditionné est leur pH indiqué directement grâce au rouge phénol présent dans le milieu de culture. Lorsque les cellules sont maintenues en culture sans renouvellement du milieu, ce dernier s'acidifie. Un suivi de cette acidification en fonction du nombre de jours en culture est présenté dans la **Figure 26**. Le pH diminue progressivement en partant d'une valeur de 7,4 qui correspond au pH du milieu NS34, pour atteindre une valeur de 6,5 vers le 8^e jour. De manière intéressante, cette acidification est concomitante avec la diminution du taux d'incorporation d'EdU lors de l'entrée en quiescence des cellules TG1/OB1 (**Figure 12** et **Figure 26**).



Figure 26. Suivi du pH du milieu de culture et de l'incorporation d'EdU lors de la mise en quiescence des cellules TG1. Les cellules TG1 sont maintenues en culture sans renouvellement du milieu. Le pH du milieu de culture et l'incorporation d'EdU sont mesurés chaque jour.

Afin d'évaluer le rôle du pH dans l'activité du DDPM, nous avons mesuré le taux d'ATP de cellules TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence à différents pH en absence et en présence de DDPM (**Figure 27**).



Figure 27. Impact du pH sur l'effet du DDPM. (A, B) Le taux d'ATP des cellules TG1 (A) et OB1 (B) en prolifération et en quiescence en fonction du pH du milieu. Les valeurs obtenues aux différents pH sont normalisées par rapport à celles obtenues à pH 7,4. (C-F) L'effet du DDPM à 10 μM sur les cellules TG1 (C, D) et OB1 (E, F) en prolifération et en quiescence aux différents pH. Pour chaque pH, le taux d'ATP des cellules traitées par DDPM dans 1% de DMSO est normalisé par rapport au taux d'ATP des cellules traitées par 1% de DMSO à chaque pH. Les expériences ont été réalisées selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes.

En absence de DDPM, l'acidification à partir de pH 6,8-6,6 induit une diminution du taux d'ATP cellulaire (**Figure 27** A-B). Cette diminution est de l'ordre de 30% à pH 6,2 quel que soit le type cellulaire et leur état (prolifération ou quiescence) et atteint des valeurs de l'ordre de 50% à pH 6 pour les cellules TG1

ou OB1 en quiescence. Cette diminution du taux d'ATP n'est cependant pas accompagnée d'une mortalité cellulaire (vérifiée avec le bleu de Trypan). En ce qui concerne l'effet du DDPM, les **Figure 27** C-F soulignent clairement une dépendance vis-à-vis du pH. Entre pH 7 et 6, l'activité de la molécule est d'autant plus forte que le pH est bas, aussi bien pour les cellules en prolifération que pour les cellules quiescentes. Les **Figure 27** C-F indiquent également une plus grande sensibilité au composé des cellules quiescentes par rapport aux cellules prolifératives. D'autre part les cellules OB1 montrent une sensibilité à la molécule aux pH compris entre 7,4 et 7 où aucun effet n'est observé pour les cellules TG1.

Pour déterminer si les conditions légèrement acides affectent la protonation du DDPM, nous avons effectué les titrations potentiométriques (études réalisées par le Dr Nassera Tounsi). Deux constantes de protonation ont été déterminées dans un milieu méthanol : eau (80 : 20). La première constante log $K_{12} = 3,97 \pm 0,02$ (pKa1) correspondant au DDPMH₂⁺ peut être attribuée au groupe pyridinium. La deuxième constante log $K_{11} = 10,78 \pm 0,01$ (pKa2) correspondant au DDPM⁻ peut être attribuée au groupe phénol. Dans un milieu aqueux, le pKa de la pyridine est d'environ 5,25 alors que le pKa du phénol est 9,96. Ces valeurs suggèrent que la déprotonation de la pyridine est complète au-dessus de pH 6. L'activité pH-dépendant du DDPM n'est donc pas liée à un changement dans l'état de protonation de la molécule.

Cette analyse indique que l'acidité de l'environnement joue un rôle dans l'activité du bisacodyl/DDPM en modifiant le fonctionnement de la cellule, voire en induisant la quiescence. Il a en effet été montré qu'une acidification du milieu extracellulaire conduisait à un arrêt rapide du cycle cellulaire (ce point sera rediscuté dans la partie Discussion). Il est donc possible d'observer un effet de la molécule sans déplétion des facteurs de croissance ou des nutriments (nous avons observé que l'ajout de glucose dans le milieu conditionné des cellules quiescentes n'empêche par la mort des cellules en quiescence induite par le DDPM).

3.2.3. Type de mort cellulaire induite par le bisacodyl/DDPM

Afin de déterminer le type de mort cellulaire (l'apoptose ou la nécrose) induit par le bisacodyl/DDPM dans les CSGs en quiescence, les différentes caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose ont été étudiées dans ces cellules traitées par le bisacodyl/DDPM.

L'activation des caspases et la fragmentation d'ADN sont deux événements bien définis lors de l'apoptose. Nous avons d'abord montré que l'utilisation du Z-VAD, un inhibiteur pan-caspases, ne bloque pas la mort cellulaire induite par le bisacodyl (**Figure 28**).



Figure 28. Impact de l'inhibiteur de caspase Z-VAD sur l'activité du bisacodyl. Les cellules TG1 en quiescence ont été traitées par le bisacodyl à 50 µM en présence et en absence du Z-VAD à 20 µM pendant 24h. La viabilité cellulaire a été évaluée avec le kit CellTiter-Glo mesurant le taux d'ATP cellulaire. En ordonnée : taux relatif d'ATP par rapport aux cellules avec 1% de DMSO (contrôle négatif)

Deux méthodes différentes, l'analyse du cycle cellulaire et la détection de cassures de l'ADN par la méthode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), ont été ensuite utilisées pour étudier la fragmentation de l'ADN. Dans les cellules TG1 traitées par la staurosporine, un contrôle positif pour l'apoptose, nous avons observé une population sub-G1 qui correspond à une population de cellules présentant une fragmentation de l'ADN. Cette population sub-G1 n'a pas été observée dans les cellules TG1 traitées par le bisacodyl (**Figure 29**). De manière similaire, par la méthode TUNEL, nous n'avons pas détecté des cassures de l'ADN dans les cellules TG1 traitées par le bisacodyl alors que les cassures ont été détectées dans les cellules traitées par la staurosporine (**Figure 30**).



Figure 29. Etudes de la fragmentation d'ADN par analyse du cycle cellulaire. Les cellules TG1 en prolifération et en quiescence ont été traitées avec 10 μ M de bisacodyl pendant 24h. Le cycle cellulaire a été ensuite analysé par cytométrie en flux après coloration de l'ADN avec l'iodure de propidium. La staurosporine à 1 μ M a été utilisée comme contrôle positif.



Figure 30. Etudes de la fragmentation d'ADN par la technique TUNEL. Les cellules TG1 en quiescence ont été traitées avec 10 μ M de bisacodyl pendant 24h. La fragmentation de l'ADN a été ensuite analysée avec le kit TUNEL par cytométrie en flux. La staurosporine à 1 μ M a été utilisée comme contrôle positif.

Le fait que le Z-VAD ne bloque pas la mort cellulaire induite par le bisacodyl ainsi que l'absence de fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées par le bisacodyl suggèrent que le bisacodyl/DDPM n'induit pas la mort cellulaire *via* l'apoptose.
Nous avons ensuite étudié la possibilité de la mort cellulaire par nécrose en utilisant la microscopie électronique de transmission (MET).



Figure 31. Images de microscopie électronique à transmission (MET) de cellules OB1 en absence ou présence de DDPM. (A-F) Les images MET des cellules OB1 en prolifération à pH 7,4, à pH 6,2 et en quiescence traitées par 1% de DMSO ou 50 μM DDPM. Echelle : 5 μm. (G-L) Les images correspondantes à plus fort grossissement. Echelle : 2 μm. N (noyau), Nu (nucléole), M (mitochondrie), RER (réticulum endoplasmique rugueux). Les flèches en pointillé indiquent des microvillosités de la membrane plasmique et la rupture de la membrane plasmique. Les flèches blanches indiquent l'enveloppe nucléaire.

Les images de MET montrent des changements morphologiques dans les CSGs OB1 en quiescence ainsi qu'en prolifération à pH 6,2 induits par le DDPM correspondant aux changements typiques observées lors de la nécrose, tels que la rupture de la membrane plasmique, la disparition des microvillosités à la surface de la membrane, la perte du contenu cytoplasmique et un épaississement de l'enveloppe nucléaire. Un gonflement des mitochondries est observé dans les cellules traitées à pH 6,2 mais non dans les conditions quiescentes (**Figure 31**). Ces changements n'ont pas été observés dans les cellules OB1 en prolifération à pH 7,4.

En conclusion, nos résultats relatifs à l'étude de la mort cellulaire sont en faveur d'une nécrose induite par le bisacodyl/DDPM dans les CSGs en quiescence ou en conditions acides.

3.2.4. Etudes des voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire induite par le DDPM

Afin de comprendre le mécanisme d'action du bisacodyl/DDPM sur les CSGs, nous avons également étudié les voies de signalisation qui peuvent être impliquées dans l'action du bisacodyl/DDPM. La signalisation induite après traitement des CSGs en quiescence par le DDPM a été analysée en examinant l'état de phosphorylation de 45 protéines (dont 43 kinases) dans les cellules non traitées et traitées par la molécule en utilisant la puce Human Phospho Kinase Array de R&D Systems.

Le traitement par le DDPM modifie l'état de phosphorylation de certaines protéines, telles que p53 (résidus S15, S46, S392), WNK1 (résidu T60), STAT3 (résidu Y705) et PRAS40 (résidu T246) (**Figure 32**). Parmi ces protéines, nous avons retenu la kinase WNK1 dont le niveau de phosphorylation sur le résidu T60 diminue après le traitement pour une étude plus approfondie, parce que la fonction de cette kinase est relativement moins définie dans les cellules cancéreuses et son implication connue dans la régulation du transport de différents ions au niveau de la membrane cellulaire est intéressante pour étudier le mécanisme d'action du bisacodyl/DDPM (dont l'effet laxatif du moins passerait par la modulation de flux ioniques).



Figure 32. Etude des modifications de phosphorylation de protéines sous l'effet du DDPM. Les cellules OB1 en quiescence ont été traitées par 10 μM DDPM pendant 2h. Le niveau de phosphorylation de 45 protéines (barres rouges) a été comparé à celui mesuré dans des cellules non traitées par le DDPM (correspondant à des cellules contrôles traitées par 1% DMSO) (barres bleues). Le profil de phosphorylation de 45 protéines a été étudié à l'aide de la la puce Human Phospho-Kinase Array (R&D systems). La phosphorylation est mise en évidence à l'aide d'anticorps anti-phospho-protein.

Le résultat obtenu avec la puce phospho-protéique sur l'état de phosphorylation de WNK1 a été confirmé par western-blot (**Figure 33**). La phosphorylation de WNK1 diminue lors du traitement des cellules OB1 par le DDPM. Après 2 heures de contact avec la molécule, la déphosphorylation du résidu T60 est totale. De manière intéressante, ce résidu T60 n'est pas phosphorylé dans les cellules en prolifération à pH 7,4. A noter également qu'il n'y a pas de modification d'expression de la kinase dans les cellules en prolifération et les cellules quiescentes.



Figure 33. Expression et phosphorylation de la kinase WNK1 dans les cellules OB1. Les cellules OB1 en prolifération et en quiescence ont été traitées avec 10 μM DDPM pendant 10 min, 30 min et 2h. L'expression ainsi que la phosphorylation de WNK (T60) ont été mesurées par western-blot.

WNK1 régule de nombreuses fonctions dans la cellule, entre autre le transport de différents ions au niveau de la membrane cellulaire. Sans connaitre de manière exacte le mécanisme d'action du bisacodyl en tant qu'agent laxatif, des données de littérature indiquent qu'il pourrait agir en bloquant des canaux sodiques. Nous avons décidé de tester plusieurs inhibiteurs des transporteurs ioniques afin de tester si l'effet du DDPM sur les CSGs peut être retrouvé avec l'un des composés. Aucun des inhibiteurs testés n'a montré une activité cytotoxique spécifique sur les CSGs en quiescence comparable à celui observé avec le DDPM (**Figure 34** A). Par contre en analysant de manière plus précise l'action de du composé S0859, inhibiteur du co-transporteur sodium bicarbonate sur des cellules TG1 en quiescence, nous avons observé que ce composé protégeait de l'effet cytotoxique du DDPM sur les cellules TG1 en quiescence (**Figure 34** B). On peut supposer que S0859 agit comme un ligand allostérique ou un antagoniste et empêche l'entrée du DDPM dans la cellule.

Des études plus approfondies de la voie de signalisation impliquant WNK1 et du rôle du transporteur NBC dans le mécanisme d'action du bisacodyl/DDPM sont en cours au laboratoire dans le cadre d'une nouvelle thèse (Thèse Wanyin Chen).



Figure 34. Effet d'inhibiteurs de transporteurs ioniques sur les CSG TG1. (A) Les cellules TG1 en prolifération et en quiescence ont été traitées avec le DDPM ou différents inhibiteurs pendant 24H. L'effet des composés a été évalué par mesure du taux d'ATP cellulaire. Bumetanide, inhibiteur du NKCC (Na⁺/K⁺/2Cl⁻ co-transporter), 50 μ M. Bifalomycine A1, inhibiteur de V-ATPase, 100 nM. Clopamide, inhibiteur du NCC (Na⁺/Cl⁻ co-transporter), 50 μ M. S0859, inhibiteur du NBC (Na⁺/HCO3⁻ co-transporter), 50 μ M. 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride, inhibiteur du NHE (Na⁺/H⁺ exchanger), 10 μ M. (B) Les cellules TG1 en quiescence ont été prétraitées avec différentes concentrations de S0859 pendant 24h. Ces cellules ont été ensuite traitées avec 10 μ M DDPM ou 1% de DMSO. (C) Structure du composé S0859.

3.3. Etude des relations structure-activité du bisacodyl

Dans le but de déterminer les groupements chimiques importants pour l'activité du bisacodyl et de son métabolite actif DDPM, une collaboration avec les chimistes dans notre UMR a été réalisée. Jusqu'à présent, 88 dérivés du bisacodyl/DDPM ont été synthétisés. L'activité cytotoxique de ces molécules a été testée sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Ceci a permis non seulement de définir la structure minimale pour l'activité du bisacodyl/DDPM, mais aussi de trouver les positions libres exploitables pour la fonctionnalisation de la molécule avec des fluorophores afin de localiser la molécule dans la cellule, ainsi que pour l'immobilisation de la molécule sur un support (ex : agarose) afin d'identifier la cible ou les cibles cellulaires.

Le bisacodyl présente deux fonctions acétoxy sur les deux cycles phényles. Le DDPM, produit d'hydrolyse du bisacodyl, possède deux fonctions hydroxyles (**Figure 23**). Dans les études précédentes sur la stabilité du bisacodyl, il a été montré que le bisacodyl était hydrolysé rapidement dans les conditions expérimentales, avec une demi-vie à 4h dans le milieu conditionné des cellules en prolifération et une demi-vie à 2h dans le milieu conditionné des cellules en quiescence.

Dans les études de relations structure-activité (RSA) des modifications ont été réalisées au niveau de deux groupes phényles, ainsi qu'au niveau de la pyridine. Les différentes molécules synthétisées sont nommées GSC-X (**Tableau 3**). Le bisacodyl et le DDPM correspondent dans cette nomenclature à GSC-1 et GSC-2, respectivement.

GSC-X	Structure	Effet sur TG1 P et Q	EC50 (μM)
1	i Con	Survice Cellulatice (%) TGO1 F F F F F F F F F F F F F F F F F F F	P: >100 Q: 1,07 ± 0,04
2	HO	Survie Cellulaire (%) Survie Cellulaire (%) 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	P: >100 Q: 1,0 ± 0,5
3	но	Collutation (%) TGO1	P: >100 Q: 8,0 ± 3,0
4	но	Convie Cellulaire (%) 100 50 0 50 100 50 100 100 100	P: >100 Q: 39,0 ± 2,0
11	HO	TG01 100 50 50 50 100 50 100 100	P: >100 Q: >100









Tableau 3. Effet des dérivés (GSC-X) du bisacodyl sur les cellules TG1 en prolifération (P) et en quiescence (Q).

3.3.1. Importance des groupements hydroxyphenyles

L'importance des deux groupes hydroxyles dans la structure du DDPM a été étudiée via la synthèse des dérivés méthoxy non-hydrolysables (GSC-17, GSC-18). GSC-17 possède deux cycles méthoxyphényles. Il est inactif sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. GSC-18 possède un groupe hydroxyphényle et un cycle méthoxyphényle. Comme le DDPM, il présente une activité sélective sur les cellules TG1 en quiescence, avec une EC50 de l'ordre de 8 µM, soi 8 fois plus élevée que celle du DDPM.

L'enlèvement des deux groupements hydroxyles dans la structure du DDPM conduit à une molécule GSC-36, qui est considérée comme inactive sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. En revanche, en enlevant un des deux groupements hydroxyles (GSC-68), la molécule conserve son activité sélective sur

les cellules TG1 en quiescence, avec une EC50 de l'ordre de 17 μ M.

Les résultats ci-dessus suggèrent qu'il faut au moins un groupement hydroxyphényle pour garder l'activité de la molécule. Cependant, le deuxième cycle phényle semble également important car une perte de l'activité a été observée dans le dérivé GSC-69 où l'un des deux hydroxyphényles a été remplacé par un hydrogène et dans le dérivé GSC-66 où l'un des deux groupements hydroxyles a été déplacé en position ortho.

De manière intéressante, le remplacement d'un des deux groupements hydroxyle par le chlorure (GSC-70) ou le groupement trifluorométhyle (GSC-71) permet de conserver l'activité sélective sur les cellules TG1 en quiescence, ce qui suggère que les modulations structurales sont possibles sur cette position.

3.3.2. Importance du cycle pyridine

L'importance du cycle pyridyle a été ensuite examinée. L'enlèvement de ce cycle (GSC-55) induit une perte complète de l'activité sur les cellules TG1. Son remplacement par un groupement phényle (GSC-63) induit une diminution de l'activité de la molécule sur les cellules TG1 en quiescence et à une perte de sélectivité car la molécule devient active sur les cellules en prolifération (bien que des concentrations supérieures à 50 μ M soient nécessaires). La substitution de l'acte du noyau pyridyle (GSC-11) induit également une perte d'activité de la molécule.

L'importance de la position de l'atome d'azote sur le cycle pyridyle a également été étudiée. Les molécules GSC-03 et GSC-04 qui possèdent un azote en position méta et para respectivement gardent leur activité cytotoxique spécifique sur les cellules TG1 en quiescence. Néanmoins, comparé au DDPM (EC50 à 1 μ M), leur efficacité diminue (EC50 à 8 μ M pour GSC-03, EC50 à 39 μ M pour GSC-04).

Ces résultats montrent l'importance du cycle pyridyl dans la spécificité de l'activité du DDPM sur les cellules TG1 en quiescence. Une activité optimale est obtenue avec l'atome d'azote en position ortho du cycle de la pyridine.

Après avoir exploré les possibilités de substitutions des noyaux hydroxyphenyles, qui n'a pas conduit à des dérivés intéressants (les molécules ne sont pas présentées dans le cadre de cette thèse), nous avons étudié la possibilité des substitutions du cycle pyridyle. Les dérivés mono-bromés semblent intéressants. Le brome sur la position 6 du cycle pyridyle (GSC-73) garde l'efficacité et la spécificité de la molécule. GSC-76, qui possède un brome sur la position 4 du cycle, montre une meilleure efficacité (EC50 vers 0,4 μ M) que le DDPM sur les cellules TG1 en quiescence. Parmi toutes les molécules synthétisées dans le cadre de l'étude RSA, GSC-76 est la seule molécule montrant une meilleure efficacité que le bisacodyl/DDPM. L'intérêt de cette molécule a été de dévoiler des positions susceptibles d'être substituées, sans perte d'activité de la molécule.

3.3.3. Synthèse des dérivés du DDPM avec des espaceurs

La position 6 sur le cycle pyridyle a été exploitée pour la synthèse des dérivés qui peuvent être utilisés pour greffer des fluorophores afin de localiser la molécule ou d'autres groupements permettant d'immobiliser la molécule sur un support dans le but d'identifier les cibles cellulaires.

L'ajout d'une chaîne espaceur sur cette position (GSC-77, GSC-79, GSC-86) garde l'activité et la spécificité de la molécule sur les cellules TG1. Le groupe BOC (tert-butoxycarbonyle) à l'extrémité de la chaîne permet de protéger le groupe amine, qui peut ensuite être utilisé dans la fixation de la molécule sur un support tel que l'agarose pour une application en chromatographie d'affinité.

En partant des structures de GSC-77 et GSC-79, deux molécules GSC-80 et GSC-81 présentant un fluorophore, la phénothiazine, à l'extrémité ont été synthétisées. Cependant aucune des deux molécules n'a conservé son activité sur les cellules TG1.

Une biotine a également été ajoutée sur la chaîne latérale (GSC-84 et GSC-85) dans le but de fixer les molécules sur un support greffé avec de l'avidine. Cependant, comme dans le cas de GSC-80 et GSC-81, cette modification induit la perte complète de l'activité sur les cellules TG1.

Finalement, nous avons décidé de greffer la molécule GSC-86 sur les billes de sepharose activées par le bromure de cyanogène (CNBr). La réaction entre la molécule dont le groupe amine a été déprotégé et le sepharose activé a permis de fixer la molécule aux billes (**Figure 35**). Ces billes greffées sont actuellement utilisées dans un projet d'identification des cibles cellulaires du DDPM (thèse de

Wanyin Chen).



Figure 35. Fixation d'une molécule avec un groupe amine sur les billes de sepharose activés par le bromure de cyanogène (CNBr).

3.4. Effet du bisacodyl / DDPM sur des modèles *in vitro* de tumeurs par culture de CSGs en 3 dimensions

3.4.1. Obtention de macro-sphères clonales de CSGs

La capacité d'auto-renouvellement est une des caractéristiques des CSGs qui est souvent fonctionnellement évaluée *in vitro* par le test de clonalité. Dans ce test, la capacité des CSGs à former les neurosphères clonales (c'est-à-dire dérivant d'une cellule au départ) est mesurée. Classiquement, le test se termine 3-4 semaines après l'ensemencement des cellules dans des conditions de dilution limite. A ce moment les sphères atteignent une taille de 200-300 µm en diamètre.

Comme nous l'avions indiqué précédemment l'auto-renouvellement de nos CSGs TG1 et OB1 a été évalué par le test de clonalité (Figure 19). A l'issue des 3 semaines de test, nous avons conservé les sphères. De manière intéressante, elles ont continué à grandir pour former, 8 semaines après l'ensemencement des cellules, de grandes sphères clonales avec un diamètre de l'ordre de 1mm (Figure 36). Cela suggérait que les cellules TG1 et OB1 possédaient une capacité d'auto-renouvellement *in vitro* extraordinaire. Nous appellerons ces sphères de grande taille des macrosphères.



Figure 36. Formation des macrosphères clonales à partir d'une cellule TG1 et OB1. Images en contraste de phase des neurosphères à différents temps après l'ensemencement des cellules. Echelle : 200 μm.

Concernant la cinétique de croissance des sphères (Figure 37), nous observons que le nombre de cellules composant les sphères (proportionnel au volume des sphères, Figure 37 B) augmente de manière exponentielle pendant les 4 premières semaines suivant l'ensemencement des cellules. Cela suggère que la plupart des cellules dans les sphères sont dans un état de prolifération pendant cette période. Par la suite, la croissance des sphères ralentit. Ceci pourrait être expliqué par une inefficacité de la diffusion des éléments nécessaires à la prolifération des cellules à travers la sphère, due à une barrière physique formée par les cellules à la périphérie. De manière concomitante au ralentissement de la croissance, une zone sombre apparait au centre de la sphère (Figure 36).



Figure 37. Suivi de la croissance des macrosphères clonales de cellules TG1 et OB1. Le diamètre (A) des sphères formées à partir d'une seule cellule TG1/OB1 a été mesuré chaque semaine après l'ensemencement des cellules. Le volume des sphères (B) a été calculé avec le diamètre des sphères.

3.4.2. Hétérogénéité structurale et cellulaire des macrosphères

Les macrosphères clonales formées à partir d'une cellule TG1/OB1 ont été fixées au paraformaldéhyde, incluses dans la paraffine, puis sectionnées en coupes fines pour être analysées.



Figure 38. Coloration à l'hématoxyline / éosine d'une coupe de macrosphère formée à partir d'une cellule TG1. Echelle : $200 \ \mu m$ (A), $100 \ \mu m$ (B), $50 \ \mu m$ (C).

Une coloration à l'hématoxyline & Eosine des coupes de sphère, révèle une hétérogénéité de structure des sphères avec à l'extérieur une zone cellulaire dense entourant une zone moins compacte (Figure 38). Sur l'état de cellules composant la sphère, une sphère de grande taille est constituée d'une couche de cellules vivantes à la périphérie et un centre des cellules en nécrose, identifiables par la perte du contenu cellulaire et une condensation nucléaire (Figure 38 C). La zone noire au centre de la sphère dans les images de contraste de phase (Figure 36) correspond donc bien à une zone nécrotique.



Figure 39. Etat de la prolifération des cellules dans les macrosphères. Les coupes de sphères TG1 (A, B) et OB1 (C, D) ont été marquées avec l'anticorps anti-Ki67 (marron). Les noyaux cellulaires (violet) ont été révélés avec une contre-coloration d'hématoxyline. Echelle : 200 μm (A, C), 50 μm (B, D).

L'état de la prolifération des cellules dans les macrosphères a été étudié en utilisant l'anticorps anti-Ki67. Seules les cellules à la périphérie expriment le marqueur de prolifération Ki67 (cellules Ki67⁺). A partir d'une profondeur d'environ 100 µm de la surface de la sphère, le marqueur n'est plus décelé dans les cellules (**Figure 39**). Ceci suggère une organisation de la structure sphérique avec des cellules en prolifération à l'extérieur et un intérieur constitué de cellules majoritairement en quiescence.



Figure 40. Gradient d'oxygène dans les macrosphères de CSG. La zone d'hypoxie (marron) dans les sphères TG1 (A, B) et OB1 (C, D) a été identifiée avec l'essai Hypoxyprobe-1 (Hypoxyprobe, Inc.). Les noyaux cellulaires (violet) ont été révélés avec une contre-coloration à l'hématoxyline. Echelle : 200 µm (A, C), 50 µm (B, D).

Nous avons d'autre part analysé la présence de zones hypoxiques dans les sphères en utilisant l'essai « Hypoxyprobe-1 » qui mesure le caractère réducteur de l'environnement et corrélativement la disponibilité en oxygène. La coloration brune observée à l'intérieur de la sphère (**Figure 40**) témoigne de la présence d'un environnement très réducteur et donc hypoxique. On peut donc supposer l'existence d'un gradient de concentration en oxygène entre l'extérieur et l'intérieur de la sphère. Cette étude montre que les cellules dans la zone dense à l'intérieur de la sphère sont dans un environnement hypoxique.

Ensuite, nous avons étudié l'expression des transporteurs de glucose GLUT-1 et GLUT-3 par les cellules dans les sphères. Le transporteur GLUT-1 est considéré comme un marqueur d'hypoxie tumorale depuis longtemps alors que le transporteur GLUT-3, qui a une affinité pour le glucose 5 fois plus élevée que GLUT-1, est exprimé préférentiellement par les CSGs dans les tumeurs de glioblastome.

Dans les sphères de TG1 et OB1, GLUT-1 et GLUT-3 sont exprimés de manière préférentielle par les cellules qui sont à l'intérieur des sphères (une faible expression est aussi observée dans les cellules au bord des sphères) (**Figure 41**).



Figure 41. Expression des transporteurs de glucose dans les macrosphères. Les coupes de sphère TG1 (A-B, E-F) et OB1 (C-D, G-H) ont été marquées avec l'anticorps anti-GLUT-1 (A-D) et anti-GLUT-3 (E-H). Les noyaux cellulaires (violet) ont été révélés avec une contre-coloration à l'hématoxyline. Echelle : 200 μm (A, C, E, G), 100 μm (B, D, F, H).

Les résultats ci-dessus montrent l'existence d'une hétérogénéité dans les macrosphères. Une sphère peut être divisée en 3 parties : une partie extérieure normoxique avec les cellules en prolifération; une partie intermédiaire hypoxique avec les cellules en quiescence qui sur-expriment les transporteurs de glucose Glut1 et Glut3; une partie centrale avec les cellules en nécrose. Un schéma récapitulant la structure et les caractéristiques des sphères est donné dans la **Figure 42**.

Nous avons également tenté de mesurer la distribution du pH dans la sphère, en utilisant le protocole de l'équipe du Dr Swietach qui a montré un gradient du pH à travers des sphéroïdes des cellules cancéreuses [206, 207]. Malheureusement, aucun résultat n'a pu être obtenu, en raison de la limite de cette technique, liée à la grande taille de nos sphères. Ce point sera rediscuté plus tard dans la partie Discussion.



Figure 42. Schéma représentatif du modèle in vitro de CSGs cultivées en 3D.

L'hétérogénéité dans les sphères peut être expliquée par une diffusion limitée des éléments à travers la sphère qui crée un gradient d'oxygène, de nutriments ainsi qu'un gradient inverse des déchets métaboliques tels que le dioxyde de carbone, le lactate et le proton. Dans ces sphères, l'environnement physico-chimique des cellules et donc leur physiologie diffèrent selon leur localisation au sein de la sphère. L'hétérogénéité structurale et cellulaire observée présente des similitudes avec celle que l'on peut trouver au sein des tumeurs solides. (Ce point sera rediscuté dans la partie Discussion.)

3.4.3. Effet du bisacodyl/DDPM sur les CSGs cultivées en macrosphères



Figure 43. Effet du DDPM sur les macrosphères de CSGs. Les sphères TG1 (A, B) et OB1 (C, D) ont été traitées avec 1% de DMSO (A, C) ou 10 µM DDPM dans 1% de DMSO (B, D) pendant 72h. Le nombre des cellules vivantes ainsi que le taux d'ATP cellulaire ont été déterminés avec le bleu de Trypan et le l'essai CellTiter-Glo (Promega), respectivement.

Les macrosphères clonales obtenues à partir des CSGs présentaient des propriétés intéressantes et s'imposaient comme des modèles *in vitro* à utiliser pour tester l'activité de d'agents chimio thérapeutiques potentiels avant de passer à l'étude *in vivo* chez l'animal. Des sphères de l'ordre de 1mm de diamètre dans du

milieu NS34 frais à pH 7,4 ont été mis en contact avec du DDPM (ou du bisacodyl) pendant 72h; Le traitement avec le DDPM (ou le bisacodyl) induit la destruction de la structure de la sphère, ainsi que la mort des cellules la constituant (**Figure 43**).

Nous avons montré dans le paragraphe 3.2 que sur des CSGs isolées (obtenues par dissociation mécanique de petites neurosphères) le bisacodyl / DDPM agissait avec une grande spécificité sur les cellules en quiescence ou se trouvant dans un environnement acide. Nous avons donc essayé de comprendre le mode d'action du bisacodyl/DDPM dans le cadre de la macrosphère sachant que celle-ci présente une zone avec des cellules en quiescence et probablement une zone acide.

Ceci a été réalisé en analysant des coupes de macrosphères traitées et non traitées au DDPM. Afin de garder la structure des sphères, le traitement avec le DDPM a été fait pendant 10h (pour TG1) ou 6h (pour OB1) (et non 72h comme dans la **Figure 43**). Après le traitement, on voit nettement sur les coupes colorées à l'hématoxyline/éosine ou au bleu de toluidine (**Figure 44**) une déstructuration de l'intérieur de la sphère, avec une expansion de la zone centrale nécrotique, ainsi qu'un amincissement de la bordure de la sphère constituée de cellules vivantes.

Ainsi après le traitement à courte durée, seule persistait une couche de cellule vivante à la périphérie de la sphère. L'analyse des images de la **Figure 44** suggère que le DDPM pénètre dans la macrosphère et exerce son effet cytotoxique spécifiquement sur les cellules à l'intérieur de celle-ci.



Figure 44. Activité sélective du DDPM sur les cellules à l'intérieur de la macrosphère. (A-D) La coloration à H&E de sphère TG1 non-traitée (A, B) et traitée avec 10 μ M DDPM (C, D) pendant 10h. (E-H) La coloration au bleu de toluidine de sphère OB1 non-traitée (E, F) et traitée avec 10 μ M DDPM (G, H) pendant 6h. Echelle : 200 μ m (A, C, E, G), 50 μ m (B, D, F, H). La couche des cellules vivantes est marquée dans les images A, C, E, G.

Ce résultat est en accord avec la sélectivité d'action du DDPM envers les cellules quiescentes et / ou dans un environnement acide, puisque ces conditions sont présentes dans les macrosphères. De plus l'intégrité de la sphère (et donc la présence de gradient physico-chimique d'oxygène et de protons) semble essentielle à l'activité du DDPM qui est nettement moins marquée sur les sphères dégradées par action mécanique d'une pipette que sur les sphères entières (**Figure 45**).



Figure 45. Importance du gradient à travers de la macrosphère dans l'activité du DDPM. Les sphères TG1 et OB1 entières (A) et les sphères dissociées mécaniquement (B) ont été traitées avec 10 µM DDPM pendant 24h. La viabilité des cellules dans les sphères a été mesurée avec le l'essai CellTiter-Glo® (Promega) mesurant le niveau d'ATP cellulaire.

Comme dans le cas des CSGs isolées, l'inhibiteur S0859 du transporteur sodium/bicarbonate (NBC) confie une protection partielle aux cellules dans les macrosphères vis à vis de l'action du DDPM (**Figure 46**).



Figure 46. Effet protecteur du composé S0859 vis-à-vis de l'activité cytotoxique du DDPM sur les macrosphères de CSGs. Les sphères TG1 ont été traitées par 1% DMSO (contrôle), 10 μM DDPM, 100 μM S0859 ou la combinaison de 10μM DDPM et de 100 μM S0859 pendant 24h. La viabilité des cellules dans les sphères a été mesurée avec l'essai CellTiter-Glo® (Promega) mesurant le niveau d'ATP cellulaire.

Il a été montré dans les études précédentes que les cellules TG1 et OB1 étaient résistantes au témozolomide (TMZ), agent alkylant utilisé actuellement comme agent de chimiothérapie en clinique pour traiter le glioblastome [78]. Nous avons montré que les macrosphères formées de cellules TG1 et OB1 sont également résistantes au TMZ (**Figure 47**) et l'activité du DDPM n'était pas renforcée en présence de TMZ.



Figure 47. Effet du TMZ sur les macrosphères de CSGs. Les sphères formées à partir de cellules TG1 et OB1 ont été traitées avec 1% DMSO, 10 µM DDPM, 100 µM TMZ et la combinaison de 1 µM DDPM/100 µM TMZ pendant 72h. La viabilité des cellules dans les sphères a été mesurée avec l'essai CellTiter-Glo® (Promega) mesurant le niveau d'ATP cellulaire.

3.5. Evaluation de l'activité antitumorale du bisacodyl *in vivo* chez l'animal

3.5.1. Etudes de la pharmacocinétique et de la biodistribution

En tant que médicament laxatif, le bisacodyl est administré par voie orale. Pour évaluer son potentiel thérapeutique anti-tumoral, plus particulièrement dans le cas de glioblastome, des études *in vivo* de pharmacocinétique et de biodistribution du bisacodyl sont indispensables. Ces études préliminaires ont été effectuées dans des souris CD1 après administration du bisacodyl par la voie intra-péritonéale (i.p.).

3.5.1.1. Pharmacocinétique

Le bisacodyl mélangé à la carboxymethylcellulose (CMC) a été injecté en i.p. à raison de 300 mg/kg à des souris CD1. La concentration plasmatique du bisacodyl ainsi que celle de son métabolite le DDPM ont été déterminées 0,5h, 1,5h, 3h, 6h, 12h et 24h après l'injection par HPLC.

Temps (h)	Concentration plasmatique du bisacodyl (nM)	Concentration plasmatique du DDPM (µM)	
0,5	$0,44 \pm 0,58$	3,71 ± 0,87	
1,5	$0,03 \pm 0,03$	1,88 ± 0,36	
3	$0,03 \pm 0,00$	1,73 ± 0,29	
6	0,14 ± 0,11	$1,52 \pm 0,40$	
12	0,42 ± 0,39	1,23 ± 0,29	
24	1,44 ± 0,19	1,52 ± 0,40	

Tableau 4. Concentration plasmatique du bisacodyl et du DDPM à différents temps après injection i.p. de bisacodyl. Le bisacodyl a été injecté à raison de 300 mg/Kg mélangé à la carboxymethylcellulose.

Le bisacodyl n'est détecté qu'à de très faibles concentrations dans le plasma

après l'injection alors que le DDPM a été détecté à des concentrations plus élevées (**Tableau 4**), ce qui suggère que bisacodyl est hydrolysé rapidement *in vivo* en DDPM. Dans toutes les expérimentations animales nous utiliserons exclusivement le bisacodyl, disponible commercialement et non le DDPM qui n'est plus disponible dans le commerce et nécessite une réaction de désacétylation (faite par les chimistes du laboratoire).

La concentration plasmatique de DDPM 30 mn après l'injection est de l'ordre de 4 μ M. Elle diminue rapidement durant la première heure pour atteindre 6h après l'injection un plateau à une concentration de l'ordre de 1,5 μ M (**Figure 48**). Les concentrations plasmatiques atteintes sont compatibles avec l'EC50 de la molécule.



Figure 48. Concentration plasmatique du DDPM après injection de bisacodyl à des souris. Le bisacodyl est administré en i.p. à des souris CD1 à raison de 300 mg/kg en suspension dans la CMC. La concentration plasmatique du DDPM a été mesurée 0,5h, 1,5h, 3h, 6h, 12h et 24h après l'injection. Le bisacodyl et le DDPM sont détectés HPLC.

3.5.1.2. Biodistribution. Détection de bisacodyl/DDPM dans le cerveau

Une des premières questions a été de savoir si le bisacodyl et le DDPM passaient la barrière hémato-encéphalique. A cet effet, le bisacodyl a été injecté 3 fois en i.p. à raison de 300 mg/kg (mélangé à la CMC) aux souris CD1 avec un intervalle de 24h entre chaque injection. La quantité du bisacodyl et de DDPM dans le cerveau des souris a été mesurée 1,5h, 6h, 10h, et 24h après la troisième

injection.



Figure 49. Détection du bisacodyl et du DDPM dans le cerveau de souris. Le bisacodyl a été injecté à raison de 300 mg/kg aux souris CD1 (n=2) à 0h, 24h, 48h. La quantité de bisacodyl et de DDPM présents dans le cerveau des souris a été déterminée à 1,5h, 6h, 10h et 24h après la dernière injection selon le protocole décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les quantités sont exprimées en ng de composé par cerveau.

La Figure 49 indique la présence de bisacodyl et de DDPM dans le cerveau des souris. Nous n'avons pas d'indication sur la répartition des molécules dans le cerveau. Des concentrations moyennes ont été estimées à partir de certains paramètres connus pour le cerveau de souris. Cette estimation indique que le DDPM qui correspond au métabolite actif du bisacodyl est présent à une concentration compatible avec l'EC50 de la molécule sur les CSGs. Néanmoins ces paramètres devront être affinés. Il est à noter que le bisacodyl qui disparait très rapidement du sang circulant (Tableau 5) est présent à des concentrations non négligeables, supérieures à celles du DDPM dans le cerveau, 6h après la dernière injection, suggérant que la cinétique de désacétylation du bisacodyl est moins rapide dans le cerveau que dans le sang.

48h +	ng/cerveau		concentration moyenne/cerveau (µM)		concentration moyenne/sang cérébral (µM)	
Temps (h)	bisacodyl	DDPM	bisacodyl	DDPM	bisacodyl	DOPM
1,5	256 ± 162	527 ± 133	1,47 ± 0,90	3,80 ± 0,95	73.60 ± 45	145.83 ± 36,80
8	419 ± 121	195 ± 8	$2,32\pm0.67$	$1,41 \pm 0.08$	$115,94 \pm 33,5$	$53,96 \pm 2,21$
10	15 - 8	66 + 32	0.08 ± 0.04	0.48 ± 0.23	4,15 + 2,21	$18,26 \pm 8.85$
24	34 ± 20	45 ± 6	$0,19\pm0,11$	0.32 ± 0.04	8,41 ± 5,53	$12,45\pm1.66$

Tableau 5. Concentration du bisacodyl et du DDPM dans le cerveau des souris après injection i.p.. Les quantités exprimées en ng/cerveau ont été transformés en concentration en se fondant sur les estimations suivantes pour les souris CD1 : volume cérébral, 500 mm³; poids cérébral, 250 mg; volume de sang cérébral, 10 μL.

Cette première étude des paramètres pharmacocinétiques et d'estimation du passage de la barrière hémato-encéphalique suggère que le bisacodyl présente les propriétés *ad hoc* pour évaluer son activité anti-tumorale dans un modèle animal.

3.5.2. Effet du bisacodyl sur des animaux xénogreffés avec des CSGs

3.5.2.1. Xénogreffes ectopiques de CSGs prétraitées avec du bisacodyl

L'effet du bisacodyl sur la formation de tumeur des CSGs a été évalué dans un modèle sous-cutané de souris. Les cellules OB1 prétraitées avec 1% de DMSO ou avec du bisacodyl dans des conditions sub-toxiques ont été mélangées à du Matrigel et injectées dans le flanc des souris Nude. Les souris ont été sacrifiées après 20 jours, les inserts matrigel prélevés et analysés après coloration avec des anticorps anti-vimentine humaine. Le traitement des cellules avec le bisacodyl induit une forte diminution de la densité de cellules tumorales (**Figure 50**). Ceci suggère que le bisacodyl altère la capacité des CSGs à initier des tumeurs *in vivo*. L'expérimentation animale a été réalisée à Paris en collaboration avec les Drs Marie-Pierre Junier et Hervé Chneiweiss.



Figure 50. Effet du pré-traitement au bisacodyl sur la capacité des CSGs à initier des tumeurs *in vivo***.** (A) Densité des cellules tumorales dans les tumeurs formées avec les cellules OB1 prétraitées avec 1% de DMSO pendant 12h à pH 6,2 ou 50 μM de bisacodyl pendant 12h à pH 6,2. (B-E) Sections histologiques des tumeurs formées 20 jours après l'injection de cellules OB1 prétraitées avec le DMSO (B, C) ou le bisacodyl (D, E) marquées avec l'anticorps anti-vimentine humaine. Echelle : 100 μm.

3.5.2.2. Xénogreffes orthotopiques de CSGs

Ce travail a été réalisé par le Dr Suzana Assad-Kahn (Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford, CA). Il fait partie du manuscrit en préparation (8.2.1 Annexe II.1).

En collaboration avec le Dr Suzana Kahn, nous avons testé le bisacodyl sur un modèle animal de GBM utilisé à « Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford ». Une représentation du protocole expérimental est donnée dans la **Figure 51**.



Figure 51. Représentation schématique du protocole de traitement des souris par le bisacodyl. Des CSGs EGFR⁺/CD133⁺ isolées de GBM primaires humains, transduits avec des constructions exprimant la GFP et la luciférase ont été implantées dans le striatum de souris immunodéficientes NSG. Le traitement a été initié après détection des tumeurs. Des analyses de bioluminescence ont été réalisées 45 jours après le début du traitement.

Pour ce modèle, des CSGs CD133⁺ / EGFR⁺ ont été isolées de glioblastomes primaires de patients. Ces cellules présentent les propriétés d'auto-renouvellement et une forte aptitude à induire des tumeurs chez l'animal immunodéprimé. Afin de suivre le développement tumoral, ces cellules ont été transduites avant l'injection aux animaux avec une construction induisant l'expression de la GFP et de la luciférase. Les animaux sont maintenus sans traitement jusqu'à l'apparition de tumeurs mise en évidence par bioluminescence (6 semaines). A ce moment, elles sont randomisées (valeur moyenne du flux pour le groupe contrôle : (4,67 x 10³) et pour le groupe bisacodyl : 4,74 x 10³) et le traitement est mis en place par injection i.p. de bisacodyl (300 mg/kg dans 1% de carboxyméthylcellulose, 0,8% de Tween 80) ou de l'excipient seul (souris contrôle) pendant 45 jours. Le bisacodyl inhibe de manière significative la croissance tumorale par rapport au contrôle (Figure 52 A et B) et les courbes de Kaplan-Meier montre une survie nettement améliorée du groupe de souris traitées (Figure 52 C). Les analyses histologiques des tumeurs sont en cours pour déterminer la taille des tumeurs formées dans le cerveau des souris.



Figure 52. Effet du bisacodyl in vivo. (A) Image de bioluminescence des tumeurs de souris traitées avec l'excipient (CTL) ou au bisacodyl pendant 45 jours. (B) Quantification des signaux de bioluminescence mesurée dans les souris traitées avec l'excipient (CTL) ou au bisacodyl. (C) Courbes de Kaplan-Meyer correspondant à la survie des souris traitées avec l'excipient (CTL) ou au bisacodyl.

Ces résultats constituent une première preuve d'efficacité du bisacodyl comme agent anti-tumoral actif sur des tumeurs induites chez l'animal par injection intracérébrale de CSGs. Ces expériences devront être confirmées avec un nombre d'animaux plus grand, mais également en utilisant les cellules TG1 et OB1 qui sont CD133⁻. Si les résultats sont positifs, une étude plus complète sera entreprise avec l'objectif d'un repositionnement de la molécule comme agent anti-tumoral.

4. Discussion sur le travail réalisé avec le bisacodyl / DDPM
4. Discussion sur le travail réalisé avec le bisacodyl / DDPM

4.1. Bisacodyl et reprofilage de médicaments

4.1.1. Définition

Par un criblage de la chimiothèque Prestwick constituée de 1120 petites molécules approuvées par la FDA (Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux), nous avons identifié le bisacodyl, un laxatif d'action locale, comme une molécule qui montre une activité cytotoxique spécifique sur les CSGs dans la condition de quiescence ou d'acidité.

Cette stratégie qui consiste à trouver des nouvelles indications pour les médicaments qui sont déjà sur le marché est appelée **le reprofilage de médicaments** (« drug repositioning » ou « drug repurposing » en anglais) [208]. Le reprofilage de médicaments est devenu actuellement une stratégie alternative importante pour le développement des médicaments, plus particulièrement pour le développement des médicaments.

4.1.2. Histoire du reprofilage de médicaments

L'approche traditionnelle pour le développement du médicament implique l'identification et la validation *de novo* des nouvelles molécules. Malgré une augmentation importante de la dépense dans la recherche et le développement durant la dernière décennie, le nombre de nouveaux médicaments introduits sur le marché n'a pas augmenté. Le coût et le temps nécessaire pour développer un nouveau médicament ont augmenté de manière significative [209]. Ce phénomène, nommé aussi « la crise de la productivité », est un des plus grands problèmes actuellement dans l'industrie pharmaceutique, qui a forcé l'industrie pharmaceutique à trouver des stratégies innovantes et alternatives pour le développement des médicaments.

Le reprofilage de médicaments représente une stratégie alternative qui a attiré

beaucoup d'attention récemment et a connu plusieurs cas de succès jusqu'à présent [208, 210–212]. L'idée derrière cette stratégie est que presque tous les médicaments sur le marché actuellement possèdent plusieurs cibles cellulaires et donc peuvent avoir des effets secondaires qui ne sont pas liés à leur activité principale. Si ces médicaments interfèrent avec les voies de signalisation impliquées dans d'autres maladies, il serait possible que ces médicaments puissent exercer un effet thérapeutique dans ces pathologies. En plus, différentes maladies peuvent impliquer les mêmes voies de signalisation et cibles cellulaires, ce qui pourrait aussi expliquer les nouvelles indications possibles pour les médicaments qui sont déjà sur le marché [210].

4.1.3. Avantages et limites du reprofilage de médicaments

Le principal avantage du reprofilage de médicaments est une diminution du coût et du temps dans le développement. Contrairement au développement *de novo* des médicaments, le reprofilage de médicaments commence avec les molécules qui ont été déjà utilisées en clinique. Leur pharmacocinétique, biodisponibilité et toxicité sont généralement bien connues et accessibles aux cliniciens et chercheurs. Ainsi, ces molécules pourraient être testées directement dans la phase clinique II ou III. La durée et le coût associé pour le développement de ces molécules peuvent donc diminuer. Une durée de 10 à 17 ans est souvent nécessaire pour développer un médicament par l'approche traditionnelle (*de novo*) alors qu'il faut 3 à 12 ans pour le développement d'un médicament par la stratégie de reprofilage [208]. De plus, en utilisant les molécules dont les propriétés pharmacologiques sont bien connues, on peut également espérer une diminution du risque d'échec lors du développement du médicament.

L'autre avantage majeur du reprofilage de médicaments se trouve au plan économique, plus particulièrement pour le développement des médicaments anti-cancéreux. En raison de la longue durée du traitement et d'un taux d'attrition élevé lors du développement, le coût des thérapies pour soigner les patients atteints de cancer reste extrêmement élevé. Au contraire, les molécules étudiées dans le cadre de reprofilage sont souvent des médicaments peu coûteux ou même des médicaments génériques. La découverte de médicaments anti-cancéreux par l'approche de reprofilage peut donc diminuer le rapport coût/efficacité des traitements.

Néanmoins, il existe aussi des limites potentielles concernant le reprofilage de médicaments. Par exemple, les molécules candidates peuvent montrer une nouvelle activité thérapeutique, mais seulement à une dose plus élevée que la dose nécessaire pour l'indication originale. Ceci nécessiterait une réévaluation de leur profil de toxicité. Dans le cas du bisacodyl, un agent laxatif d'action locale administré par voie orale, une nouvelle voie d'administration serait nécessaire pour soigner les patients atteints de glioblastome. Pourtant, la principale limite concernant le reprofilage de médicaments se situe au plan économique. Faute de récompense économique comparable à celle générée par la mise sur le marché de nouveaux agents anti-cancéreux, l'industrie pharmaceutique n'est pas motivée pour développer des médicaments par l'approche de reprofilage, initié par les chercheurs académiques, puisse entrer dans les essais cliniques qui sont extrêmement coûteux.

4.1.4. Exemples et situation actuelle

L'exemple le plus connu parmi les médicaments découverts par reprofilage est le sildénafil (Viagra chez Pfizer). Initialement développé pour traiter l'angine de poitrine, le sildénafil, un inhibiteur spécifique des phosphodiestérases de type 5 (PDE5), était supposé relâcher les artères coronaires et ainsi permettre un plus grand flux sanguin au niveau coronaire. Les effets cardiovasculaires désirés n'ont pas été observés sur les volontaires sains dans les études de phase I en 1991 et 1992. Mais les effets secondaires observés lors du développement, à savoir des érections exceptionnellement fortes et persistantes, ont conduit Pfizer à développer le sildénafil comme un médicament pour traiter les troubles de l'érection. Le sidénafil est ensuite devenu un des médicaments les plus rentables de Pfizer.

Dans le domaine de l'oncologie, un des premiers exemples des agents repositionnés avec succès comme agent anti-cancéreux est la thalidomide. Mise sur le marché comme sédatif et anti-nauséeux pour les femmes enceintes en 1957, la thalidomide est plus connue historiquement pour le scandale sanitaire à cause de ses effets tératogènes. Elle a été retirée du marché en 1961. En 1994, les chercheurs ont montré un effet anti-angiogénique de la thalidomide, ce qui a non

seulement expliqué ses effets dramatiques sur le développement de fœtus, mais représentait aussi une propriété intéressante dans le domaine du cancer [213]. L'effet anti-cancéreux de la thalidomide a été montré pour la première fois chez les patients atteints de myélome multiple [214]. En 1998, le brevet MOU (method of use) de la thalidomide a été acheté par Celgene qui a ensuite mis la molécule sur le marché pour traiter le myélome multiple. Les études récentes ont montré l'efficacité de la thalidomide contre plusieurs types cancers, tels les syndromes myélodysplasiques [215, 216] et la leucémie myéloïde aiguë [217].

D'autres médicaments non anti-cancéreux, tels que l'aspirine, la metformine, la rapamycine, l'acide valproïque sont également évalués pour leur potentiel anti-cancéreux [210].

Dans le cas du glioblastome, de nombreuses molécules non anti-cancéreuses ont montré un potentiel thérapeutique contre le glioblastome. Dans une étude publiée en 2012, par un criblage de chimiothèque, Hothi et al. [218] ont identifié le disulfirame, un médicament pour traiter la dépendance à l'alcool, comme une molécule qui montre une activité cytotoxique sur les CSGs, via une inhibition de la voie ubiquitine-protéasome. Dans l'autre étude qui est publiée en 2014 par Kitambi et al. [219], un criblage de chimiothèques a permis d'identifier le Vacquinol-1 comme une molécule induisant spécifiquement la mort des cellules de glioblastome par l'induction de la vacuolisation catastrophique dans les cellules tumorales. D'autre part, les cliniciens et les chercheurs de l'association (International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care) ont proposé le protocole CUSP9 qui consiste à utiliser le cocktail de 9 molécules différentes pour traiter le glioblastome récurrent [220, 221]. Ces 9 molécules sont déjà sur le marché dans indications des non anti-cancéreuses et sont bien caractérisées pharmacologiquement. Chaque molécule inhibe une ou plusieurs voie(s) de signalisation importante(s) pour le maintien ou la résistance de tumeur de glioblastome, telles que les voies Akt, Hedgehog, VEGF. L'essai clinique avec le protocole CUSP9 chez les patients de glioblastome récurrent est actuellement planifié.

4.1.5. Conclusion sur le reprofilage

La crise de productivité dans l'industrie pharmaceutique, combinée à un besoin médical non-satisfait, surtout dans le domaine de l'oncologie, a forcé la société à

réfléchir sur la stratégie pour le développement de nouveaux médicaments. Le reprofilage de médicaments qui a déjà connu plusieurs exemples de réussite, représente une stratégie alternative prometteuse pour trouver de nouveaux médicaments. Etant donné sa relative rapidité pour le passage en clinique et son coût de développement moins élevé, cette stratégie doit être encouragée, plus particulièrement pour traiter les maladies pour lesquelles le choix thérapeutique est limité, telle glioblastome.

Néanmoins, des collaborations entre l'industrie pharmaceutique et le milieu académique, ainsi que des améliorations de la réglementation, sont nécessaires pour favoriser le reprofilage de médicaments, dans le but d'augmenter la diversité de l'arsenal de chimiothérapie.

4.2. Cibler les CSGs en quiescence

4.2.1. Quiescence des CSGs et résistance aux traitements

En une décennie, depuis l'introduction du témozolomide dans le traitement standard (protocole de Stupp) en 2005, le pronostic du glioblastome ne s'est guère amélioré [8]. Le glioblastome reste actuellement une des tumeurs les plus malignes chez l'homme, avec une médiane de survie d'environ 14 mois.

Néanmoins, la dernière décennie a connu une explosion de notre connaissance de la pathophysiologie des tumeurs. La caractérisation moléculaire et la découverte de cellules tumorales ayant des propriétés de cellules souches sont parmi les avancées les plus marquants dans notre compréhension du glioblastome.

Les projets de caractérisation moléculaire menés par le TCGA (The Cancer Genome Atlas) et d'autres organisations ont dévoilé un panorama des voies de signalisation altérées dans les tumeurs de glioblastome. Ceci a également permis de classer ces tumeurs en 4 sous-types (pro-neural, neural, classique et mésenchymateux) en fonction de leur profil d'expression des gènes. Sur le plan clinique, les efforts de caractérisation moléculaire du glioblastome sont en train de transformer le protocole de traitement, en donnant la possibilité de remplacer les agents de chimiothérapie classique par des thérapies ciblées plus spécifiques. L'identification des cellules souches de glioblastome (CSGs) a également transformé notre vision de cette tumeur cérébrale qui n'est pas simplement un amas de cellules en croissance anarchique, mais un ensemble avec une organisation cellulaire hiérarchique, composée de cellules à différents degrés de différenciation et douées de plasticité. Même s'il existe encore certains points de conflits sur la terminologie et les marqueurs des CSGs, il est bien accepté actuellement qu'il existe dans les tumeurs des cellules plus immatures qui jouent un rôle essentiel dans le maintien et la résistance aux traitements des tumeurs. Ceci nécessite donc un changement du paradigme avec la nécessité de cibler par le traitement non seulement les cellules de la masse tumorale, mais aussi les CSGs, plus résistantes aux agents radio- et chimiothérapeutiques.

Plusieurs mécanismes ont été identifiés pour expliquer la résistance des CSGs aux traitements, tels une capacité renforcée de réparation de l'ADN, l'expression des pompes d'efflux et l'état de quiescence. Les deux premiers points ont été largement étudiés et plusieurs stratégies thérapeutiques ont été proposées et testées en utilisant les inhibiteurs des protéines impliquées dans la réparation d'ADN (ex. PARPs) [222–227] et les inhibiteurs des pompes d'efflux [228–232]. Cependant même si l'état de quiescence des CSGs ainsi que son rôle dans la résistance aux traitements ont été bien montrés dans des études indépendantes [119, 125, 233], la quiescence des CSGs reste pour l'instant un aspect peu exploité sur le plan thérapeutique.

C'est pour cette raison qu'un criblage différentiel de la chimiothèque Prestwick a été réalisé dans notre laboratoire sur les CSGs en prolifération et en quiescence, dans le but de trouver des petites molécules actives spécifiquement sur les CSGs en quiescence. A notre connaissance, c'est le premier cas de criblage de chimiothèque réalisé sur les cellules cancéreuses dans la condition de quiescence, tous cancers confondus [219, 234–237].

4.2.2. Caractérisation de la quiescence des CSGs

La mise en quiescence des CSGs a été réalisée dans notre laboratoire en laissant les cellules sans renouvellement du milieu de culture pendant 9 jours après un passage normal (dissociation des petites neurosphères et changement de milieu). L'état quiescent des cellules a été vérifié par i) le test d'incorporation de l'EdU qui mesure la synthèse d'ADN dans les cellules, ii) les analyses du cycle

cellulaire et iii) les analyses de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 qui ont montré une accumulation des cellules dans la phase G0.

Cet état de quiescence des CSGs est réversible. Nous avons d'abord montré que les cellules quiescentes n'étaient pas en senescence. Ensuite, en remettant les cellules quiescentes dans le milieu de culture frais, nous avons pu observer que ces cellules étaient capables de sortir de cet état de quiescence et de proliférer de nouveau. Ceci a été vérifié également par les tests d'incorporation de l'EdU, l'analyse du cycle cellulaire et la présence de Ki67.

La réversibilité de cet état de quiescence apporte de la pertinence à notre modèle de quiescence en montrant que les cellules en culture conservent cette propriété des cellules souches cancéreuses *in vivo*. Il est généralement admis que la sortie de l'état de quiescence est responsable (au moins partiellement) de la récurrence des tumeurs après traitement des patients.

Nous avons également montré que dans l'état quiescent, les cellules ont gardé les mêmes caractéristiques de CSGs que les cellules en prolifération, y compris l'expression des marqueurs de cellules souches, l'expression des marqueurs de surface de CSGs, la capacité de différenciation *in vitro*, ainsi que la capacité tumorigène *in vivo*.

Les mécanismes moléculaire et cellulaire de la régulation du cycle cellulaire dans les tumeurs de glioblastome restent encore mal connus à l'heure actuelle. Dans une étude publiée en 2014, Patel et al. [125] ont montré par le séquençage d'ARN dans 430 cellules individuelles provenant de 5 glioblastomes primaires, une corrélation inverse entre la signature transcriptomique du cycle cellulaire et la signature d'hypoxie, ce qui suggérait que l'hypoxie pourrait jouer un rôle dans la régulation de la quiescence. Cependant, il est bien connu que l'hypoxie tumorale favorise aussi l'angiogenèse et l'invasion des cellules tumorales. Ainsi, ces observations sont en conformité avec le modèle de la régulation du cycle cellulaire des CSGs proposé par Chen et al. [56] et présenté dans la partie Introduction du manuscrit (**Figure 9**) : la prolifération locale des cellules tumorales crée un environnement hypoxique; l'hypoxie tumorale favorise ensuite l'angiogenèse et la migration des cellules vers les vaisseaux sanguins; ces cellules se multiplient et forment de nouvelles colonies. L'évolution de la tumeur, ainsi que la régulation de la prolifération des cellules tumorales cellules tumorales cellules tumorales cellules tumorales cellules tumorales cellules tumorales cellules cellules vers les vaisseaux sanguins; ces cellules se multiplient et forment de nouvelles colonies. L'évolution de la tumeur, ainsi que la régulation de la prolifération des cellules tumorales sont donc des processus dynamiques.

Dans notre modèle de quiescence, malgré l'absence du facteur « hypoxie », l'incubation des cellules dans les flaques sans renouvellement du milieu simule à un certain degré les conditions dans les zones hypoxiques au sein de la tumeur où les échanges des éléments sont limités en raison d'une vascularisation aberrante. L'accumulation des déchets métaboliques et l'accès limité aux nutriments pourraient donc induire l'arrêt du cycle cellulaire.

Il reste à déterminer jusqu'à quel degré l'état de quiescence obtenu dans nos conditions expérimentales ressemble à l'état de quiescence *in vivo* dans les tumeurs. Néanmoins, la réversibilité de cet état de quiescence, ainsi que le maintien des propriétés de CSG des cellules en quiescence suggèrent que ce modèle de quiescence des CSGs est pertinent et peut être utilisé comme un outil pour rechercher les molécules avec potentiel thérapeutique et étudier la physiologie de ces cellules.

4.3. Mode d'action du bisacodyl/DDPM

Par un criblage différentiel de la chimiothèque Prestwick sur les CSGs en prolifération et en quiescence, notre laboratoire a identifié le bisacodyl comme la seule molécule dans la chimiothèque qui montre une activité cytotoxique spécifique sur les CSGs en quiescence. De plus, la molécule est inactive sur les cellules saines telles que les astrocytes humaines (HA), les cellules HEK et les cellules souches neurales fœtales (f-NSC). Ce travail a fait l'objet d'une publication [205] à laquelle je suis associée. Une grande partie des études dans le cadre de ma thèse a été consacrée à la compréhension de cette spécificité du bisacodyl sur les CSGs en quiescence et de son mécanisme d'action. Ce manuscrit est en cours de rédaction (8.2.1 Annexe II.1).

4.3.1. Mécanisme d'action décrit dans la littérature

Le bisacodyl a été mis sur le marché dans les années 1960 en tant qu'agent laxatif pour le traitement des constipations et la préparation à l'endoscopie digestive basse. Son activité anti-cancéreuse n'a jamais été évaluée.

L'effet laxatif du bisacodyl est dû à une induction de la motricité intestinale et la sécrétion d'électrolytes, une inhibition de l'absorption d'eau au niveau intestinal

[238, 239]. Néanmoins, le mécanisme d'action exact sous-tendant ces effets reste peu étudié et mal compris. Il a été montré dans les différentes études que ces effets pourraient impliquer l'inhibition de Na⁺/K⁺ ATPase [240, 241], la libération de la prostaglandine E₂ (PGE₂) [241, 242] ou de l'oxyde nitrique (NO) [243] ou l'activation de l'adénylate cyclase de l'entérocyte [239]. L'ATPase Na⁺/K⁺ est impliquée dans le transport transépithélial de Na⁺. La création d'un gradient osmotique causé par l'extrusion de Na⁺ au niveau de la membrane baso-latérale des entérocytes permet le passage de l'eau. L'inhibition de l'enzyme par le bisacodyl induirait un effet laxatif par rétention d'eau au niveau intestinal. Une autre étude sur le colon de rat relie l'inhibition de l'absorption de l'eau (et par conséquent l'effet laxatif) à une inhibition de l'expression de l'aquaporine-3 via la libération de la PGE₂ par les macrophages [244]. Chez l'homme, l'activation de l'adénylate, en produisant du cAMP modifie le flux des électrolytes et de l'eau et diminue l'absorption des fluides. En ce qui concerne le NO, Gaginella et al. [243] ont montré que chez le rat l'effet laxatif du bisacodyl pouvait être retardé par l'ester N^G-nitro-L-arginine methyl (L-NAME), un inhibiteur de la NO synthase. Afin de tester si le NO était impliqué dans l'effet cytotoxique du bisacodyl sur les CGS, nous avons prétraitées nos cellules en prolifération et en quiescence avec le L-NAME avant l'ajout de bisacodyl. Aucun effet n'a été observé (résultat non présenté). Les autres cibles n'ont pas été analysées pour l'instant.

4.3.2. Rôle de l'acidité et de l'état de quiescence dans l'activité cytotoxique du bisacodyl /DDPM

Dans le cadre de notre projet de recherche, à l'issue du criblage, afin de comprendre l'action spécifique du bisacodyl et de son métabolite actif DDPM sur les CSGs en quiescence, nous avons d'abord étudié le rôle du milieu de culture et pu identifier le milieu conditionné des cellules en quiescence comme un facteur essentiel pour l'activité du bisacodyl/DDPM.

Suite à l'observation que la mise en quiescence des cellules est accompagnée par une acidification progressive du milieu de culture (pH vers 6,5 au jour 9), nous avons décidé de tester la molécule sur les cellules aux différents pH. Nous avons pu montrer l'importance du pH dans l'activité du bisacodyl/DDPM car la molécule est active sur les CSGs en prolifération et en quiescence dans la condition légèrement acide (pH 6,0–6,6). Cependant les cellules en quiescence sont plus sensibles au traitement avec le bisacodyl/DDPM que les cellules en prolifération au même pH.

Ces résultats peuvent ainsi répondre au moins en partie à notre question concernant la spécificité du bisacodyl/DDPM sur les CSGs en quiescence. Deux facteurs, l'acidité et l'état physiologique des cellules (leur quiescence), sont responsables à cette spécificité. Cependant, ces deux facteurs ne sont pas forcément indépendants car nous avons aussi observé avec le test d'incorporation d'EdU que l'acidité (pH 6,2) pouvait induire la quiescence des CSGs (résultats non-présentés). La recherche de molécules ou de conditions permettant d'induire la quiescence des cellules sans acidification du milieu sera nécessaire afin de dissocier les deux phénomènes et analyser l'influence de chacun dans l'activité cytotoxique du bisacodyl sur ces cellules.

La mort cellulaire induite par le bisacodyl/DDPM a été caractérisée avec les différentes techniques (utilisation du Z-VAD, activité des caspases, analyses du cycle cellulaire, TUNEL, microscopie électronique à transmission). Nous avons montré que la molécule induisait la mort cellulaire par nécrose, mais non par apoptose.

4.3.3. Modification de l'état de phosphorylation

Pour appréhender les signalisations qui sous-tendent l'activité du bisacodyl/DDPM sur les CSGs nous avons étudié le changement de l'état de phosphorylation de 45 sites de phosphorylation dans les cellules en quiescence suite au traitement avec le DDPM. Cela nous a permis d'identifier quelques protéines (WNK1 (with no lysine (K) kinase-1), p53, STAT3 et STAT6) dont l'état de phosphorylation est altéré par le DDPM. Etant donné que le bisacodyl pourrait exercer son effet laxatif *via* la régulation du transport des ions au niveau intestinal et que son activité cytotoxique sur les CSGs est pH-dépendante, nous avons choisi d'étudier, parmi ces protéines, la kinase WNK1 car cette kinase est aussi impliquée dans la régulation du transport des ions et pourrait donc être impliquée dans l'activité du bisacodyl/DDPM. L'altération de l'état de phosphorylation du WNK1 a été ensuite confirmée par des expériences de Western-Blot.

Le gène de WNK1 a été cloné en 2000 par l'équipe de Cobb [245]. Il a été

ensuite montré en 2001 que les mutations dans le gène de WNK1 étaient responsables d'une forme héréditaire du syndrome d'hypertension nommée syndrome de Gordon ou PHAII (pseudohypoaldostéronisme de type II) [246]. C'est pour cette raison que la plupart des études sur la kinase WNK1 ont été consacrées à la compréhension de son rôle dans la régulation du transport des ions au niveau rénal.

La voie de signalisation concernant WNK1 la plus caractérisée jusqu'à présent est la voie WNK1-SPAK (SPS1-related proline/alanine-rich kinase)/OSR1 (oxidative stress-responsive kinase 1). SPAK et OSR1 sont des substrats directs de WNK1 qui régulent *via* leur activité kinase plusieurs transporteurs d'ions, tels que NCC (Na⁺/Cl⁻ co-transporter), NKCC1 et NKCC2 (Na⁺/K⁺/2Cl⁻ co-transporter 1 et co-transporter 2, respectivement) [247, 248].

La fonction de WNK1 dans les cellules tumorales reste relativement peu étudiée, surtout dans les cellules de glioblastome, à part quelques exceptions [249]. L'équipe de Sun [189, 250] a montré que le traitement avec le témozolomide (TMZ) induisait l'activation de la voie de signalisation WNK1-OSR1/SPAK-NKCC1 dans les cellules de glioblastome. Cette activation est impliquée dans la résistance des cellules au TMZ et favorise la migration des cellules tumorales suite au traitement avec la molécule. Les auteurs ont ainsi proposé une stratégie thérapeutique TMZ avec molécule qui inhibe la voie combinant le une WNK1-SPAK/OSR1-NKCC1.

Comme le traitement avec le DDPM perturbe la voie de signalisation WNK1-SPAK/OSR1 qui régule l'activité de plusieurs transporteurs ioniques, nous avons testé une série d'inhibiteurs de transporteurs ioniques, seuls ou en combinaison avec le DDPM, sur les cellules CSGs, afin de regarder si l'une des molécules pouvaient avoir un effet similaire au DDPM, ou bloquer son activité. Aucun des inhibiteurs testés n'a montré une activité similaire au DDPM sur nos cellules. Pourtant, de manière intéressante, nous avons observé que le S0859, un inhibiteur du NBC (Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter), pouvait protéger les cellules contre l'action du DDPM. Il semble donc que ce transporteur ait un rôle dans l'activité cytotoxique du bisacodyl/DDPM sur les CSGs en quiescence. Une étude plus approfondie doit être menée pour comprendre le mécanisme protecteur exercé par S0859. Les deux molécules S0859 et DDPM agissent-elles par un mécanisme d'inhibition compétitive ou par un mécanisme de type allostérique? Pour l'instant

nous ne savons pas si la molécule agit sur une cible membranaire, ou une cible intracellulaire ou les deux. On pourrait envisager que le co-transporteur NBC serve de porte d'entrée du bisacodyl dans la cellule pour agir ensuite sur sa (ses) cible(s) intracellulaire(s).

Les résultats obtenus à ce jour suggèrent que l'activité cytotoxique du bisacodyl/DDPM sur les CSGs en quiescence pourrait impliquer la voie de signalisation WNK1-SPAK/OSR1 et le co-transporteur d'ions NBC. Les études concernant l'implication de WNK1 dans l'action du bisacodyl/DDPM sont en cours dans notre laboratoire.

En outre, les études de relation structure-activité (RSA) réalisées en collaboration avec les chimistes dans notre laboratoire ont permis de greffer notre molécule sur un support de sépharose. L'identification des cibles cellulaires du bisacodyl/DDPM en utilisant la chromatographie d'affinité et la spectrométrie de masse est également en cours.

4.4. Modèle de macro-sphère de CSGs

Le maintien des neurosphères générées lors du test de clonalité dans des conditions de culture optimales jusqu'à 8 semaines après l'ensemencement nous a permis d'obtenir des sphères clonales de grande taille (diamètre environ 1 mm) aussi bien avec les cellules TG1 qu'avec les cellules OB1.

Ces sphères de grande taille représentent un modèle de CSGs *in vitro* très intéressant pour étudier la physiologie de CSGs et pour évaluer le potentiel thérapeutique des molécules.

4.4.1. Modèle 3D dans la recherche sur le cancer

L'utilisation du modèle organotypique en trois dimensions (3D) dans la recherche biomédicale a une longue histoire [251–255]. Ces modèles ont récemment attiré l'attention de nombreux chercheurs, surtout dans le domaine de la biologie régénérative [256–267] et la biologie du cancer [268–273].

4.4.1.1. Avantages des modèles 3D

Les tumeurs solides poussent dans un espace en trois dimensions. Dues à la vascularisation tumorale qui est souvent structurellement et fonctionnellement

anormale et à une limite de diffusion dans les tissus animaux, les différents éléments (oxygène, nutriments, facteurs de croissance, déchets métaboliques, etc.) sont distribués de manière hétérogène dans les tumeurs [34]. Cette hétérogénéité du microenvironnement est considérée actuellement comme une des caractéristiques les plus importantes des tumeurs solides [38]. Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de l'état physiologique des cellules tumorales et de leur réponse aux traitements [57, 274].

Dans le système de culture cellulaire en 2D, l'hétérogénéité du microenvironnement est absente car toutes les cellules sont exposées au milieu de culture de la même manière. En revanche, dans les cultures en 3D, certains aspects de l'hétérogénéité tumorale peuvent être observés, tels que la présence de cellules en prolifération et en quiescence, la présence d'un gradient du proton et d'oxygène [273].

D'ailleurs, l'interaction entre les cellules dans un espace tridimensionnel peut influer sur la structure cellulaire, l'adhésion, la mécanotransduction ainsi que la signalisation cellulaire en réponse à des facteurs solubles et donc le fonctionnement des cellules en général d'une manière qui diffère dramatiquement des cellules dans le système de culture en 2D [275].

Ainsi, les études sur les cellules dans les modèles en 3D peuvent générer des informations qui ne peuvent pas être observées sur les cellules cultivées en 2D.

4.4.1.2. Classification des modèles en 3D

A ce jour, de nombreux modèles en 3D des cellules tumorales ont été développés avec différentes techniques afin d'étudier les processus biologiques dans ces cellules en prenant en compte les caractéristiques d'architecture des tumeurs. Ces modèles en 3D peuvent être divisés en 4 grands groupes en fonction de leur origine et de leur méthode de préparation (**Figure 53**) [273].



Figure 53. Préparation des modèles en 3D. (A) Les sphéroïdes de tumeur multicellulaires sont obtenus par l'agrégation et le compactage de suspension des cellules cultivées dans les conditions non-adhérentes. (B) Les tumorosphères sont formées par la prolifération clonale des cellules dans le milieu de culture pour les cellules souches. (C) Les sphères dérivées du tissu tumoral sont générées par la dissociation partielle et le compactage du tissu tumoral. (D) Les sphéroïdes organotypiques multicellulaires sont obtenus à partir du tissu tumoral qui est coupé puis arrondi dans les conditions de culture non-adhérentes. Figure adaptée de Weiswald et al. [273].

4.4.1.2.1. Sphéroïdes de tumeur multicellulaires

Les sphéroïdes de tumeur multicellulaires sont obtenus par l'agrégation et le compactage d'une suspension des cellules issues d'une lignée de cellules cancéreuses. L'agrégation et le compactage des cellules peuvent être réalisés par plusieurs méthodes, telles que l'utilisation d'un système de culture en rotation,

l'utilisation des plaques de culture à très faible adhérence (ultra-low attachment plate), la méthode de la goutte pendante (hanging-drop) où un petit volume de suspension cellulaire (environ 30 μ L) est déposée sur un support qui est ensuite inversé pour former une goutte en suspension.

Ce modèle est le modèle le plus couramment utilisé et le plus caractérisé jusqu'à présent pour la recherche en cancérologie. Dans les sphéroïdes avec un diamètre supérieur à 500 µm, on peut observer une zone nécrotique au centre et une couche de cellules en prolifération à la périphérie du sphéroïde, ainsi qu'une couche intermédiaire constituée de cellules en quiescence [273]. Cette hétérogénéité cellulaire est liée à une distribution hétérogène des éléments tels que l'oxygène, les nutriments et les déchets métaboliques à travers le sphéroïde. La croissance des sphéroïdes est caractérisée par une phase exponentielle au début suivie par une phase de croissance ralentie.

En fonction du type de cellule utilisé et du système de culture, les sphéroïdes de tumeur multicellulaires peuvent être obtenus en 1 à 7 jours.

4.4.1.2.2. Tumorosphères

Les tumorosphères sont formées par la prolifération clonale des cellules tumorales dans la condition de culture des cellules souches. Les cellules sont ensemencées à densité clonale au début dans un milieu de culture sans sérum et avec les facteurs de croissance bien définis. Par une prolifération clonale, ces cellules engendrent des tumorosphères. Due à sa nature clonale, la formation des tumorosphères est plus lente que d'autres modèles 3D. Plusieurs semaines voire des mois sont nécessaires pour la génération des tumorosphères.

La méthode pour l'obtention des tumorosphères a été initialement développée pour l'isolement et l'expansion des cellules souches neurales et des cellules souches cancéreuses de glioblastome. Nos sphères de CSGs font donc partie de ce groupe.

Par rapport aux sphéroïdes de tumeur multicellulaires, le modèle de tumorosphère reste moins caractérisé car la méthode a été développée pour étudier les propriétés des cellules souches cancéreuses plutôt que pour mimer les conditions en 3D dans les tissus tumoraux. Le degré auquel ces tumorosphères peuvent récapituler la structure et le microenvironnement des tumeurs *in vivo* reste

peu connu [273].

4.4.1.2.3. Sphères dérivées du tissu tumoral

Contrairement aux sphéroïdes de tumeur multicellulaires qui sont obtenus à partir d'une suspension de culture cellulaire, les sphères dérivées du tissu tumoral sont obtenues à partir des tissus tumoraux qui sont dissociés mécaniquement ou/et par digestion enzymatique. Les tissus tumoraux partiellement dissociés sont ensuite mis en culture et les sphères sont formées par le compactage et le remodelage des cellules tumorales.

Une propriété majeure de ce modèle est sa capacité de mimer la tumeur parentale sur le plan histologique et au niveau de l'expression des gènes. D'ailleurs, la fraction des cellules en prolifération dans ces sphères est plus proche de celle observée *in vivo* dans les tumeurs, contrairement aux sphéroïdes de tumeur multicellulaires qui montrent une capacité de prolifération extensive, probablement due à une sélection lors de la culture cellulaire *in vitro* [273].

4.4.1.2.4. Sphéroïdes organotypiques multicellulaires

Le modèle de sphéroïde organotypique multicellulaire est très proche du modèle d'explant qui consiste à cultiver les fragments de tumeur *ex vivo* sans dissociation, contrairement au modèle de sphère dérivée du tissu tumoral.

Pour générer ces sphéroïdes, le fragment de tumeur est coupé en petits morceaux de 0,3 à 0,8 mm, puis incubé dans une flasque recouvert par 0,75% d'agar avec le milieu de culture. Après 1 à 2 semaines, les fragments de tissu vont s'arrondir et former des sphéroïdes organotypiques multicellulaires.

Même si ce modèle reste relativement peu caractérisé, il est bien reconnu que ces sphéroïdes récapitulent l'hétérogénéité originale de tumeur en gardant les constituants du stroma tumoral. La fraction des cellules en prolifération dans les sphéroïdes est proche aussi de celle *in vivo* dans les tumeurs. En plus, le profil de l'expression des gènes de ce modèle est stable et plus représentatif de la tumeur parentale que la culture primaire à court terme.

4.4.2. Caractérisation des macro-sphères de CSGs TG1 et OB1

4.4.2.1. Cinétique de croissance et hétérogénéité des sphères

Pour obtenir des sphères clonales de grande taille (diamètre d'environ 1mm) à partir d'une seule cellule TG1/OB1, les cellules ont été laissées dans des conditions de culture optimales pendant 8 semaines. Nous avons montré (**Figure 37**) que pendant les 4 premières semaines, le nombre de cellules dans la sphère augmente de manière exponentielle. Puis, après 4 semaines, la croissance ralentit avec apparition d'une zone nécrotique au centre de la sphère dont la taille augmente avec la taille des sphères.

Ces observations suggèrent que la prolifération des cellules dans la sphère n'est pas limitée au début lors de la croissance de la sphère parce que toutes les cellules ont suffisamment de ressources pour la prolifération et l'évacuation des déchets métaboliques produits par les cellules est efficace. Cependant, lorsque les sphères atteignent une certaine taille (diamètre de 400-500 µm), les cellules dans la partie extérieure de la sphère peuvent continuer à proliférer alors que les cellules au centre de la sphère arrêtent leur division car les ressources deviennent limitantes pour leur prolifération, en raison de la barrière physique constituée par les cellules dans la partie extérieure de la sphère et d'oxygène, combinée à une accumulation des déchets métaboliques, induisent l'arrêt de la croissance des cellules et progressivement leur mort.

Avec les différentes méthodes de caractérisation, nous avons pu montrer une hétérogénéité du microenvironnement ainsi qu'une hétérogénéité cellulaire dans les macro-sphères. Comme indiqué dans le **Figure 42** et **Figure 54** ci-dessous, la sphère peut être subdivisée en trois zones différentes : une couche périphérique normoxique constituée de cellules en prolifération; une couche intermédiaire hypoxique constituée de cellules en quiescence qui sur-exprime les transporteurs de glucose (GLUT-1 et GLUT-3); une zone centrale nécrotique.



Figure 54. Comparaison de sphère de CSG à la tumeur de glioblastome. (A) Coupe de sphère TG1 avec la coloration Hématoxyline & Eosine. Echelle : 200 μm. (B) Coupe d'une tumeur de glioblastome avec la coloration Hématoxyline & Eosine. Une zone nécrotique (N) entourée par la structure en pseudo-palissade (P). Image B de Brat et al. [139].

Il est intéressant de comparer la structure des sphères à celles des tumeurs solides. Ainsi la présence de zones nécrotiques liée à l'ischémie résultant d'un déséquilibre entre prolifération cellulaire et néovasculatisation est une caractéristique de tumeurs très agressives [276–279]. De même, une des caractéristiques histologiques des tumeurs de glioblastome est la présence de zones nécrotiques entourées par de structures en pseudo-palissade (**Figure 54** B). Différentes études ont montré que la mort des cellules dans les zones nécrotiques est due à une hypoxie sévère. La structure en pseudo-palissade est considérée comme une couche des cellules en train de migrer à l'extérieur vers les vaisseaux sanguins fonctionnels [139, 140, 280]. Ainsi l'hétérogénéité de microenvironnement observée dans nos sphères mime celle retrouvée au sein des tumeurs dans lesquelles la vascularisation est insuffisante pour assurer l'apport d'oxygène et de nutriments et évacuer les déchets métaboliques.

L'observation que les transporteurs de glucose GLUT-1 et GLUT-3 soient préférentiellement exprimés dans les cellules à l'intérieur de la sphère est également à signaler. En fait, pour supporter leur croissance, les cellules tumorales consomment une grande quantité de glucose pour maintenir un flux glycolytique élevé, un phénomène appelé « effet Warburg ». Cette caractéristique est exploitée en clinique pour le diagnostic et la surveillance métabolique de tumeur par tomographie à émission de positons (TEP) avec le [¹⁸F] désoxyglucose. Le glucose entre dans les cellules par la diffusion facilitée à l'aide des transporteurs de glucose (GLUTs) qui sont surexprimés par les cellules cancéreuses. Le génome humain code 12 transporteurs GLUT. Les mieux étudiés sont les transporteurs GLUT 1 – 4.

GLUT-1 a une distribution relativement large et il est responsable d'un niveau basal de transport de glucose dans la plupart des cellules où son niveau d'expression est inversement proportionnel à la concentration en glucose. GLUT-3 est plus spécifiquement exprimé dans les neurones et le placenta. Il présente une haute affinité pour le glucose garantissant l'approvisionnement du cerveau avec son substrat énergétique favori. Dans une étude récente, il a été montré que le GLUT-3 est surexprimé par les CGSs dans les tumeurs de glioblastome. Cette surexpression confère aux CSGs un avantage de survie dans les conditions de stress. L'expression du GLUT-3 est aussi associée à un mauvais pronostic des patients atteints de glioblastome [281].

L'observation que ces deux transporteurs soient surexprimés dans les cellules à l'intérieur de la sphère est en accord avec l'environnement austère auquel elles sont confrontées avec des apports en glucose et en oxygène limités. Leur présence traduit l'adaptation des CSGs aux conditions environnementales et leur plasticité.

L'hétérogénéité microenvironnementale et cellulaire que nous avons montrée dans les macro-sphères est similaire à celle qui est observée dans le modèle de sphéroïde de tumeur multicellulaire (4.4.1.2.1.). Néanmoins, cette hétérogénéité n'a jamais été décrite dans le modèle de tumorosphère constituée de cellule souche cancéreuse. A notre connaissance, notre modèle représente le premier modèle de sphère de grande taille formée avec les cellules souches cancéreuse qui récapitule les caractéristiques d'hétérogénéité des tumeurs *in vivo*.

4.4.3. Action du bisacodyl/DDPM sur les macro-sphères de CSGs

Comme les macro-sphères de CSGs récapitulent l'hétérogénéité microenvironnementale et cellulaire de tumeurs, elles représentent un modèle intéressant pour tester notre molécule.

Sur les cellules TG1 et OB1 dissociées dans la condition de culture classique, nous avons pu montrer que le bisacodyl/DDPM exerce une activité cytotoxique sur les cellules lorsqu'elles se trouvent dans des conditions légèrement acides ou dans un état de quiescence.

Le DDPM est également actif sur les macrosphères clonales formées avec les cellules TG1 et OB1, dans des conditions où le milieu de culture dans lequel

baignent les sphères est du milieu NS34 frais, sans acidification. L'examen de coupes de sphères traitées au DDPM (**Figure 44**) suggère que l'effet de la molécule s'exerce à partir de l'intérieur de la sphère.

Nous avons montré par immuno-marquage avec l'anticorps anti-Ki67 que les cellules à l'intérieur de la sphère sont dans un état de quiescence. Il est intéressant de comparer l'état de quiescence dans la culture classique et l'état de quiescence dans les macrosphères. Les deux conditions de quiescence sont liées à une accumulation des déchets métaboliques et un manque des nutriments. Dans le premier cas, ceci est réalisé par le non-renouvellement du milieu de culture pendant 9 jours alors que dans le deuxième cas, il est dû à la barrière physique constituée de cellules à la périphérie de la sphère qui limite les échanges des éléments entre le milieu de culture et les cellules à l'intérieur.

Dans la condition de culture classique, l'état de quiescence est accompagné d'une acidification du milieu qui est essentielle pour l'activité cytotoxique du bisacodyl/DDPM. Dans les sphères de grande taille, nous pouvons aussi supposer qu'il existe un gradient de protons dans la sphère et que ce gradient pourrait renforcer l'action du DDPM.

L'équipe du Dr Swietach [206, 207] a montré l'existence d'un gradient de protons dans les sphéroïdes (diamètre de 400-500 μ m) formés de cellules de cancer du colon et de cellules de cancer du sein, en utilisant un fluorophore dont les spectres d'émission et d'absorption varient en fonction du pH. Nous avons appliqué le protocole décrit par le laboratoire du Dr Swietach à l'étude de nos macrosphères. Aucun résultat n'a pu être obtenu, en raison de la taille des sphères qui empêche la pénétration de la lumière laser. D'autres expériences basées sur la RMN font état d'une acidification intraspheroïdale avec, pour des sphères de 600 μ m, une baisse d'environ 0,6 unités de pH [282]. Cette acidification semble logique compte tenu du métabolisme des cellules cancéreuses qui favorisent la glycolyse au détriment de phosphorylation oxydante, y compris dans des conditions aérobies et du manque de drainage qui empêche l'évacuation des protons. Ces observations nous permettent d'admettre que le microenvironnement à l'intérieur de nos sphères est également acide.

Nous avons également montré que les macrosphères présentaient une zone hypoxique qui favorise la quiescence des cellules et l'acidification du pH.

En exploitant la capacité d'auto-renouvellement extensive de nos cellules, nous avons pu générer des macrosphères clonales de grande taille, un modèle original de CSGs qui récapitule l'hétérogénéité tumorale et notamment l'hétérogénéité du microenvironnement caractérisée par une distribution hétérogène de l'oxygène, des nutriments et des protons; l'hétérogénéité cellulaire (état de prolifération, expression des transporteurs de glucose). Ces caractéristiques miment remarquablement celles retrouvées au sein des tumeurs *in vivo*.

Le DDPM agit sur les cellules composant la sphère et notamment sur celles se trouvant à l'intérieur. Nous avons montré que l'intégrité de la structure était nécessaire à l'activité de la molécule, puisque l'altération de cette intégrité par simple dissociation mécanique rend les cellules de la sphère moins sensibles au traitement avec le DDPM. Cette activité sur les cellules se trouvant dans la zone nécrotique et hypoxique est d'autant plus remarquable que cette zone est difficile à cibler et de nombreuses molécules soient n'y accèdent pas, soit sont inactivées notamment à cause de l'acidité (cas des molécules basiques) [283]. Le DDPM remplit les propriétés recherchées pour de nouvelles molécules à activité anti-tumorale. Cette activité environnement-dépendante est d'autant plus intéressante qu'elle confère à la molécule une spécificité d'action cytotoxique dans le micronenvironnement particulier relativement caractéristique du microenvironnement intratumoral.

A notre connaissance, ce modèle de macrosphères clonales est le premier à avoir été caractérisée de manière aussi détaillée et à avoir été utilisé pour montrer l'activité sélective d'une molécule dont l'activité est dépendante du microenvironnement tumoral.

Le fait que ces macrosphères clonales constituent des modèles *in vitro* pertinents est renforcé par les résultats de l'activité *in vivo* du bisacodyl montrant un ralentissement significatif du développement tumoral et une augmentation conséquente de la survie des animaux xénogreffés traités par le bisacodyl seul.

Compte tenu du mode d'action du bisacodyl et de la localisation des cellules ciblées, il serait intéressant de réaliser de nouveaux tests *in vivo* sur des associations de bisacodyl et de molécules de chimiothérapies classiques. De même l'activité de la molécule devra être testée sur des CSGs isolées d'un nombre plus important de patients. A cette étude de l'activité *in vivo* se rajoute la recherche

de la (des) cible(s) du bisacodyl et une étude approfondie des mécanismes conduisant à la nécrose des cellules traitées.

4.5. Ciblage du microenvironnement tumoral

Les études sur le mode d'action du bisacodyl/DDPM en utilisant les cellules isolées et un modèle 3D nous ont dévoilé un profil original de la molécule. L'activité cytotoxique du bisacodyl/DDPM sur les CSGs est dépendante de plusieurs facteurs tels que la quiescence des cellules, l'acidité et l'hypoxie du microenvironnement, ce qui rend notre molécule très intéressante car il est devenu de plus en plus clair que tous ces facteurs intrinsèques et environnementaux des cellules tumorales peuvent influencer la réponse thérapeutique des tumeurs et doivent être pris en compte lors du développement des nouvelles molécules thérapeutiques.

4.5.1. Microenvironnement et plasticité des cellules tumorales

L'échec thérapeutique des glioblastomes et d'autres tumeurs solides est lié à l'hétérogénéité tumorale. Cette hétérogénéité pourrait être expliquée par la théorie de cellule souche cancéreuse (CSC) qui assimile la tumeur à une sorte d'organe avec les CSCs au sommet d'une hiérarchie cellulaire et d'autres cellules tumorales plus différenciées avec une capacité de prolifération limitée. Les CSCs sont considérées comme responsables du maintien des tumeurs et de leur résistance aux traitements. Malgré les débats concernant la théorie des CSCs dès sa proposition au début du 21^e siècle, la présence des cellules tumorales qui sont plus immatures et possèdent des propriétés de cellules souches dans les tumeurs est admise, y compris dans les tumeurs de glioblastome. Néanmoins, en prenant en compte la plasticité des cellules tumorales et l'évolution dynamique des tumeurs, il est bien reconnu que la notion de cellule souche cancéreuse est une description de l'identité cellulaire.

L'hétérogénéité tumorale peut être également reflétée au niveau du microenvironnement tumoral. En raison d'une vascularisation tumorale chaotique et d'une diffusion limitée, la distribution des nutriments, oxygène, facteurs de croissance, déchets métaboliques, et autres éléments est hétérogène dans la

tumeur. Cette hétérogénéité au niveau du microenvironnement est en évolution constante lors du développement des tumeurs. L'hypoxie et l'acidité sont parmi les caractéristiques du microenvironnement tumoral les plus importants et les plus étudiées jusqu'à présent.

Il faut noter que ces deux aspects de l'hétérogénéité tumorale, l'état des cellules et le microenvironnement, sont inséparables. Leur interaction est souvent bidirectionnelle. D'un côté, l'état des cellules tumorales peut moduler le microenvironnement. Par exemple, la croissance rapide des tumeurs peut créer un environnement hypoxique et acide. De l'autre côté, la variation du microenvironnement tumoral peut aussi influer sur le phénotype des cellules tumorales. Il est bien connu que le stress hypoxique et le stress acide peuvent induire une reprogrammation des cellules tumorales vers un phénotype des CSCs. Ceci pourrait expliquer l'association qui est souvent observée entre l'hypoxie et l'état souche des cellules dans les tumeurs de glioblastome et d'autres tumeurs solides. L'hypoxie tumorale peut aussi jouer un rôle dans la régulation de la quiescence des cellules.

La plasticité des cellules tumorales, la variation dynamique du microenvironnement ainsi que leur interaction réciproque, reflètent la nature évolutive du développement des tumeurs et sont à l'origine de l'hétérogénéité tumorale.

4.5.2. Stratégies thérapeutiques ciblant le microenvironnement tumoral

Jusqu'à très récemment, la recherche et le développement des médicaments anti-cancéreux se sont focalisés uniquement sur les cellules tumorales, avec le développement des agents de chimiothérapie classiques visant généralement la prolifération des cellules cancéreuses, puis des agents plus ciblés agissant sur des protéines caractéristiques de la tumeur ou sur la néovascularisation tumorale. Cependant, en raison d'une amélioration très limitée du pronostic et à une accumulation de notre connaissance sur le rôle du microenvironnement dans l'évolution et la réponse thérapeutique des tumeurs, beaucoup d'attention a été portée actuellement sur les stratégies ciblant le microenvironnement tumoral. Les différentes stratégies qui ciblent directement le microenvironnement tumoral ou exploitent les caractéristiques du microenvironnement sont maintenant en cours de développement et ont commencé à montrer des résultats prometteurs.

L'hypoxie tumorale est une des caractéristiques du microenvironnement tumoral les plus ciblées directement ou exploitées à des fins thérapeutiques. Des petites molécules perturbant la fonction du facteur transcription HIF-1 qui reprogramme les cellules tumorales pour leur permettre de s'adapter à la condition hypoxique, ont montré des effets antiprolifératifs et antiangiogéniques dans des études précliniques [284–287]. L'autre stratégie exploitant l'hypoxie tumorale consiste à développer des pro-drogues qui peuvent être activés dans la condition hypoxique pour avoir une meilleure spécificité du traitement [288–290]. La molécule TH-302, un pro-drogue qui est transformée en l'agent alkylant moutarde bromo-isophosphoramide (Br-IPM) en condition hypoxique, a montré des résultats encourageants chez les patients atteints de cancer du pancréas en essai clinique [291].

Des stratégies thérapeutiques ciblant l'acidité tumorale ont été aussi développées. La première stratégie consiste à inhiber les différentes protéines impliquées dans le maintien du pH intracellulaire, qui est crucial pour la survie des cellules tumorales dans un environnement acide, en utilisant des petites molécules inhibitrices ou des anticorps. Parmi les protéines ciblées, on peut trouver notamment les NHEs (Na⁺/H⁺ exchangers), MCTs (monocarboxylate transporters), CAs (anhydrase carbonique), NBCs (Na⁺/HCO⁻ co-transporters), V-ATPase [184, 185, 292]. L'acidité tumorale est aussi exploitée dans le développement des nanoparticules qui libèrent les agents cytotoxiques dans les conditions acides afin d'obtenir une meilleure distribution des molécules dans le tissu tumoral [293–295].

Contrairement aux stratégies thérapeutiques ci-dessus qui ont des cibles cellulaires bien définies, le mécanisme d'action exact du bisacodyl/DDPM n'est pas encore connu pour l'instant. Pourtant, son mode d'action original (dépendance de l'acidité, l'hypoxie et la quiescence) permet de cibler les CSGs de manière plus efficace et plus spécifique, en prenant en compte l'état physiologique de ces cellules *in vivo* ainsi que les propriétés physico-chimiques de leur microenvironnement.

5. Conclusions et Perspectives sur le bisacodyl / DDPM comme agent antitumoral potentiel

5. Conclusions et perspectives sur le bisacodyl / DDPM comme agent antitumoral potentiel

Le glioblastome est une des tumeurs les plus malignes chez l'homme. Malgré une accumulation remarquable de connaissances sur la physiopathologie de ces tumeurs au cours de la dernière décennie, le pronostic du glioblastome ne s'est pas amélioré depuis l'ajout du témozolomide dans le traitement standard (protocole de Stupp) en 2005. Le glioblastome reste actuellement incurable, avec une médiane de survie d'environ 14 mois et un taux de survie à 5 ans à 5%. Il existe donc un vrai besoin médical pour traiter le glioblastome.

L'identification des cellules souches cancéreuses de glioblastome (CSGs) a transformé notre vision globale sur le glioblastome en révélant une hiérarchie cellulaire au sein de cette tumeur, avec les CSGs au sommet de cette hiérarchie et d'autres cellules tumorales plus différenciées ayant une capacité de prolifération limitée. Les CSGs sont considérées comme les cellules entretenant la tumeur et responsables de leur résistance aux traitements. La découverte des CSGs a conduit à un changement de paradigme dans le développement des thérapies avec la nécessité de cibler dans le traitement non seulement les cellules de la masse tumorale, mais aussi les CSGs.

L'état quiescent des CSGs joue un rôle essentiel dans leur résistance aux traitements. Pourtant, cet état de quiescence reste relativement peu exploité jusqu'à présent sur le plan thérapeutique. C'est pour cette raison qu'un criblage différentiel de la chimiothèque Prestwick a été réalisé dans notre laboratoire sur les CSGs en prolifération et en quiescence, afin de trouver des petites molécules avec une activité spécifique sur les CSGs en quiescence.

Le bisacodyl, agent laxatif d'action locale, a été identifié comme la seule molécule dans la chimiothèque Prestwick qui montre une activité cytotoxique spécifique sur les CSGs en quiescence. La molécule est inactive sur les CSGs en prolifération et les cellules saines. Dans notre condition expérimentale, le bisacodyl est transformé rapidement en son métabolite actif DDPM, qui a le même profil que le bisacodyl sur les cellules testées. Nous avons ensuite montré que l'action spécifique du bisacodyl/DDPM sur les CSGs en quiescence était due à la dépendance de son activité de deux facteurs, l'acidité (pH 6,0 – 6,6) et l'état de quiescence des cellules.

Nous avons également établi un modèle 3D des CSGs, les macro-sphères clonales. Ce modèle récapitule de manière remarquable des caractéristiques de l'hétérogénéité des tumeurs *in vivo*, au niveau cellulaire ainsi qu'au niveau microenvironnemental. Le DDPM agit sur les cellules constituant la sphère et plus particulièrement sur celles à l'intérieur qui sont quiescentes et dans un environnement hypoxique.

Le mode d'action original du bisacodyl/DDPM, dévoilé par des tests sur les CSGs dans les conditions de culture classique et sur le modèle 3D, rend cette molécule très intéressante comme un agent thérapeutique potentiel pour des raisons suivantes :

- Les CSGs sont situées au sein des tumeurs dans les niches spécifiques qui sont hypoxiques. Le stress hypoxique et le stress acide peuvent reprogrammer les cellules tumorales vers un phénotype des CSGs.
- 2) La molécule reste active sur les CSGs en quiescence, qui sont résistantes aux agents de chimiothérapie classiques antiprolifératives.
- 3) Les cellules tumorales dans la zone nécrotique et hypoxique sont normalement difficiles à cibler car de nombreuses molécules n'y accèdent pas ou elles sont inactivées notamment à cause de l'acidité (cas des molécules basiques).
- 4) L'activité environnement-dépendante confère au bisacodyl une spécificité d'action cytotoxique dans le microenvironnement tumoral.
- 5) La molécule a un bon profil de pharmacocinétique et elle peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Elle ralentit le développement des tumeurs dans un modèle animal orthotopique et prolonge la survie des animaux traités.

Compte tenu du mode d'action du bisacodyl/DDPM et de la localisation des cellules ciblées par la molécule, il semble important de tester *in vivo* la combinaison de notre molécule avec les agents de chimiothérapie classiques.

De plus, vu la nature hétérogène des tumeurs de glioblastome, l'activité de la molécule devra être testée sur des CSGs isolées d'un nombre plus important de patients.

De même, une meilleure compréhension du mécanisme d'action, ainsi que l'identification de la (des) cible(s) cellulaire(s) de la molécule seront également essentielles pour valoriser la molécule comme potentiel agent antitumoral et définir le cadre de son utilisation.

Etant donné que la molécule ne sera pas administrée *per os* en raison de sa faible absorption intestinale (de l'ordre de 5 - 10%), il sera nécessaire de refaire des études de toxicité et évaluer l'effet laxatif de la molécule après changement de la voie d'administration.

La compréhension du mode d'action de la molécule et la mise en évidence de sa cible permettent aussi d'envisager la synthèse de nouvelles molécules ne présentant pas l'activité laxative.

L'ensemble de notre étude a révélé une molécule douée d'une activité tout à fait originale, ciblant le cœur hypoxique et acide des tumeurs de glioblastome et peut-être des tumeurs solides de manière plus générale. Les résultats constituent une preuve de concept dans le domaine du développement de nouvelles stratégies antitumorales.

6. Etude bio-guidée et isolement d'une molécule active sur le CSGs à partir d'Albizia lebbeck

6. Etude bio-guidée et isolement d'une molécule active sur le CSGs à partir d'*Albizia lebbeck*

Avec l'objectif d'identifier d'autres molécules actives sur les CSGs, nous avons collaboré avec l'équipe de Pharmacognosie de l'UMR7200 et plus particulièrement avec des membres de l'équipe travaillant sur l'identification de substances actives extraites de plantes camerounaises de la famille des Légumineuses/Mimosacées. Les plantes de cette famille sont en effet connues pour leur valeur médicinale [296] et plusieurs molécules avec des activités antiprolifératives *in vitro* et *in vivo* ont été isolées [297] dont les avicines D et G isolées de *Acacia victoriae* un arbre du désert australien [298–300].

Les avicines sont des saponines triterpéniques avec un cœur aglycone composé d'acide acacique. Elles présentent une activité pro-apoptotique et antiinflammatoire sur une grande variété de types cellulaires [298, 300, 301]. L'équipe de Pharmacognosie a comparé les profils chimiques de différentes Mimosacées africaines (genres Acacia et Albizia) et sélectionné celles capables de biosynthétiser des analogues des avicines. Nous avons travaillé avec le Pr Annelise Lobstein (UMR 7200) et le Dr Olivier Noté (Université de Yaoundé, Cameroun) sur la purification bioguidée de molécules extraites d'Albizia lebbeck et Albizia boromoensis Aubre' v. & Pellegr, actives sur les CSGs. Albizia boromoensis est un arbre poussant au Cameroun, Soudan, Sénégal sans usage ethnobotanique connue. Albizia lebbeck (L.) Benth (Figure 55) est une espèce pantropicale originaire de l'Asie du Sud et actuellement présente dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales. La plante, essentiellement l'écorce du tronc et les feuilles, est utilisée en médecine traditionnelle entre autre comme astrigent, tonique, antiinflammatoire, antidiarrhéique, antitumoral dans le cas de tumeurs abdominales [302, 303].



Figure 55. *Albizzia lebbeck (L.) Benth.* Image de Medicinal Plants Database of Bangladesh (www.mpbd.info).

L'étude menée au laboratoire a porté sur la recherche de dérivés dans les racines des deux espèces *Albizia lebbeck et A. boromoensis*.

Parallèlement à mon travail sur le bisacodyl, j'ai effectué les tests sur les produits de fractionnement des extraits de racines de ces plantes. Les tests ont été principalement réalisés sur les CSGs TG1 et sur la lignée U87 MG de cellules de glioblastomes. Aucune molécule active n'a été trouvée pour *Albizia boromoensis*. Par contre, deux glycosides dérivés de l'acide acacique ont été identifiés et purifiés à partir des racines d'*Albizia lebbeck*. *C*es composés, dont les structures sont présentés dans la **Figure 56** furent nommés lebbeckosides.



Figure 56. Structure des lebbeckosides.

Les lebbeckosides A et B présentent une cytotoxicité vis-à-vis des cellules U87 MG avec une EC50 de 3,5 μ M et 2,1 μ M, respectivement et vis-à-vis des CSGs TG1 de 1,36 μ M et 2,24 μ M, respectivement.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de deux publications [304, 305] présentées dans 8.1.2 Annexe I.2 p 252 et 8.1.3 Annexe I.3 p 261.

Il serait à présent intéressant de tester ces molécules sur d'autres types de cellules cancéreuses et non cancéreuses afin d'évaluer leur spécificité d'action. De même le mécanisme par lequel elles induisent la mort cellulaire devra être déterminé. Il pourra être comparé aux mécanismes d'action rapportés dans la littérature pour les avicines D et G (activité pro-apototique, antiinflammatoire et antioxydante) [298–301].
7. Bibliographie

1. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J: **CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011.** *Neuro Oncol* 2014, **16 Suppl 4**:iv1–iv63.

2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P: **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.** *Acta Neuropathol* 2007, **114**:97–109.

3. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, et al.: Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010, **17**:98–110.

4. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang D-A, Jones DTW, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu X-Y, Fontebasso AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, von Komorowski G, et al.: Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 2012, **22**:425–37.

5. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov I V, Sarkar G, Caron AA, Kollmeyer TM, Praska CE, Chada AR, Halder C, Hansen HM, McCoy LS, Bracci PM, Marshall R, Zheng S, Reis GF, Pico AR, O'Neill BP, Buckner JC, Giannini C, Huse JT, Perry A, Tihan T, Berger MS, et al.: **Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors.** *N Engl J Med* 2015, **372**:2499–508.

6. Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, Cooper LAD, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, Morozova O, Robertson AG, Noushmehr H, Laird PW, Cherniack AD, Akbani R, Huse JT, Ciriello G, Poisson LM, Barnholtz-Sloan JS, Berger MS, Brennan C, Colen RR, Colman H, Flanders AE, Giannini C, Grifford M, Iavarone A, Jain R, Joseph I, Kim J, et al.: **Comprehensive, Integrative Genomic**

Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. N Engl J Med 2015, 372:2481–98.

7. Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L, Bauchet F, Fabbro M, Campello C, Capelle L, Durand A, Trétarre B, Frappaz D, Henin D, Menei P, Honnorat J, Segnarbieux F: **French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases.** *J Neurooncol* 2007, **84**:189–99.

8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO: **Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.** *N Engl J Med* 2005, **352**:987–96.

9. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P: **Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study.** *Cancer Res* 2004, **64**:6892–9.

10. Ohgaki H, Kleihues P: **Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, **64**:479–89.

11. Ohgaki H, Kleihues P: Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007, **170**:1445–53.

12. Hottinger AF, Khakoo Y: **Update on the management of familial central nervous system tumor syndromes.** *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007, **7**:200–7.

13. Gu J, Liu Y, Kyritsis AP, Bondy ML: **Molecular epidemiology of primary brain tumors.** *Neurotherapeutics* 2009, **6**:427–35.

14. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, Simon M, Marie Y, Boisselier B, Delattre J-Y, Hoang-Xuan K, El Hallani S, Idbaih A, Zelenika D, Andersson U, Henriksson R, Bergenheim AT, Feychting M, Lönn S, Ahlbom A, Schramm J, Linnebank M, Hemminki K, Kumar R, Hepworth SJ, Price A, Armstrong G, Liu Y, Gu X, Yu R, et al.: **Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma.** *Nat Genet* 2009, **41**:899–904.

15. Rajaraman P, Melin BS, Wang Z, McKean-Cowdin R, Michaud DS, Wang SS, Bondy M, Houlston R, Jenkins RB, Wrensch M, Yeager M, Ahlbom A, Albanes D, Andersson U, Freeman LEB, Buring JE, Butler MA, Braganza M, Carreon T,

Feychting M, Fleming SJ, Gapstur SM, Gaziano JM, Giles GG, Hallmans G, Henriksson R, Hoffman-Bolton J, Inskip PD, Johansen C, Kitahara CM, et al.: **Genome-wide association study of glioma and meta-analysis.** *Hum Genet* 2012, **131**:1877–88.

16. Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D: **Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis.** *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**:1544–50.

17. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy BJ, Rajaraman P, Schwartzbaum J a., Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels JL, Wrensch M, Buffler P a.: **Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium**. *Cancer* 2008, **113**:1953–1968.

18. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R: **MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.** *N Engl J Med* 2005, **352**:997–1003.

19. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, Armstrong TS, Wefel JS, Won M, Blumenthal DT, Mahajan A, Schultz CJ, Erridge S, Baumert B, Hopkins KI, Tzuk-Shina T, Brown PD, Chakravarti A, Curran WJ, Mehta MP: **Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial.** *J Clin Oncol* 2013, **31**:4085–91.

20. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen J, Ram Z: **A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma.** *Neuro Oncol* 2003, **5**:79–88.

21. Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E: **Gliadel wafer in initial** surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)* 2006, **148**:269–75; discussion 275.

22. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WKA, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T: **Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:4733–40.

23. Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I, Garren N, Mackey M, Butman JA, Camphausen K, Park J, Albert PS, Fine HA: **Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor**

progression in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol 2009, 27:740-5.

24. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ, Mehta MP: **A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma.** *N Engl J Med* 2014, **370**:699–708.

25. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes AA, Hilton M, Abrey L, Cloughesy T: Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014, **370**:709–22.

26. Taal W, Oosterkamp HM, Walenkamp AME, Dubbink HJ, Beerepoot L V, Hanse MCJ, Buter J, Honkoop AH, Boerman D, de Vos FYF, Dinjens WNM, Enting RH, Taphoorn MJB, van den Berkmortel FWPJ, Jansen RLH, Brandsma D, Bromberg JEC, van Heuvel I, Vernhout RM, van der Holt B, van den Bent MJ: **Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial.** *Lancet Oncol* **2014, 15**:943–53.

27. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008, **455**:1061–8.

28. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhim R, Bernard B, Wu C-J, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, et al.: **The somatic genomic landscape of glioblastoma.** *Cell* 2013, **155**:462–77.

29. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RGW, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K: **Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma.** *Cancer Cell* 2010, **17**:510–22.

30. Omuro AMP, Faivre S, Raymond E: Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther* 2007, **6**:1909–19.

31. Thomas AA, Brennan CW, DeAngelis LM, Omuro AM: **Emerging therapies** for glioblastoma. *JAMA Neurol* 2014, **71**:1437–44.

32. Lang FF, Bruner JM, Fuller GN, Aldape K, Prados MD, Chang S, Berger MS, McDermott MW, Kunwar SM, Junck LR, Chandler W, Zwiebel JA, Kaplan RS, Yung WKA: **Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results.** *J Clin Oncol* 2003, **21**:2508–18.

33. Yuan Y, Liao Y-M, Hsueh C-T, Mirshahidi HR: **Novel targeted therapeutics:** inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *J Hematol Oncol* 2011, **4**:16.

34. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT: **Angiogenesis in brain tumours.** *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**:610–22.

35. Soffietti R, Trevisan E, Bertero L, Cassoni P, Morra I, Fabrini MG, Pasqualetti F, Lolli I, Castiglione A, Ciccone G, Rudà R: **Bevacizumab and fotemustine for recurrent glioblastoma: a phase II study of AINO (Italian Association of Neuro-Oncology).** *J Neurooncol* 2014, **116**:533–41.

36. Galanis E, Anderson SK, Lafky JM, Uhm JH, Giannini C, Kumar SK, Kimlinger TK, Northfelt DW, Flynn PJ, Jaeckle KA, Kaufmann TJ, Buckner JC: **Phase II study of bevacizumab in combination with sorafenib in recurrent glioblastoma (N0776): a north central cancer treatment group trial.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**:4816–23.

37. Batchelor TT, Gerstner ER, Emblem KE, Duda DG, Kalpathy-Cramer J, Snuderl M, Ancukiewicz M, Polaskova P, Pinho MC, Jennings D, Plotkin SR, Chi AS, Eichler AF, Dietrich J, Hochberg FH, Lu-Emerson C, lafrate AJ, Ivy SP, Rosen BR, Loeffler JS, Wen PY, Sorensen AG, Jain RK: **Improved tumor oxygenation and survival in glioblastoma patients who show increased blood perfusion after cediranib and chemoradiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:19059–64.

38. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, **144**:646–74.

39. Jacobs JFM, Idema AJ, Bol KF, Nierkens S, Grauer OM, Wesseling P, Grotenhuis JA, Hoogerbrugge PM, de Vries IJM, Adema GJ: **Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors.** *Neuro Oncol* 2009, **11**:394–402.

40. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh

AJM, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ: **Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.** *N Engl J Med* 2010, **363**:711–23.

41. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon R-A, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, Agunwamba BU, Zhang X, Lowy I, Inzunza HD, Feely W, Horak CE, Hong Q, Korman AJ, Wigginton JM, Gupta A, Sznol M: **Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma.** *N Engl J Med* 2013, **369**:122–33.

42. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, Leming PD, Lipson EJ, Puzanov I, Smith DC, Taube JM, Wigginton JM, Kollia GD, Gupta A, Pardoll DM, Sosman JA, Hodi FS: Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *J Clin Oncol* 2014, **32**:1020–1030.

43. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbé C, Charles J, Mihalcioiu C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA: **Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation**. *N Engl J Med* 2015, **372**:141116004513004.

44. Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, Gilbert MR, Herndon JE, McLendon RE, Mitchell DA, Reardon DA, Sawaya R, Schmittling RJ, Shi W, Vredenburgh JJ, Bigner DD: **Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:4722–9.

45. Thomas AA, Fisher JL, Ernstoff MS, Fadul CE: Vaccine-based immunotherapy for glioblastoma. *CNS Oncol* 2013, **2**:331–49.

46. Fadul CE, Fisher JL, Hampton TH, Lallana EC, Li Z, Gui J, Szczepiorkowski ZM, Tosteson TD, Rhodes CH, Wishart HA, Lewis LD, Ernstoff MS: Immune response in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy. *J Immunother* 2011, **34**:382–9.

47. Ardon H, Van Gool SW, Verschuere T, Maes W, Fieuws S, Sciot R, Wilms G, Demaerel P, Goffin J, Van Calenbergh F, Menten J, Clement P, Debiec-Rychter M, De Vleeschouwer S: Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the standard of care treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma: results of the HGG-2006 phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother* 2012, 61:2033–44.

48. Mitchell DA, Batich KA, Gunn MD, Huang M-N, Sanchez-Perez L, Nair SK, Congdon KL, Reap EA, Archer GE, Desjardins A, Friedman AH, Friedman HS, Herndon II JE, Coan A, McLendon RE, Reardon DA, Vredenburgh JJ, Bigner DD, Sampson JH: **Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients**. *Nature* 2015, **519**:366–9.

49. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA: Brain tumour stem cells. Nat Rev Cancer 2006, 6:425–36.

50. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**:57–70.

51. Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976, **194**:23–8.

52. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM: Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006, **66**:9339–44.

53. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, VandenBerg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS: **A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma.** *Cancer Cell* 2010, **17**:362–75.

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

55. Meyer M, Reimand J, Lan X, Head R, Zhu X, Kushida M, Bayani J, Pressey JC, Lionel AC, Clarke ID, Cusimano M, Squire JA, Scherer SW, Bernstein M, Woodin MA, Bader GD, Dirks PB: **Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity.** *Proc Natl Acad Sci U*

S A 2015, **112**:851–6.

56. Chen J, McKay RM, Parada LF: Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* 2012, **149**:36–47.

57. Kreso A, Dick JE: **Evolution of the cancer stem cell model.** *Cell Stem Cell* 2014, **14**:275–91.

58. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S: Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110:4009–14.

59. Soeda A, Hara A, Kunisada T, Yoshimura S, Iwama T, Park DM: **The** evidence of glioblastoma heterogeneity. *Sci Rep* 2015, **5**:7979.

60. PIERCE GB, DIXON FJ, VERNEY EL: Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. *Lab Invest* 1960, **9**:583–602.

61. Baylin SB, Weisburger WR, Eggleston JC, Mendelsohn G, Beaven MA, Abeloff MD, Ettinger DS: Variable content of histaminase, L-dopa decarboxylase and calcitonin in small-cell carcinoma of the lung. Biologic and clinical implications. *N Engl J Med* 1978, **299**:105–10.

62. Bennett DC, Peachey LA, Durbin H, Rudland PS: **A possible mammary** stem cell line. *Cell* 1978, **15**:283–98.

63. Hager JC, Fligiel S, Stanley W, Richardson AM, Heppner GH: Characterization of a variant-producing tumor cell line from a heterogeneous strain BALB/cfC3H mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1981, **41**:1293–300.

64. Bonnet D, Dick JE: **Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.** *Nat Med* 1997, **3**:730–7.

65. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:3983–8.

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

67. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE: **Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:973–8.

68. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007, 1:313–23.

69. Li C, Lee CJ, Simeone DM: Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol* 2009, **568**:161–73.

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

71. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ: **Prospective** identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005, **65**:10946–51.

72. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG: **Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells.** *Oncogene* 2006, **25**:1696–708.

73. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE: **A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice.** *Nature* 2007, **445**:106–10.

74. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R: **Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.** *Nature* 2007, **445**:111–5.

75. Wu C, Wei Q, Utomo V, Nadesan P, Whetstone H, Kandel R, Wunder JS, Alman BA: **Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential.** *Cancer Res* 2007, **67**:8216–22.

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

77. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R,

Foroni C, Dimeco F, Vescovi A: Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004, 64:7011–21.

78. Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, Renault-Mihara F, Thirant C, Leonard N, Berhneim A, Mihalescu-Maingot M, Haiech J, Bièche I, Moura-Neto V, Daumas-Duport C, Junier M-P, Chneiweiss H: CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer* 2010, **10**:66.

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

80. Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong D-S, Lee J-I, Jeon JW, Kim MH, Kang BG, Jung Y, Jin J, Hong S-C, Park W-Y, Lee D-S, Kim H, Nam D-H: Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest* 2008, **88**:808–15.

81. Zhang M, Song T, Yang L, Chen R, Wu L, Yang Z, Fang J: Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2008, **27**:85.

82. Bexell D, Gunnarsson S, Siesjö P, Bengzon J, Darabi A: **CD133+ and nestin+ tumor-initiating cells dominate in N29 and N32 experimental gliomas.** *Int J Cancer* 2009, **125**:15–22.

83. Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, Zhang Y, Ling E-A, Gao J, Hao A: **Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas.** *Histopathology* 2011, **59**:763–75.

84. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CMA, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H: **HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells.** *Cancer Res* 2011, **71**:4640–52.

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

86. Son MJ, Woolard K, Nam D-H, Lee J, Fine HA: **SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:440–52.

87. Anido J, Sáez-Borderías A, Gonzàlez-Juncà A, Rodón L, Folch G, Carmona MA, Prieto-Sánchez RM, Barba I, Martínez-Sáez E, Prudkin L, Cuartas I, Raventós C, Martínez-Ricarte F, Poca MA, García-Dorado D, Lahn MM, Yingling JM, Rodón J, Sahuquillo J, Baselga J, Seoane J: **TGF-**β **Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma.** *Cancer Cell* 2010, **18**:655–68.

88. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, Miyazono K: Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J Biol Chem* 2011, **286**:41434–41.

89. Thon N, Damianoff K, Hegermann J, Grau S, Krebs B, Schnell O, Tonn J-C, Goldbrunner R: **Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas.** *Mol Cell Neurosci* 2010, **43**:51–9.

90. Ge Y, Zhou F, Chen H, Cui C, Liu D, Li Q, Yang Z, Wu G, Sun S, Gu J, Wei Y, Jiang J: **Sox2 is translationally activated by eukaryotic initiation factor 4E in human glioma-initiating cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **397**:711–7.

91. Hägerstrand D, He X, Bradic Lindh M, Hoefs S, Hesselager G, Ostman A, Nistér M: Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile. *Neuro Oncol* 2011, **13**:1178–91.

92. Mizutani K, Yoon K, Dang L, Tokunaga A, Gaiano N: **Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors.** *Nature* 2007, **449**:351–5.

93. Presente A, Andres A, Nye JS: **Requirement of Notch in adulthood for neurological function and longevity.** *Neuroreport* 2001, **12**:3321–5.

94. Lino MM, Merlo A, Boulay J-L: Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target? *BMC Med* 2010, 8:72.

95. Kanamori M, Kawaguchi T, Nigro JM, Feuerstein BG, Berger MS, Miele L, Pieper RO: **Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme.** *J Neurosurg* 2007, **106**:417–27.

96. Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang X-F, White RR,

Rich JN, Sullenger BA: Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 2010, **28**:17–28.

97. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li Y-M, Maciaczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi AL, Eberhart CG: **NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts.** *Stem Cells* 2010, **28**:5–16.

98. Shih AH, Holland EC: Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. *Neoplasia* 2006, **8**:1072–82.

99. Cayuso J, Ulloa F, Cox B, Briscoe J, Martí E: **The Sonic hedgehog** pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* 2006, **133**:517–28.

100. Shahi MH, Lorente A, Castresana JS: **Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma.** *Oncol Rep* 2008, **19**:681–8.

101. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A: **HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity.** *Curr Biol* 2007, **17**:165–72.

102. Xu Q, Yuan X, Liu G, Black KL, Yu JS: Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas. *Stem Cells* 2008, **26**:3018–26.

103. Uchida H, Arita K, Yunoue S, Yonezawa H, Shinsato Y, Kawano H, Hirano H, Hanaya R, Tokimura H: **Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells.** *J Neurooncol* 2011, **104**:697–704.

104. Ulasov I V, Nandi S, Dey M, Sonabend AM, Lesniak MS: Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy. *Mol Med* 2011, **17**:103–12.

105. Clevers H: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006, **127**:469–80.

106. Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W: **Deciphering the function** of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 2008, **22**:2308– 41.

107. Cheng L, Bao S, Rich JN: **Potential therapeutic implications of cancer** stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* 2010, **80**:654–65.

108. Rossi M, Magnoni L, Miracco C, Mori E, Tosi P, Pirtoli L, Tini P, Oliveri G, Cosci E, Bakker A: **β-catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma.** *Cancer Biol Ther* 2011, **11**:753–61.

109. Kaur N, Chettiar S, Rathod S, Rath P, Muzumdar D, Shaikh ML, Shiras A: Wnt3a mediated activation of Wnt/β-catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Mol Cell Neurosci* 2013, **54**:44–57.

110. Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu W-T, Lee H-T, Colman H, Huang H, Xue J, Liu M, Wang Y, Sawaya R, Xie K, Yung WKA, Medema RH, He X, Huang S: **FoxM1** promotes β-catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell* 2011, **20**:427–42.

111. Verrecchia F, Mauviel A: **Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation.** *J Invest Dermatol* 2002, **118**:211–5.

112. Han J, Alvarez-Breckenridge CA, Wang Q-E, Yu J: **TGF-**β signaling and its targeting for glioma treatment. *Am J Cancer Res* 2015, **5**:945–55.

113. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K: Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009, **5**:504–14.

114. Sanai N, Berger MS: Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* 2008, **62**:753–64; discussion 264–6.

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

116. Cheng L, Wu Q, Huang Z, Guryanova OA, Huang Q, Shou W, Rich JN, Bao S: L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *EMBO J* 2011, **30**:800–13.

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

118. Beier D, Rohrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B, Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P, Beier CP: **Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma**. *Cancer Res* 2008, **68**:5706–5715.

119. Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF: A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012, **488**:522–6.

120. Gaspar N, Marshall L, Perryman L, Bax DA, Little SE, Viana-Pereira M, Sharp SY, Vassal G, Pearson ADJ, Reis RM, Hargrave D, Workman P, Jones C: **MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature.** *Cancer Res* 2010, **70**:9243–52.

121. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS: Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006, **5**:67.

122. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou M-F, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MCM, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich P-Y, Zimmer Y, Cairncross JG, Janzer R-C, Domany E, Delorenzi M, Stupp R, Hegi ME: Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 2008, **26**:3015–24.

123. Bleau A-M, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC: **PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:226–35.

124. Hosokawa Y, Takahashi H, Inoue A, Kawabe Y, Funahashi Y, Kameda K, Sugimoto K, Yano H, Harada H, Kohno S, Ohue S, Ohnishi T, Tanaka J: Oct-3/4 modulates the drug-resistant phenotype of glioblastoma cells through expression of ATP binding cassette transporter G2. *Biochim Biophys Acta* 2015, 1850:1197–205.

125. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed B V, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suvà ML, Regev A, Bernstein BE: **Single-cell RNA-seq highlights intratumoral** heterogeneity in primary glioblastoma. Science 2014, 344:1396-401.

126. Pattabiraman DR, Weinberg RA: **Tackling the cancer stem cells - what** challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* 2014, **13**:497–512.

127. Heldin C-H, Rubin K, Pietras K, Ostman A: **High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:806–13.

128. Vaupel P: **Tumor microenvironmental physiology and its implications** for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 2004, **14**:198–206.

129. Gatenby RA, Gillies RJ: A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008, **8**:56–61.

130. Mueller MM, Fusenig NE: Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:839–49.

131. Harris AL: **Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:38–47.

132. Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM: **Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression.** *Nature* 2006, **441**:437–43.

133. Wilson WR, Hay MP: **Targeting hypoxia in cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**:393–410.

134. Keith B, Johnson RS, Simon MC: **HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression.** *Nat Rev Cancer* 2012, **12**:9–22.

135. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P: **Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review.** *Cancer Res* 1989, **49**:6449–65.

136. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK: Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 1997, **3**:177–82.

137. Evans SM, Jenkins KW, Jenkins WT, Dilling T, Judy KD, Schrlau A, Judkins A, Hahn SM, Koch CJ: **Imaging and analytical methods as applied to the evaluation of vasculature and hypoxia in human brain tumors.** *Radiat Res* 2008, **170**:677–90.

138. Evans SM, Judy KD, Dunphy I, Jenkins WT, Nelson PT, Collins R, Wileyto EP, Jenkins K, Hahn SM, Stevens CW, Judkins AR, Phillips P, Geoerger B, Koch CJ: **Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle**

electrodes and EF5 binding. Cancer Res 2004, 64:1886–92.

139. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG: **Pseudopalisades in glioblastoma** are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* 2004, **64**:920–7.

140. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ: "**Pseudopalisading**" necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006, **65**:529–39.

141. Evans SM, Jenkins KW, Chen HI, Jenkins WT, Judy KD, Hwang W-T, Lustig RA, Judkins AR, Grady MS, Hahn SM, Koch CJ: **The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study.** *Transl Oncol* 2010, **3**:160–9.

142. Sathornsumetee S, Cao Y, Marcello JE, Herndon JE, McLendon RE, Desjardins A, Friedman HS, Dewhirst MW, Vredenburgh JJ, Rich JN: **Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:271–8.

143. Semenza GL: **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:721–32.

144. Zhao C, Deng W, Gage FH: **Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.** *Cell* 2008, **132**:645–60.

145. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S: Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004, **304**:1338–40.

146. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ: **A perivascular niche for brain tumor stem cells.** *Cancer Cell* 2007, **11**:69–82.

147. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN: **Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor.** *Cancer Res* 2006, **66**:7843–8.

148. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, Hoffman RM, Kerbel RS: Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res* 2009, **69**:7243–51.

149. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R: **Tumour vascularization via** endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 2010, **468**:824–8.

150. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V: **Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium.** *Nature* 2010, **468**:829–33.

151. Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN: **Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy.** *Mol Aspects Med* 2014, **39**:82–101.

152. Clarke L, van der Kooy D: Low oxygen enhances primitive and definitive neural stem cell colony formation by inhibiting distinct cell death pathways. *Stem Cells* 2009, **27**:1879–86.

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

154. Christensen K, Schrøder HD, Kristensen BW: **CD133 identifies** perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *J Neurooncol* 2008, **90**:157–70.

155. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S: **Hypoxia** enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009, **5**:237–41.

156. Keith B, Simon MC: **Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer.** *Cell* 2007, **129**:465–72.

157. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A: **Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche.** *Cell Stem Cell* 2010, **7**:150–61.

158. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu C-J, Labosky PA, Simon MC, Keith B: **HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell**

function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006, **20**:557–70.

159. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN: The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 2009, 8:3274–84.

160. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze A-T, Nistér M, Reifenberger G, Lundeberg J, Frisén J, Acker T: **A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha.** *Brain* 2010, **133**(Pt 4):983–95.

161. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer N V, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996, 16:4604–13.

162. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL: **Regulation of colon** carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003, 63:1138–43.

163. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL: **Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression.** *Cancer* 2000, **88**:2606–18.

164. GRAY LH, CONGER AD, EBERT M, HORNSEY S, SCOTT OC: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953, **26**:638–48.

165. Höckel M, Vaupel P: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**:266–76.

166. Höckel M, Schlenger K, Höckel S, Vaupel P: **Hypoxic cervical cancers** with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res* 1999, **59**:4525–8.

167. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996, **379**:88–91.

168. Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, DiPaolo JA, Peehl DM, Giaccia AJ: Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer Res*

1997, **57**:4200–4.

169. Clarke RH, Moosa S, Anzivino M, Wang Y, Floyd DH, Purow BW, Lee KS: Sustained radiosensitization of hypoxic glioma cells after oxygen pretreatment in an animal model of glioblastoma and in vitro models of tumor hypoxia. *PLoS One* 2014, **9**:e111199.

170. Persano L, Rampazzo E, Basso G, Viola G: **Glioblastoma cancer stem** cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol* 2013, **85**:612–22.

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

172. Kolenda J, Jensen SS, Aaberg-Jessen C, Christensen K, Andersen C, Brünner N, Kristensen BW: Effects of hypoxia on expression of a panel of stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma-derived spheroids. *J Neurooncol* 2011, **103**:43–58.

173. Kallinowski F, Vaupel P: **pH distributions in spontaneous and isotransplanted rat tumours.** *Br J Cancer* 1988, **58**:314–21.

174. Gerweck LE, Seetharaman K: Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 1996, **56**:1194–8.

175. Gatenby RA, Gillies RJ: **Why do cancers have high aerobic glycolysis?** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:891–9.

176. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J: **Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer.** *J Cell Mol Med* 2010, **14**:771–94.

177. WARBURG O: On the origin of cancer cells. Science 1956, 123:309–14.

178. Kroemer G, Pouyssegur J: **Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel.** *Cancer Cell* 2008, **13**:472–82.

179. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB: **Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.** *Science* 2009, **324**:1029–33.

180. Vander Heiden MG: **Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens.** *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**:671–84.

181. Ward PS, Thompson CB: **Metabolic reprogramming: a cancer hallmark** even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 2012, **21**:297–308.

182. Schulze A, Harris AL: How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 2012, **491**:364–73.

183. Mayers JR, Vander Heiden MG: **Famine versus feast: understanding the metabolism of tumors in vivo**. *Trends Biochem Sci* 2015, **40**:130–40.

184. Andersen AP, Moreira JMA, Pedersen SF: Interactions of ion transporters and channels with cancer cell metabolism and the tumour microenvironment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014, **369**:20130098.

185. Parks SK, Chiche J, Pouysségur J: **Disrupting proton dynamics and** energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013, **13**:611–23.

186. Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ: **Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study.** *Cancer Res* 2006, **66**:5216–23.

187. Bourguignon LYW, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E: **CD44** interaction with Na+-H+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 2004, **279**:26991–7007.

188. Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF: **Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells.** *Cancer Res* 1994, **54**:6517–25.

189. Yang X, Wang D, Dong W, Song Z, Dou K: Inhibition of Na(+)/H(+) exchanger 1 by 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride reduces hypoxia-induced hepatocellular carcinoma invasion and motility. *Cancer Lett* 2010, **295**:198–204.

190. Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noël A, Frankenne F, Foidart J-M, Baba M, Hata R-I, Miyazaki K, Tsukuda M: Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2005, **280**:10938–44.

191. Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A,

Bailey K, Balagurunathan Y, Rothberg JM, Sloane BF, Johnson J, Gatenby RA, Gillies RJ: Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013, **73**:1524–35.

192. Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD, McLendon R, Lindner D, Sloan A, Rich JN: **Acidic stress promotes a** glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ* 2011, **18**:829–40.

193. Choi SYC, Collins CC, Gout PW, Wang Y: **Cancer-generated lactic acid:** a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J Pathol* 2013, **230**:350–5.

194. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M: **Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells.** *Blood* 2007, **109**:3812–9.

195. Calcinotto A, Filipazzi P, Grioni M, Iero M, De Milito A, Ricupito A, Cova A, Canese R, Jachetti E, Rossetti M, Huber V, Parmiani G, Generoso L, Santinami M, Borghi M, Fais S, Bellone M, Rivoltini L: **Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes.** *Cancer Res* 2012, **72**:2746–56.

196. Gerweck LE, Vijayappa S, Kozin S: **Tumor pH controls the in vivo** efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* 2006, **5**:1275–9.

197. Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ: **Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics.** I. Acid pH affects the distribution of **chemotherapeutic agents in vitro.** *Biochem Pharmacol* 2003, **66**:1207–18.

198. Raghunand N, Mahoney BP, Gillies RJ: **Tumor acidity, ion trapping and** chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol* 2003, 66:1219–29.

199. Vukovic V, Tannock IF: Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *Br J Cancer* 1997, **75**:1167–72.

200. Raghunand N, He X, van Sluis R, Mahoney B, Baggett B, Taylor CW, Paine-Murrieta G, Roe D, Bhujwalla ZM, Gillies RJ: **Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH.** *Br J Cancer* 1999, **80**:1005–11.

201. Lotz C, Kelleher DK, Gassner B, Gekle M, Vaupel P, Thews O: Role of the

tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells. *Oncol Rep* 2007, **17**:239–44.

202. Thews O, Dillenburg W, Rösch F, Fellner M: **PET imaging of the impact** of extracellular pH and MAP kinases on the p-glycoprotein (Pgp) activity. *Adv Exp Med Biol* 2013, **765**:279–86.

203. Thews O, Nowak M, Sauvant C, Gekle M: **Hypoxia-induced extracellular** acidosis increases p-glycoprotein activity and chemoresistance in tumors in vivo via p38 signaling pathway. *Adv Exp Med Biol* 2011, **701**:115–22.

204. Sauvant C, Nowak M, Wirth C, Schneider B, Riemann A, Gekle M, Thews O: Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. *Int J Cancer* 2008, 123:2532–42.

205. Zeniou M, Fève M, Mameri S, Dong J, Salomé C, Chen W, El-Habr EA, Bousson F, Sy M, Obszynski J, Boh A, Villa P, Assad Kahn S, Didier B, Bagnard D, Junier M-P, Chneiweiss H, Haiech J, Hibert M, Kilhoffer M-C: **Chemical Library Screening and Structure-Function Relationship Studies Identify Bisacodyl as a Potent and Selective Cytotoxic Agent Towards Quiescent Human Glioblastoma Tumor Stem-Like Cells.** *PLoS One* 2015, **10**:e0134793.

206. Swietach P, Patiar S, Supuran CT, Harris AL, Vaughan-Jones RD: **The role** of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular ph in three-dimensional tumor cell growths. *J Biol Chem* 2009, **284**:20299–310.

207. Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Swietach P: **Dual role of CO2/HCO3(-) buffer in the regulation of intracellular pH of three-dimensional tumor growths.** *J Biol Chem* 2011, **286**:13815–26.

208. Ashburn TT, Thor KB: **Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs.** *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**:673–83.

209. Pammolli F, Magazzini L, Riccaboni M: The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**:428–38.

210. Gupta SC, Sung B, Prasad S, Webb LJ, Aggarwal BB: **Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs.** *Trends Pharmacol Sci* 2013, **34**:508–17.

211. Jin G, Wong STC: Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discov Today* 2014,

19:637–44.

212. Novac N: Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends Pharmacol Sci* 2013, **34**:267–72.

213. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J: **Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:4082–5.

214. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B: **Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma.** *N Engl J Med* 1999, **341**:1565–71.

215. Wei W, Zhou F, Zhang Y, Guo L, Shi H, Hou J: A combination of thalidomide and arsenic trioxide is effective and well tolerated in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2012, **36**:715–9.

216. Scherman E, Malak S, Perot C, Gorin NC, Rubio MT, Isnard F: Interest of the association azacitidine-lenalidomide as frontline therapy in high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia with complex karyotype. *Leukemia* 2012, **26**:822–4.

217. Fehniger TA, Byrd JC, Marcucci G, Abboud CN, Kefauver C, Payton JE, Vij R, Blum W: Single-agent lenalidomide induces complete remission of acute myeloid leukemia in patients with isolated trisomy 13. *Blood* 2009, 113:1002–5.

218. Hothi P, Martins TJ, Chen L, Deleyrolle L, Yoon J-G, Reynolds B, Foltz G: High-throughput chemical screens identify disulfiram as an inhibitor of human glioblastoma stem cells. *Oncotarget* 2012, **3**:1124–36.

219. Kitambi SS, Toledo EM, Usoskin D, Wee S, Harisankar A, Svensson R, Sigmundsson K, Kalderén C, Niklasson M, Kundu S, Aranda S, Westermark B, Uhrbom L, Andäng M, Damberg P, Nelander S, Arenas E, Artursson P, Walfridsson J, Forsberg Nilsson K, Hammarström LGJ, Ernfors P: **Vulnerability of glioblastoma cells to catastrophic vacuolization and death induced by a small molecule.** *Cell* 2014, **157**:313–28.

220. Kast RE, Boockvar JA, Brüning A, Cappello F, Chang W-W, Cvek B, Dou QP, Duenas-Gonzalez A, Efferth T, Focosi D, Ghaffari SH, Karpel-Massler G, Ketola K, Khoshnevisan A, Keizman D, Magné N, Marosi C, McDonald K, Muñoz M, Paranjpe A, Pourgholami MH, Sardi I, Sella A, Srivenugopal KS, Tuccori M, Wang W, Wirtz CR, Halatsch M-E: **A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: coordinated undermining of survival paths with nine**

repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care. *Oncotarget* 2013, **4**:502–30.

221. Kast RE, Karpel-Massler G, Halatsch M-E: CUSP9* treatment protocol for recurrent glioblastoma: aprepitant, artesunate, auranofin, captopril, celecoxib, disulfiram, itraconazole, ritonavir, sertraline augmenting continuous low dose temozolomide. *Oncotarget* 2014, **5**:8052–82.

222. Venere M, Hamerlik P, Wu Q, Rasmussen RD, Song LA, Vasanji A, Tenley N, Flavahan WA, Hjelmeland AB, Bartek J, Rich JN: **Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells.** *Cell Death Differ* 2014, **21**:258–69.

223. Chalmers AJ: The potential role and application of PARP inhibitors in cancer treatment. *Br Med Bull* 2009, **89**:23–40.

224. Karpel-Massler G, Pareja F, Aimé P, Shu C, Chau L, Westhoff M-A, Halatsch M-E, Crary JF, Canoll P, Siegelin MD: **PARP inhibition restores extrinsic apoptotic sensitivity in glioblastoma.** *PLoS One* 2014, **9**:e114583.

225. Barazzuol L, Jena R, Burnet NG, Meira LB, Jeynes JCG, Kirkby KJ, Kirkby NF: Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 combined with radiotherapy and temozolomide in glioblastoma. *Radiat Oncol* 2013, 8:65.

226. Tentori L, Ricci-Vitiani L, Muzi A, Ciccarone F, Pelacchi F, Calabrese R, Runci D, Pallini R, Caiafa P, Graziani G: **Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide.** *BMC Cancer* 2014, **14**:151.

227. Russo AL, Kwon H-C, Burgan WE, Carter D, Beam K, Weizheng X, Zhang J, Slusher BS, Chakravarti A, Tofilon PJ, Camphausen K: **In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor E7016.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:607–12.

228. Lin F, de Gooijer MC, Roig EM, Buil LCM, Christner SM, Beumer JH, Würdinger T, Beijnen JH, van Tellingen O: **ABCB1**, **ABCG2**, and **PTEN determine the response of glioblastoma to temozolomide and ABT-888 therapy**. *Clin Cancer Res* 2014, **20**:2703–13.

229. Zinzi L, Contino M, Cantore M, Capparelli E, Leopoldo M, Colabufo NA: **ABC transporters in CSCs membranes as a novel target for treating tumor relapse.** *Front Pharmacol* 2014, **5**:163.

230. Martín V, Sanchez-Sanchez AM, Herrera F, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Alvarez-Vega MA, Antolín I, Rodriguez C: **Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells.** *Br J Cancer* 2013, **108**:2005–12.

231. Li W-Q, Li Y-M, Tao B-B, Lu Y-C, Hu G-H, Liu H-M, He J, Xu Y, Yu H-Y: **Downregulation of ABCG2 expression in glioblastoma cancer stem cells with miRNA-328 may decrease their chemoresistance.** *Med Sci Monit* 2010, **16**:HY27–30.

232. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD: **ABC transporters in** cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 2010, **10**:147–56.

233. Campos B, Gal Z, Baader A, Schneider T, Sliwinski C, Gassel K, Bageritz J, Grabe N, von Deimling A, Beckhove P, Mogler C, Goidts V, Unterberg A, Eckstein V, Herold-Mende C: **Aberrant self-renewal and quiescence contribute to the aggressiveness of glioblastoma.** *J Pathol* 2014, **234**:23–33.

234. Visnyei K, Onodera H, Damoiseaux R, Saigusa K, Petrosyan S, De Vries D, Ferrari D, Saxe J, Panosyan EH, Masterman-Smith M, Mottahedeh J, Bradley KA, Huang J, Sabatti C, Nakano I, Kornblum HI: **A molecular screening approach to identify and characterize inhibitors of glioblastoma stem cells.** *Mol Cancer Ther* 2011, **10**:1818–28.

235. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire JA, Smith A, Dirks P: **Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:568–80.

236. Germain AR, Carmody LC, Morgan B, Fernandez C, Forbeck E, Lewis TA, Nag PP, Ting A, VerPlank L, Feng Y, Perez JR, Dandapani S, Palmer M, Lander ES, Gupta PB, Schreiber SL, Munoz B: **Identification of a selective small molecule inhibitor of breast cancer stem cells.** *Bioorg Med Chem Lett* 2012, **22**:3571–4.

237. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES: Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009, **138**:645–59.

238. Ewe K: Effect of bisacodyl on intestinal electrolyte and water net transport and transit. Perfusion studies in men. *Digestion* 1987, **37**:247–53.

239. Ratnaike RN, Jones TE: Mechanisms of drug-induced diarrhoea in the

elderly. Drugs Aging 1998, 13:245–53.

240. Schreiner J, Nell G, Loeschke K: Effect of diphenolic laxatives on Na+-K+-activated ATPase and cyclic nucleotide content of rat colon mucosa in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980, **313**:249–55.

241. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E: Effects of bisacodyl on cAMP and prostaglandin E2 contents, (Na + K) ATPase, adenyl cyclase, and phosphodiesterase activities of rat intestine. *Dig Dis Sci* 1980, **25**:602–8.

242. Beubler E, Schirgi-Degen A: **Stimulation of enterocyte protein kinase C by laxatives in-vitro.** *J Pharm Pharmacol* 1993, **45**:59–62.

243. Gaginella TS, Mascolo N, Izzo AA, Autore G, Capasso F: Nitric oxide as a mediator of bisacodyl and phenolphthalein laxative action: induction of nitric oxide synthase. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, **270**:1239–45.

244. Ikarashi N, Baba K, Ushiki T, Kon R, Mimura A, Toda T, Ishii M, Ochiai W, Sugiyama K: The laxative effect of bisacodyl is attributable to decreased aquaporin-3 expression in the colon induced by increased PGE2 secretion from macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011, **301**:G887–95.

245. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH: WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 2000, **275**:16795–801.

246. Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford D V, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP: **Human hypertension caused by mutations in WNK kinases.** *Science* 2001, **293**:1107–12.

247. McCormick JA, Ellison DH: **The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions.** *Physiol Rev* 2011, **91**:177–219.

248. Thastrup JO, Rafiqi FH, Vitari AC, Pozo-Guisado E, Deak M, Mehellou Y, Alessi DR: **SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation.** *Biochem J* 2012, **441**:325–37.

249. Moniz S, Jordan P: Emerging roles for WNK kinases in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2010, **67**:1265–76.

250. Zhu W, Begum G, Pointer K, Clark PA, Yang S-S, Lin S-H, Kahle KT, Kuo JS, Sun D: WNK1-OSR1 kinase-mediated phospho-activation of Na+-K+-2Clcotransporter facilitates glioma migration. *Mol Cancer* 2014, **13**:31.

251. Folkman J, Hochberg M: **Self-regulation of growth in three dimensions.** *J Exp Med* 1973, **138**:745–53.

252. Sutherland R, Carlsson J, Durand R, Yuhas J: **Spheroids in Cancer Research**. *Cancer Res* 1981, **41**:2980–2984.

253. Sutherland RM: Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988, **240**:177–84.

254. Acker H, Holtermann G, Bölling B, Carlsson J: Influence of glucose on metabolism and growth of rat glioma cells (C6) in multicellular spheroid culture. *Int J Cancer* 1992, **52**:279–85.

255. Görlach A, Acker H: pO2- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1994, **1227**:105–12.

256. Yamada KM, Cukierman E: **Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D.** *Cell* 2007, **130**:601–10.

257. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK: **The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:839– 45.

258. Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA: **Cerebral organoids model** human brain development and microcephaly. *Nature* 2013, **501**:373–9.

259. Sasai Y: Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell* 2013, **12**:520–30.

260. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J: **Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues.** *Trends Biotechnol* 2013, **31**:108–15.

261. Choi SH, Kim YH, Hebisch M, Sliwinski C, Lee S, D'Avanzo C, Chen H, Hooli B, Asselin C, Muffat J, Klee JB, Zhang C, Wainger BJ, Peitz M, Kovacs DM, Woolf CJ, Wagner SL, Tanzi RE, Kim DY: **A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease**. *Nature* 2014, **515**:274–8. 262. Karthaus WR, Iaquinta PJ, Drost J, Gracanin A, van Boxtel R, Wongvipat J, Dowling CM, Gao D, Begthel H, Sachs N, Vries RGJ, Cuppen E, Chen Y, Sawyers CL, Clevers HC: **Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures.** *Cell* 2014, **159**:163–75.

263. Marx V: Models: stretching the skills of cell lines and mice. *Nat Methods* 2014, **11**:617–20.

264. Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Verstegen MMA, Ellis E, van Wenum M, Fuchs SA, de Ligt J, van de Wetering M, Sasaki N, Boers SJ, Kemperman H, de Jonge J, Ijzermans JNM, Nieuwenhuis EES, Hoekstra R, Strom S, Vries RRG, van der Laan LJW, Cuppen E, Clevers H: Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver. *Cell* 2014, 160:299–312.

265. Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, Amenduni M, Szekely A, Palejev D, Wilson M, Gerstein M, Grigorenko EL, Chawarska K, Pelphrey KA, Howe JR, Vaccarino FM: **FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders**. *Cell* 2015, **162**:375–390.

266. Reardon S: Scientists seek "Homo chippiens". *Nature* 2015, 518:285–6.

267. Reardon S: "Organs-on-chips" go mainstream. Nature 2015, 523:266.

268. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK, Wongvipat J, Kossai M, Ramazanoglu S, Barboza LP, Di W, Cao Z, Zhang QF, Sirota I, Ran L, MacDonald TY, Beltran H, Mosquera J-M, Touijer KA, Scardino PT, Laudone VP, Curtis KR, Rathkopf DE, Morris MJ, Danila DC, Slovin SF, et al.: **Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer.** *Cell* 2014, **159**:176–87.

269. Jiguet Jiglaire C, Baeza-Kallee N, Denicolaï E, Barets D, Metellus P, Padovani L, Chinot O, Figarella-Branger D, Fernandez C: **Ex vivo cultures of glioblastoma in three-dimensional hydrogel maintain the original tumor growth behavior and are suitable for preclinical drug and radiation sensitivity screening.** *Exp Cell Res* 2014, **321**:99–108.

270. Zhang X, Fryknäs M, Hernlund E, Fayad W, De Milito A, Olofsson MH, Gogvadze V, Dang L, Påhlman S, Schughart LAK, Rickardson L, D'Arcy P, Gullbo J, Nygren P, Larsson R, Linder S: Induction of mitochondrial dysfunction as a

strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. *Nat Commun* 2014, **5**:3295.

271. Boj SF, Hwang C-I, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvise M, Tiriac H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Öhlund D, Handly-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, et al.: **Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer**. *Cell* 2014, **160**:324–38.

272. van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, van Houdt W, van Gorp J, Taylor-Weiner A, Kester L, McLaren-Douglas A, Blokker J, Jaksani S, Bartfeld S, Volckman R, van Sluis P, Li VSW, Seepo S, Sekhar Pedamallu C, Cibulskis K, Carter SL, McKenna A, Lawrence MS, Lichtenstein L, Stewart C, Koster J, Versteeg R, van Oudenaarden A, Saez-Rodriguez J, Vries RGJ, et al.: **Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients**. *Cell* 2015, **161**:933–945.

273. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V: Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* 2015, **17**:1–15.

274. Plaks V, Kong N, Werb Z: **The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells?** *Cell Stem Cell* 2015, **16**:225–238.

275. Baker BM, Chen CS: **Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues.** *J Cell Sci* 2012, **125**(Pt 13):3015–24.

276. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE: Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1999, **79**:991–5.

277. Tomes L, Emberley E, Niu Y, Troup S, Pastorek J, Strange K, Harris A, Watson PH: **Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma.** *Breast Cancer Res Treat* 2003, **81**:61–9.

278. Edwards JG, Swinson DEB, Jones JL, Muller S, Waller DA, O'Byrne KJ: Tumor necrosis correlates with angiogenesis and is a predictor of poor prognosis in malignant mesothelioma. *Chest* 2003, **124**:1916–23.

279. Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster

WS, Zincke H, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED: **Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness**. *Cancer* 2005, **104**:511–20.

280. Brat DJ, Van Meir EG: Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* 2004, **84**:397–405.

281. Flavahan WA, Wu Q, Hitomi M, Rahim N, Kim Y, Sloan AE, Weil RJ, Nakano I, Sarkaria JN, Stringer BW, Day BW, Li M, Lathia JD, Rich JN, Hjelmeland AB: **Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake.** *Nat Neurosci* 2013, **16**:1373–82.

282. Alvarez-Pérez J, Ballesteros P, Cerdán S: Microscopic images of intraspheroidal pH by 1H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *MAGMA* 2005, **18**:293–301.

283. Minchinton AI, Tannock IF: **Drug penetration in solid tumours.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**:583–92.

284. Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW, Giannakakou P: **2ME2** inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003, **3**:363–75.

285. Yeo E-J, Chun Y-S, Cho Y-S, Kim J, Lee J-C, Kim M-S, Park J-W: **YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1.** *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**:516–25.

286. Block KM, Wang H, Szabó LZ, Polaske NW, Henchey LK, Dubey R, Kushal S, László CF, Makhoul J, Song Z, Meuillet EJ, Olenyuk BZ: **Direct inhibition of hypoxia-inducible transcription factor complex with designed dimeric epidithiodiketopiperazine.** *J Am Chem Soc* 2009, **131**:18078–88.

287. Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, Zhang H, Teng Q, Nicholson AC, Giannakakou P, Zhou W, Olson JJ, Pereira MM, Nicolaou KC, Van Meir EG: Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res* 2005, **65**:605–12.

288. Kling J: **Hypoxia-activated prodrugs forge ahead in cancer.** *Nat Biotechnol* 2012, **30**:381.

289. Weiss GJ, Infante JR, Chiorean EG, Borad MJ, Bendell JC, Molina JR,

Tibes R, Ramanathan RK, Lewandowski K, Jones SF, Lacouture ME, Langmuir VK, Lee H, Kroll S, Burris HA: **Phase 1 study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of TH-302, a hypoxia-activated prodrug, in patients with advanced solid malignancies.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**:2997–3004.

290. Papadopoulos KP, Goel S, Beeram M, Wong A, Desai K, Haigentz M, Milián ML, Mani S, Tolcher A, Lalani AS, Sarantopoulos J: **A phase 1 open-label**, accelerated dose-escalation study of the hypoxia-activated prodrug AQ4N in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2008, **14**:7110–5.

291. Borad MJ, Reddy SG, Bahary N, Uronis HE, Sigal D, Cohn AL, Schelman WR, Stephenson J, Chiorean EG, Rosen PJ, Ulrich B, Dragovich T, Del Prete SA, Rarick M, Eng C, Kroll S, Ryan DP: **Randomized Phase II Trial of Gemcitabine Plus TH-302 Versus Gemcitabine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer.** *J Clin Oncol* 2014, **33**:1475–81.

292. Neri D, Supuran CT: Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**:767–77.

293. Lee ES, Gao Z, Bae YH: Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. *J Control Release* 2008, **132**:164–70.

294. Shi J, Liu Y, Wang L, Gao J, Zhang J, Yu X, Ma R, Liu R, Zhang Z: A tumoral acidic pH-responsive drug delivery system based on a novel photosensitizer (fullerene) for in vitro and in vivo chemo-photodynamic therapy. *Acta Biomater* 2014, **10**:1280–91.

295. Song S, Chen F, Qi H, Li F, Xin T, Xu J, Ye T, Sheng N, Yang X, Pan W: Multifunctional tumor-targeting nanocarriers based on hyaluronic acid-mediated and pH-sensitive properties for efficient delivery of docetaxel. *Pharm Res* 2014, **31**:1032–45.

296. Wunderlin R: The Leguminosae: A source book of characteristics, uses, and nodulation. *Econ Bot* 1982, **36**:224–224.

297. Ali M, Heaton A, Leach D: Triterpene Esters from Australian Acacia. *J Nat Prod* 1997, **60**:1150–1151.

298. Haridas V, Higuchi M, Jayatilake GS, Bailey D, Mujoo K, Blake ME, Arntzen CJ, Gutterman JU: Avicins: triterpenoid saponins from Acacia victoriae (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:5821–6.

299. Haridas V, Arntzen CJ, Gutterman JU: Avicins, a family of triterpenoid saponins from Acacia victoriae (Bentham), inhibit activation of nuclear factor-kappaB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:11557–62.

300. Mujoo K, Haridas V, Hoffmann JJ, Wächter GA, Hutter LK, Lu Y, Blake ME, Jayatilake GS, Bailey D, Mills GB, Gutterman JU: **Triterpenoid saponins from Acacia victoriae (Bentham) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis.** *Cancer Res* 2001, **61**:5486–90.

301. Haridas V, Hanausek M, Nishimura G, Soehnge H, Gaikwad A, Narog M, Spears E, Zoltaszek R, Walaszek Z, Gutterman JU: **Triterpenoid electrophiles** (avicins) activate the innate stress response by redox regulation of a gene battery. *J Clin Invest* 2004, **113**:65–73.

302. Benth AL: Albizia lebbeck. Dr Duke's Phytochem Ethnobot Databases 2008.

303. Albizia lebbeck (L.) Benth. Int Legum Database Inf Serv 2005.

304. Noté OP, Jihu D, Antheaume C, Zeniou M, Pegnyemb DE, Guillaume D, Chneiwess H, Kilhoffer MC, Lobstein A: **Triterpenoid saponins from Albizia lebbeck (L.) Benth and their inhibitory effect on the survival of high grade human brain tumor cells.** *Carbohydr Res* 2015, **404**:26–33.

305. Noté OP, Jihu D, Antheaume C, Guillaume D, Pegnyemb DE, Kilhoffer MC, Lobstein A: **Triterpenoid saponins from Albizia boromoensis Aubrév. & Pellegr**. *Phytochem Lett* 2015, **11**:37–42.

8. Annexes

8.1. Annexe I Articles parus

8.1.1. Annexe I.1

Chemical library screening and structure-function relationship studies identify bisacodyl as a potent and selective cytotoxic agent towards quiescent human glioblastoma tumor stem-like cells.



G OPEN ACCESS

Citation: Zanicu V, Féve V, Memari S, Dong J, Solomei C, Chon W, enal (2018) Chemical Library Scheming and Shucture-Function Relationship Studies kernify Bisocodylas in Pokent and Selective Cytotoxic Againt fowards Culescent Human Similactions Temor Stein Like Cerk, PLoS ONE 10(8), e0134793, doi:10.1371/journet.pone.0134793

Editor: Chrosopher Heeschen Spanish National Dancer Canthe (CNIO), SPA N

Received: September 30, 2014

Accepted: July 14, 2015

Published: August 13, 2010

Copyright is 2015 Zenou et al. This is an open access article distributed under the terms of the Greative Comptons Addituition Eldense, which permits unrestricted use, definitution and reproduction in any medium, provided the original suffice and source are tredied.

Date Availability Statement: All relevant data ans whin the paper and its Supporting information Tes-

Funding This work was subported by the drug resourch center Lubes (Luberatory of Excellence) Vedals, "La Ligue contre la Cencer", the Agenca Nationale pour la Restriction (AVR)", SATT Conection Alsade (Technology Transfer Office of the University of Strassourg), University of Strasbourg, CNRS, the Franch "Whistere de Tense greenert Superiour et de la Restriction" and by Région the de France Danobrophie" (EACH failowships), Marie Féveils RESEARCH ANTICLE

Chemical Library Screening and Structure-Function Relationship Studies Identify Bisacodyl as a Potent and Selective Cytotoxic Agent Towards Quiescent Human Glioblastoma Tumor Stem-Like Cells

Maria Zeniou^{1+*}*, Marie Fève¹⁺, Samir Mameri^{1+a}, Jihu Dong¹, Christophe Salome¹, Wanyin Chen¹, Ellas A. El-Hebr², Fanny Bousson¹, Mohamadou Sy¹, Julie Obszynski¹, Alexandre Boh¹, Pascal Villa³, Suzana Assad Kahn^{Sao}, Bruno Didier^{1,3}, Dominique Bagnard¹, Marle-Pierre Junier², Hervé Chneiweiss², Jacques Halech¹, Marcel Hibert^{1+*}, Marie-Claude Kilhoffer^{1‡}

 Laboracine d'Innevation Thérapeutique, Université de Strasbourg / CNRS UMR7200, Laboratoire d'Excellence Medalle, Facuité de Pharmacle, 74 route du Hhin, 67401 Illikiron, France, 2 Neuroscience Paris Seine-IBPS, CNRS UMR 6246/ Inserni UT130/ UPMC UMCR18, 7 quai Saini Bernard, 75005 Paris, France, 3 Plateforme de Chimie Biologie Intégrative (PCBIS), Université de Strasbourg / CNRS UMS 3256, Laboratoire d'Excellence Medalis, ESBS Pôle API-Bid Sébastier Brani, 67401 Illikirch, France, 4 U682, Inserni, Université de Strasbourg, 3, Avenue Molière, 67200 Strasbourg, France.

These authors contributed equally to this work.

nel Current address: Institut de Chimie, Université de Strasbourg/ GNRS UMR 7177, 4 rue Blaise Peace. 67000 Strasbourg, France

nb Ourtent address: Institute for Stem Cell Bibliogy and Regenerative Medicine, Stanford University, Stanford, California, United States of America

‡ These authors also contributed equally to this work.
* zentos @utdstra.in

Abstract

Cancer stem-like cells reside in hypoxic and slightly acidic tumor niches. Such microenvironments favor more aggressive undifferentiated phenotypes and a slow growing "quiescent state" which preserves them from chemotherapeutic agents that essentially target proliferating cells. Our objective was to identify compounds active on glioblastoma stem-like cells, including under conditions that mimick these found *in vivo* within this most severe and incurable form of brain malignancy. We screened the Prestwick Library to identify cytotoxic compounds towards glioblastoma stem-like cells, either in a proliferating state or in more slow-growing "quiescent" phenotype resulting from non-renewal of the culture medium *in vitro*. Compound effects were assessed by ATP-level determination using a cell-based assay. Twenty active molecules belonging to different pharmacological classes have thus been identified. Among those, the stimulant laxative drug bisacodyl was the sole to inhibit in a potent and specific manner the survival of quiescent glioblastoma stem-like cells. Subsequent structure-function relationship studies led to identification of 4,4'-dihydroxydiphenyl-2-pyridyl-methane (DDPM), the deacetylated form of bisacodyl, as the pharmacophore. To our knowledge, bisacodyl is currently the only known compound targeting glioblastoma


ndebled to Franch "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" for doctoral l'elevenip Warvin Chennecesved PhD functing from "La Lique terrare le Cancer". cancer stem-like cells in their quiescent, more resistant state. Due to its known non-texicity in humans, bisecodyl appears as a new potential anti-tumor agent that may, in association with classical chemotherapeutic compounds, participate in tumor eradication.

Competing Interests. The exitors have declared hall no competing interests exist.

Introduction

Because of their location, invasiveness and resistance to standard therapies, treating malignant brain tumors is challenging. This is especially true for glioblastoma (GBM), the most common and high grade form of glioma [1, 2]. Current glioblastoms treatments combine surgery, radiotherapy and chemotherapy with temozolomide, a DNA-alkylating agent [3]. Despite multiple therapeutic approaches, median survival of glioblastoms patients rarely exceeds 2 years [4].

Glioblastomas are histopathologically beterogeneous with cells characterized by various degrees of proliferative ability, differentiation and/or invasiveness. In the past years, the cancer stem cell model was proposed to explain tumor beterogeneity [5-7]. A subpopulation of malignant cancer stem-like cells, with tumor-propagating, self-renewal and differentiation capacities, was first isolated and characterized from hematoposetic malignancies [8] and subsequently from solid tumors of the brain and other organs [6]. In addition, numerous studies support the participation of cancer stem-like cells in tumor recurrences after treatment. Glioblastoma stem-like cells (GSCs) are more resistant to radiation-induced apoptosis and survive chemotherapy through increased expression of drug transporters. Finally, impaired functioning of apoptotic pathways has been described in these cells [9].

Thus, to be effective, cancer treatments should also target cancer stem-like cells, either by killing them or by forcing them to acquire a differentiated state more sensitive to conventional treatments [5, 10]. In this context, different strategies have been used to target such cells [11-13]. So far, however, most published data aim at finding molecules targeting proliferating tumor stem-like cells despite increasing evidence arguing in favor of the existence of relatively quiescent cancer stem-like cells within the tumor bulk in vivo [14]. Slowly proliferating cells with stem cell properties and tumor-initiation ability were identified in several solid tumors including ovarian, liver, breast cancer and melanoma [15-18]. In addition, a slow-cycling stem cell subpopulation from pancreatic adenocarcinoma has been shown to be endowed with increased tumorigenic and invasive potential as compared with faster-cycling cells from the same tumors [19]. More importantly, the quiescent state may contribute to the resistance of cancer stem-like cells to current chemotherapeutic agents. It was shown that leukemic stem cells survive in the dormant G0 phase of the cell cycle after chemotherapy and that relapses and metastases of breast cancer often occur after long intervals, suggesting an involvement of cells in a deep dormant phase [20-22]. Moreover, several studies have reported the resistance to conventional treatments of relatively quiescent cells from ovarian, breast and pancreatic tumors [14]. Thus, there is a great need to find new drugs that target both proliferating and ouiescent tumor stem-like cells.

With the aim of tracking chemical compounds with the aforementioned properties, we screened the Prestwick Library, using patient derived human GSCs. The activity of the compounds was evaluated on both proliferating cells and on cells grown under conditions favoring their quiescence. Most hit compounds were active under both conditions and showed cytotoxleity towards control cell types including human primary astrocytes (HA cells) and non-cancer human fetal neural stem cells (f-NSCs). Interestingly, one drug, bisacody), showed high specificity towards quiescent GSCs. Subsequent structure-function relationship studies identified 4.4'-dihydroxydiphenyl-2-pyridyl-methane (DDPM), the metabolite of bisacodyl as the minimal pharmacophore carrying activity. Because of its specific activity profile, bisacodyl appears as a potential chemotherapeutic agent, able to target the particularly resistant quiescent cancer stem-like cells present within human tumors, that may be used as adjuvant in a multi-therapy approach.

Materials and Methods

Materials

Bisacodyl (4,4'-diaoetoxydiphenyl-2-pyridyl-methane: CAS number: 603-50-9) and DDPM (4,4'-dihydroxydiphenyl-2-pyridyl-methane: CAS number: 603-41-8) also called IMIPM (bis-(p-hydroxyphenyl)-pyridyl-2-methane) were purchased from Sigma-Aldrich.

Ethics statement

The biomedical research was conducted according to the declaration of Helsinki, to the Frenchlaws and was approved by the institutional review board of Sainte Anne Hospital, Paris, France. Patients have given written informed consent. Isolation and characterization of neural stem cells from human fetal brain at embryonic day 50–55 (Carnegie stage 19–22) were performed under ethical approval from the University Paris-Descartes internal review board using tissue donated with written informed consent after elective termination of pregnancy.

Cell culture

Glioblastoma (WHO grade IV glioma) stem-like cells (TG1, TG16 and OB1 CSCs) were derived from tumor samples of 3 patients (Sainte Anne Hospital, Paris, France), as previously described [13], and expanded as neurosphere cultures. In proliferating cultures, neurospheres were mechanically dissociated in single-cell suspensions twice a week. Quiescent cells were obtained by non-renewal of the medium for 9–16 days following cell seeding. Experimental procedures used to phenotypically and functionally characterize proliferating and quiescent GSCs are described in the phenotypic and functional characterization section of Materials and Methods.

Primary human astrocytes (IIA cells) were expanded in AM Medium (from ScienCell Research Laboratories, Carlshad California) according to the manufacturer's instructions.

Human embryonic kidney 293 cells (HEK 293 cells) were expanded in minimum essential medium with 2 mM L-glutamine. 100 IU/mL-100 [ag/mL penicillin-streptomycin and 10% FBS. Human fetal neural stem cells (F-NSCs) were isolated and cultured as previously described

[24]

Human brain tumor cells U-87 MG (American Type Culture Collection, ATCC) were expanded in ATCC complete growth medium according to the manufacturer's instructions.

Master and working cell banks were established for all cell types. Cells were used at defined ranges of cell passages. Additional information concerning cell source, handling and resource sharing information is provided in St. Table.

Phenotypic and functional characterization of GSCs

Measurements of cell cycle, cell proliferative activity and cell viability. DNA synthesis activity of TG1 and OB1 GSCs at different conditions (1-16 days without medium renewal, 9 days without medium renewal followed by medium change at day 9 and day 13) was assessed with the Click-iT EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) Flow Cytometry Assay Kit from Invitrogen. Cell viability was measured using 7-AAD included in this kit. For Ki-67 expression studies and cell cycle analysis using propidium lodide staining, cells were permeabilized and fixed in 70% ethanol at -20°C for 2h. They were then incubated with EITC-conjugated Ki-67 mouse anti-human antibody (Life technologies, MHKI6701) or FITC-conjugated mouse IgGI isotype control (Life technologies, MG101) at room temperature for 30 min. After a treatment with 10 µg/mL RNase A and 20 µg/mL of propidium iodide for 30 min at room temperature, cells were analyzed on a FACSCalibor flow cytometer (3D Biosciences).

Expression of apoptosis and cell cycle related genes. Total RNA was isolated from 5-10 x 10º TG1 or OB1 GSCs using the TRJ Reagent (Euromedex, France) according to the manufacturer's instructions, RNeasy mini kit columns (QIAGEN) were used for further purification of the RNA samples. Cells were used in the following conditions: proliferating, quiescent (9 days without medium renewal) and proliferating after quiescence corresponding to quiescent cells (9 days without medium renewal) reintroduced into a proliferating medium for 1-4 days. NanoDrop ND-1000 (Lahtech) was used for absorption spectra analysis and RNA purity. assessment. Absorption ratios A260/A230 and A260/A230 were comprised between 1.8 and 2.1. RNA concentration was determined using the Qubit fluorometer and the Quant-it RNA Assey Kit from Invitrogen, RNA integrity was further evaluated with an Agilent 2100 Bioanalyzer and the RNA 6000 LabChip kit. Only RNA with a RNA Integrity Number (RIN) higher than 9 was processed (2100 expert software, Agilent Technologies). 1 ug of total RNA was reverse transcribed to single-stranded cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies). Real-time PCR analysis was performed with individual TaqMan gene expression assays in an ABI Priam 7000111 apparatus (Applied Biosystems, Life Technologies) using standard experimental conditions designed by the manufacturer, Individual assay IDs are as follows: p53: 11s 01034249-m1; BAX: Hs00180269-m1; p21: Hs 00355782-m1. Results were normalized to the 185 rRNA expression levels determined in all conditions. Results are shown as mean 1 SD of two independent experiments.

Senescence evaluation. Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) activity was examined with Cellular Senescence Assay Kit (Merck Millipore, KAA002) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were fixed with paraformaldehyde-based Fixing Solution for 10 min at room temperature and then incubated with SA-β-gal Detection Solution at 37°C overnight before microscopy examination. U-87 MG cells treated with 100 µM TMZ for 5 days were used as a positive control.

Expression of stemness, pluripotency and differentiation markers. TaqMan QPCR Assays (Applied Biosystems, Life Technologies) were used for determination of stemness and differentiation marker mRNA expression levels as indicated in S1 Methods. Validation of gene expression levels for some genes (IFITM1: Hs00705137-s1, GBX2: Hs00230965-m1, NANOG: Hs04399610-g1) with individual gene expression assays (Applied Biosystems, Life Technologies) was performed as described in the expression of apoptosis and cell cycle related genes section of Materials and Methods. The percentage of proliferating and quiescent cells expressing the Nanog protein (antibody from R&D) was determined by FACS analysis (S1 Methods).

Expression of surface markers, clonal, *in vitro* differentiation and *in vivo* engraftment properties. Surface marker expression, clonal properties of both proliferating and quiescent cells, as well as their *in vitro* differentiation ability and their *in vivo* engraftment properties, were assessed according to 52, 53, 54 and 55 Methods, respectively.

Primary and secondary chemical screens

The Prestwick Library (commercialized by Prestwick Chemical) used in this screen is composed of 1120 off-patent drugs (mostly EDA-approved) and some natural substances. Proliferating or quescent TG1 GSCs were seeded (30 000 and 40 000 viable cells/well, respectively) into 96-well opaque bottom plates (Greiner) with the Biomek FX robot (Beckman Coulter). Each compound from the Prestwick Library was then added (final concentration: 50 µM; 1% DMSO). Each molecule was tested once. Negative control wells (12/96 per assay plate) contained cells treated with 1% DMSO (final concentration) and positive control wells (4/96 per assay plate) contained cells treated with the fungal toxin ophiobolin A (Sigma Aldrich) at 50 µM with 1% DMSO. Ophiobolin A is cytotoxic both to proliferating and quiescent GSCs. Relative ATP levels were measured 24 hours later using the CellTiter-Glo reagent (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luminescence in each well was measured with the Victor3 plate reader (PerkinElmer).

Relative ATP levels in each well were determined by calculating the percentage of luminescent signal in the well with respect to the average signal measured in negative control wells. Compounds were considered as hits if relative ATP levels in the respective wells were less than 5% and/or if the corresponding luminescent signal was lower than the mean signal of negative control wells minus 5 times the standard deviation from this value.

Primary screen hits were further tested in duplicate, at two concentrations (50 and 5 µM) on proliferating and quioscent TG1 GSCs. Cell plating and treatment with compounds were as for the primary screen. Hit selection/confirmation criteria for quiescent cells were as described above. Due to a higher variability on proliferating cells' assay plates, compounds were considered as hits if the corresponding luminescent signal was lower than the mean signal of negative control wells minus only 3 times the standard deviation from this value.

Screen reliability was evaluated by the Z' factor [25] for each assay plate. The median Z' factors were 0.615 and 0.68 for the primary and secondary screens, respectively. Results were taken into account only if Z'>0.5.

Dose-response curves and EC₅₀ determination

Hits were validated by performing dose-response curves on the viability of proliferating and quiescent 1G1 cells under conditions similar (cell density, time of treatment) to those used for the primary and secondary screens (n = 3).

The BC_{n0} value was determined for each compound by fitting the data points according to the following equation:

$$\frac{S_{nu} + S_{nn} + \left(x + \frac{1}{n_{nn}}\right)^{2}}{1 + \left(x + \frac{1}{n_{nn}}\right)^{2}}$$

where y represents the expected response, x is the chemical compound concentration, S_{max} and S_{max} are the maximum and minimum responses recorded, respectively and n is the Hill coefficient. Curve fitting was performed using Microsoft Excel Solver component.

Similar dose response curves were performed using GSCs isolated from GBM of two other patients (TG16 and OB1 G5Cs) grown under proliferating and quiescent conditions. Dose response curves were also performed using f-NSCs (100 000 cells/well), HEK 293 and HA cells (50 000 cells/well).

Cell viability measurements

Proliferating and quiescent TG1 cells and 11A cells were treated with bisscodyl (10 µM, 1% DMSO for TG1 cells; 50 µM, 1% DMSO for HA cells) for 24 hours. Cell mortality was evaluated by trypan blue staining (0.1% (v/v)). Control cells were incubated for 24 hours in their medium in the absence or presence of 1% DMSO.

Evaluation of bisacodyl stability in cells' medium

Bisacodyl was dissolved in freshly prepared TG1 culture medium or quiescent TG1 conditioned culture medium at a final concentration of 10 µM in 1% DMSO. The solution was kept at room temperature. At given times (2 min, 2b, 4b, 6h and 24h), aliquots of 150 µL were taken and mixed with 150 µL of acctonitrile in order to precipitate proteins. After vortexing, the mixture was centrifuged at 15 000g for 10 min. Supernatants were analyzed by HPLC using a kinetex 2.6µ C18 100A (50x4.6 mm) column. Areas under the compound elution peaks were used for quantification. Reference solutions of bisacodyl or derivatives were used for calibration. Bisacodyl, its monnester derivative and the bi-phenotic form (DDPM) were eluted at 1.78 min, 1.56 min and 1.35 min, respectively.

Synthesis of bisacodyl and bisacodyl derivatives

Commercially available bisacodyl and DDPM could also be synthesized according to our reported procedures (S6 Methods). General methods for bisacodyl and bisacodyl derivative synthesis and reaction schemes are given as supporting information (S6 Methods). HPLC-MS chromatograms of all the compounds with the exception of commercial ones are presented in \$7 Methods.

Dose-response curves and EC50 calculations for SAR studies

All chemical compounds synthesized were dissolved in DMSO to obtain 10 mM stock solutions.

Proliferating or quiescent TG1 cells were seeded in 50 µL of their respective media (30 000 and 40 000 viable cells/well, respectively) into 96-well opaque bottom plates (Greiner, Courtaboeuf, France). Compound treatment was performed by adding 50 µL of compound solutions (in the presence of 2% DMSO in culture medium). Negative control wells contained cells treated with 1% DMSO and positive control wells contained cells treated with the antihistaminic drug Terfenadine (50 µM) (BIO-TREND) which was identified during the screening process and shown to be cytotoxic to all the cell types used in this study. ATP levels were measured 24b later and EC₃₀ values were determined as described above. All compounds were tested in triplicate in each experiment. Independent experiments were performed at least twice for almost all of the compounds.

Results

Quiescence of glioblastoma stem-like cells in vitro

Proliferating TG1 GSCs (Fig 1A, left panel) were previously selected and expanded in culture through the neurosphere assay. These cells were extensively characterized and showed long-term self-renewal, clonal properties and ability to initiate tumor formation in view thus fulfilling the criteria of tumor stem-like cells [23]. To achieve quiescence of TG1 GSCs *in vitro*, proliferating cells were seeded (day 0) and left without medium renewal. EdU incorporation and 7-AAD staining were used to assess cell proliferation and viability. GSCs maintained in culture up to 16 days without medium renewal were morphologically similar to their proliferating counterparts. They form neurospheres (Fig 1A) which at day 9 were similar to those formed under proliferating conditions and slightly looser at day 16. At day 0, just after cell passaging, 50–60% of the cells incorporated EdU (Fig 18). The percentage of cells going through the S phase increased significantly at days 1 and 2 and then returned to initial levels by day 4. A marked decrease was observed between days 4 and 8. The low level of DNA synthesis activity measured at day 8 remained almost similar between days 8 and 16. TG1 GSC viability

8 9 10 11 12 13 14 15 16 17





2 3 4 * 6 1

10 11 12 13 14 15 16 17

doi:10.1371.journel.pone.0134758.0001

6 ١ 1 3 4 13 -8 7 0 1

PLOS

ONE

measured at the same time points was not significantly decreased until day 9, whereas the number of cells incorporating EdU was already markedly affected at this time point (Fig.1B and 1C). At later time points, the number of viable cells decreased and then remained stable between days 11 and 16 (Fig 1C). Similar EdU incorporation profiles were obtained for OB1 and TG16 GSCs although the percentage of OB1 cells incorporating EdU was generally lower than the one observed for TG1 cells (Fig 1B for OB1 cells). To evaluate if quiescence was reversible, TG1 and OB1 cells left for 9 days without medium renewal (and called thereafter Q9 cells) were reintroduced into freshly prepared NSJ4 culture medium. Medium change was preformed twice, at day 9 and at day 13. As indicated in Fig 18, medium renewal led to an increase of the percentage of TG1 and OB1 GSCs incorporating EdU suggesting that cells are able to reenter the 5 phase, i.e. that the non-dividing state obtained by the absence of medium renewal is reversible. Cell cycle exit and reentrance of TG1 and OB1 GSCs was confirmed by cell cycle analysis using propidium iodide staining coupled to the study of modifications of Ki-67 protein levels, known to be high in dividing cells and low in non-cycling cells. As shown in Fig 2A, 2B and 2D, absence of medium renewal led to a significant increase in the number of TG1 and



Fig 2. Cell cycle analysis and Ki-67 expression in TG1 and OB1 GSCs under different *in vitro* culture conditions. (A) TG1 (apportance) and OB1 (lower panel) GSCs maintained in outure for 1.9 and 14 days without medium renewal (d1, d9, d14, respectively) or cells obtained after 9 days without medium renewal and subjected to freshly prepared culture medium for 5 days (G+5) were permeabilized and statenet with anti-Ki-67 antibodes conjugated to FITC and propiolum todde (P1) (B-E) Histograms represent the percentage of TG1 (B, C) and OB1 (D, E) cells present in the G1, S, G2/M phases of the cell cycle as well as the percentage of quiescent cells in GC and of cells showing DNA fregmentation (sub-G1). Cells in the G2/M phase were further distinguished as a function of the Ki-67 proliferation marker expression levels (G2/M high Ki-67 and G2/M low Ki-67). Analysis was performed on cells maintained for 1–14 days without medium renewal (B, D for TG1 and OB1 cells, respectively) or on cells off without medium renewal for 9 days (Q) and re-introduced into freshly prepared culture medium for 1 (Q+1), 2 (Q+2), 3 (Q+3), 4 (Q+4) or 5 (Q-5) days (G, E for TG1 and OB1 cells, respectively).

doi:10.137130.mei pore.0134798.g062

PLOS ONE

OB1 cells in the G0 phase with a maximum obtained after 8 days in non-renewed medium. From days 8 to 14, the percentage of cells in the G0 phase did not vary significantly (Fig 2B and 3D). Concomitant with the increase of the percentage of cells in the G0 phase, there is a decrease in the number of dividing cells (cells expressing Ki-67 in the G1, S and G2/M phases of the cell cycle) (Fig 2A upper and lower panels and Fig 2B and 2D). When Q9 quiescent cells were submitted to fresh medium, both TG1 and OB1 GSCs were able to re-enter the cell cycle as shown by the increase of the percentage of cells in G1, S. G2/M and the decrease of the number of cells in phase G0 (Fig 2A upper and lower panels and Fig 2C and 2E). Interestingly, the mRNA levels of p21, a cyclin-dependent kinase inhibitor, reported to control both entry into quiescence and maintenance of the quiescent state [26] and whose expression may be controlled by p53, were significantly higher (4 fold) in quiescent TG1 GSCs after 9 days without medium renewal compared to their proliferating counterparts. The expression of this gene decreased when cells were placed back in proliferating conditions (Fig 3A). No significant changes in the expression level of this gene were observed between proliferating and quiescent OB1 GSCs (Fig 3B) pointing to differences between these two GSC types. Of note, the percentage of cells showing DNA fragmentation (cells in sub-G1) did not significantly vary from day 1 to day 14 without medium change in TG1 and OB1 GSCs (Fig 2A upper and lower panels and Fig 2B and 2D), mRNA expression levels of p53, a known apoptosis regulator, showed a slight decrease (c.a. 50%) in Q9 quiescent TG1 GSCs which remained unchanged when these cells were reintroduced in proliferating conditions for 1-4 days (Fig 3A). No significant variations were observed in p5J expression levels in OB1 GSCs under similar conditions (Fig.3B). The mRNA levels of Bax, a mediator of mitochondrial apoptosis whose expression is controlled by p53, were also similar in proliferating versus Q9 quiescent TG1 and OB1 GSCs (Fig 3A and 30). These data reinforce the previous results and suggest that cells maintained in vitro without medium renewal for several days did not undergo massive apoptnsis. In addition, the absence of β-galactosidase positive TG1 or OB1 GSCs after 9 days without medium renewal suggested that the cells obtained under these conditions were not senescent (Fig 3D and 3F). Altogether, these data strongly support the conclusion that quiescent and viable non-dividing GSCs may be obtained in vitro after several days without medium renewal.

To determine whether quiescent culture conditions modify the stem-like phenotype of GSCs by inducing cell differentiation, expression of 90 well-defined genes validated as pluripotency or differentiation markers was analyzed in TG1 and OB1 GSCs grown under proliferating or quiescent conditions using TaqMan Human Stem Cell Pluripotency Arrays. Each array contains 7 genes expressed in undifferentiated cells or involved in maintenance of pluripotency, 31 genes correlated with stemness and 52 differentiation markers (see list in \$2 Table). 185 rRNA, which did not show any expression change under the experimental conditions tested, was used as housekeeping gene. Only genes with ACt (gene cycle threshold (Ct) minus 18s (RNA cycle threshold) values < 21 in at least one of the conditions tested were considered. Genes with ΔCt values > 21 corresponded to genes with low expression and poor signal to noise ratios. 23 genes were considered to be significantly expressed. As shown in Fig 4A and 411, most of these genes (but GBX2, IFITM1 and LAMC1 (only in OB1 cells)) did not show a major change in their expression between proliferating and quiescent states. Namely, no significant changes in gene expression were observed for the pluripotency markers Sox2 and Nanog (confirmed in Individual TaqMan assays for Nanog, see Fig 4C and 4D). Nanog expression was also evaluated at the protein level using FACS. More than 85% of the cells expressed this marker. This percentage remained similar between proliferating and quiescent cells (85% vs 89%, respectively, for TG1 GSCs; 88% vs 86% respectively, for OB1 GSCs). In addition, nuclear localization of Nanog was confirmed by immunocytochemistry (data not shown). Nanog expression also remained stable when quiescent cells re-enter the cell cycle (Fig 4C and 4D).



PLOS ONE





Fig 3. Expression of apoptosis and call cycle related genes and absence of senescence related activity in TG1 and OB1 cells under different in vitro culture conditions. (A-9) H stograms representing mHNA expression levels of p53, Bax and p21 genes in proliferating (P) and outecent (Q) TG1 (A) and OB1 (B) GSCs obtained after 9 days without medium renews or quiescent cells after 9 days without modium renews/reinforced in proliferating culture medium for 1–4 days (G-1-Q+4). Results were expressed as fold change (2^{+2,40C}) taking proliferating TG1 (A) or CB1 (B) cells as calibrator. 185 rRNA was used as housescenping gene. Data were from two independent experiments, each performed in duplicate. (C-E) Senescence-related β-galactesidase activity measurements in U-87 MG cells treated with TMZ (100 μM) for 5 days (C, positive control) and in quiescent TG1 and OB1 GSCs obtained after 9 days without medium for events(D, E, respectively). Scale bass: 100 μm.

dci 10.1971.journal parte.0194790.g003







Fig 4. Expression of stemmess, pluripotency or differentiation related genes in TG1 and OB1 cells under different *in* vitro culture conditions. (A-B) Histograms representing mRNA expression levels of stemmess, pluripotency or differentiation associated genes included in the TaqMan Human Stem Cell Pluripotency Array from Life Technologies in proiferating (P) and oulescent (Q) (9 days without medium renewal) TG1 (A) and OB1 (B) GSCs. Pesults were normalized to the 18S rRNA levels and expressed as ΔΔCt taking proliferating TG1 (A) and OB1 (B) GSCs as calibrator samples. Data are from three independent experiments, each penormed in duplicate. (C-D) Histograms representing mRNA expression levels of Nanog, GBX2 and FTM1 genes in proliferating (P) and quiescent (Q) TG1 (C) and CB1 (D) GSCs obtained after 9 days without medium renewal or quiescent cells after 9 days without medium renewal reintroduced in proliferating culture rendom for 1–4 days (Q+1-C+4). Results are expressed as in A-B. Data are from two independent experiments, cach performed in duplicate.

cct10.1371.jp.mel.pape.0134/58.g004

PLOS ONE

The expression of GBX2 and IFITM1, two other stemness markers which presented some variation between proliferative and quiescent states on the arrays, was further analyzed in individual TaqMan assays. As shown in Fig 4C and 4D, quiescence induced a slight increase in GBX2 mRNA levels in TGI GSCs (AACt -1.22 1/-0.3; fold change: 2.32 1/-0.48) and OBI cells (AACt: -0.75 +/+0.37; fold change: 1.68 +/- 0.43). These variations were reversed when quiescent cells re-entered the cell cycle (Fig 4C and 4D). The GBX2 gene product has previously been shown to promote reprogramming and maintenance of the pluripotent state of mouse embryonic stem-cells downstream of a LIF/Stat3-dependent pathway [27]. A greater change in expression was observed for IFITM1 when TG1 and OB1 cells became guiescent (AACE-2.66 -/- 0.75; fold change: 6.32 -/- 3.26 and AACt -2.82 -/- 1.02; fold change: 7.06 +/- 4.99, respectively) (Fig 4C and 4D). When cells were reintroduced into proliferating conditions (following medium renewal), IFIT MI expression decreased rapidly to reach levels similar to those observed in proliferating GSCs (Fig 4C and 4D). IFITMI was previously shown to regulate proliferation either negatively or positively depending on the cell model [28, 29]. Our data are in favor of an anti-proliferative effect of IFTTM1 since its expression increases in quiescent cells. Finally, a slight decrease in the expression of LAMC1, an early differentiation marker, was detected but only in quiescent OBI cells. On the overall, quiescence did not appear to cause major changes in the stemness of GSCs.

To further characterize quiescent TG1 and OB1 GSCs, we examined various properties previously described for these cells in proliferating conditions, namely the expression of cell surface markers, their clonal and differentiation properties as well as their engraftment ability after orthotopic injection in mouse brain. Concerning cell surface markers, quiescent GSCs expressed CXCR4 and CD56 and were CD133 negative, similarly to their proliferating counterparts (S1A-SIC (1g) [23, 30, 31]. In addition, quiescence did not alter IGI and OBI GSCs' clonal properties since isolated quiescent cells, when placed back into fresh culture medium, formed new neurospheres (S2A and S2B Fig). Moreover, as their proliferating counterparts. [23], quiescent cells kept their ability to differentiate when exposed to serum containing medium. Results for differentiation of both proliferating and quiescent TG1 and OB1 GSCs are presented in \$3 Fig. Serum addition led to cell adherence and morphological changes reflected by flattening and acquisition of a fusiform shape. These morphological changes were accompanied by a decrease in the expression of the stemness-related gene Sonic Hedgehog (SHH) in proliferating and quiescent TG1 GSCs and in proliferating OB1 cells (53B and 53D Fig). Concomitantly, a marked increase in the expression of the astrocytic marker glial fibrillary acid. protein (GFAP) was observed in proliferating TGI and OBI cells and in quiescent TGI GSCs (S3C and \$3E Fig). A significant change in the expression of the neuronal marker 83 tubulin (TUBB3) was only observed when quiescent cells (TG1 or OB1) were subjected to differentiation (S3B and S3D Fig). Altogether these data suggest that quiescent GSCs obtained in vitro maintain their differentiation ability when subjected to serum supplemented medium and point to a preferential differentiation (under the conditions used) towards an astrocytic phenotype.

The last point investigated in this study concerned GSCs' *in vivo* engrafiment ability. This property was reported previously for TG1 and OB1 GSCs [23, 30]. Results presented in 54 Fig suggest that intracerebral engrafiment was not altered when quiescent GSCs were injected into immune-deficient animal brains. Indeed, eight weeks after orthotopical injection, human cells were present in mouse brains, with no differences in cellularity whether injected cells were proliferating or quiescent (S4A and S4D Fig). In addition, in both cases, Ki-67 positive cells were detected, suggesting that the quiescent phenotype may be reversed *in vivo* (S4C and S4D Fig).

Altogether, the results presented suggest that i) quiescence can be obtained in vitro for GSCs, ii) quiescent GSCs retain the stem, clonal, differentiation and its vivo engraltment properties of their proliferative counterparts. GSCs were thus designated as quiescent after 9 to 16 days in culture without medium renewal.

Prestwick Library screening of proliferating and quiescent GSCs

The Prestwick Library was screened in order to find molecules with cytotoxic activity on proliferating and /or quiescent GSCs (Fig 5A). In the primary screen (Fig 5B), about 5% of the compounds tested significantly reduced the relative ATP level of proliferating or quiescent TG1 cells. Of the 1120 compounds, 57 were active on proliferating cells and 69 on quiescent GSCs, with 40 compounds exhibiting similar effects on both cell types. Seventeen compounds triggered an increase in ATP levels.

To confirm hits from the primary screen, a secondary screen was performed on 86 compounds that reduced relative ATP levels and 16 molecules that increased them. The secondary screen confirmed the activity of approximately 50% of the compounds that lowered ATP levels (29/57 compounds for proliferating TG) GSCs and 33/69 for cells grown under quiescent conditions) (Pig 5C). Twenty-three of the confirmed hits were active on both proliferating and quiescent TG1 GSCs. None of the 16 compounds tested for their potential to increase cell ATP levels was confirmed. Results of primary and secondary screens are summarized in 53 Table.

Dose-response curves were generated using both proliferating and quiescent TG1 GSCs for 20 out of 39 active compounds selected in the secondary screen (list in Table 1). Compounds excluded were antibacterial, antifungal, anti-parasitic agents or molecules endowed with known detergent activity. All those excluded compounds showed activity on both proliferating and quiescent cells. Preliminary experiments were performed on the 20 selected compounds to verify that measured luminescence changes were related to an effect of the tested molecule on cell A1P levels and not to an interference with the readout setup. Analysis of the different dose-response curves allowed classifying the compounds into three groups, according to their EC₅₀₀ values for TG1 GSCs in either their proliferative or quiescent state (Table 1). Structures and amile codes of the twenty hit compounds are represented in 54 Table.

Representative results of the activity profiles of each group are shown in Fig 6A. Soloctidil, a vasodilator, is representative of a group of compounds (group 1) with cytotoxic activity towards both proliferating and quiescent TG1 GSCs (Fig 6A, left panel). For this group, compound EC₄₀ on proliferating GSCs was less than two-fold higher or lower compared to the value observed on their quiescent counterparts. Twelve compounds belong to this family (Table 1). The antipsychotic zuclopentnized bydrochoride (Fig 6A, middle panel) is representative of a group of 4 molecules which exhibited higher activity towards proliferative cells (group 2). In this group, compound EC₅₀ was more than two fold lower for proliferative TG1 GSCs compared to quiescent cells. Group 3, represented by the laxative bisacodyl (Fig 6A, right panel) unveils molecules with selectivity for quiescent TG1 GSCs. In this group, EC₅₀ of a given compound was at least two fold lower for quiescent TG1 GSCs compared to proliferative cells. Bisecodyl was the molecule with the lowest EC₅₀ and which appeared with outstanding specificity for quiescent TG1 GSCs (Fig 6A right panel and Table 1).

The activity of the 20 molecules was further tested on stem-like cells derived from two other distinct burnan gliohiastomas (TG16 and OB1 GSCs). As for TG1 GSCs, dose response curves were performed on cells grown under proliferating and quiescent conditions. Activity profiles and EC_{s0} values obtained were similar to those observed for TG1 GSCs (Table 1 and Fig 7).

To determine the specificity of the selected compound towards GSCs, dose-response curves were performed on the non-cancerous neural cells f-NSCs, and HA cells as well as on to the non-neural cell line HEK 293. Most of the 20 compounds, namely those belonging to groups 1 and 2 (Table 1), showed cytotoxicity, after the 24 hours of the test, towards all the cell types



Fig 5. Prestwick Library screen on GSCs using the ATP-Glocell based assay. (A) Schemalic representation of the assay design and protocol. GBM globlastomal (B) Resalts of the primary screen are represented as histograms of the relative ATP signal lovels obtained for much compound screened against proliferating (block cars) and quiescent (open bars) TG1 cells. Molecules producing ATP levels that exceeded 200% of the control lovels are not ahown. Zoom in of results for compounds with an ATP level below 55% of the control levels is provided. A compound was considered as a hit enter if it reduced relative ATP levels to less than 5% of control levels (compounds on the left of the drange dotted line) or if the corresponding luminescent signal was lower than the mean signal of negative control wells minus 5 times the standard deviation from this value (number of molecules indicated on the top of each cert. (C) 85 compounds reducing relative ATP levels and 16 molecules increasing relative ATP levels were tested in a secondary screen at concentrations of 5 and 50 µM. Results of the secondary screen performed at 50 µM are shown following the same representation as in (B).

col.10.1371/journel.pone.0134798.g005

PLOS ONE

ATC	Compound name	Therapeutic/	F TG1 GSCs EC ₅₀ (µM)	G TG1 GSCs EC ₅₀ (µM)	P TO15 OSCe EC _{s0} (µM)	Q TG16 GSCe EC _{s0} (µM)	P 081 GSCs EC _{s0} (µM)	G OB1 GSCe EC _{s0} (µM)	Astrocytee (HA cells) EC ₂₀ (µM)	EC:0	HEK 293 EC _{s0} (µM)
classification		phermacological clase									
Group 1				10.00	-		- 120	in the second			
CO18D01	Amiodarone hydrochlosda	Cardiovesdullar system/ Antisin'hythreio/Adrenergic blocker	1053	1069	11=1	14:5	12=1	1921	22::7	10	2524
CO IDX02	Prenylamine lectate	Vesodilatator	22:3	2723	32-2	42±8	3017	49±4	30-2	8=2	25:16
D04AX19	Sulocitidi	Vasodilatator peripheral/ Hypolipidemic	11:1	1321	13.5	14:5	15±2	2014	11=1	51	10:11
008CA02	Felodipine	Cardioveacular system/ Antihypertensive/Calcium channel blocker	58±1	90±3	39::4	9323	4325	4126	0625	59±12	55±2
COSEA01	Fendtine Hydrochloride	Cartfoveact ar system/ Antianhythmic/Antiangina/L- calcium channel brocker	22±1	32-1	42±1	45=16	40±13	464.9	4256	11±1	34±9
D08EX02	Pernexil n maleate	Cardiovascular/Vasiditate/of	10:1	1443	11:1	2144	1211	2214	1212	3:1	1211
6030C03	Lynesinonol	Progesogen	3812	4318	32:2	2848	2615	58a10	20=1	2515	5748
KEGG Brite D09154	Elipticine	Anticarcier	13a1	1925	13.1	58±10	8±1	3049	ā±1	7:2	1342
LO2BACT	Tempsifen citrate	Anticursion	14:2	2011	21.1	2043	2813	2913	15±4	1419	30±10
NCGADOS	Sertraine	Antidepressant/Psychoanaleptic	1941	3841	3141	44.19	32111	4542	24=1	1012	234*
P02CF01	lverneolin	Antiparastik/Antheimintk/Acaricid	311	411	1.5	6=2	a _{s1}	762	311	4:1	1347
KEGG C08921	Della Escin	Peripheral vascular disorders/ Anticedenatious/	1713	12.3	611	841	1211	đ±1	7±1	nd	31.1.1
		Amiinflummatory/Glucoconticoid like?									
Group 2			-								
NESAF05	Zuckpenthool hydrochloride	Ampsycholic	2043	62:3	2915	48±18	2719	≥ 100	12=1	1311	2911
R06AX11	Astemizole	Antihistaminic	12±2	28+3	17±2	5848	1315	43±16	19=4	6.3 ±0.2	214B
RC6AX12	Terferadne	Antihisteminic	B±1	17±1	9±1	24±6	10:2	22±4	9:2	4=1	Ec.I
KEGG Bitte CPD C07609	Partnenolide	Antlinfiammatory/Antsecretory/ Spasmo ytic	15:2	4826	10±2	nd	1524	35±11	69±4	8.4 10.2	13::5
Group 3		and a set of the set									
A06A802	BisacodM	Cathartic lexative	> 100	1.07 ±0.04	> 100	1.3	> 100	0.5 ±0.1	0.8-40.3*	> 100	> 100
D03CC01	Etheorynic add	Diurebo	81111	41±11	>100	12:22	60±20	24:5	> 100	21:11	> 100
KEGG (01514	Luteolin	Expectorant	> 100	2012	> 100	34:14	> 100	1524	> 100	70:36	> 100
G03DA04	Propesterone	Propestogen	> 100	25111	75:5	25±9	69-29	23-11	> 100	= 100	38:10

Table 1, EC50 values of Prestwick Ubrary hit compounds on the different cell types tested,

PLOS ONE

Screening of the Prestwick Library on TG1 human glioblastome stem-like cells (GSCa) unversed 20 molecules decreasing the relative ATF even in these cells. Dose response curves were performed with the 20 molecules using ATP Glo assay as readout. Molecules were tested on S different types of proliferating (P) and quiescent (Q) GSCs (1G1, TG16, GB1), non-cancer neural cells including human fetal neural stem cells (FNSC) and primary asprocytes (HA cells) as well as HEK 293 cells, a non-cancer and non-neural cell line. Hits are classified into 3 groups according to their differential activity or not or proliferative and quiescent TG1 GSCs. In each group, molecules were clustered according to their ATC (Anatomical, Therapeutic, Cimican classification, not not determined.

* The maximum effect observed for this compound on HA cells was a reduction of only 50% of ATP, evels which was not due to call death.

doi:10.1271.jp.me.pone.0134783.4001



Fig 8. Dose-response curves for compounds exhibiting the strongest cytotoxic effect on GSCs. (A) Chemical structures of sciented compounds and dose-response curves of succidid (kn), zuccepenth xel HC (middle) and bisaccidyl (right) with representative activity profiles on proliferating (-) and subscient (**A**) TG1 GSCs. The fitted signoidal logistic curve to ATP-Glo cell survival assay readouts is shown on each plot (n = 3). (B) Dose-response curves of subclicit (left), zuccepenthize HC (middle) and bisaccidyl (right) on proliferating TG1 cells (-), quescent TG1 cells (**A**), human primary astrocytes (-) and human fetal neural stem cells (C). Curves were fitted as in A in = 3), (C-D) Cell visibility measurements (typen blue staining) on proliferating (P) or quescent (Q) TG1 cells (C) and HA cells (D) treated with bisaccidyl (compound 1 in Fig 9).

doi:10.137130.mei.pone.0134793.g006

PLOS ONE



Fig 7. Activity of Prestwick Library hit compounde on GSCs and control cell types. Graphics: presentation of the activity of the high-throughput screen hit compounds (expressed as 1/EC₅₂) on proliferating (P) and quiescent (Q) GSCs derived from three patients (101, 1016 and DB1), human primary astrocytes (HA cells), numanified neural stem cells (FNSC) and a human embryonic kidney cell ine (HEK 293). Upper, middle and low panels: group 1, group 2 and group 3 molecules as defined in Table 1, respectively. EC₅₀ values correspond to mean values calculated from fitted dose-response curves to ATP-GIo assay readings of three independent experiments (n = 3). *: Given that the moximum effect of beacody on HA cells is a 30% reduction of ATP kivels which is not que to get death (see Fig ftD), the corresponding EC₅₀ value was not taken into account. **: EC₅₀ values observed >100 µM, ***: EC₅₀ values not determined.

doi:10.1371.journal.pone.0134798.g007

tested, whether they were neural or not, cancerous or not (Table 1 and Fig.7). Compounds of group 3 which showed higher activity on quiescent GCSs compared to proliferative ones were mostly inactive or showed reduced activity on the other cell types. One molecule, bisacodyl, stood out from the rest by showing a specific activity on GSCs grown under quiescent conditions, with a low EC₈₀ -1 µM (Figs 6A and 7: Table 1). For quiescent TG1 GSCs, trypan blue and 7-AAD staining indicated that the ATP level decrease induced by bisacodyl resulted from cell death (Fig 6C). In addition, bisacodyl showed no activity on 5-NSCs and HEK 293 cells (Table 1, Figs 6B and 7). A decrease in the relative ATP level could be observed for 11A cells (primary astrocytes) (Fig 6B). However, using trypan blue exclusion, we showed that bisacodyl did not alter HA viability (Fig 6D), suggesting that this compound might induce metabolic changes in these cells.

Altogether, these data, pointed to bisacodyl as a highly potent and selective inhibitor of quiescent GSC survival. This property drew our attention and triggered further investigation of the molecule.

Bisacodyl acts on GSCs via DDPM, its active metabolite

Bisacodyl (The 6A upper-right panel) is a marketed laxative compound corresponding to a prodrug. Following oral administration, it is rapidly converted to its active metabolite 4.4 -dibydroxydiphenvl-2-pyricyl-methane (DDPM) also known as BHPM, through hydrolysis of its two acetyl groups [32]. To get deeper insight into the active compound under our experimental conditions, stability of bisecodyl in GSCs' culture medium as well as activity of DDPM on TG1 GSCs were investigated. Stability of bisacodyl in the culture media (freshly prepared medium) for proliferating conditions, conditioned medium in contact with quiescent cells for 9 days for quiescent conditions) was followed as a function of time using HPLC as indicated under Materials and Methods. Bisacndyl eluted from the column as a peak at 1.78 min. In proliferating condition medium, this peak disappeared with a half-life of 4 hours whereas a half-life of 2 hours was observed in quiescent cell conditioned medium (Fig 8A and 8B). Concomitantly, in both proliferating condition culture medium and quiescent cell conditioned medium, two other peaks appeared on the chromatogram. One of them, with a 1.56 min retention time, was transient and corresponds to the monoester derivative of bisacodyl (compound 3 in Fig 9). The second, with a 1.35 min retention time, corresponds to DDPM (compound 2 in Fig. 9). As shown in Fig 88, DDPM was the only derivative present in the quiescent TGI GSCs' conditioned medium after 24h. Evolution of the areas under the three peaks as a function of time (Fig 5A and 8B) is in favor of the hydrolysis of hisacodyl (Fig 5A upper-right panel and compound 1, Fig 9) in the culture medium and formation of DDPM (compound 2, Fig 9). As ATP level readouts were performed after a 24h of GSCs incubation with bisacodyl, one might suggest that the effect observed was due to DDPM. The effect of DDPM (obtained commercially or synthesized in-house) on the relative ATP level of TG1 GSCs was therefore evaluated. Experimental results were totally superimposable to those obtained using bisacodyl (data not shown) with the same specificity towards TG1 GSCs grown under quiescent conditions, suggesting that bisacodyl (Fig 6A upper-right panel and compound 1, Fig 9) is hydrolyzed to its active DDPM derivative (compound 2, Fig 9) in the cell culture media of both proliferative and quiescent IGI GSCs. A similar activity profile was obtained with compound 3 (Fig.9), the monnester derivative of bisacodyl,

Bisacodyl pharmacophore identification

With the aim at identifying the pharmacophore elements present on DDPM (compound 2, Fig. 9), additional derivatives were synthesized (Fig.9). The importance of the two hydroxyl groups







cci 10.1371/journal.pone.0134793.g008

was investigated through synthesis of non-hydrolysable methoxy- derivatives (compounds 4 and 5, Fig.9). Compound 4 with two methoxyphenyl rings was inactive on both proliferative and quiescent TG1 GSCs, whereas compound 5 with one free phenol group and one methoxyphenyl ring was, similarly to DDPM, active on quiescent TG1 GSCs only, albeit with a 8 fold higher EC_{sto}. Compound 6 in which the hydroxyl groups of DDPM (compound 2) were removed can be considered as inactive, similarly to compound 4. On the other hand, compound 7 where only one of the two hydroxyl groups of DDPM was removed behaved similarly to compound 5 and exhibited selective activity on quiescent TG1 GSCs with an EC₃₀ of 17.1 \pm 6.3 μ M. Solubility measurements indicated that the lack of activity of compound 6 was not due to reduced solubility (data not shown). The activity of the molecule thus appeared to require at least one phenol group in the structure. The second phenyl ring is however important since a total loss in activity was observed for compound 8 where one of the phenol groups was moved.

Compound	Dischos	il journariel cogentierentsi	Profession FGT-GSCs FCst-grWi	Esclescent FG1 GSCs ECar (J/W)	Compound (contrat	Shume	onumber of dependents	Polifimiting TET GBCs ECe (JW)	Duinscett FOI DECs (FC= (JM)
4	ida	<u>s</u> ?	>139	167 = 0.64		"ola"	4	> 10E	124 6 8 9
	"ea.	2	>155	1.8 ±0.9	17	"ola	×.	60.5 ±10,4	14.2 ± 9.8
1	1,000		2°30	15+05	0		1	No acostly	No activity
*	-ora-		No activity	No.adivity		rolai	ħ.	-100	*10
	"cla	*	×100	88+66	15	"ola	\$	-100	0.9 ± 2.9
•	Se	2	~m	54.8 + 8 *	16	"ola"	ĩ	~100	39.9 ± 2.0
	o°o.	2	94193	17.1 ±0.3	-at	20.	- (4)	No amility	204600
2 4 8	e.	8	No scierty	No octivity	18	.ofc.		No actually	0.35 ± 0.36
(6)		2	No solvity	078±0.7	-19	. Somer	F	No entivity	5.84
10	ofc.		>:30	48±14					

Fig 9. Structure-activity data. Tables representing structure-activity data of bisacody (compound 1) and bisacody derivatives (compounds 2-19) on proliferating and quiescent TG1 globbastomu stem-like cells (GSCs). The ATP-Glo cell survival assay was used to measure compound act vity. Compound structures are shown. Compounds were tested in triplicate in each experiment.

doi 18.1371.journal parte.0134759.g008

PLOS ONE

to the ortho position. Interestingly, the p-chloro- and p-irribuoromethyl-phenyl monophenols 10 and 11 retained activity (ECs₀ = $4.0 \pm 1.4 \,\mu$ M and $12.4 \pm 6.9 \,\mu$ M, respectively) with an excellent selectivity versus proliferating TG1 GSCs, suggesting that pharmacomodulation is possible at this position.

To a second step, the importance of the pyridyl ring and the position of the nitrogen atom on the ring were investigated. Phenyl replacement of the pyridyl ring (compound 12) resulted In an at least 10 fold activity decrease of DDPM (compound 2) towards quiescent GSCs. Furthermore, the compound presented activity on cells grown under proliferative conditions, although high concentrations were needed for activity. Removing the pyridyl group (compound 13) or forming a methyl pyridinium (compound 14) resulted in a total loss of activity towards TG1 GSCs. The importance of the nitrogen atom position on the pyridyl ring was also investigated. Compounds 15 and 16 with nitrogen in positions meta and para, respectively, kept their total specificity towards quiescent GSCs. However, their efficacy was decreased compared to DDPM (compound 2), with a \sim 8—fold increase in EC₅₀ for compound 15 and \sim 40 fold for compound 16. Those data suggested a role of the pyridyl ring in the activity of DDPM (compound 2) towards GSCs and its specificity towards cells grown under quiescent conditions. Optimal activity was obtained with the nitrogen atom at the ortho position of the ring.

We further checked the incidence of pyridyl ring substitutions. As shown in Fig.9, mono bromide substituted derivatives appeared promising. Bromide at position 6 of the pyridyl ring (compound 17) did not alter activity and specificity. Furthermore, compound 18, with the bromide at position 4, showed increased activity towards quiescent GSCs compared to compound 1. DDPM (compound 2), thus appears amenable for further structure activity relationship (SAR) studies aiming at increasing its activity.

The position 6 was also explored for the production of derivatives that could be used for other purposes and namely target identification. Addition of a linker at this position led to compound 19, which retained activity and selectivity as DDPM (compound 2). This result opens the possibility to synthesize substituted resins or to develop derivatives for pull down assays. A target identification program based on related compounds is currently under investigation.

In conclusion, our results indicate that bisacodyl (compound I, Fig P) acts through its descetylated metabolite, DDPM (compound 2, Fig P), and the minimal pharmacophoric pattern consists in a p-hydroxyphenyl-aryl-pyridyl-2-methane. Minor modifications lead to changes in potency and/or specificity though pharmacomochilation appears feasible both on the aryl and pyridinyl nuclei, as currently studied. The SAR study is currently on-going and will be disclosed later.

Discussion

Scientific literature of the past several years points to the presence of quiescent, slow-cycling cancer stem-like cells in a number of turnor types [14]. Namely, a restricted cell population of Ki-67 negative and nestin positive cells was identified in a murine glioblastoma model and stem-like cells with molecular signatures applying to slow-rate dividing cells were evidenced by a single-cell RNA-seq approach [33, 34]. "Furnor cell queescence including the dormant phenotype observed for cancer stem-like cells in vivo, represents a major mechanism underlying treatment resistance or tumor recurrence and/or metastasis several years following initial therapeutic intervention [33, 35, 36]. Cellular quiescence is defined as an actively maintained state of proliferation arrest with cells being able to re-enter the cell cycle in response to proliferating stimuli. Quiescent cells are characterized by the lack of expression of proliferation and apoptotic markers, low rate of BrdU incorporation and label retention properties indicating a low turnover [36]. In this study, we have identified culture conditions that induce is vitro quiescence of GSCs. Quiescence of these cells was demonstrated by reduction of EdU incorporation. lowering of Ki-67 expression with concomitant absence of significant variations in the expression of apoptosis-related genes. In addition, increased expression of the cell cycle negative regulatory protein p21 was observed in quiescent TG1 GSCs. Interestingly, our data point out the reversibility of the quiescent state following re-exposure to proliferating culture conditions. In addition, we show that quiescent GSCs obtained in vitro retain all the characteristics of their

proliferating counterparts including cell surface and stent-cell marker expression, clonal and differentiation properties as well as *in vivo* engraftment ability. Quiescent GSCs as well as their proliferating counterparts were subsequently used in a screening assay aiming at identifying compounds with activity on these cells.

Screening the Prestwick Library using the ATP-Glo cell assay, disclosed 20 molecules that decreased cells' ATP levels in a dose-dependent manner. Changes in ATP levels may reflect alteration in either energy metabolism and/or cell survival. The complete drop in cell ATP level observed in the presence of most of the active molecules we identified, points to a cytotoxic effect.

The Prestwick Library is mainly composed of FDA-approved drugs plus some natural substances. Most hit molecules can thus be clustered according to the ATC (Anatomic, Therapeufic and Clinic) classification (Table 1). Seven out of the twenty hit molecules belong to anatomic group C of molecules acting on the cardiovascular system, although with different therapeutic indications and pharmacological modes of action. Nine more molecules belong to six other anatomical groups and four molecules are natural products. Among those twenty molecules, only tamoxifen and ellipticine are considered as anti-cancer drugs. The Prestwick Library contains 60 other molecules labeled as anticancer drugs. Most of them are antiproliferative agents. However the experimental screening conditions used in the present study, with short time exposure of cells to chemical compounds (24h compared to 48h or 72h classically), did not uncover those anticancer molecules. Tamoxifen, an estrogen receptor (ER) modulator derived from triphenylethylene, is used for ER-positive breast cancer treatment and prevention of breast cancer in high-risk women [37]. At doses in the micromolar range, the compound also exerts ER independent cytotoxic activity on different cell types [38-40]. Cytotoxicity towards human and ratigliome cell lines was reported to occur via PKC, PI3K/AKT, INK and ERK signaling pathways [41, 42]. Tamoxilen has also been evaluated, in association with temozolomide, as a second line therapeutic strategy for the treatment of recurrent glioblastoma [43]. Recently, apoptotic cell death induced by famoxifen (with EC to values of approximately 30 (rM) has been reported in the tumorigenic human neural dial cell line HNGC-2 which forms neurospheres and presents neural stem cell markers [14]. This is in agreement with the cytotoxic effect on human GSCs observed in the present study. However, our data also point to the lack of specificity of the molecule at those doses, as it presents the same efficacy towards non-cancerous cells such as human astrocytes and neural stem cells. In addition, the activity of the molecule does not seem to be related to the proliferative state of the cells, as similar efficacy was observed for proliferative and quiescent GSCs.

The second molecule, ellipticine, is a planar alkaloid isolated from *Apocyanaceae* plants. A methyl-hydroxy derivative (Celiptium) was developed by Sanofi for treating metastatic breast malignancies, but the drug showed numerous adverse effects. Besides its intercalating properties and inhibition of topoisomerase II, ellipticine and derivatives act on a variety of targets [45–49]. Ellipticine presents cytotoxicity towards various cancer cell lines including U-87 MG glioblastoma cells [50–53]. Recently, the molecule has been shown to reduce problemation and self-renewal ability of aldehyde dehydrogenase 1 class A1-positive breast cancer stem cells [54]. On GSCs treated for 24b, the cytotoxic activity of ellipticine is uncovered at concentrations > 10 μM. A difference in sensitivity between GSCs can be observed as OB1 and TG16 GSCs appear more sensitive to the molecule when grown under proliferative conditions, whereas TG1 cells exhibit the same sensitivity, whether proliferating or quiescent. However, the cytotoxic activity of ellipticine is and the molecule acts, even with higher efficacy, on non-cancer cells (HA cells and t-NSCs in the present study).

Among the hit molecules retained in our screening setting and used in other non-cancer indications, some were already reported to reduce cancer cell viability. Among the molecules in group 1 (Table 1), the vasodilator drug prenylamine has been shown to induce an intracellular calcium increase and cell death in human ovarian tumor cells at a concentration of 100 µM [55]. However, this molecule shows high risks of cardiac arrhythmias and its antiproliferative activities were not further investigated. Fendiline, known as a L-type calcium channel blocker was shown to inhibit, in a calcium independent manner, the survival of human oral cancer cells (OC2) at concentrations between 5-25 µM [56]. In the same concentration range, fendiline inhibits K-Ras signaling in a variety of cancer cells (pancreatic, colon, lung and endometrial) that express oncogenic K-Ras and, as a result, their proliferation [57]. The calcium antagonist vasodilatator perhexiling was also reported to decrease proliferation of the human colon cancer cell line HT29 with an EC26 of cs 10 µM [58], and in the micromolar concentration range, to stimulate phagocytosis and induce mTORC1 inhibition in MCF7 cells [59]. These latter two activities were shared, at concentrations > 10uM, with antiodarone, a highly prescribed antiarrhythmic agent which acts on diverse ion channels, namely the (Ns⁽⁴⁾/Ca⁽²⁻⁾ exchanger (NCX), L-type Ca⁽²⁺⁾ channels and Na⁺⁺ channels. Antiproliferative activities of the molecule on prostate cancer cells through potassium channel inhibition was reported earlier [60].

The secotonin reuptake inhibitor sertraline was shown to induce apoptosis of PC-3 cells. [61] and human MG63 osteosarcoma cells [62] at concentrations of ca 30 μ M. The drug also exerted a cytotoxic activity on the U-87 human GBM cell line with an BC₅₀ of 8 μ M and acted in synergy with imatinih to decrease U-87 cell proliferation via a drastic decrease in Akt phosphorylation and in an additive manner with temozolomide [63]. An antiproliferative phospho-Akt dependent activity of the drug has also been reported for melanoma cells [64]. Clinical trials using sertualine in combination with standard treatments have been performed for glioblastoma and colon cancer [65, 66]. The molecule also appeared in the list of nine repurposed drugs that could be used as adjuvants in new innovative GBM care [67]. In the present study, we show that sertraline also exhibits cytotoxicity towards GSCs at concentrations of ca 20 μ M. However it shows the same potency towards the non-cancerous human astrocytes.

Cancer cell growth inhibitory effects and chemosensitization have also been reported for the anthelmintic drug ivermectin on human ovarian cancer cells [68, 69] and leukemia cells [20]. The molecule acted in the 5–20 µM range through mechanisms such as inhibition of the oncogenic protein kinase PAK1 [68, 69], inhibition of importin/HE4 (human epididymis protein 4) [71] or increase in ROS production [76]. Antiproliferative activities and chemosensitization are also properties of heta eacin, a natural mixture of triterpenoid saponins which acts on leukemia cells [72], hepatocellular carcinoma [73, 74], cholangiocarcinoma [75], human lung carcinoma A549 cells [76], human acute leukemia lurkat T cells [77], human colon carcinoma cell lines [78] and pancreatic cancer cells [79]. Several mechanisms appear to sustain the activity of the molecule, namely apoptosis [75], downregulation of)AIG/STAT pathways [74, 76] and inhibition of nuclear kappa B factor [60, 81]. The involvement of the antihypertensor and antianginal felodipine in cancer cell death is not very well documented although one report involved this compound in cholangiocarcinoma [81].

Thus, most molecules of group 1, showed activity on other (non-stem-like) cancer cell types (even if information is sometimes limited) at concentrations in the same range as those reported in Table 1 for their cytotoxicity on proliferating or quiescent GSCs. However, at these concentrations, the molecules were also cytotoxic towards non-cancer cells and namely astrocytes, HER 293 cells and neural stem cells.

Concerning molecules of group 2, the histamine 111 receptor antagonist asternizole, currently used as antimalarial and antihistaminic drug, has been proposed as a potential chemotherapeutic agent [83–85]. Its anti-proliferative activity occurs through different mechanisms, namely by targeting proteins involved in cancer progression including human ether a-go-go-1 (hEag1) and Eag-related gene (hErg) potassium channels [83, 85–89] and by modulating autophagy [84]. Terfenadine, a second histamine 111 receptor antagonist has previously been reported for its apoptosis-inducing properties against a variety of cancer cells [90–92], including human melanoma cells [93, 94] and more recently prostate cancer cells [95]. The molecule appears to act through a variety of mechanisms, some implying changes in calcium homeostasis or ROS production. So far, there are no reports of terfenadine effects on human glioblastoma. In the present study we show that terfenadine and astemizole show cytotoxic activity on GSCs with higher efficacy on proliferating cells (EC_{50} of cs 10 µM; comparable to the one measured for other cancer cells). The molecules remain active on quiescent cells, but EC₅₀ values are increased by about two fold. As for the other molecules already discussed, there is no specificity for cancer cells compared to non-cancer cells. In addition, their activity on ether a-go-go K⁺ channels (IC₅₀ in the nanomolar range) also sustains the cardiotoxic effect of these molecules with O1 interval prolongation and torsades de pointe [96–99].

Cytotoxic activity of the sesquiterpene lactone purthenolide has been reported several decades ago [100, 101]. Since, the molecule was shown to act on various cancer cell types. including GBM cells [102-104] in which it induced apoptosis via an AKT/NF-kB dependent pathway [104]. However, as for other cancer cells, more pathways may be activated [105-107]. ECsp values between 13 and 29 µM were determined for different GBM cells (U373, U-87, C6 and U138 MG), similar to those reported here for proliferative GSCs (Table 1). Astrocytes appeared less sensitive to parthenolide with an EC₅₀ value of $186 \pm 10 \,\mu\text{M}$ in the literature [104] and 59 ± 4 µM in our study. Recently, structurally related molecules with activity towards. a variety of cancer cells in the nanomolar and low micromolar range were obtained [168]. As far as the neuroleptic zuclopenthixel is concerned, only one publication relates its possible involvement in apoptosis of mouse lymphoma cells. [109], Zuclopenthixol is the cis-isomer of clopenthized, a mixed antagonist of dopaminergic G-protein coupled receptors D1 and D2 [110]. A comparative GPCR receptor expression study in TG1, OB1, HA and f-NSC cells performed in our laboratory [31] pointed to DR2 receptor expression in these cells. However, the high concentrations of zuclopenthizol required to induce cytotoxicity do not suggest the involvement of this receptor in GSC cell death induced by this compound.

Molecules in group 3 correspond to compounds with selectivity towards guiescent GSCs. Interestingly, two compounds of this group, ethacrynic acid (FA) and luteolin, are known inthe literature as chemoadjuvants or for their anticancer properties towards a variety of cancer cell types. EA, a loop diuretic which inhibits the Na⁽¹⁾-K⁻¹-2Cl⁻¹ kidney sympost, presents, additional effects and namely inhibitory activity towards glutathione S-transferase [111] which was used to overcome chemotherapeutic drug resistance [112-115], including in GBM [116]. Besides, EA was also shown as an inhibitor of multiple myeloma [117-119], renal cancer, as well as of chronic lymphocytic leukemia cell survival [120] by interfering with the Wht/betacatenin signaling pathway [12] [Depending on the cell type, concentrations between ca 40 and 230 µM were required to induce cell death. At those high concentrations, cytotoxicity of the molecule can be observed for TG1 and OB1 GSCs in the proliferative and quiescent state (Table 1). As we did not test our molecules at concentrations above 100 µM, no information can be given for an effect of EA at high concentrations on proliferative TG16. Among the noncancer cells tested here, f-NSCs appear the most sensitive to EA with an EC₁₀ of 21 ± 11 µM. This difference in activity of EA depending on the cell type or physiological state of the cell may be further explored.

Luteolin, the second molecule of group 3 with known potential anticancer activity is a bioflavonoid (3.4.5.7-tetrahydroxy-flavone) found in various plants, including dietary food vegetables. The molecule shows antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activities [122-124]. The efficacy of the molecule relies on a variety of mechanisms as reviewed in [122, 125-127]. More recently, apoptosis and inhibition of the JAK/STAT3 pathway in cholangiocarcinoma [128], upregulation of miR34a in gastric cancer cells [129], apoptosis and upregulation of Fas signaling in Hep-2 cells [130], apoptosis and interference with PI3K/Akt/ mTOR signaling in non-small cell lung cancer [131], cell cycle arrest and apoptosis of liver cancer cell lines [132], ROS generation and intracellular copper mobilization in different cancer cell types [133] and inhibition of cyclin G-associated kinase in PC-3 prostate cancer cells [134] were reported for lutenlin. Effective concentrations vary, depending on the cell type and the time of exposure, between 8 and 50 µM. Concerning neural cancers, it was shown that under non-cytotoxic doses (15-30 µM), latenlin interferes with GBM cell migration (135). Only one publication deals with luteolin effects on glioma stem-like cells and shows that treatment of U251 glioma stem-like cells with 10 µM lutcolin significantly inhibits their sphere forming abilities [136]. To the present study, cytotoxicity of lutenlin at concentrations below 100 µM was only observed for GSCs in the quiescent state, pointing to differences in signaling pathways between the two states. The present study also discloses a higher resistance of proliferating OSCs towards luteolin compared to other cells tested in the literature (which, with one exception, were non-stem-like cells). Interestingly, under the concentrations tested, luteniin did not show any effect on astrocytes and HEK 293 cells and high concentrations are required to affect f-NSCs. Thus, through its pientropic targets, lutenils appears as a potential therapeutic agent, but a poor pharmacological tool which does not allow better knowledge of GSCs' pathophysiology.

No cytotoxicity or antiproliferative activity towards cancer cells was attributed so far to the remaining compounds identified in our screening, *i.e.* subortidil and lynestrenol in group 1 and bisacodyl and progesterone in group 3. Subortidil is a vasodilator and anti-platelet agent that has recently been found in a repurposing screen at 50 µM to have fungilytic activity on Cryptococcus neoformans (a property shared with several other molecules found in the present screen, namely perhexiline, tamoxifen, amiodarone and sertraline [137]. However, as opposed to the other molecules, no antitumor activity has been reported for this compound. Its activity profile on GSCs and non-cancer cell lines is similar to the one observed for perhexiline, amiodarone or sertraline, which were documented as affecting cancer cell survival. Thus, at concentrations in the low micromolar range, suloctidil might be considered as a cytotoxic agent, with no specificity towards cancer cells.

The stimulant laxative bisacodyl appeared in this study as a molecule with highly selective cytotoxicity towards GSCs in their quiescent state and no adverse effect towards non-cancer neural cells. Furthermore, the molecule exerts its unique cytotoxic activity with the highest efficacy (EC_{s0} value in the micromolar range) compared to the other molecules tested and this activity was observed for temozolomide-resistant GSCs [23] originating from GBM of three different patients and presenting different molecular signatures (*i.e.*, p53 mutation is observed in FG16 but not in TG1 or OB1 cells). We showed that in the culture medium, bisacodyl is transformed into DDPM, its known *in vivo* active metabolite. Similar results on cell viability were obtained using either bisacodyl or DDPM. The key structural elements necessary to retain activity and/or specificity have been characterized. They consist in the p-phenolarylpyridinyl-methane scaffold with some limited pharmacomodulation freedom on the aryl and pyridine molecules that remain to be further explored, DDPM and its mono bromide substituted derivative corresponding to compound 18 presented in this study remain the most potent and specific compounds identified so far.

The molecular mechanisms underlying the cytotoxic effect of bisacodyl/DDPM on GSCs as well as the direct molecular target(s) of the active metabolite are under investigation. The laxative effect of bisacodyl is thought to occur via a mechanism involving ion channel (Na⁺/K⁺) perturbation at the intestinal level. However, few mechanistic studies are available for this old drug marketed in the sixties. The present finding appeals further studies to unveil both the specific activity of bisacodyl/DDPM on quiescent GSCs and some aspects of GSC functioning. Finding a molecule with selective cytotoxic activity on quiescent GSCs is very attractive as cancer stem-like cells are known to be particularly chemo- and radio-resistant. Their ability to enter quiescence in two reinforces their propensity to escape chemotherapies [14]. To our knowledge, bisacodyl/DDPM is the first small molecule endowed with cytotoxic activity towards slow growing cancer stem-like cells. None of the chemical screens described in the literature investigated cancer stem-like cells under domant conditions, whatever the cancer type considered [12, 14, 138, 139]. The present finding opens new avenues for an old molecule with an original mode of action towards cells designated as central culprits in cancer maintenance and relapse after therapy.

Supporting Information

S1 Fig. Expression of surface markers in proliferating and quiescent GSCs. (A-B) Immonohistochemical staining of proliferating and quiescent TG1 and OB1 GSCs with CXCR4 (A) and CD56 (B) antibodies. Nuclei are stained with DAP1. Image magnification: 40x. Scale bars, 20 µm. (C) Expression of the CD133 surface marker was evaluated in proliferating (P) and quiescent (Q) TG1 and OB1 GSCs using flow cytometry (lower panels). Controls using FITC-conjugated antibody isotypes are shown (upper panels). The percentage of CD133 positive cells is indicated. (TIF)

S2 Fig. Evaluation of clonal properties of proliferating and quiescent GSCs. (A) Evaluation of the clonal properties of proliferating (-) and quiescent (\blacktriangle) TG1 cells. The graph represents the mean number of spheres obtained after 3 weeks in culture as a function of the initial number of cells in a well. (B) Evaluation of the clonal properties of proliferating (-) and quiescent (\bigstar) OB1 cells. Results are represented as in (A). Images of clonal neurospheres obtained from TG1 and OB1 GSCs after 3 weeks are shown as inserts in (A) and (B), respectively. (TIF)

S3 Fig. Differentiation ability of proliferating and quiescent TG1 and OB1 GSCs. (A) Phase contrast images of proliferating (P) and quiescent (Q) GSCs dissociated and incubated in culture medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) for 0 (d0) to 14 days (d14). Scale bars: 100 μ m. (B-E) Histograms representing mRNA expression levels of the sonic hedgehog (SHH), β 3-tubalin (TUBB3) and glial fibrillary acid protein (GFAP) genes in proliferating (P) and quiescent (Q) TG1 (B, C) and OB1 (D, E) GSCs cultured in differentiation inducing medium containing 10% FCS for 0 (d0) to 14 days (d14). Results, related to the cycle threshold (Ct) value obtained for each gene, were normalized to the 185 rRNA expression levels in each condition and are shown as fold change (2^{-- ΔΔCl}) observed in proliferating or quiescent TG1 or OB1 cells after 14 days in the presence of serum compared to the expression observed in the same cells at day 0. Data are from two independent experiments. (TIF)

S4 Fig. In vivo engraftment properties of proliferating and quiescent GSCs. (A-B) Proliferating (A) or quiescent (B) GSCs were grafted in the left striatum of nude mice. Mice were samficed 8 weeks later and brain sections were immunostained with an antibody recognizing specifically human vimentin. Brown vimentin staining thus allows identifying human cells. Scale bar in insert images of the whole brain indicating the region containing human GSCs: 500 μm. Scale bars in colarged images: 100 μm. (C-D) Immunohistochemical labeling of brain sections obtained as in (A-B) with an anti-Ki-67 antibody. (TIF) S1 Methods. Expression of stemness, pluripotency and differentiation markers in proliferating and quiescent GSCs. The expression levels (mRNA) of 90 genes enclosing stemness, pluripotency and differentiation markers and 6 endogenous controls (see S2 Table) were studied in both proliferating and quiescent TG1 and OB1 GSCs using the real-time PCR based Taq-Man Human Stem Cell Pluripotency Array (Applied Biosystems, Life Technologies), Briefly, total RNA was extracted using TriReagent (Invitrogen), cDNA synthesis was performed with 10 µg of total RNA at 37°C for 2 hours using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Life Technologies). Quantitative PCR was performed using the ABI Prism 7900111 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Cycle threshold (Ct) values were measured. Ribosomal RNA18s was used as housekeeping gene. Expression levels of Nanog, GBX2 and IFITMI were also verified using individual TaqMan gene expression assays from Applied Biosystems, Life Technologies as described in the Materials and Methods section, FACS analysis was used to study Nanog protein expression in proliferating and quiescent TG1 and OB1 GSCs. Neurospheres were dissociated and cells were resuspended in PBS. Fixable viability Dye eFluor 450 labeling (eBioscience) was performed to irreversibly label dead cells. Following washing with PBS, cells were fixed with 2% paraformal debyde in PBS [10 min at room temperature). Permeabilization (5 min at room temperature) was performed in the presence of 0.1% of saponin and cells were then washed once in HBSS buffer containing saponin (0.1%). Nonspecific sites were blocked in PBS solution containing 3% BSA and 2.5% of fetal bovine serum for 30 min at room temperature. Primary antihody labeling (anti-Nanog rabbit polyclonal; Abcam; 1/200) was performed overnight at 4°C. Secondary antibody incubation (1 hour at room temperature) was followed by FACS analysis. Cells labeled with the secondary antibody in the absence of the primary antihody were used as negative controls. (DOCX)

\$2 Methods. Expression of surface markers. Detection of CXCR4 and CD56 expression asing immunocytochemistry. Cells were mechanically dissociated and centrifuged onto slices with a Cytospin centrifuge. Cellular auto-fluorescence was blocked by incubating cells with 0.06% KMnO4 at room temperature for 10 min. After a blockade with 1% BSA in PBS, cells were incubated with CXCR4 antibodies (Merck Millipore, AB1847, 1:50) or CD56 antibodies (BioLegend, 304601, 1:25) at 4°C overnight. Cells were then washed and incubated with Alexa 488-conjugated secondary antibodies (Jackson Immuno Research, 1:250) for 20 min in the dark at room temperature. DAPI was used for counterstaining before fluorescence microscopy observation. Evaluation of CD133 expression by flow cytometry. Following mechanical cissociation and washing in PBS, 1x10° proliferating and quiescent TG1 and OB1 cells were resuspended in 100 µL PBS with 0.5% BSA. Cells were then incubated with 10 µL of PTICconjugated CD133 antihody (Milteny) Biotec, 130-105-226) or 10 µL of FITC-conjugated isotype control (Miltenyi Biotec, 130-104-562) for 10 min in the dark in a refrigerator. Cells were washed in 2mL PBS with 0.5% BSA and then analyzed with a FACSCallbur flow cytometer (BD Biosciences). Propidium iodide was used to exclude dead cells. (DOCX)

53 Methods. Clonality tests. Clonality of proliferating and quiescent TG1 and OB1 CSCs was evaluated in 96-well plates seeded at various cell densities (1, 2, 5, 10, 20 and 50 cells/well) in 0.2 ml of freshly prepared NS34 medium (16 wells/cell density condition). The number of wells containing at least one secondary sphere as well as the number of spheres in each well were evaluated after 3 weeks in culture.

(DOCX)

S4 Methods. Evaluation of *in vitro* differentiation properties of GSCs. Proliferating and quiescent (9 days without medium renewal) TG1 and OB1 GSCs were dissociated and seeded in freshly prepared NS34 medium supplemented with 10% FBS (Day 0). Cells were then maintained in this differentiation-inducing culture medium for 14 days. At day 0 and day 14, 2.5–5 x 10⁶ cells in each condition were collected and total RNA was extracted, purified, characterized and reverse transcribed as described in the Materials and Methods section. Expression at the mRNA level of stem cell and differentiation markers (Sonic Hedgehog (SHH): His 00179843-m1, 33 tubulin (1UBB3): His 00801390-S1 and glial fibrillary acid protein (GFAP): Ha00909233-m1) was determined using individual TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Life Technologies) and quantitative PCR analysis as described in previous sections. (DOCX)

55 Methods. Evaluation of *in vivo* engraftment properties of GSCs. Mice (NMRI Nude, Janvier) were anesthetized by inhalation of isoflurane. 10° glioblastoma OB1 cells (proliferating and quiescent) were injected into the left striatum of mice (4 mice per experimental setting), using a stereotaxic set-up with a 10 µL Hamilton syringe. The needle was kept in place for 5 min after injection and then slowly removed. 8 weeks after injection, mice were anesthetized with xylazine, then perfused with 4% formaldehyde. Mouse brains were fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin and cut into serial 10 µm-thick sections. Human cells were identified with immunohistochemical staining with an antibody against vimentin (clone V9, Dako). Ki-67 positive cells were identified with immunohistochemical staining with corresponding antibodies from Dako (clone MIB-1). (DOCX)

S6 Methods. Experimental section for the synthesis of the chemical compounds. (DOCX)

S7 Methods. LC/MS analytical data. (DOCX)

S1 Table. Cell source, cell handling and resource sharing information. P: proliferating: Q: quiescent.

```
(DOCX)
```

S2 Table. Assay ID numbers, IDs and names of genes included in the TaqMan Human Stem Cell Pluripotency Arrays from Applied Biosystems, Life Technologies. List of the 90 stem cell or differentiation associated genes and 6 housekeeping genes (ACT8, RAF), CTNNB1, GAPDH, EEFIA1, 18S) included in the Human Stem Cell Pluripotency Array from Life Technologies. (DOCX)

S3 Table. Primary and secondary screen hit compounds. GSCs: glioblastoma stem-like cells. Hit compounds selected both in the primary and secondary screens for their activity in at least one of the conditions tested are highlighted in yellow. (DOCX)

S4 Table. Hit compound structures. Molecules were disclosed from the Prestwick Library for their activity on GSCs. (XLSX)

Acknowledgments

We thank "La Ligue contre le Cancer" for PhD funding of Wanyin Chen. Marie Fève was supported by a French Ministry of Higher Education and Research scholarship and the University of Strasbourg. We thank Dr René Frydman (Antoine Bécière hospital, Clamart, France) and Dr Hervé Coffiny for providing fetal brain tissues and the Sainte Anne neurosurgery team for providing gliobilastoma tissues. Patrick Gizzi (PCBIS-TechMed, Illkinch France) for physicochemical analyses and Justine Viéville and Patrick Wehrung (Plateforme d'Analyse Chimique de Strasbourg Illkinch (PACSI), France), for LC-MS analyses. We also thank Ryan Djemili, Louis Dorin, Florence Konalian, Gomady Vetrivel, Florine Schmidlin, Sarah Vollmer and Gauthier Denninger, students of the IUT Robert Schuman, and Mérouane Belkou for the re-synthesis of some compounds.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MZ SM CS HC MPJ JH MH MCK. Performed the experiments: MZ MF SM ID CS WC EAEH FB MS IO AB. Analyzed the data: MZ MF SM ID CS WC EAEH FB DB JH MH MCK. Contributed reagents/materials/analysis tools: SAK PV BD DB MPJ HC. Wrote the paper. ID MZ CS SM ID MPJ IH MII MCK.

References

- Dunn GP, Hinne ML, Wykosky J, Genovess G, Quayle SN, Dunn IF, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastome. Genes Dev. 2012; 26(6):755–64. doi: 10.1101/ged 187922.112 PMID: 22508724
- Furnari FB, Penton T, Bechoo RM, Mukasa A, Stonimel JM, Stegh A, et al. Matgnant astrocytic gilomel genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev. 2007; 21(21):2583–710, PMID 17974913
- Stupp R, Mason WP, van den Bert MJ, Weller M, Fisher B, Taphoom MJ, et al. Radiotherapy pus concompant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005; 352(10):987–96, PMID: 15754009
- Alifiente C, Tratalia DT, Glioblastome multiforme: Pathogenesia and treatment. Pharmacology & therapeutos. 2015.
- Druz MH, Siden A, Catal GM, Delwar ZM, Yakistch JS. The stemmess chemotype model. ISBN encolcgy. 2012;2012;392847, doi: 10.5402/2012/092647. PMID: 22928120
- Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer sterr: cell concept. J Clin Invest. 2011; 120(1):41–50.
- Songupta A. Cancelas JA. Cancer stem cells: a stride towards cancer cure? J Cel Physiol. 2010; 225(1):7–14. doi: 10.1002/cp.22219 PMID: 20458786
- Bornet D, Dick JE, Human acute myeloki leukerna is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoletic cell. Nat Med. 1997; 3(7):730–7. PMID: 9212069
- Frostna G. Frostnars in largering glome stem cells. Eur J Cancer. 2011;47(4):496–507. doi: 10.1016/ ielca.2010.11.017 PMID: 21185189
- Reya T, Monison SJ. Clarke MF, Weissman L. Stem cells, cencer, and cancer stem cells. Nature, 2001; 414(8659):105–11. PMID: 11689955
- Hothi P, Manins TJ, Chen L, Deleyrolle L, Yoon JG, Reynolds B, et s. High-throughput chemical screens identify disulfiramies an inhibitor of human globlestoma stem cells. Oncotarget. 2012; 3(10): 1124–36. PMID: 25165409
- Polard SM, Yeshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, et al. Glioma stem cell inesexpanded in achievent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. Cell Stem Cell. 2009; 4(6):565–60. doi: 10.1016/j.atem.2009.03.014 PM.D: 19497285
- Visnyei K, Oncelera H, Demoscaux R, Salgusa K, Petrosyan S, De Vries D, et al. A netrocital screening approach to identify and characterize inhibitors of globalstoma stem cells. Mol Cancer Ther. 2011; 10(10):1618-28. doi: 10.1159/1535-7163.WCT-11-0268 PM/D; 21859939
- Woore N, Lyre S. Quescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. J Oncol. 2011.

- Gad MQ, Choi YP, Kang S, Youn JH, Cho NH. CD24+ cets from hierarchically organized dvarian carcer are enroted in cancer stem cells. Oncogene. 2010; 29(18):2672–80. doi: 10.1005/onc.2010;35 PMID: 20190612
- Haroguchi N, Ishii H, Minori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, et al. CD13 is a therapeutic larger in numan liver cancer stem cells. J Clin Invest. 2010; 120(9):3325–39. doi: 10.1172/JCI42250 PMID. 20697169
- Pece S, Tosoni D, Conference S, Mazzaro G, Vecch M, Ronzoni S, et al. Biological and molecular neterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. Cell. 2010; 140(1): 62–73. doi: 10.1048/j.eell.2009.12.007 PMID: 20074520
- Roesch A, Fukunega-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, et al. A temporarily dialinct subpopulation of slow-cycling metanoma cells is required for continuous tumor growth. Cell. 2010; 141(4):553–94. doi: 10.1016/j.cel.2010.04.020 PMID: 20478252
- Dembiniski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subcopulation in pancress adenocarchroma. Clin Exp Vetastasis. 2009; 26(7):611–23. doi: 10.1007/ a10585-009-9260-0 PMID: 19421680
- Guan Y, Gerhard B, Hegge DE. Detection, isolation, and sumulation of quiescent primitive exernic progenitor cells from patients with acute mysroid leukemia (AML). Blood. 2009; 101(8):3142–9. PMID: 12468427
- Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A iso abon of a highly guescern subpopulation of primitive isukernic cells in chronic myeloid leukernia. Blood. 1999; 94(6):2056–64. PMID: 10477755
- Weng S, Tripathy D, Frenke EP, Shete S, Naltalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with treast center domainary. Cin Cancer Res. 2004; 10(24):81-52–62. PMID: 15622589
- Patru C, Homao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E. Cadusseeu J, et al. CD153. CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer atem cells from human marignant glio-neuronal tumors. BMC Cancer. 2010; 10:86. doi: 10.1186/1473-3407-10-68 PMID: 20161281
- Thirant C, Sessette B, Variet P, Puget S, Cadusseau J, Taveres Sdos P, et al. Ofnice relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. PLoS One. 2011; 5(1) e 18375. doi: 10. 1371/Journal.pone.0016375 PMID: 21297991
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KB. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validaion of High Throughput Screening Assays. J Biomet Screent, 1999; 4(2):67–73. PMID: 10638414
- Perusce P, Cazzelini O, Madine M, Savto M, Leskey RA, Vannini V, et al. Loss of p21 CDKN1A impairs entry to bulescence and activates a DNA damage response in normal fibrioblasts induced to gulescence. Cell Cycle. 2009; 8(1):105–14. PMID: 19106607
- Tai Ci, Ying QL, Sbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. J Cel Sci. 2013; 126(Pt5): 1093–6. doi: 10.1242/ce.118273 PMID:23345404
- Yang G, Xu Y, Chen X, Hu G. IFITM1 plays an essential role in the antiproliferative action of interteror-partma. Oncogene. 2007; 28(4):594–503. PMID: 16847454
- Yu F, Ng SS, Chow BK, Sze J, Lu G, Poon WS, et al. Knockdown of interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) inhibits proliferation, migration, and invasion of gliome cells. J Neurocricol. 2011; 103(2):187–95. doi: 10.1007/s11060-010-0377-4 PMID: 20839853
- Fareh M, Turchi L, Vicele V. Decrayne D, Anexicae F, de-a-Forest Divorme S, et al. The miR 302-367 cluster destically affects self-rerowal and infiltration properties of gioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. Cell Death Differ, 2012.
- Feve M, Sallou JM, Zenicu M, Lehnon S, Carapito C, Dong J, et al. Comparative Expression Study of the Ender-G Protein Coupled Receptor (GPCR) Repertoire in Human Stichlastoms Cancer Stem-Ika Cells, US7-MG Cells and Non Malignant Cells of Neural Orgin Unveils New Potential Therapeutic Tangets, PLoS One, 2014; 9(3):e91519, doi: 10.1371/journal.pone.0091519 PMID: 24662738
- Jauch R, Hankwitz R, Beschke K, Peizer H. Sia-(p-hydroxyphenyl-pyrioyl-2-methane. The common laxative principle of Bisacodyl and sodium piccoulfate. Arzneimitterorschung, 1975; 25(11):1796–800. PMID: 1243088
- Dhen J. Li Y. Yu TS, McKay RM, Burrs OK, Kemie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastome growth after chemotherapy. Nature. 2012; 436(7412):522–6. doi: 10.1098/nature11297 PMID: 20954761
- Pater AP, Trosn I, Tromoetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell PNA-seq nightights introduces heterogeneity in primary globbastania. Science. 2014; 344(6190):1396-401. doi:10.1125/weienen.1254257.PMID: 24925914
- Soss MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell domancy: sn awakening field. Nat Rev Cancer. 2014, 14(9): 611–22. doi: 10.1036/https//bb.PMID: 25116602

- Wang SH, Lin SY, Tumor dormancy: potential therapeutic target in tumor recurrence and metaatasia prevention. Experimental hematology & proclogy, 2013; 2(1):29
- Kumm BS, Mirkin S, An overview of current and emerging SERMs. The Journal of steroid biochemislity and molecular biology. 2014.
- Obrero M, Yu DV. Shapiro DJ. Estrogen receptor-dependent and estrogen receptor-independent pathways for tempositen and 4-hyproxytemositen-induced programmed cell death. J Biol Chem. 2002; 277(47):45895–703. PMID: 12244117
- Li C, Zhou C, Weng S, Fang Y, Lin W, Lin S, et al. Sensitization of glome cells to temoxifen-induced apoptosis by PiS-kinase inhibitor through the GSK-3beta-beta-cetenin signaling bethway. PLoS One. 2011; 6(10):e27053; doi: 10.1371/journal.pone.0027059 PMID: 2204e442
- Guo WZ, Shiina I, Wang Y, Umeda E, Watanabe C, Uetake S, et al. Ridailer-S38, a novel tamoxifent derivative, induces apoptosis via reactive oxygen species-dependent signaling pathway. Biochem Pharmacol. 2013; 86(8):1272–84. doi: 10.1016/j.bcp.2013.08.000 PMID: 23973528
- Couldweif WT, Hinton DR, He S, Chen TC, Sebat I, Weiss MH, et al. Protein kinase Climitibiors induce appotosis in human malignam gliome cell lines. FEBS Lett. 1994;345(1):45–6. PMID: 8194507
- Feng Y, Huang J, Ding Y, Xie F, Shen X. Tamoxfen-induced apoptosis of rat C6 glioma cells via PI3K/Akc, JNK and ERK activation. Onoclogy repons. 2010; 24(6):1561–7. PMID: 21042752
- DIC A, Carrabba G, Lanfranchi G. Menghetli C. Rampini P, Caroli M. Continuous tamoxifen and dosedense tempolomide in recurrent gliublastoma. Ant concer research. 2013, 33(8):3383–9. PMID: 23896108
- Jagtap JC, Dawood P, Sheh RD, Chandrika G, Netean K, Shiras A, et al. Expression and regulation of prostate apoptosis reaconse-4 (Par-4) in human glioma atem cells in drug-induced apoptosis. PLoS One. 2014; 9(2):e88506. doi: 10.1371/journal.pone.0088505 PMID: 24823904
- Andrews W., Panova T. Normand C. Gadal O. Tiknorova G. Panov KI. Old drug, new target ellipticines selectively inhibit RNA polymerase Hanscription. J Bio Chem. 2013; 268(7):4567–82. doi: 10.1074/jbc.html2.411611.PMID: 23293027
- Garbert NC, Graves DE, Extending nature's leads: the anticancer agent ellipticine. Curr Med Chem. Anticancer Agents. 2004; 4(2):149–72. PMID: 15032720
- Ohashi M, Sugikawa E, Nakanishi N. Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyelliptione a possible anticancer mechanism. Jpn J Cencer Res. 1995; 86(9):819–27, PMID: 7501058
- Prudent R. Moucadel V. Nguyen CH, Barette C. Schnidt F, Florent JC, et al. Antitumer activity of pyriducartiszole and benzopyrisiondole derivatives that inhibit protein sinase CK2. Cancer Res. 2010; 70(23):9865-74. doi: 10.1158/0008-5472. CAN-10-0917 PMID: 21118972
- Stborovs M, Breuer A, Aimova D, Stborovs-Hupertova M, Wiessler M, Fre E. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rate determined by 32P postabeling. Int J Cancer. 2003; 107(6): 865–90. PMID: 14601046
- Wanthkova E, Dohlenwill M, Fiel E, Stibecova M. Cytotoxicity of and DNA adduct formation by elliptidine in human US7WG glioblastoma cancer cells. Neuro endocrinology tetlers. 2009; 30 Suppl 1:50–6. PMID: 20027146
- Marinkova E, Maglott A, Leger DY, Bonnet D, Sticorova M, Takeda K, et al. alpha5oeta1 inagén antegorists reduce chemotherapy induced premature senescence and facilitate apoptosis in human clipblastoma cells. Int J Cancer. 2010; 127(5):1240–9. doi: 10.1002/jp.25187.PMID: 20099278
- Stiborova M, Poljekova J, Martinkova E, Borak-Dohalska L, Eckachiager T, Kizek R, et al. Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines—a comparative study. Interdisciplinary toxicology. 2011; 4(2):96–105. soi: 10.2476/v10102-011-0017-7 PMID: 21753906
- Sliborova M, Fei E. Elliptiones as DNA-targeted chemotherapeuros. Cum Med Chem. 2014; 21(5): 575–91. PMID: 24058026
- Pandrangi SL, Chikati R, Chauten PS, Kumer CS, Banari A, Sazena S. Effects of ellipticine on ALDH1A1 expressing breast cancer stem cells—an in vitro and in slico study. Turnour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2014; 35(1):723–37.
- Popper LD, Betra SC, Release of intracellular calcium by prenytemine in numan ovarian tumour cells. Cancer laders. 1993; 71(1–3):5–10. PM D: 8364698
- Huang C, Huang C, Cheng J, Lu S, Chen I, Tsai J, et al. Fendline-repked [Ca2)] rises and non-Ca2 i-triggered cell death in human eral cancer cells. Human & experimental toocology. 2009; 28(1):41–8.
- van der Hoeven D, Sho KJ, Ma X, Ohigurupsti S, Parton HG, Handook JF, Fendline inhibits K-Rascleama membrane localization and blocks K-Ras signal transmission. Mol Cell Biol. 2019; 33(2): 237-51. doi: 10.1128/MCB.00884-12.PMID: 23129815

- Betra S, Alentall J. Effect of diverse categories of drugs on numan color tumour cell proliferation. Anticancer research. 1991; 11(3):1221–4. PMID: 1588155
- Balgi AD, Fonseca BD, Durohue E, Tsang TC, Lajcie P, Proud CG, et al. Screen for chemical modulators of autophagy reveats novel therapeutic inhibitors of mTCRC1 signaling. PLoS One. 2009; 4(9): e7124. doi: 10.1371/doime.come.8007124 PMID: (9771169)
- Aboul M. Hoosein N. Expression and activity of polassium ion channels in human prostate cancer. Dancer laters. 2002; 188(1):59–105. PMID: 12163061
- Hueng JK, Cheng HT, Chou CT, Shu SS, Kuo OC, Tasi JY, et al. The mechanism of serbisineinduced (Ca(2+)) (if rise in human PCS prostate sencer cells. Basic & clinical pharmacology & toxicoogy, 2011 105(2) 103–10.
- Lin KL, Chi CC, Lu T, Tkeng LL, Wang JL, Lu YC, et al. Effect of seriraline on [Ca2+]i) and visbility of human WG63 esteesancoms cells. Drug Oftem Toxicol. 2013; 36(2):231–40. doi: 10.3109/01480545. 2012.710625. PMID: 22931134
- Tzadok S, Beery E, Israeli M, Uziel O, Lahav M, Fenig E, et al. In vitro rovel combinations of osychotropics and enti-cancer modalities in US7 human globaleatoma cells. International journal of oncology. 2010; 37(4):1043–51. PMID: 20811727
- Redby KK, Letkove B, Chen LB, Govindara an B, Carrebedo A, Velasco G, et al. The antidepressant serbs ine downregulates Akt and has activity against melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res. 2008; 21(4):451–6. doi: 10.1111/j.1786-148X.2006.00481.x PMID: 18710373
- Caucill JS. Brown PD. Central JH, Rummans TA. Selective servicinin reuplake inhibitors, gliobastoma multiforme, and impact on toxic tiss and overall survival: the mayo clinic experience. Am J Clin Oncol. 2011;34(4):385-7. PM D: 20859197
- Walker AJ, Greinge M, Bates TE, Card TH. Survival of gloma and colorectal cancer patients using thcyclic antidepressants cost-diagnosis. Cancer Causes Control. 2012; 23(12):1959–64. doi: 10.1007/ =10552-012-0073-0 PMID: 20065071
- Kast RE. Bocokvar JA, Bruning A, Cappello F, Chang WW, Gvek B, et al. A sonceptuely new treatment approach for relapsed glioblastoma: coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Carel Onostarget. 2013; 4(4):502–50. PM ID: 23584494
- Hashinota H, Messerii SM, Suda T, Maruta H, Ivermediin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human evolution cancer and NF2 tumor cell lines. Drug Discov Ther. 2009; 3(6):243–6. PMID: 224/26656
- Hashimoto H, Sudo T, Maruta H. Nishimura R. The direct PAK1 inhibitor, TAT-PAK18, blocks preferentially the growth of human ovarian cancer cell lines in which PAK1 is accornally activated by autophosphorylation at Thr 423. Drug Discov Ther. 2010; 4(1):1–4, PMID: 22491145
- Sharmeen S, Skriic M, Sukhai MA, Humen R, Gronda M, Wang X, et al. The antiperasitic agent ivermectin induces chicros-decendent membrane hyperpolarization and cell ceath in leukemiz cells. Blood. 2010; 116(18):S593–603. doi: 10.1185/blood-2010-01-282675 PMID: 20644115
- Lokich E, Singh RK, Han A, Ramano N, Yano N, Kim K, et al. HE4 expression is associated with hormoral elements and mediated by imponin-dependent nuclear transfocation. Sci Rep. 2014; 4:5500 doi: 10.1038/srep05500 PMID: 24975515
- Nu YP, L LD, Wu LM. Beta-eescin: a potent natural inhibitor of proliferation and inducer of apoptosis in human chicarte mystald teckensia K552 cells in vitro. Leuk Lymphoma. 2006; 49(7):1364–91. doi: 10.1060/1042619090000161 PMID: 19462082
- Zhou XY, Fu FH, Li Z, Dong QJ, He J, Wang CH. Escin, Einsture of Interpene seponins, exhibits antitumor activity against hepatocellular sercinoma. Pienta Med. 2009; 75(15):1550–5. doi: 10.1055/s-0029-1165636 PMID: 19579181
- Tan SM, L.F. Rejencren P, Kumar AP, Hui KM, Sethi G. Identification of beta-escin as a novel inhibitor of signal transducer and activator of transcription 2/Janus-activated knase 2 signaling puthway that suppresses proiferstion and induces apoptosis in tuman nepatocellular carcinoms cells. J Phermacol Exp Ther. 2010; 394(1):285–89. doi: 10.1124/jpet.110.185459 PMID; 20578717
- Shen DY, Kang JH, Song W, Zhang WQ, LI WG, Zhao Y, et al. Acoptosis of human choicingicaardnoma cell lines induced by beta-escin through mitochondrial cascase-dependent sathway. Phytotherapy research: PTP. 2011; 25(10):1518–26. doi: 10.1002/pir.3405 PMID: 21394804
- JI DB, Xu B, Liu JT, Ran FX, Cu JR, beta-Escin sodium inhibits inductible nitro oxida synthase expression via downregulation of the JAK/STAT pathway in A549 cells. Mol Carolinog. 2011; 50(12):945–60. doi: 10.1002/md.20762 PMID: 21400645

- Zheng Z, Gao J, Cai X, Zheo Y, Wang Y, Lu W, et al. Escin addium induces apoptosis of human adule eukemia Junkat T cells. Phytotherapy research: PTR. 2011;25(12):1747–55. doi: 10.1002/ptr.3457 PMID: 21452372
- Severyn E, Giersk M, Sroda-Porrianek K, Ceremuga I, Wiedenzyk M, Garnar A, Cytotoxic effects of four assorn types on human colon adendoarchioma bet lines. Nat Proc Commun. 2014; 9(3): 387–90. PMID: 26689224
- Rimmon A, Vexler A, Berkovich L, Earon G, Ron I, Lev-Ari S, Eacin Chemosensitizes Human Partenatic Cancer Cells and Inhibits the Nuclear Factor-kappaB Signaling Pathway. Biochemistry research international. 2013; 2013;251752. doi: 10.1155/2013/251752. PMID: 24282638
- Harikumar KB, Sung B, Panday MK, Guns S, Krishnan S, Aggarwal SB. Escin, a pentacyclic trilercene, chemosensitizes human tumor cells through inhibition of nuclear factor-kappaB eignaling pathway. Mol Pharmacol. 2010; 77(5):516–27. doi: 10.1124/mol.109.062760 PMID: 20103606
- Bit. Stota SC, Tyagi AK, Deshmukn-Tasker P, Hinojosa M, Prasad S, Aggurwal BB. Downregulation of tumor nectosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. Arch Biochem Biophys. 2014.
- Bracom C, Swenson E, Kogare T, Haang N, Pate T, Targeting the L-6 dependent phenotype can dentify revet therapies for cholangiocarcinoma. PLoS One. 2010;5(12):e15195. doi: 10.1371/ comed.pone.0015195 PMID: 21179572
- Garda-Quimz J, Camecho J. Astemizote an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug. Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 2011; 11(3) 307–14. PMID: 21443504
- Nelson MP, Shadka JJ, Autophagy Modulation in Disease Therapy: Where Do We Stand? Curr Pathobiol Rep. 2013; 1(4):239–45. PMID: 24470360
- de Guadalupe Chevez-Lopez M. Hernandez-Gallegos E, Vazquez-Sanchez AY, Gariglio P, Carnacho J. Antiproliferative and proapoptotic effects of asternizole on cervical cancer cella. Int J Gynecol Cancer. 2014; 24(5):824–0. PM:D: 24819856
- Hammertein B, Weselch HM, Metolde Queiroz F, Knotgert H, Sanchaz A, Rubio ME, et al. Overexcression of Esg1 potessium channels in clinical tumosits. Mol Cencer. 2006; 5:41. PMID: 17022810
- Pardo LA, Suhmer W. Eagt as a cancer larget. Excen Opin Ther Targets. 2008; 12(7):837–43. doi: 10.1517/14728222.12.7.637 PMID: 18654152
- Asher V. Sowter H, Shaw R, Bel A, Khan R, Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. World J Surg Oncol. 2010; 8:113. doi: 10.1186/1477-7813-8-113 PM/D .21190577
- Roy J. Vantel B. Cowley EA. Blay J. Linsdel P. Pharmacological separation of hEAG and hERG Kchannel function in the human mammary cardinoma cell line MCF-7. Oncology reports. 2008; 19(6): 1511–6. PMID: 18487958
- Liu JD, Wang YJ, Ohen CH, Yu CF, Chen LC, Lin JK, et al. Molecular mechanisms of G0/G1 cellcycle arrest and apoptosis induced by tertenestine in human cancer cells. Mol Caminog. 2000; 37(1): 39–50. PMID: 12720299.
- Blaya B, Nicolau-Galmes F, Jangi SM, Ortaga-Martinez I, Alonso-Telenna E, Burgoa-Bretones J, et al, Histamine and histamine receptor antagonists in cancer bloidgy. Inflamm Allergy Drug Targets 2010; 9(3):146–57. HMID: 20022959
- Hadzijzaulovic E. Peter B. Gleixner KV, Schuch K, Pickl WF, Theiwong T, et al. H1-receptor amagonists terfenadine and londadine inhibit spontaneous growth of neoplastic mast cells. Exp Hematol. 2010; 38(10):096-907, doi: 10.1016/j.expnam.2010.05.008 PMIC: 20570632
- Jang SM, Huiz-Larres VB, Nicolau-Galmes F, Andolo N, Anoyo-Berdugo Y, Onega-Martinez I, et al. Terfenedine-Induced spoptosis in human melanoma cells is mediated through Ce2+ homeostasis modufation and tyrosine kinase activity, independently of H1 histernine receptors. Caroinogenesis 2008; 29(3):500–5. doi: 10.1093/caroin/bgm292.PMID: 18174239
- Nicolau-Galmes F, Asumend A, Alonso-Telerina E, Perez-Yarza G, Jang SM, Gardeazabal J, et al. Terfenedine induces apoptosis and autophagy in melanoma cells through ROS-dependent and -Independent mechanisms. Apoptosis, 2011; 16(12):1253–67. doi: 10.1007/ario195-011-0640-y PMID. 21851192
- Wang WT, Chen YH, Hsuult, Leu WJ, Yu DC, Chan SH, et al. Terlenatine induces anti-proliferative and apoptotic activities in human hormone-refractory prostate cancer through histamine receptorindependent MoH I cleavage and Bak up-regulation. Naunyn-Schmiedeberg s aronives of pharmacology. 2014; 387(1):33–45. doi:10.1007/s00210-013-0812-a PMIO: 24046439
- Hey JA, del Prado M, Sherwood J, Kreutner W, Egan RW. Comparative analysis of the cardioxoxicity procrivities of second generation antih-stamines in an experimental model predictive of adverse clinical ECG effects. Accountibulionaching, 1996; 46(2):153–4. PMID: 8720304

- Roberts Bull Cardioloxicity of second-generation antihistamines. Drugs. 1999; 57(6):1033–4. PMID: 10400411
- Paakkari I. Cardiotoxicity of new antih-starcines and cisapride. Toxood Lett. 2002; 127(1–3):279–84. PMID: 12052668
- Qian JY, Guo L. Altered cytosolic Ce2+ dynamics in cultured Guines pig cardiomycoytes as an in vitro model to identify potential cardioloxicants. Toxicol in Vitro. 2010; 24(3):960–72. doi: 10.1016/j.tiv. 2009.12.027 PMID: 20084605
- Wiechoof AM, Young M, Bianchi E, Cole JH. Tumor inhibitory agent from Magnelle grandriora (Magnol aceae). I. Parthenolide. J Pharm Sci. 1973; 62(2):345.
- Hoffmann JJ, Tortance SJ, Widebopi RM, Cole JR. Cytotoxic agents from Michelia champaca and Talkuma ovata: parthenolide and cost unclide. J Pharm Sci. 1977; 55(5):363–4. PMIC: a89557
- Anderson KN, Bejoek BE. Parthenoide induces apoptosia in glioblastomas without attecting NF-kapbaB. J Pharmacol Sci. 2006; 105(2):318–20. PMID: 13277052.
- Zanodo-Filho A, Bragantel E, Schroder R; de Souza LH, Dalmolin RJ, Pasqual MA, et al. NFkappiB inhibitors induce cell desthin glioblastomes. Biochem Pharmacol. 2011; 81(3):412–24. doi: 10.1016/j. bcp.2010.10.014 PMID: 21040711
- Nekabayaah H, Shimizu K. Involvement of Akt/NP-kappa8 pathway in antilumor effects of parthenoide on globlastoma cells in vitro and in vivo. BMC Cancer. 2012; 12:453: doi: 10.1186/1471-2407-12-463 PMID: 20029030
- Zheo X, Liu X, Su L, Parthenolide incuces apoptosis via TNFHSF10B and PMAIP1 pathways in human ung pencercels. J Exp Clin Cencer Res. 2014, 33:3. doi: 10.1186/1756-8966-33-3.PMID: 24387758
- Carlis D. D'Anneo A. Martinez R, Emanuele S, Buttitta G, Di Fiere R, et al. The oxygen indicats involved in the toxicity induced by partnericitie in MDA-MB-231 cells. Oncology reports: 2014; 32(1): 167–72. doi: 10.3892/or.2014.3212 PMID: 24859613
- Sun J, Zhang C, Beo YL, Wu Y, Chen ZL, Yu CL, et al. Parthenoide-Induced Apoptosis. Autochagy and Suppression of Proliferation in HepG2 Cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2014; 15(12):4697–902. PMID: 24999500
- Jangunat V, Penthala NR, Madadi NR, Chen Z, Crooks PA. Anti-cancer activity of carbamate derivatives of meremportagnolide B. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2014; 24(15):3499–502.
- Varga A, Sabal P, Mucsi I, Flores VC, Kalser HE, Moroar J. Effects of butaclanci, clopertrixo, repromazine and compating storepisoners on apoptosis induction. An iconcernescench. 2001; 21(4A):2709–12. PMID: 11724344
- Hyttel J, Christensen AV. Biochemical and pharmacological differentiation of neurolectic effection dopamine D-1 and D-2 receptors. J Neural Transm Suppl. 1983; 18:157–64. PMID: 6155740.
- Someorg JC, Moinar J. The piciotropic effects of etheorynic acid. Am J Ther. 2009; 16(1):102-4. PMID: 19142157
- Byun SS, Kim SW, Choi H, Lee C, Lee E. Augmentation of cisp atin sensitivity in cisplatin-resistant numan bladder cencer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. BJU int. 2005; 95(7):1086–90, PMID: 154(3993)
- Depsile P, Cuq P, Passagne I, Evrard A, Vian L. Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanomic orug resistance. Br J Cancer. 2005;93(2):216–25. PMID: 15989 100.
- Wang P, Lu C, Xia L Zhao G, Gabrilove J, Waxman S, et al. Etheorynic acid and a derivative enhance apoptosis in arsenic tricaide-treated reyeloid leakernis and lymphoma cells. The role of glutathure S-transferase p1-1. Clin Cancer Res. 2012; 18(24):6690–701. doi: 10.1158/1078-0402 CCP-12-0770 PMID: 23082001
- Musdai Y, Hegazy UM, Aksoy Y, Mannervik S. FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. Chemico-biological interactions. 2013;205(1): 53–62. doi: 10.1016/j.dx.2013.06.000 PMID: 23799909
- Juillenet-Jeanneret L, Bernasconi CC, Bricod C, Gros S, Trepey S, Benhettar J, et al. Heterogeneity of numan globlastome: glutsih one-S-transferese and methylguenine-methylbansferese. Cencer Invest. 2008; 26(6):597–509. doi: 10.1080/07957900002072913 PMID: 16564351
- Schmeel LC, Schmeel FC, Kim Y, Endo T, Lu D, Schmidt-Woll IG. Targeting the Wirthera-catenin cellway in multiple mycloma. Anticancer research. 2013; 33(11):4719–26. PMID: 24322106
- Kim Y, Gast SM, Endo T, Lu D, Carson D. Schmidt-Wolf (G. In vivo efficacy of the diureto agent etheorynic sold against multiple myeloma. Leuk Res. 2012; 36(5):598–600. doi: 10.1016/ leukres.2012. 01.025 PMID: 22358738

- Schmidt M, Sievers E, Endo T, Lu D, Carson D, Schmidt-Worf IG. Targeting Whit pathway in lymphome and myelome cells. Br J Heametol. 2009; 144(5):796–8. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008. 07505 x PMID: 19036118
- Lu D, Lu JX, Endo T, Zhou H, Yao S, Willert K, et al. Ethacrynic acid exhibits selective toxicity to chronic tymphocytic leukemia cells by inhibition of the Wht/cete-caterun pathway. PLoS One 2009; 4(12):68294. doi: 10.1371/journel.pone.0006294 PMID: 20011658
- Koher CM, Kim Y, Schmidt-Wolf IG. Targeting renal cancer with a combination of WNT inhibitors and a b-functional peptide. Anticancer research. 2013; 33(6):2405–40. PMID: 20749892
- Locez-Lazaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. Mni Rev Med Chent. 2009; 9(1):31–59. PMID: 19149659
- Seelinger G, Morton I, Schempp CM. Anti-exident, anti-bifammatory and arti-at ergic activities of ueptin. Planta Med. 2008; 74(14):1687–77. doi: 10.1055/s-0028-1068314 PMID: 16837165
- Sabor M. Ant-Inflammatory and anti-allergic properties of fevoroids. Prog Cim Biol Res. 1986; 213:471–60. PMID: 2472660
- Weng CJ, Yon GC, Flavoruide, a ubiquitous dietary phenolic subcrass, exert extensive in vitro antirotative and in vivo anti-metastatic activities. Cancer Metastasis Rev. 2012; 31(1-2):323-51. doi:10. 1007/s10555-012-9347-y PMID: 22314287
- Lin Y, Shi R, Wang X, Shert HM, Luteoin, a flavonois with potential for cancer prevention and therapy. Can Cancer Drug Targets. 2008; 8(7):534–46. PMID: 19991571
- Kandaawami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, et al. The antitumor activities of flavonoids. In Vivo. 2005; 19(5):895–809; PMID: n6097445.
- Ansknar P, Kosongviriyapan V, Provan A, Kongpetch S, Sripa B, Senggurprai L, Lutcoln Arrests Cell Cycling, Induces Apoptosis and Inhibits the JAK/STAT3 Pathway in Human Cholangiocarcinoma Cells: Asian Pac J Cancer Prev. 2014. 15(12):5071–6. PMID: 24996568
- Wu H, Huang M, Lu Y, Shu Y, Liu P, Luteo in Induces Apoptosis by Up-regulating miR-34a in Human Sasitic Cancer Cells. Technol Cancer Hes Treat. 2014.
- Zhang H, Li X, Zhang Y, Luan X. Luteolin induces apoptosis by activating Fas signaling pathway at the receptor level in bryogeal squamous cell like Hep-2 cells. Eur Arct Otechnolaryngol. 2014; 271(6):1653–9. doi: 10.1007/s00405-014-2903-z PMID: 24477342
- Hong Z, Cao X, Li N, Zhang Y, Lan L, Zhou Y, et al. Luleolin is effective in the non-small cell ung carcer model with LB58P/T790M EGF receptor mutation and enfolin-b resistance. Br J Plummacol. 2014; 171(11):2942–53. doi: 10.1111/bpt.12610.PMID. 24471785
- Ding S, Hu A, Hu Y, Ms J. Weng P. Dai J. Anti-hepatoms cells function of luteoim through inducing apoptosis and cell cycle arrest. Tumour biology: the journal of the international Society for Oncodeveopmental Biology and Medicine. 2014; 35(4):3059–60.
- Khan HY, Zubair H, FaisarM, Ullah MF, Fashan M, Sarkar FH, et al. Plant polychemol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intrace lular copper-one and reactive oxygen species generation: a mechanism for cancer chemopreventive action. Mol Nutl Food Res. 2014; 58(3):437–45. doi: 10.1002/mmf.201900417 PMID: 24123726
- Sakurat MA, Ozaki Y, Okuzaki D, Noito Y, Sasakura T, Okarroto A, et al. Gelitinib and LuteoIm Cause Growth Arrest of Human Prostate Cancer PC-3 Cells via Inhibition of Cyclin G-Associated Kinese and Induction of miR-630. PLoS One. 2014; 5(6):e100124. doi: 10.1577/journal.pone.0100124 PMID: 24971999
- Chang WY, Chiao MT, Liang YJ, Yang YC, Shan CC, Yang CY, Lutedin inhibits migration of human glioblastoma L-87 MG and T88G cells through downregulator of Cdo42 expression and PI3K/AKT activity. Mol Biol Pep. 2013; 40(9):5315–28. doi:10.1007/s11033-013-2832-1.PMID: 23677714
- Fang X, Zhou Q, Lu C, Tao ML, Orug screening study using glioma stem-like calls. Mol Med Hep. 2012; 6(5):1117–20. doi: 10.3882/mmi.2012.1040 PMID. 22923060
- Butts A, DiDone L, Koselny K, Baxter BK. Chaprier-Reactic Y, Wellington M, et al. A recorposing approach identifies off-patent orags with tangicidal cryptocococal activity, a common structural chercotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptocococais. Eukaryot Cell. 2010; 12(2):278–87. doi: 10.1126/EEC.00314-12.2000; 23243064
- Seman AR, Carmody LC, Morgan B, Farnandez C, Forbeck E, Lewis TA, et al. Identification of a selective small molecule inhibitor of brisist cancer stem cells. Bioorganic & medicinal chemistry letics. 2012; 82(10):3571–4.
- Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of selective inhibitors of cariceriatem cells by high-throughput screening. Cell. 2009; 138(4):645–59. doi: 10.1016/ cell.2009.06.054 PMID: 19682790

8.1.2. Annexe I.2

Triterpenoid saponins from *Albizia lebbeck* (L.) Benth and their inhibitory effect on the survival of high grade human brain tumor cells

Carbolypetrate Research 404 (2015) 36-13

Contents lists available at Science/Direct

Carbohydrate Research

ournal homepage: www.elsevier.com/locate/carres

Triterpenoid saponins from Albizia lebbeck (L.) Benth and their inhibitory effect on the survival of high grade human brain tumor cells



Olivier Placide Noté "", Dong Jihu", Cyril Antheaume", Maria Zeniou", Dieudonné Emmanuel Pegnyemb", Dominique Guillaume", Hervé Chneiwess, Marie Claude Kilhoffer , Annelise Lobstein "

*Pharmicognesis of Melfenies Neurolley Beachess Laborations d'Innovation Phérapeursque, USBS 7200, ENRS-Universal de Streebourg, Franké de Phormacie, 14 route du Ran, 2-67401 Bielen Cedex, Beace

¹ Enformance de Pharmacochanie des Substances Notatelles, Sépartement de Conne Organique, Faculté de Sciences, Educanté de Standard, IP 852 Yournal, Campenno, ¹ Chinae-Ballogie Balgentine, Enformance d'Incomplete Philippendique, DMR 2200, CMRS-Educernal de Standards, Faculté de Standards, 74 soute du Rich.

8-67407 Indina-Codex, Brance-

⁶ Science Common (Vicalyse, UMB 7200, CMS5-Universitä de Strachowy, Esculté de Pharmache 74 maise d. 80%, 6-67401 distrib Cenez, France

¹ UFB Mildelest-Barmann, CMR5-2MBF7312, 51 tate Cognolog July, 51100 Reline, France

¹Non-science Parts Scine, ISBN: DVR5-UM9-8245, Inserin GU190, UMMC, 7 Juni Sant Bernard, 79005 Parts, Renard

ARTICLE INFO

Annole Macry: Received 23 August 2014 Secreted in revised form 20 November 2014 Accepted 13 December 2014 Acadebic of the 23 January 2015

Agynoriis Album lebberk Minnosoceae Triferpenere saponnis Lebbeckosides Cytoineit activity

ABSTRACT

As part of our snatch of new bisactive triterpenoid saponing from Cathersonian Mintosactae plants, phytochemical investigation of the routs of Albeie lebicok led to the isolation of two new obsaume-type saponina, named lebbeckouldes A -B (1, 2). Their structures were established on the basis of extensive 10 and 20. NM8 (¹H. ¹³C NMR, IEPT, CDSY, 10CSY, 80ESY, HSQC, and HWBC) and HRESIMS studies, and by chemical evidence. Compounds 1, 2 were evaluated for their inhibitory effect on the metabolism of high grade human brain tumor cells, the human glioblastoma 0,87. VG cell lines and the glioblastoma stem like 10 t cells isolated from a patient tumor, and known to be particularly resistant to soundard therapies. The isolated saponing showed significant cyritoxic activity against 0,87. MI, and 10.1 cancer cells with U to values of 3.46 µM and 1.36 µM for 1, and 2.10 µM and 2.24 µM for 2, respectively.

2014 Eisevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The genus Albina comprises about 150 species widely distributed in the tropics, with the greatest diversity in Africa and South America.¹ Triterpepoid suporitis are commonly described in this genus. Adiantifications, grandifications are complex triterpenoid suporins isolated from the Albina genus.² These glycosides, represent a class of very complex glycosides possessing a common agiycon unit, acade acid, having various oligosaccharide moleties at C-3 and C-28 and an acyl group at C-21. They have been reported to inhibit the growth of tumor cells, and thus appear as a new potential class of anticancer natural miterpenoid saponins.² In order to discover new bloattive acade acid glycosides, we screened the saponin content of Camerbornan Minosaceae including Albina, Acodia, and Entada genera. Three Albina species, among which

4 Corresponding within Tel.: +237 72700015; 9x: +237 22230586.

1-molf anthesis downerood twy above if (Q.F. Note).

Albizig lebbeck, were selected on the basis of their HPLC-DAD, LC-NMR, and LC-MS profiles.

Albuie lebbeck (L.) Benth is a pantropical species distributed in Africa. Asia. America, and Australia. In West Africa, it is traditionally used against diarrhea, dyservery, hemoryhoids, bronchitis, asthma, eczema, and leprosy." In South-East Asia and Australia, the stern back is used as a tolk remedy to treat abdominal turnors, bulk, crugh, eye disorders, and lung allments. It is also reported to be astringent, pectoral, rejuvenating, and tonic." Nootropic and anototytic activtics of a saponin fraction isolated from A. lebbeck leaves have been reported." Oral administration of the saponin fraction isolated from A lebbeck back to male rats has been reported to significantly reduce fertility through reduction of sperm mobility and density. "Previous phytochemical studies of A lebbeck stern back reported the presence of glycosides of acacic actid lartones."

In the present investigation on A *khbeck* roots, we report the isolation and structural characterization of two new acacic acid glycosides, named lebbeckosides A-B (1-2). The isolated compounds were evaluated for their inhibitory effect on the


metabolism of high grade human brain tomor cells, namely the human globlastoma U-87 MG cell lines and tempzolomide-resistant glioblastoma stem-like cells isolated from a patient tumor, results are reported herein.

2. Results and discussion

The air-dried powdered roots of A lebbeck (300 g) were extracted with ac-EtOH 70% using a soxhler apparatus. After evaporation of the solvent, the resulting brown residue was partitioned between water and water-saturated n-BoOH. The n-BuOH fraction was then submitted to vacuum-liquid chromatography (VLC) on reversed-phase silica gel yielding three main fractions that were subjected to VLC on silica gel. Purification of the eluated subfractions by Semprep-HPLC afforded two new triterpenoid saponins (Chart 9).

Lebbeckoside A [1] was obtained as a white, amorphous powder. Its high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS) (positive-ion mode) exhibited a pseudo-molecular ion peak at m/z 2486.2146 [M+NHa]* (calcd 2485.2147), consistent with a molecular formula of C115H186O5a. Upon acid hydrolysis with 2.0 M HCI, 1 gave an adacip acid lactone unit, which was identified with an authentic sample, and compound 1 also gave glucose (Clc), sylose (Xy), fucose (Fuc), rhamnose (Rha), arahinose (Ara), and quinovose (Qui), which were identified by co-TLC with authentic samples. The absolute configuration of these sugar residues was determined to be o for Glc, Xyl, and Fut, and 1 for Ara and Rha based on GC analysis of their trimethylsikyl thiazolidine derivatives." Its H NMR spectrum showed seven angular methyl groups as singlets at 5, 0.90, 1.01, 1.08, 1.10, 1.12, 1.31, and 1.84 (each 30, s), one plefinic proton at $\xi_{\rm H}$ 5,64 (1H, br s), and sugar proton signals at $\xi_{\rm H}$ 4.89-6.42. ¹¹C NMR spectrum showed two eleftnic carbon signals at at 123.5 and 143.8, suggesting that 1 was an oleanane type triterpenoid saponin, 1D (1H, 1PC NMR, DEPT) and 2D (COSY, HSQC and HMBC) NMR techniques permitted assignments of all 'H and ¹²C NMR signals of the aglycone of 1. This aglycon was thus recognized to be acacic acid (36.16o,216-trihydroxyolean-12-ene-28-oic acid) by comparison of its 'H and "C NMR signals with those reported in the literature." It the downfield position of the axial group at C-14 (Me-27, § 1.84) in the 'H NMR spectrum, implied an additional axial (a) hydroxyl group at C-16. The ROESY correlations observed between H-21 (3.5.37) and H-29 (3.1.01, s), suggested an or-axial orientation of H-23, as well as between H-3 (a 3.49) and H-5 (8 0.82) indicated the graxial orientation of the two protons. The 3.21-hydroxy groups and 28-carbonyl group of the aglycon carried a sugar molety, respectively, as evidenced by the glycosylation- and acylation-induced shifts observed at & 89.0 (deshielded signal for C-3 of the aglycon), 174.9 (shielded signal for C-28 of the aglycon), and 77.6 (deshielded signal for C-21 of the aglycon), indicating that 1 was a 21-acyl 3,28-bidestnosidic acacic acid derivative with sugar chains linked to C-3 and C-28 of the aglycon through an ether and ester bond, respectively, and with an acyl group attached at C-21.

The 'H NMR spectrum of 1 showed 10 anomenic protons at ϕ_0 4.91 [d, J = 8.0 Hz, glucose (Glc I)], 4.97 [d, J = 8.0 Hz, fucose (Fuc.)]. 5.09 [d, J = 7.1 Hz zylose (Xyl I)], 6.16 [d, J = 8.0 Hz, glucose (Glc [17], 6.42 [br s. thamnose (Rha)], 5.42 [d, J+8.1 Hz, glucose (G); [II]], 5.30 [d, J = 7.1 Hz, xylose (Xyl II)], 4.90 [d, J = 8.0 Hz, quintwase "Qui I'], 4.89 (d. / + 8.0 Hz, quinovose (Qui II)], and 4.97 [d. / + 8.0 Hz, quinovose (Qui III)], which correlated with ten anomeric carbon atom resonances at & 105.3, 103.7, 107.3, 95.6, 101.6, 106.4, 105.8. 99.7, 99.6, and 97.3, respectively, in the HSQC spectrum (Tables 1 and 2). The 'H and "C NMR data (Tables 1 and 2) of the monosaccharide residues were assigned starting, either from the readily identifiable anomeric proton of each hexosyl or pentosyl unit, or from the CH3-proton doublet of each 6-deoxyhexosyl unit, by means of TOCSY, HSQC, and HMBC spectra obtained for this compound. The anometic centers of the r-glucose, o-fucose, p-quinovose, and p-xylose units were each determined to have a β -configuration based on large $\frac{\eta_{2}}{2\pi}$ (μ_{2}) values. And the α -anometic configuration of the c-tham nose was judged by the broad singlet of the anometic proton and the chemical shift value of C-5 (368.8) 11 In



Table 1 ¹⁰ NMR (500 MHz) and ¹⁴E NMR (125 MHz) data of the sugar molecies attached at C-3 and E-28 of compounds 1-2 in pyridine-2, (6 in ppn)²

Funter	1		2	
	A G to Hel	8	Au () in Hz)	14
1-0-Sagara	101101			
GIL 1-0	4.91 d (8.0)	005.3	4,89 (5.0)	105.4
2	4.03	76.9	4.92	73.8
3	4.12	78.5	4.13	78.7
4	4.15	71.3	4.15	73.4
5	4,02	76.6	4.01	76.7
6	4,56; 4,73	76.2	4.36; 4.74	70,3
Pac-1	4.97 d 16:01	100.7	4.99 8 (9.1)	103.0
2	4.45	82.6	4.45	82.6
3	4.14	75.7	4.15	75.9
	4.04	72.2	4,32	72.2
5	3.74	71.8.	3,70	82.8
8	1.37 d (%5)	1.8%	1.38 8 (5.1)	12.0
Xy 1-1	5.00 d 17.11	107.3	8.88 d (71)	107.3
2	4,08	76,7	4.08	75.8
1	4.01	76.8	4.02	76.7
	4.10	71.3	4.11	71.3
5	3.60; 4.48	67.5	3.59; 4,46	67.6
20-0-500075				
Gle II-5	0.15 d [801]	55.0	6.15 0 (8.9)	95.0
12	4.51	76.7	4.30	705.0
2	4.07	78.0	4.95	22.9
4	6.13	21.8	4.17	91.9
5	4.00	79.5	4.02	79.5
6	430: 441	62.4	4.27, 4.30	62.4
-Bita-I	6.42 br a	101.5	6.41 to a	101.5
2	4.82	72.2.	4.81	77.2
3	4.30	83.6	4.49	83.3
4	4.40	83.4	4.32	81.4
5	4.50	66.0	4,59	08.9
	r's q (art)	18.8	Pauliture	18.8
Gle 20-1	5.4T d (83)	106.4	5.43 d (R. 1)	06.2
2	4,14	75.5	4.15	73.8
1	4,18	77.7	4.17	77.6
4	4.15	77.7.	4.16	71.8
5	3,98	76.4	3,93	A8(3)
	9.48; 4.29	CD.1	4.09; 4.27	63.3
Apr. 0-1	5.30 d (77.1)	106.6	5.29 8 (71)	100,8
2	4.19	76.3.	4.11	76.1
3	4.05	20.9	4.95	12.9
4	4.12	71.3.	4.13	211
5	3.54; 4.26	67.7	1.53; 4.27	67.7

Overlapped procon NMR signals are reported without designated multiplicity. * Assignments tage based on the EMBC, HSQC COSY, TOCSY, ROESY, and TEPT experiments.

addition, the -H NMR spectrum of compound 1 exhibited three olefinic proton signals at $\delta_{\rm E}$ 6.89 (d, J = 7.3 Hz), 7.00 (d, J = 7.3 Hz), and 7.68 (d, J = 7.1 Eq), and three groups of one substituted ofelin proton signals, one group at a, 6.25 (dd. / - 10.5; 17.5 Hz), 5.28 (d. [= 10.5 Hz) and 5.47 (d,] = 17.5 Hz), another group at 8, 6.27 (dd. / = 10.5; 17.5 Hz), 5.28 (d. / = 10.5 Hz) and 5.47 (d. / = 17.5 Hz), and the other group at an 5.99 (dd. J-11.0: 17.2 Hz), 5.30 (d. [-10.5 Hz] and 5.39 (d, [-17.2 Hz], indicating that compound 1 had three units of monoterpeopid moleties," Extensive analysis of 1D and 2D NMR spectra of 1, revealed that the sugar molety at C-3 was identical to that of julihoosides); and j, "II and Jie," and albizoside A," and the monoterpese quinovosyl molety at C-21 was identical to that of gummiferanside C.11 contartnside A,11 and coriariosides C-D." Hence, the units attached at C-3 and C-21 of the aniycon of 1 were established as 8-o-xylopyrahosyl-(1+2;-8p-fucopyranosyl-(1+6)-p-p-glucopyranoside_and_[(2E.6S)-6-0-[4-0-][2E,65]-2,6 dimethyl 6-0 (β o-quinovopyranosyl)octa 2.

7 dienoyl]-4-0 ((2E.6S)-2,6 dimethyl-6-0 (p-o-quinovopyranosyl) octa-2.7-dienoyl]-6-o-quinovopyranosy()-2,6-dimethylocta-2,7dienoyl], respectively [Tables 1 and 2].

For the glycosidic chain at C-28 of the aglycone, a correlation in the HSQC spectrum at $\delta_0/\delta_{\rm E}$ 95.6(6.16 (d, J = 8.0 Hz) showed that Glc II is linked to the carboxylic group of the aglycon by an ester linkage. This conclusion was supported by the shielded signal of C-28 at & 174.9, in comparison with the free carboxylic acid, and by the HMBC correlation observed between H-1 of Gic II (5r, 6.15) and C-28 of the aglycone (5r, 174.9). Moreover, the MS' spectrum of 1 revealed a fragment ion at m/s 1884.0074 [(M+NH₄) 602]", in which 602 mass units were accounted for the mass of the C-28-linked oligosaccharidir chain consisting of ane pentose, one deoxyhexose, and two hexose units. Extensive analysis of 1D and 2D NMR spectra revealed that this oligosaccharide molety was constituted by two Gir, one Xyl, and one Rha. In addition, the HMBC correlation observed between H-1 of Rha (δ_0 , 6.42) and C-2 of Gle II (δ_0 , 76.7), led us to suggest that Rha was attached to C-2 of Glc II. This was supported by the ROESY correlation observed between H-2 of Glc II (4, 4.31) and H-1 of Rhs (\$< 6.42). Moreover, in the HMBC spectrum, a correlation observed between H-1 of Cir III (3_H 5.42) and C-3 of Rha (3_E 83.5), indicated that Gic III was linked to C-3 of Rha. This was confirmed by the ROESY correlation observed between H-3 of Rha (d_a 4.30) and H-1 of Glc III (d_b 5.42). Furthermore, the ROESY correlation observed between H-T of Xyl II (5), 5:30) and H-4 of Rha (6, 4.49), showed that Xyl II was linked to C-4 of Rha. Thus, the tetrasacchatide molety attached at C-28 of the aglycon was determined to be β-e-xylopycanosyl-(1-4)-i8-c-glucopyran $osy[-(1 \rightarrow 3)]-\alpha$ -t-rhamnopyranosy[-(1 $\rightarrow 2)-\beta$ -t-glucopyranosy] (Fig. 1). Hence, the structure of lebbeckoside A (1) was elucidated as 3-0 [3-5 kylopyranosyl (1-2)-6-5 fucopyranosyl-(1→6)-B-p-glucopyranosyl|-21-0-[12E.65]-6-0-[4-0-](2E,65)-2. 6-dimethyl-6-0-(B-t-quinovopyranosyl)octa-2,7-dienoylj-4-0-((25, 55)-2.6-dimethyl-6-O-(p-t-quinovopyranosyl]octa-2,7-dienoyl]-pn quinovopyranosyl]-2,6-dimethylocta-2,7-dienoyl]acacit acid acid 28-O-8-t-xylopyranosyl-(1-4)-[t-p-glucopyranosyl-(1-3)]-2-trhamnopyranosyl-[1-2]-p-p-glucopyranosyl ester.

Lebbeckoside 8 (2) obtained as a white amorphous powder, exhibited in its HRESIMS spectrum (positive-ion mode) a pseudomolecular ion peak at m/r 2174.0665 [M+NIL] (calcd 2173.0574), consistent with a molecular formula of C₁₀₂H₁₀₂O₄₃₉ As already observed for 1, acid hydrolyvis of 2 also afforded an acacir acid lactone, identified by co-TLC with an authentic sample, together, with a glucose, a sylose, a lucose, a charmose, a arabinose, and p-quinovose units which were identified by GC analysis of their trimethylsilyl thiazolidine derivatives." Comparison of 1D and 2D NMR data of 2 with those of 1 indicated that 2 had acadit acid as aglycon while the major difference regarding the aglycone molety was the absence of one monoterpene-quinovosyl (MT-Qui) unit in 2, as already suggested by its mass spectrum, which displayed 312 mass units less than that of 1. The observation of glycosylation- and adylation-induced shifts at C-3 (& 89.1), C-21 [& 77.5), and E-28 (Ac 175.1) in the "C NMR spectrum of 2 suggested that it should also be a 21-acyl 3,28-bidesmosidic acadic acid derivative with sugar chains linked to C-3 and C-28 through an other and ester bond, respectively, and with an acyl group attached at C-21. The ¹H NMR spectrum of 2 showed nine anomeric protons signais at an 4.90 [d. / = 8.0 Hz, glucose [Glc 1]], 4.99 [d. / = 8.1 Hz, fucose (Fuc)], 5.08 [d,] = 7.1 Hz, sylose (Xyl i)], 6.15 [d,]= 8.0 Hz, giacose (Gir II)], 6.41 [br s. (hammose (Rha)], 5.43 [d, J ~ 8.1 Hz, glacose [Cir III], 5.28 [d,] = 7.1 Hz, sylose (Xyl II)], 4.90 [d,] = 7.3 Hz, quinovose (Qui T)], and 4.89 [d, j=8.2112, quinovose (Qui T)], which gave correlations with nine anometic carbon resonances at or 105.4, 103.8, 107.3, 95.6, 101.6, 106.2, 106.8, 99.7, and 99.7,

O. P. Noté et al / Carloshydrate Ressored 46d (2015) 26-33

Table 2

¹H NNR (300 MHz) and ¹⁰C NNR (125 MHz) due of the nonovergene-quinovosyl movement attached at C 21 of comparison 1-2 in pendine at [4 in pen]¹⁰

Protition	1.		1		
	Ag [] m Hz [Ne -	Auto Ba	10	
(592)					
MT-1-1	-	1083	-	198.3	
2	-	138.0	The second second	128.5	
3	6.89.4 (2.0)	142.4	0.51 (7.1)	142.7	
4	2,48	24.0	1.79, 2.45	24.1	
5	1.76	48.0	1.78	40.2	
6	· Constant and a second second	ND.	A DATE OF THE PARTY OF THE PART	79.0	
7	6.25 dd (10.5; 17.5)	144.3	6.24. doi:(0.1) 16.81	164.5	
8	5.38 d (10.51 5.47 d (17.5)	115.4	5.25 d (9 1); 5.46 d (16.9)	115.5	
5	193 1	13.1	1.91 1	131	
10	2,51.2	29.2	1.57.5	26.0	
DOL: 10-1	E-00	1060		168.2	
2	-	128.3		1283	
3	7.00 (22.3)	143.2	7.05 ((7.3)	1438	
4	2.42	23.8	2.50	24.1	
5	1.76	41.4	1.78	40.8	
é.		83.	-	53.2	
7	6.27 dd (10.5; 17.5)	144.4	6.27 dd 110.4 18.0	144 3	
8	5.28 c (10.3); \$ 47(17.8)	115.2	9.31 0 (15.4), 5.48 (18.0)	1153	
6	185 4	13.1	1.85 4	15.1	
16	1571	24.2	1.58 1	24.7	
ATT 10.1	STERCE ST	112.2	1.0360(5)		
and the state		120.5			
6	1 ma + 11 m	149.9			
	3.45	24.7			
	1.74	0.0			
-		837			
3	3 20 44 (11 /0) 17 25	143.5			
g	3 33 4 (11 01 5 35 4 /17 25	115.8			
-	LOC .	13.1			
100	58.	22.0			
Dist.	4.00 4.09.0	00.7	4.777 4177 23	20.7	
and the second sec	4.02	75.0	4.00	77.0	
	4.03	70.0	4.32	20.0	
	1.22	10.0	4.45	10.0	
	3.30	70.5	1.15	100	
	1 30 4 (6.5)	12.0	151 4(50)	10	
CON VICE	- an a tract	1.485	1.41 9 (200)		
12:11-1	A.99 & (9.0)	99.5	4.89 (1 (9.2)	33 7	
2	4.02	75.7	4,99	75.7	
2	4.20	70.2	4.1.9	127	
4	2.0-9	75.9	4.22	75.0	
2	1.75	72.7	3.70	729	
100 M	2.00 d (5.2)	19.2	1.61 4 (5.4)	18.2	
Qu. 10-1	4.57 # (8.0)	97 E			
2	4.03	75.0			
1	4.22	76.4			
4	8.73	27.1			
5	3.72	70.0			
	1.02 6 (50)	19.5			

Overlapped precon NNR signals are reported without designated institutienty.

* Assignments were based on the HMSC HEQC, COSY, TOCSY, ROESK and DEPT reperiments.

respectively, in the HSQC spectrum (Tables 1 and 2). In addition, the 'H NMR spectrum of 2 exhibited two olefinic proton signals at $\sigma_{\rm E}$ 6.91 (d, l = 7.1 Hz) and 7.05 (d, l = 7.3 Hz), and two groups of one-substituted olefin proton signals, one group at $\sigma_{\rm R}$ 6.21 (dd, l = 9.1; 16.9 Hz), 5.26 (d, l = 9.1 Hz) and 5.46 (d, l = 16.9 Hz), the other group at $\sigma_{\rm R}$ 6.27 (dd, l = 10.4; 18.0 Hz), 5.31 (d, l = 10.4 Hz) and 5.48 (d, l = 18.0 Hz), indicating that compound 2 had two units of monotorpenoid moieties." Hence the units attached at C-3 and C-28 of the agiycon of 2 were established as β -t-xylopyranosyl-($1 \rightarrow 2$)- β -D-fucopyranosyl-($1 \rightarrow 6$)- β -D-glucopyranoside, and β -e-xylopyranosyl-($1 \rightarrow 4$)- β -D-glucopyranosyl-($1 \rightarrow 3$)]-2--rhamnopyranosyl-($1 \rightarrow 2$)- β -D-glucopyranosyl-($1 \rightarrow 3$)]-2---

Extensive analysis of 1D and 2D NMR spectra of 2 allowed to identify the unit attached at C-21 as [(2E,65)-6 0 (4-0 [(2E,65)- Aracic acid-type saponins have been reported to exhibit cytotoxic activity on various turnor cell types, namely human Juckat leukemia cells, cutaneous lymphoma cells, breast, ovarian and pancreatic turnors.⁴ To address the cytotoxic activity of these our



Figure 1. Key HMPC and ROESY correlations for compound 1.

new acacic acid glycosides, lebbeckosides A(1) and B(2), we evaluated their activity on cancer stem-like cells isolated from glioblastenta which correspond to high grade human brain turnors, with very poor prognosis and for which there is an unmet medical need: Brain tamors, like many other tamors contain cancer stem-like cells, "" known for their implication in turnor fueling, resistance to chemotherapies and tumor recurrence after therapy." 10 increase therapy efficacy, new chemical compounds targeting those cells need to be found. "We therefore tested our newly isolated molecules on cancer stem-like cells isolated from patients' globlastoma." These cells were characterized and were shown to exhibit the typical properties of cancer stem-like cells, including resistance to chemotherapeutic agents and namely against temozolomide (TMZ) the standard of care for glioblastoma.²⁴ Finding molecules with cytotoxic activity toward such cells is of prime importance to improve cancer control and therapy. Activity of the lebbeckosides was also evaluated on U-87 MG the commercially available glioblastoma cell line. Compounds 1 and 2 inhibited US7 glioblastoma cell survival, assessed by ATP level measurements, with ICm values of 3.16 and 2.10 µM (Fig. 7 and Table 3). Lebbeckesides A (1) and B (2) were also active on the highly appressive, drug resistant IG1 cells with an IC₅₀ in the same range as that determined for the U-R7 MC. cell lines (Fig. 2 and Table 3). Their cytotoxic effect on both cell types was confirmed by trypan blue staining. Lebbeckoside 8 (1) showed a slightly higher activity toward TET than tebbeckoside B (2) as indicated by their ICity values (Table 3). Also, the level of cell death observed for 1 and 2 after 24 h of treatment pointed out a larger efficacy of the molecules toward IG1 compared to U-87 MG cells. Hill coefficients values (n₁) determined from curve fitting suggested the presence of several binding sites for the different compounds.

with binding cooperativity. Non-avidin-type saponins, such as glycosides of obsanolic acid, had no effect on gliohlastoma cell survival (dom not shown). Under the experimental conditions used to test the lebbeckooldes, known anticancer agents such as etoposide, topotecan, pachtakel, and damorubicin did not show any activity on TGT cells' viability at concentration up to 50 μ M. Only tamoxifen, an estrogen antagonist used to treat estrogen receptor positive breast cancers, induced cell doath within the 24 h of the experiment. Tamoxifen has already been shown to act on cancer cells different from breast cancer cells and to be active on glioma and glioblastoma cell lines.³⁰⁰ In addition, tamoxifen alone in association with other drugs, namely TMZ has been used in clinical trials to treat glioblastoma.³⁰⁰ In comparison to tamoxifen (Table 1) lebbeckosides induced cell death of hoth glioblastoma cell types and more particularly the glioblastoma stern. Tike cells with a 10 ford higher activity.

3. Conclusion

This study unveiled the presence in Albizia lebbeck of new acacle acid-type saponies, molecules cylotoxic at a micromolar concentration toward high-grade glioma cancer cells including these with stem-like cell properties, known to be resistant to standard treatments. The cylotoxic effect of the two major avicins (D and C) nolated from Acacla victoriae, another Mimosaceae species from Australia on cancer cells has been reported to occur through various mechanisms. Indeed, avicin D-mediated cell death has been reported to be associated with the activation of the death receptor-caspase-8 pathway.⁴ Avicins appear also to affect phospholipid dependent processes,⁴⁴ and trigger caspase independent autophagic cell death by the regulation of the AMPK-TSC₂-mTor



Figure 2. I firm of labbeckosties A and 0 on (a and b) globlactoma 1, -67 MG cell lines and (c and d) 104 globlactoma stem-like cells. Cells were treated for 24 h at the given abbeckostie concentration. The imme number of cells is thereed with either labbeckostie or which (control). Online represents percent approximation of cells in the rest with either labbeckostie or which (control). Online represents percent approximation of cells in the sector with either labbeckostie or which (control). Online represents percent approximation of cells in the sector version which there is a similarity of the sector of cells in the sector of cells in the sector of the sector of

Table 3

 $M_{\rm eff}$ and HD coefficients (e.g of which evolves λ (1) and 8 (2) on 1987 ME and 763 glinth anterna store-like cells (764 GSCs)

Compand	1087 143		TGI GS	-
	(C., (J.31)	94	HL. TUNT	
1	3.46+ 0.10	66	138+0.07	2.8
2	2,10+3.05	5.6	2.24 ± 0.18	
Tamoxies	31.1.2	59	1612	14

pathway." Moreover, it has recently been shown that some avicins may increase the level of ubiquitinated proteins in human luckat T cells possibly through an up-regulation of ubiquitin ligase activ-However, avicins seem to have other, and yet only partially identified, molecular targets.¹⁷ Lebbeckosides A-B, two new avicin analogs isolated from Albizio lebberk, might therefore be highly useful to further decipher the mechanism of action of this triterpene saponin and obtain new structure-activity relationship data. it will be also of high interest to compare the effect of lebbeckosides A and B on other types of cancer cells, as well as to use these mulecules as tools to investigate the pathophysiology of cancer cells with stem properties versus non-stem cancer cells. In addition, on the chemotaxonomic potot of view, this study represents a valuable contribution to the chemotaxonomy of the Albizia genus, which is known to be a rich source of triterpenetif saponing. Furthermore, the findings, especially for the monotespene-quinovosyl units, established in compounds 1 and 2, and identical to those found in the related compounds isolated from Albizia contaria and Albizia gummifero may indicate a close relationship between the three species of Albizia genus.

4. Experimental section

4.1. General methods

Optical rotations were measured on a Jasco P-200 polarimeter. 11 NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) spectra were recorded at room temperature in pyridine d_a using a Braker AVANCE III 500 spectrumeter. Chemical shifts are given in δ (ppm) value relative to TMS as internal standard. HRESIMS spectra were recorded on a microTO7 ESI-TOF mass spectrumeter (Broker) operating in positive mode. Analytical HPLC was performed on Varian 920-LC apparatus equipped with an autosamplet, a pump, a diode array detector, and Calaxie software. Semipreparative HPLC was performed on a Gilson apparatus equipped with Tribution IC software using a Nacleodur 100-5 C18er (23 × 250 nm, 5 µm) column purchased from Machery-Naget (Germany). Thin layer chromatographies (TLC) were performed on precoated silica gel plates (60 F_{2NA} , Merck) (n-BuOH-AcOH-H₂0, 65:15:25). The spots were observed after spray with Komarowsky reagent, a (5:1) mixture of p-hydroxybenzaldehyde (2% in MeOH) and (50% H₂SO₄ in EtOH). Vacuum-liquid nhromatography (VLC) was carried out using RP-18 silica gel 60 (25–40 µm) and silica gel 50 (15–40 µm and 40–63 µm).

4.2. Plant material

The roots of Albeda lebbeck (L.) Benth were harvested at Nicolais son. Yaoundé peripheral quarter, in Cameroon in October 2011 under the guidance of Mr. Victor Nana, botanist of the National Herbatium of Cameroon (NHC), where a voucher specimen (47196/HNC) was deposited.

4.3 Extraction and isolation

Air dried and powdered roots of A letheck (300 g) were extracted with EtD11 70% in a soxhlet apparatus. The hydroairoholic solution was then evaporated to dryness under reduce pressure to yield a brown residue (4.83 g). This residue was suspended in 200 mL of water and partitioned between H₂O and saturated *n*-B00H (3 \times 300 mL). The *n*-BuOH-soluble part (3.04 g) which exhibited cytotoxic activity against glioblastoma cancer stem cells (FC1) and human glioblastoma cell line (0-87 MC), with 10₃₀ values of 8.52 and 5.01 µg/ml, respectively, was dissolved in a minimum of water (10 mL) and then submitted to VLC using RP 18 (25–40 µm) silica gel and eluting with a gradient of MeOH H₂O (100% H₂O \times 1000 MeOH) to yield 3 main fractions (11-L3). The 70-85% MeOH fraction (L3) (484.2 mg) which showed significant cytoroxic activity against the used cancer cells (TC1, IC10 4.87 µg/ ml and L-87 MG, ICs: 3.18 ugind) was subjected to VLC on silicagel 60 (15-40 µm) eluted with CHCL-MeOH-H-O (80:20:2, 70:30:5, 60:33:7, and 60:40:10) to give 29 subfractions. The subfractions were combined into 6 main subfractions (131-136) based on TLC behaviors. Subfraction L33 (66.6 mg, TG1 IC in 3.31 µg/ml, and U-87 MG IC₅₀, 2.28 agoin!) was purified by Semipreparative HPLC using a gradient system of CH₂CN-H₂O (20 ml/min) to yield compounds 1 (19.8 mg, t₀ 27.07 min) and 2 (8.7 mg, t₀ 24.23 min).

4.3.1. Lebbeckoside A (1)

White anticphous powder, $[x]_D^{-1}$ +30.95 (c 0.06, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, C.D.N) and ¹³C NMR (125 MHz, C.D.N) data of the agiycon (Supporting information), 'H and "C NMR data of oligosaccharidic chains, see Tables 1 and 2, 'H and ¹¹C NMR data of monoterpene units, see Table 2, HRESIMS (positive-ion mode) m/ z: 2486.2146 [M+NHz] [caled for CristHun054, 2485.2147].

4.3.2. Lebbeckoside B (2)

White amorphous powder; [2]6 -20.45 (c 0.16, MeOH); H NMR (500 MHz, U,D,N) and ¹⁹C NMR (125 MHz, C,D,N) data of the agiycon, "Supporting information). "H and ¹⁵C NMR data of oligosarchandic chains, see Tables 1 and 2. 'H and 12C NMR data of monotempene units, see Table 2, HRESIMS (positive-ion mode) nd z: 2174.0565 [M+NH4]" (caled for Cup HarzOna, 2173.0574).

4.4. Acid hydrolysis of 1-2 and determination of absolute configuration of monosaccharides

Each saponio (2 mg) was bylimlyzed with 2 ml of 2 M HCI at 85 °C during 2 h. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. The sugar mixture was extracted from the aqueous phase (10 ml) and washed with CH₂Cl₂ (3 × 5 ml). The combined CH₂Cl₂ extracts were washed with water to give after evaporation the aglycon molety. The sugars were first analyzed by TLC over silica gel (CHCl₃-MeOH-H₂O, 8:5:1) by comparison with standard samples. The absolute configuration of each monosaccharide was determined from GC-MS analysis of their trimethyisilylated derivatives by comparison with authentic samples using the method previously described." GC analysis was performed with a capillary TR-5MS SQC (15 m = 0.25 mm = 0.25 µm) column. Operating conditions were as follows: carrier gas, helium with a flow rate of 1 ml/min: column temperature, 1 min in 150 °C. 150-220 C at 4 C/min injector temperature, 250 °C; volume Injected 1 µl of the trimethylsilylated sugar in methylene chloride (0.13); split ratio, 1:50. The MS operating parameters were as follows: ionization potential, 70 eV; ion source temperature, 230 °C; solvent delay 4.0 min, mass range 100-700. The following sugars were detected for 1 and 2: + glucose, +-quinovose, p facose, p-xylose, and t-rhamnose.

4.5. Evaluation of inhibitory effect of saponins

4.5.1. Chemical reagents

Glioblastoma U-87 MG cells were purchased from AJCC. IG1 cancer stem-like cells isolated after surgical resection of a human glioblastoma (WHO grade IV glioma) were obtained from Dr. H. Chnetweiss (Neuroscience Paris), Stock solutions of the chemicals were prepared: 2 mg/ml, of lebbeckosides in milliQ water and 16 mM of tamoxilen in DMSO.

4.5.2. Cell cultures

Glioblastoma stem like cells (TG1) were grown as neurospheres as previously described." Neurospheres were mechanically dissociated twice a week and medium renewed. Glioblastoma U-87 MG cells were expanded in adherent culture according to the supplier's instructions (ATCC). All cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO>

4.5.3. Effect of chemical compounds on cell viability

Effect of chemical compounds on glioblastoma cell viability was assessed using the CellTiter Glo* luminescent cell viability assay (Promega), Sub-confluent U87-MG cells were trypsitized and resuspended in fresh medium to a density of 300000 cells/ml. 100 µL of cell suspension were seeded in each well of the 96-well opaque bottom plate (Creiner, Courtaboeuf, France, 30000 cells, well). Cells in the 96-well plate were incultated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 a for cell adherence. The medium in each well was then replaced by fresh medium (100 µL) with the desired concentrations of chemical compounds (or no chemical compound for untreated cells), TG1 cells were mechanically dissociated and resuspended in fresh medium to a density of 600,000 cells/mL 50 µL of cell suspension was seeded in a 96-well plate (30 000 cells; well), 50 µL of medium with or without 2 - the desired concentrations of chemical compounds were added to each well,

Cells were incubated at 37 °C, 5% CO2 and cell viability was measured 24 h later using the CeliTiter Gio* luminescent cell viability assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luminescence was measured using a Victor® plate reader (PerkinElmer), Relative ATP levels in each well were determined by calculating the percentage of luminescent signal in the well with respect to the average signal measured in negative control wells (without compounds). Each compound was tested in triplicate. Compound induced cell death was also assessed using trypan blue exclusion assay.

Curve fitting for IC is culculations: The IC is value was determined for each compound by fitting the data points according to the following equation:

$$y = \frac{S_{max} + S_{max} + ([compound] + \frac{1}{k_{max}})^m}{1 + ([compound] + \frac{1}{k_{max}})^m}$$

where y represents the expected response, [compound] is the chemical compound conceptilation, \$200, and \$200, are the maximum and minimum responses recorded, respectively, and n_e corresponds. to the Hill coefficient. Curve fitting was performed using the Microsoft Excel Solver component.

Acknowledgment

The authors are grateful to Dr. Victor Nana of the National Herbarium of Cameroon (NHC) for the identification and collection of plants.

Supplementary data

Supplementary data (1D, 2D NMR, and HRESIMS of compounds 1-2) associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2014.12.004,

References

- 4. aburt-Rater, M.; Hoth, J., Berger, J. M.; Fram, R., Miller, J. S.; Wirks, J. Hil Manufer, S. W. J.: Julian, M.: Hingston, D. C. I. J. Nat. And 2007, 64 (196-199), Lacable Habris, M. A.: Peggyemb, U. Li, Note, B. P., Matane-Offer, A. C.
- d, Biometsian Rev. 2014, 10, 565-584.
- 3 Inhomine, M. Aubres, infestion of illines day arres d'Aplane in Thurst, 504000 Edmons One: Paris 2009, p 183.
- Herrardi, S.L. Tantalised Against Cancery & Survey, Lloydia, 1971; pp. 109–160. The H. Cit, Sandaya I. V. P.; Pol, S. C., Wanters, Y. S., Kanner, S. S. Sharranat -Monimum, Johan, 2001, 65, 1395-1051.

- 5 Diams R. L. Chandlary, R.: Yaday, & K.: Memah, S. A.: Shihai, M. P. J. Telesopherman, 2009, 36, 31-93.
- Pul. B. C., Achan, B.; Yestinizawa, K.; Arthura 's Dyenichemistra 1999, 28, 1207-7.
- Chaobi, M., Chabert, P., Vontmers-Gévétibes, C.: Weniger, B.: Ocations, M.: Compart, H.: Sontry, J. Declaron, 1.; solitanile, A. Postschern, Fert. 2010, 5, 79–74.
- 9 Rettl. S.: Thorann (1.) Sevenet, 1.; Winngsons, B. W.; Lawind, F. J. Nat. Pead. 2003 67.007.001
- 10. Can S. Hurra, A. Miller, J.S. Xetworton, F. Rasallisalaria, J. Ambrautoferma, E: Ratimums V.E. Teorytin K. Jult, T.: Ringmun, D.G. I.J. No. Prod. 2007, 20. 101-104.
- 11. Henta, E.; Englowner, S.; Aralle, K.; Kimjer, J.; Stoharn, T.: Misconn, T. J. Man. Prod. 1997, 63 103-107. 12 1 Jang, H., Terg, W. V. 2040, V. V. Pol. J. B., To, 6, 11 Biorg, Med. Com. Lett.
- 2000.15 4493 4495.
- 12. Zhong, Li Zhong, J. Zhao, Y. Wang, P., Wu, L. Linng, H. Bissing, Still Chom. Lett. 2006 15 2765-2768
- 14. 200, K. 2bm, Y. D. G. Cui J., Bu Z. Zhing, R. Coursbolt, Res 2000, 134, 103-188.
- 15. Voshikawa, K. Sarou, V., Takanaga, V.; Tanaka, M.; Arihana, S.; Nigaru, S. K.J. Nur. Prod. 1998, 67, 440-4-61,
- 10. Note G. F. Mitame-Offer A. L. Migamoro, L. Panklat, L. Mitpole, J. J. Bochamp, B., Peynyman, D. E.: Lana Re-Dubints, M. A. J. Mat. Plus. 2009, 77. 1228-1730,
- Zon, R.; Jong W. T. Liang, H.; Cui, J. M.; Cui E. Z.; Shao, Y. T.; Zhang, R. Y. Carbolynin Ner, 2005, 380, 1529–1559.
- 18: You, M. Phang, C.Y.; Wang, R.; Ful, J.R.; Zhao, Y.Y.; Phang, R.Y. Mon, Phang, and 2010, 92, 2160 - 2108.
- 19. Liny, B.; Sha, S.; Yu, S.; Pei, Y.; Zhang, S.; Chem, A.; Jhung, J.J. Red. Fred. 2009, 72, 677-011
- 20, 7m, K., 7m, Y., Tu, G.; Cai J.; Ba, 7; 7mmg, R. Elemetydy, Rev. 2000, 124, 183-1.9814
- Ninds, G. P.; Mitanne-Offer, A. C.; Miyamuta, T.; Peguyarun, B. F.; Lacathe-Datain, M. & Mage Review Chine, 2010, 49, 129–139.

- 22. tum, J. C.; Ma L.; Reng, L. F. Moorg, Mor. Chem. 2008, M, 2012-2008.
- 23 (in it: Ma, S., in, Y. Yr. S., Chen X. Jhnns, J. Condolysh, No. 2010, 245, 2925-Sec.
- 24: Herometi, H. D.; Nakana, I.; Lanaroff, J.A.; Massyman-Smith, M.; Gentrowiczi, D. R. Tenninge-France, M., Rounhillins, H. J. Print Anni. Acad. Sci. 175:4, 2003, 100. 15578-13181
- 25. Birgh, E.R., Clarke, I.D., Treasani, M.; Bhun, V.B., Hawkins, C.; Manner, J.: Dieta. P. II. County Roy, 2003, 611 1421-3828.

- Sengsapus A.; Cancellas, J. A. J. Cell. Physics. 2010, 225, 7–19.
 Frank, N. Y.; Scharmer, S. Frank, M. H. J. Conc. Intera. 2010, 122, 41–56.
 Brya. B. (Mortners, E.). Clarim, M. F. Witsaman, J. Schner 2001, 416, 001–
- 29: Barry, C. Roman, L. Varley, P.; Condonatel, L., Rapon, E., Cadurnon, J. Benautt-Millional, E.; Hittaht, C.; Instand, M.; Berhumon, A.; Millialmano-Microgof, M.; Daverh, J.; Billshin, J.; Moura Netty, V.; Dramas Duport, C.; Jumer, M. W.; Choresworth, H. 1980; Linice 20010, 111 00-774
- 53. Jahren, C. R. Coldswell, W. F. Villemann, J. G. Vong, V. W. Nevrouegory 1985. 11. 195-501.
- 31 Invasiak, K., Tome, S. A., Barnett, G. H., Lines, M. L., Copta, M. K., Stenn, P. S. Cancer Immunol Immunority, 1985, 40 228-234,
- 35 Satturit, G. H.; Stemmata, G.; Langleben, A.; Witermon, J. G. Cm. J. Meanol. Sci. 1993.20.108-120.
- Datel, A.; Dillian, V.; Metersberg, R.; Plannery, T.; Patel, A.; Dibujit: A. Carsten, A.; Amin, P. 197 J. Banny, Own. Biol. Phys. 2012, 85, 730-742.
- 31. 25 Crisiolori, A.; Czesibba, G.; Laukenetti, G.; Mengherti, C.; Romptill, P. Anthoneser Res 2019 \$ 33, 1130 3-32006.
- Wang, H. Haridas, V. Tatteernar, J. H. Ro, Z.-R. Commun. Sungr. Biol. 2010, 1. 2011-2010
- Government J. R.; Em, H. T.; Yang, P.; Harrises, V.; Gesmont, A.; Marrus, S. Proc. 35. Non Acad 5:1 (15A 2005, 192, 13771-13776)
- 17; Matthus V.: Franseerik, M.; Highlinnara, G.; Stellinger, H.; Galawaet A.: Maron, M.; Spears, J., Johannek, R., Walannek, Z.; Cottorrman, J. C. J. tole Server, 2004, 113 65-73

8.1.3. Annexe I.3

Triterpenoid saponins from *Albizia boromoensis* Aubre^v. & Pellegr

Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ohytol





Triterpenoid saponins from Albizia boromoensis Aubrév. & Pellegr

Olivier Placide Noté 2014, Dong Jihu , Cyril Antheaume , Dominique Guillaume , Dieudonné Emmanuel Pegnyemb[®], Marie Claude Kilhoffer[®], Annelise Lobstein[®]

"Partnacognose el Maléciaes Nauvelles Boartives, Laboratore d'Internation Thérapeutique, oMR 7200 (INE-Université de Straborry,

ABSTRACT

Pacallef de Pharmacia, 24 name du illum, 1-67491 Elkirch Cedes, Prancé

¹ Enbergebie de Parsmanachimis des Substances Netanolles. Département de Canna Erganque, Farante de Stiences, Gravonst? de Vecandé, de 812, Scounde Commune

Course: Dislogie Intégrative, Laboratorie d'Annovation Mérageanque, UMN /265, CARS-Ontwenter de Strasbourg, Excelle de Planmacia, 24 rease de main. F-87461 Bliften Codex, Fronte

¹Service Commun d'Assaints: USAN 2200, CMR-Ambersol de Strachaury, Bacado de Planmaras, 74 mare du Blon, R-6740 i Indena Ceday, Pranse

no positive activity detected.

* Information de Chimie Thimpetulipus, 1949 6220, 51 nur Congrano-Jay, 51766 Relma, Prance

ABPICLE INFO

Arterio destary: Receiped 23 Aneust 2014 Received in cryited from 5 Voyember 2014 Accepted 14 Nevember 2014 Available online 20 November 2014

Separate. Minosachin Allicia annomatists Thrependid seporting Récomponnesides 3346

L. Introduction

Albízia boromoenuis Aubrév, & Pellegr, (Mimosaceae) is a large emergent tree of the legume family. It is found growing naturally in Senegal, Soudan, and Cameroon where it is harvested for timber (Arbonnter, 2009). No ethnomedicinal use of this plant is documented. Its chemical constituents have not been previously

investigated but phytochemical studies on related species of Albizia genus revealed the presence of triterpeopid sapunins (Andel Kader et al., 2001; Haddad et al., 2003; Lio et al., 2009; Krief et al., 2005; Zheng et al., 2006; Melek et al., 2007; Cap et al., 2007; Note et al., 2009; Miyase et al., 2010). As a part of our continuing stuffies on saponing from Cameroonian medicinal plants (Note er al., 20133, we have investigated the saponins content of the roots of A. boromoensis.

to the present paper, we report the isolation and structure characterization of four new triterpenoid saponins, named boromoenosides A-D (1-4) having oleanolic acid as aglycone.

2. Results and discussion

As part of our search of new bioactive sapomus from Cameroonian medicinal plants, obstochemical

investigation of the mosts of Affania boromoustic led to the isolation of four new oleanane type saparing.

named botomorphotides A-D (1-4). Their structures were established by direct interpretation of their

spectral data, mainly HRESIMS, TUNMR (1), ¹¹C NMR, and DEPT) and 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC and

HVBC), and by comparison with the literature data. All isolated saponins were assayed for their cytotoxicity against U 87 MG human globlastoma cell lines and 16.1 glioblastoma stem-like cells with

2014 Phytochemical Society of Europe, Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

The air dried powdered roots of A baromoensis (200 g) were extracted with 70% EtOH in soxhlet and after evaporation of the solvent, the hydroalcoholic extract was partitioned against n-BuOH saturated with water. The n-BuOH fraction was then submitted to vacuum-liquid chromatography (VLC) on reversed phase silica gel yielding a methanol fraction that was subjected to a VLC on silica gel. Purification of the eluted fractions by semipreparative high pressure liquid chromatography (HPLC) afforded compounds 1 (7.9 mg), 2 (8.5 mg), 3 (7.2 mg), and 4 (5.3 mg). Their structures (Fig. 1) were established by extensive analysis of NMR techniques, makely 1D NMR,"H, "CNMR, and DEFT; and 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC and HM8C) experiments, and HRESIMS and by comparison with the literature data.

Boromoenoside A (1), obtained as a white amorphous powder, was assigned a Co4H_04O31 molecular formula, as deduced from the [M+NL]* ion at m/z 1386.5789 in the positive ion mode HRESIMS.

1874 7900/5 2014 Phytiochemical Society of Europe, Published by Elsevier 2.V. All rights reserved

Corresponding author at. Laboratoire de charmiscothimie des Substances Naturelles, Département de Chime Organique, Faculté de Smendes, Université de Yoounce, 09 012, Yaoundé Cameroon Tell: +207 72700015; fax: +207 22239580. E-mail address, of her month Weathoush (M.F. Note')

http://dx.doi.org/10.1010/j.pisycol.2014.11.004



The ¹H NMR and ¹⁴C NMR data of boromoeooside A displayed resonances due to the aglycone part characteristic for oleanolic acid (Table 1), a common triterpene of triterpene glycosides, which were in full agreement with literature data (Nigam et al., 1997; Mimaki et al., 2004). The sugar moleties of 1 were determined to be

regluence (Clc), rearabitiose (Ara) and respire (Xyl) by acid hydrolysis followed GC analysis of their tranethylsilylated derivatives by comparison with authentic samples (Section 3). The sugar portion of compound 1 exhibited in the ¹H NMR spectrum, six anometic proton signals at § 4.84 [d, J=7.0 Hz.

table 1

MAR spectroscopic data (500MB) for 1/1 and 125 Mar for "C) for the approve moteties of compounds 1-4 (2 in ppm and , in Hz).

No.	1	12/10/10/10	2		1	and the second second second	14	121.
	8_	6.	Sc.	ð.,	3c	ða	30	â <u>0</u>
1	98.9	0.98: 1.91	39.0	0.97: 1.00	38.9	0.92: 01	986	0.92.1.09
14	27.0	1.66:230	227.0	1.901 2.32	27.0	1.87 2.53	27.0	1.92:2.94
	85.5	3.15 [1001. 13.8]	20.7	1.15	59.4	3 17 (to)t, 12.6)	83.7	5.20 (8, 14.5)
24	30.5		10.5	A	30.8		33.6	
3	56.1	6.52 (500. 11.5)	36.1	6.63 (hed. 11.8)	38.1	0.63 (bul, 11:8)	要請	0.64 /lud, 8.55
8	28.8	1,25; 1.44	8.7	1.21 1.44	18.9	1.21, 1.45	18.7	1.22, 1.40
1	33.4	1.44, 1.60	13.2	41 1.51	55.7	1.44, 1.55	33.4	1.37; 1.33
8	42.2	The Anna and	42.4	-000 A.E.D	43.4		42 =	- 100 0000
0	48.3	1.59 (d-like; 5.3)	48.2	L58 (d-like; 8.8)	48.7	1.58 (1-100; 5.8; 8.2)	48.2	1.57 (6-100; 5:8; 5.2)
30	37.2	100.0210000000	37.7	TTD AR DOOT DOLOT	262		Sel	A CONTRACTOR OF THE PARTY
11	24.0	1.69	241	1.07	251	0.94: 1.90	20.0	1.97
14	122.9	5.01 (brs)	129.9	3.40 (brs)	122.0	5.41 (brs 5.7)	123.2	5.99 (bes)
13	144.7	- C. C.	244.2		1224		100.0	
34	42.5		42.4	Courses and	22.4	The part of the second s	42.2	Thereas
15	29.4	1.38: 2.27	29.4	1.37 225	29.4	1.402.01	29.1	all of
16	23.3	2.12: 2.33	23.3	2.12: 2.32	23.3	nfi nf	23.3	nE m
17	47.3	and which the second	47.3	Contraction of the	47.5	The second	47 5	
15	47.8	3.10.24 11.81	42.6	3.17	42.1	8.40	41.0	8.20:
Ð	46.6	1,26(1.77	46.7	1.26 1.70	46.6	28: 01	46.6	1.27; 1.75
20	31.1	12	3.18	-	51.0	-	310	44
23	34.4	1.07; 1.33	34.1	JUB; 1.81	54.4	1.67, 1.59	34.3	1.12; 1.35
22	32.6	1.74: 1.86	52.5	1,75, 1,86	82.5	1.70. m	32.8	1.78; 1.92
23	28.5	1.15 (s)	28.4	1.27 (5)	28.2	1.20 (9)	28 4	1.28.(5)
21	17.1	1,95 (8)	17.1	1.12 (5)	17.1	1.02 (8)	17.1	1.11 (s)
25	15.0	0.90 (s)	72.0	\$175 (c)	15.8	0.28 (a)	15.9	0.74 (6)
26	17.7	1.01 (s)	72.7	(199 (a)	37.7	1.03 (6)	1/8	5.01 (s)
21	26.9	1.22 (8)	26.4	1.21(s)	25.4	1 23 (6)	25 4	1.25 (s)
28	176.8		270.9	a state of the sta	1/5.8		1/5.8	
20	33.4	0.80 (4)	122.4	6.89 (8)	88.5	0.02.(*)	33.4	0.02 (8)
30	24.1	0.88 (4)	34.0	6.88 (1)	24	0.00 (14)	240	0.01 (8)

Assignments were based on the BMBC, HSOC, 2059 and DEFT reported on a

* Overlapped 12 BMR signals are reported without designated multiplicity, of net found.

glucose (Gic)], 4.93 [d, J=6.5 Hz, arabinose (Ara)], 5.38 [d, J=7.4 Hz, sylose (Xyl)], 5.16 [d, J=8.2 Hz, glucose (Glc)), 5.71 [d,] = 7.7 Hz, glucose (Gle")], and 5.82 [d,] = 7.7 Hz, glucose (Gle"]]. Their associated "C resonances assigned from HSQC and HMBC experiments were at \$ 104.9, 105.6, 106.3, 93.8, 104.9, and 105.6: respectively. All proton signals due to the sugar moleties were identified by careful analysis of COSY, TOCSY and NOESY spectra, and the carbon signals were assigned based on HSQC and further confirmed by HMBC spectrum (Table 2). Data from the above experiments indicated that these six sugar residues were intheir pyranose form. The relative large 36,14,2 values of these sugar moleties (6.1–8.2 Hz) in their pyranose form indicated a β anometic configuration for all file and Xyl moneties, and an o annomeric configuration for Ara (Mimalit et al., 2004; Tené et al., 2011). The observation of the "C NMR signals at 5 89.5 (C-3 of aglycone) and 176.9 (C-28 of the aglycone) demonstrated that 1 is a bidesmosidic glycoside of oleanolic acid (Saho and Achaei, 2001: Tepé et al. 2011) with sugar chains linked to C-3 and C-28 of the aglycone through an other and ester bond, respectively. The linkage points of the sugar units to each other and to C-3 of the aglycone were established from the HMBC correlations of signals at 34.84 (H-1 of Glc1) with 389.5 (C-3 of the aglycone), 84.93 (H-1 of Ara) with 8 70.1 (C-6 of Glc) and 8 5.38 (H-1 of Xyl) with 8 83.3 (C-2 of Gic]. This was supported by the NOESY correlations of signals at 8 4.84 (H-1 of Clc) with 8 3.16 and 8 1.18 (H-3 and H₂ 23 of the

aglycone, respectively), § 4.24 (H-6a of Gic) with § 4.93 (H-1 of Ara) and 8 5.38 (H-1 of Xyl) with 8 4.19 (H-2 of Glc). Accordingly, the sugar arrangement in the 3-O-saccharide chain was established as a-t-arabinopyranosyl-(1--6)-(8-c-xylopyranosyl-(1--2)l-B-oglucopyranesyl (Fig. 2). The sequence and hinding sites of the sugar units at C-28 were determined by following HMBC correlations: 8 6.16 (H-1 of Glc) with 8 176.9 [C-28 of the aglycone], 8 5.71 (H-1 of Cit') with 8 69.3 (C-6 of Cit') and 8 5.62 (H-1 of Glc*) with 8 78.5 (C-2 of Gic'). Therefore, the sugar sequence at C-28 of the aglycone was determined as β -p-copyranosyl. Thus, the structure of horomoenoside A (1), xylopyranosyl-(1--2)|-fi-a-glucopyranosyl]-28-O-[fi-a-glucopyranosyl (1 +6) [8-e-glucopyranosyl (1+2)] -8-e-glucopyranosyl]pleanolit: acid.

The analysis of ¹¹C NMR spectra showed that the trisaccharide chain was common to all four saponins and placed at C-3 of the aglycone. It will not be further discussed in the structural elucidation of compounds 2-4.

The HRESIMS spectrum $([M+NH_n]^*$ at m/z 1386.6575) of boromoenoside B (2), obtained as a white amorphous powder, was identical to that obtained for compound 1, suggesting that these compounds were isomers with $C_{2d}H_{12d}O_{21}$ formula. Comparison of their NMR spectra showed that the sugar directly

Table 2

WMR spectroscopic data (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹(f) for the sugar underles of our pounds 1-5 (& in ppm and J in Hz)

Fusicion	1		2		3		4	
	à _c	CAG:	40	10	A_	81	N.	Ag.
5-9-96871		1		17				
Gla-L	104.0	484 (d. 7.6)	105.0	484 (c. 7.4)	105.9	4.84 13.7.4	105.0	4.84 14. 7.31
2	843	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	83.2	1 1 M	33.3	4.19	83.3	4.19
1	77.7	414	77.7	4.11	77.7	4.14	77.7	4.14
4	71.7	4.08	72.2	4.00	72.2	4.08	72.2	4.08
	75.7	400	76.7	4.07	76.7	4.06	76.7	4.06
6	1701	4.24 4.85	10.0	4.25, 4.84	70.0	4.25, 486	70.0	4.26 4.84
	12.00	(1. 105) 7.69		(host, 10.4)	07.5580	A DOD T PROCE.		Derta bereiten.
Ara-1	105.6	4.53 (0, 6.5)	185.6	4 23 (4, 65)	05.5	4.04 (4.65)	105.5	4.04 (0, 6.4)
2	72.5	4.45	72.4	4.43	72.5	4.40	77.5	4:40
3	.719	6.00	71.0	105	22.9	1.08	21.8	4.99
4	72.6	4.26	25.5	120	74.7	4.20	74.0	4.20
2	44.2	449: 4,7534,983	56.2	449: 4.72 (d. 19.1)	64.1	4.64: 4.97	64.2	4.63: 6.74
WWW-L	105.3	5 38 (6, 7,0)	195.2	237 67.11	106.3	5.37 (d. 7.5)	106.3	5:39.54 4.51
2	83.1	415	73.7	9.33	23.2	4.15	23.1	115
3	76.7	4.04	78.0	0.04	28.2	4.93	210.7	4.04
4	71.8	4.08	71.8	+00	71.8	4.05	71.8	4.00
	65.7	437 3.78	85.5	4 38 3.77	66.6	4.34 3.78	66.5	4.34 3.78
		(4, 11:0)		(heit, 16.35		14. 10.31		
29-07 Sugar								
Gle 1	90.8	G.16 (d. 0.2)	93.7	\$14 (d. 8.2)	\$3.9	6.2014.62	43.1	0.22 (9.80)
2	765	1.42	79.5	4.39	29.2	4.52	25.4	4.95
3	77.6	4.21	17.0	130	77.9	4.1.1	28.2	4.19
4	72.0	6.24	70.7	1200	70.9	4.39	71.0	4.25
2	76.0	500	17.8	393	710.7	3.95	76.0	4.95
6	-71 T	4 39: 4.55 (box, 1.0)	52.9	4.37 4.40	62.2	4,38 4 46	60.7	4.37: 471
Glot-1	104.0	3.7/ (4, 7.7)	134.0	5.60 (c. 7.7)	104.9	5.77 (4. 7.8)	104.3	5.77 (4, 7.4)
2	75.6	4.05	79.7	-08	73.4	4.00	75.7	4.08
3	78.4	4.27	78.2	437	78.4	4.27	78.2	4.30
4	72.1	4.05	71.4	4.15	60.3	4.35	65.3	4.15
10	78.7	3.0	75.3	- 04	70.4	1,04	78.7	3.91
8	112.9	6.21 4.63	09.3	3,007,4,05	A.3.0	4.37-4.55	102.4	4.19-5.50
S.	1997		1993	(brd. 10.7)	202	(Official Institution	20025	1.0000
Gief 1	105.6	5.02 (d. 7.7)	T95.0	5.02 (d. 7.7)				
2	75.2	004	15.2	6.02				
2	747	620	78.4	218				
4	04.3	6.24	59.3	\$30				
15	78.3	460	78.5	3.08				
8	510	497 4.55	52.0	- 30, 4.52				

Assignments were based on the HMBC, HSOC, COSY and CEPT representations. Overlap and "HINMR signals are imported without designated in the life.



Fig. 2. Key SMBC and MDEXY correlations for compound 1

attached at C-28 (Glc') in **2** was monosubstituted at its C-2 position, instead of been disubstituted at its C-2 and C-6 positions as described in the case of **1** (Table 1). The presence of only one glycosylation shift at δ 78.5 (C-2 of Glc'), the absence of glycosylation shift at δ 69.3 (C-6 of Glc') and the presence of one glycosylation shift at δ 69.3 (C-6 of Glc') and the presence of one glycosylation shift at δ 69.3 (C-6 of Glc') and the presence of one glycosylation shift for Glc'' were evidences for the linear sequence established for the sugar molecy attached at C-28 of the aglycone for compound 2. Therefore, the sugar sequence at C-28 of the aglycone was determined as β -t-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -t-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -t-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -to-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -

HRESIMS of boromoenoside C (3), obtained as a white, amorphous powder, indicated a $C_{30}H_0$, O_{20} molecular formula, as deduced from the [M+NH₀]⁺ ion at *mix* 1224.6789 in the positive ion mode. The difference between compounds 2 and 3 (162 amu lower) was assigned to one glucose molety to account for the similarities between their ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 2). Instead of a trisarcharide molety at C 28 of oleanolic acid, compound 3 displayed signals for a disarcharide unit attached at C 28 of the aglycone according to the analysis of 20 NMR experiments. Accordingly, boromoenoside C (3) was elucidated to be 3-0- β -[α -t-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[β -o-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -o-glucopyranosyl]-28-0-[β -t-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -t-glucopyranosyl]-oleanolic acid.

The HRESIMS spectrum ($[M-NH_4]^*$ at *mix* 1386.6575) of horomoenoside D (4), obtained as a white amorphous powder, was identical to that obtained for compound **3**, suggesting that the compounds were isomers with $C_{ag}H_{ad}O_{26}$ formula. Comparison of their NMR spectra aboved that compound **4** differs from compound **3** only by the substitution patient of the sugar chain at C-28 of the aglycone. This difference was evidenced by the carbon signal at δ 69.7 (C-6 of Glc') in **4**, which was downfield shifted of 7.2 ppm compared to the carbon signal at δ 62.2 (C-6 of Gir) as assigned in the case of 3. Therefore, the sugar sequence at C-28 of the aglycone was determined as β -t-glucopyranesyl-(1-6)- β -o-glucopyranesyl. Consequencity, the structure of boromoenoside D was elucidated as 3-O- β - $[\alpha$ -t-arabinopyranesyl-(1-6)- $[\beta$ -t-sylopyranesyl-(1-2)- β -n-glucopyranesyl-(28-0)- β o-glucopyranesyl-(1-6)- β -o-glucopyranesyl-leanolic acid.

Compounds 1-4 were evaluated for their inhibitory effect on the survival of high grade human brain tumor cells, including the U-87 MG human glioblastoma cell line and the TG1 glioblastoma cancer stem-like cells isolated from a patient. None of the isolated compounds showed positive activity in our assay. In addition, to the hest of our knowledge, our study in the first phytochemical study of A, horomorpus and represents a valuable contribution to the chemotaxomy of Albizia genus, which is known to be a rich source of triterpenoid saportins.

3. Experimental

3.1. Ceneral experimental procedures

Optical rotations were measured on a Jasco P-2000 polarimeter. H NMR (500 MHz) and ¹¹C NMR (125 MHz) spectra were recorded at room temperature in pyridine-d, using a Bruker AVANCE III 500 spectrometer. Chemical shifts are given in 8 (ppm) value relative to TMS as internal standard. HRESIMS spectra were recorded on a microTOFESI-TOF mass spectrometer (Agilent) operating in positive mode. Analytical HPLC was performed on Varian 920-LC apparatus. equipped with an autosampler, a pump, a diode array detector (DAD), and Galaxie software. Semi preparative HPLC was performed on a Gilson apparants equipped with Trilution LC software using a Nucleodur 100-5 C18ec (21 mm = 250 mm, 5 µm) column purchased from Machery-Nagel (Germany), Thin layer thromatography (TLC) was performed on precoated silica gel plates (60 Fast, Merck) using the system solvent n-BuOH-AcOH-HJO, 55:15:25 as eluent. The spots were observed after spray with Komarowsky reagent, a (5:1) mixture of p-hydroxyberzaldehyde (28 in MeOH) and (508 H₂O in EtOH). Vacuum-liquid chromatography (VLC) was carried out using RP-18 silica gel 60 (25–40 μm) and silica gel 60 (15–40 μm and 40–63 μm).

3.2. Plant material

The roots of A. boromocrads were harvested at Nkolbisson, Vaoundé peripheral quarter, in Cameroon in October 2011 under the guidance of Dr. Paul Nana, botanist of the National Herbarium of Cameroon (NHC), where one specimen (47196/HNC) was deposited.

3.3. Extraction and isolation

The air-dried, powdered roots of A. toromoensis (200 g) were extracted with 70% EtOH in soxhlet apparatus. The resulting bydroalcoholic solution was then evaporated to dryness under reduce pressure to yield brown residue (4.83 g). This residue was suspended in 200 mL of H₂O and partitioned with n-BuOH sat. H₂O (3 × 300 mL). The n-BuOH soluble phase was evaporated to dryness affording 5.14 g of brown gum residue which was taken in a minimum of water (10 mL) and then submitted to vacuumliquid chromatography (VLC) using RP-18 silica gei 60 (25-40 µm) eluted with a gradient of MeOH-H₂O (100% H₂O -+ 100%MeOH). The 70-85% MeOH fraction (600,5 mg) was subjected to VLC using ailica gel 60 (15-40 µm) eluted with CHCL--MeOH-H₂O (80:20:2, 70:30:5, 50:33:7, and 60:40:10) to give four main subfractions (Bfr1-Bfr4), Subfraction Bfr4 (126.3 mg) was purified by semipreparative HPLC using gradient system of CH-CN-H₂O (20 mL) min) to yield compounds 1 (tg. 13.20 min. 7.9 mg), 2 (tg. 13.68 min, 8.5 mg), 3 (t₂, 16.16 min, 7.2 mg), and 4 (t₁₀, 16.63 min, 5.3 mg),

 3-O β (α + aratinopyranosyl (1 +6) (β - -sylopyranosyl (1--2)l-β-o-glucopyranosyll-28-O-/β-o-glucopyranosyl-(1--6)-/βo-glucopyranosyl-(1--2)]-β-o-glucopyranosyll-oleonolic axid (1)

White amorphous powder; $\alpha_B^{(2)} = 14.4 (c.0.01, MeOH); HNMR (C_2D_2N, 500 MHz) and ¹⁹C NMR (C_2D_2N, 125 MHz) data, see Tables 1 and 2; HRESIMS$ *max*: L186.6789 [M+NHs]^{*} (calcd, for C₅₄H₃₆₆O₂₁, 1386.6905).

3.5. $3-0-\beta-(\alpha-i)$ -anabinopyranosyl- $(1\rightarrow 6)-(\beta-i)$ -xylopyranosyl- $(1\rightarrow 2)$ - $\beta-i$ -glucopyranosyl- $(1-6)-\beta-i$ -glucopyranosyl- $(1-6)-\beta-i$ -glucopyranosyl- $(1-2)-\beta-i$ -glucopyranosyl- $(1-6)-\beta-i$ -glucopyranosyl- $(1-2)-\beta-i$ -glucopyranosyl- $(1-6)-\beta-i$ -glucopyranosyl-(1-6)

White amorphous powder: $\alpha_{D}^{(2)}$ 17.5 (c.0.01, MeO(1); ¹H NMR (C₂D₂N, 500 MHz) and ¹²C NMR (C₂D₂N, 125 MHz) data, see Tables 1 and 2; HRESIMS muz: 1385.8787 [M+NHz]² [calcd. for CeallingOn, 1385.6905).

 3.6. 3-O-β-(α-ι-arabinopyranosyl-(1--6)-/β-c-xylopyranosyl-(1--2)]-β-o-ghicopyranosyl[-28-O-][β-c-ghicopyranosyl-(1--2)-βo-ghicopyranosyl]-oleanolic acid (3)

White amorphous powder; $|\alpha|_{0}^{25} = 2.2 (c.0.01, MeOH); H NMR (C_{3}D_{3}N, 500 MHz) and ¹²C NMR (C_{2}D_{3}N, 125 MHz) data, see Tables 1 and 2; HRESIMS miz: 1224.6789 [M+NH₄]² (calcd, for <math>C_{32}H_{34}O_{20}$, 1224.6869).

3.7. 3-O-β-(α-ε-erabinopyranosyl-(1-6)-(β-ε-sylopyranosyl-(1-2))-β-ο-plucopyranosyli-28-O-(β-ε-glucopyranosyl-(1-6)-βo-glucopyranosyli-aleanolic acid (4)

White amorphous powder; [α]²⁷ 5.3 (c.0.01, MeOH); ⁴H NMR (C₂D₂N, 500 MHz) and ¹²C NMR (C₂D₂N, 125 MHz) data, see Tables 1 and 2; HRESIMS m/c: 1224.6787 [M-NH₄]⁺ (caled for C₃₈H₉₄O₂₆₁ 1224.6869).

3.8. Acid hydrohysts of compounds and determination of the absolute configuration of the sugar residues

Each saponin (2 mg) was hydrolyzed with 2 mL of 2 M HCl at 85 °C during 2 h. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. The sugar mixture was extracted from the aqueous phase (10 mL) and washed with CH_2Cl_2 (3 × 5 mL). The combined CH_2Cl_2 extracts were washed with water to give after evaporation the aglycone milety. The sugars were first analyzed by TLC over solica get (CHCl₂-MeOH-H₂O, 8:5:1) by comparison with standard samples. The absolute configuration of each monosaccharide was determined from CC-MS analysis of their trimerhylsilylated derivatives by comparison with sothentic samples using the method previously described (Charbi et al., 2010). The following sugars were detected: p-glucose, c-xylose, and t-arabinose.

3.9. Evaluation of inhibitory effect of suponins

Effect of chemical compounds on glioblastoma cells' ATP level was assessed using the CellTiter Cloreagent (Promega). Cells were seeded in 50 μ L of their respective media (between 30 000 and 50 000 cells/well) into 96-well opaque bottom plates (Greiner, Courtaboeuf, France). 50 μ L of pure compounds 1–4 (or 50 μ L of Tamoxifen) dissolved at a given concentration in the respective cell culture medium, were added to the cell suspension. Cell were incubated at 37 °C, 5% CO₂ and ATP levels were measured 24 h later according to the manufacturer's instructions. Laminescence was measured using a Victor³⁵3 plate reader (Perkinfilmer), Relative ATP levels in each well were determined by raiculating the percentage of luminescent signal in the well with respect to the average signal measured in negative control wells (without compounds), Tamoxifen was used as positive control.

Acknowledgement

The authors are grateful to Dr. Victor Nana of the National Herbartum of Cameroon (NHC) for the identification and collection of plant.

References

- Malei-Kadou, M., Hach, J., Senger, D.Y., Fasan, R., Miller, J.S., Wisser, J.H., Manufert, S.W., Dalton, J.M., Kingston, T.G., 2001. From insurflying appointing from 409250 millionname from the particular manuformal J. Nat. Acad. 04, 330–539.
- Arlameter, M., 2008. Advest actionest in flation des annes d'Afrique de 'Albeett MNHM, Onze Parls, pp. 383
- Lice, S. Norris, A. Miller J.S. Zotovesen, F. Jaziftsatanna J. Andreanadienna, R. Rammen, V.E. Fendyke, K. Sell, T. Rangston, D.J.L. 2007. Cytotexin criteripe and separative of Albana groundfractions. Managamar cambres: J. Nat. Prod. 33, 201–200.
- Uhadh, M., Chabert, P., Vonintron Sénéthecu, C., Weninger, B., Ountairu, M., Corstjens, H., Sente, I., Deckney, J., Lebstein, A. 2010. And and Rawows: perceptionurdes from digities antilla serves. Phytochem. Lett. 3, 70–74.
- Haidad, M., Mayamon, F., Litarens, V., Litchile Dubon, M.A. 2009. Two new histography action triberprovidal separate arguith with Gibylic and fram Autors administration. Nat. Rev. 56, 372–377.
- Erief, S., Hucison, G., Sevener, T., Wrangham, R.W., Lavaud, C., 2005. Intersection caponics with avalance form Advance groundiferences in seesing ested by primates in Uganda. J. Net. Prod. 88, 807–803.
- LU, R., Ma S., Yu, S., Pei, Y., Zhang, S. Chen, A. Zhang, J. 2009 Control commune interprete superiors from Albeda chinesen, J. Ref. Frod. 72, 332 (39).
- Meldis, F.S., Miyasa, T., Citaly, N.S., Nabil M. 2007. Tritroprovid segarities with Veacetyl sugar from the bank of Albana process. Phytochemistry 98, 1201–1208.
- Menzia, Y., Vokosska, A., Ramanasa, M. Sakama C., Yamori, I., Shibata, Y., 2004. Tolography supporting from the score of Classific common. J. Met. Paul, 57, 1911–1916.

- Miyase, T., Mohn, E.R., Ghuly, N.S.; Warashime, T., El-Rady, M., Nabil, M., 2010. Editory wire acid 3 18-0-magine courses from 400/26 general Phytochemicary 71, 100 (2010). 1075-1080
- Ngum, S.X. Gepal, M., Uddim, R., Yoshikawa, K., Kawamoto, M., Arihum, S., 1987. Pithedu.co.des A. G. cleanane physiciales from Within addam dates. Etypochem-http://dx.1329-1184
- Nex6, 3-2, Mitaine-offer, A.L., Miyantoso, T. Fundalas, T. Micjohn, J.F. Duchamy, O., Fegnyenh, D.K., Laradh-Dicbola, M.A., 2008. Cytoroxoc acards acid glycanides from the cools of Algebra controls. J. Nat. Proc. 72, 1728–1730.
- Noré, C.P., Tapendiou, A., Minaine-offer, A., Miyamote, T., Pegnyemb, D.E., Local is-Debols, M.A., 2013. Tetrophysical supermultion (*Physical Mathematical System Lines Physical Letters Lett.*, 6, 309–510.
- Sahu, N.P., Achen, B., 2001. Advances in Intertwell Octomation of Second and Improved glycondex. Curr. Drg. Chem. 3, 315–336.
 Tené, M., Chabert, P., Noté, O., Kenla, N.T., Tane, P., Labridon, A., 2011. Transported
- toponen feter Cyllicone to gammingte. Phytochem. Lett. 6, 89–92.
 Zheng, L., Zheng, J., Zhao, Y., Wang, S., Wu, L., Hang, H., 2006. Three-and-fumor suponine rices Alatria julifyruate. Biology. Med. Chem. Lett. 16, 2767–2758.

8.1.4. Annexe I.4

Comparative Expression Study of the Endo–G Protein Coupled Receptor (GPCR) Repertoire in Human Glioblastoma Cancer Stem-like Cells, U87-MG Cells and Non Malignant Cells of Neural Origin Unveils New Potential Therapeutic Targets.

Comparative Expression Study of the Endo–G Protein Coupled Receptor (GPCR) Repertoire in Human Glioblastoma Cancer Stem-like Cells, U87-MG Cells and Non Malignant Cells of Neural Origin Unveils New Potential Therapeutic Targets

Marie Fève^{1*}, Jean-Michel Saliou^{3*}, Maria Zeniou^{1*}, Sarah Lennon², Christine Carapito², Jihu Dong¹, Alain Van Dorsselaer², Marie-Pierre Junier³, Hervé Chneiweiss³, Sarah Cianférani², Jacques Haiech¹, Marie-Claude Kilhoffer^{1*}

11aboratore d'imposition Trésolochique, UMR7200 Laborature d'Escollence Venaity, CNR5, Université de Strasbourg, Facute de Pharmacie, illochi, France, 21aboratoire de Spectromètre de Vasse BioOrganose, uVR7178 CNR5, Institut Pharmacie Judien Curier, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, 3 Neurophierre Paris Serie UM/8246, Insern UT-10, ministra de Biologie Paris Serie, CNR5, université Parie et Marie Carle, Paris, France, 3 Neurophierre Paris Serie UM/8246, Insern UT-10, ministra de Biologie Paris Serie, CNR5, université Parie et Marie Carle, Paris, France.

Abstract

Glioblastomas (GBMs) are highly aggressive, invasive brain tumors with bad prognosis and unmet medical need. These tumors are heterogeneous being constituted by a variety of cells in different states of differentiation. Among these, cells endowed with stem properties, tumor initiating/propagating properties and particularly resistant to chemo- and radiotherapies are designed as the real culprits for tumor maintenance and relapse after treatment. These cells, termed tancer stem-like cells, have been designed as prominent targets for new and more efficient cancer therapies. G protein coupled receptors (GPCRs), a family of membrane receptors, play a prominent role in cell signaling, cell communication and crosstalk with the microenvironment. Their role in cancer has been highlighted but remains largely unexplored. Here, we report a descriptive study of the differential expression of the endo-GPCR repertoine in human glioblastoma cancer stem-like cells (GSCs). U 87 MG cells, human astrocytes and fetal neural stem cells (FNSCs). The endo GPCR transcriptome has been studied using Tagman Low Density Arrays. Of the 356 GPCRs investigated, 138 were retained for comparative studies between the different cell types. At the transcriptomic level, eight GPCRs were specifically expressed/overexpressed in GSCs. Seventeen GPCR appeared specifically expressed in cells with stem properties (GSCs and fNSCs). Results of GPCR expression at the protein level using mass spectrometry and proteomic analysis are also presented. The comparative GPCR expression study presented here gives dues for new pathways specifically used by GSCs and unwells novel potential therapeutic targets.

Charlien: Fore M. Schur, M. Zerlee, N. Luman, S. Sarapto, C. et al. (2014) Comparative Receiver: Study of the Enda-G Picture Coupled Receiver (EPCR) Reportone in Human Glob actions Cancer Stem-Ne Cels, 087-We Cels and Non Malgnant Cels of Neural Origin Linvels New Potential Therapoutic Targets, PLoS DNR 931, 491519, doi:10.1321/journal.pore.0001510

Editor: Roland Sellert, Medical School of Hannava, Company

Received Occumum 28, 2015; Accepted February 10, 2014; Published Manth 24, 2014.

Copyright: 7, 22 4 Five stat. This is an open access online distributed under the terms of the Creative Common Attribution linease, which permits amendated use, distribution, and reproduction in any medical provided the original author and source are condited.

Funding: This work was supported by 1. Igan more to Carson, to Final-time, and to Section to Molectin. The Agence Nationale prior to Recherche /ANR, the France Molectin. The Section of t

Competing Interests: The authors now declared the null competing interests exist.

"Fmail: moilhofferSurisha."

* These authors contributed equally to this work.

Introduction

Globlarizmus (World Hearth Organization 'WHO' grade IV introdynamic are highly aggressive, angiogenic and infiltrating train turnors representing more than 50% of all glipmas [1]. Their outcome is poor, must meatments currently in ose termining mufficient on long term survival [2,3,4] and less than 5% of patients survive by years post diagnosis [1]. Numerous clinical trials, mainly in phase I/H, are ongoing withdwick to find treatments with increased efficiery (http://clinical.trials.gov/, http://apps who, int/trialsearch/and for recent review see [5]). Improvement of the standard Stopp protocol [5,6], association to topologomerate inhibitors, aliquining agents, tyrosine kinase inhibitors, intercularing agents or antibodies targeting VEGP or the EGP receptor, development of new combinations of themotherapeotic agents and using new delivery drug devices have been used in different protocols (for exhaustive review see [5]). However no therapy appears as the panaeea Socking for new molecules using on largets different from those explored so far and improvement of multi-nargeted protocols are necessary to decrease recurrence and morbidity of this brain cancer that afflicts humans of all ages.

A new paradigm in camer therapies arose a decade ago with the identification, within tumors, of cells enclosed with stem cell properties and able to propagate tumors in immanodeficient trice with high efficacy. Such cells were first identified in hematological. cancers [7]. In 2001, Reva postulated that they may be an integral part of most if not all turners [8]. Galls with stem properties, long. term naviyal, able to self-reace, differentiate into various cella types and lead to tumor formation after serial transplantation of few cells to immuno-deficient mice were found in many solid turnors induiting glioblastomas (GBM; [9,10], breast [11], coloncancer [12,13], melanoms [14,15] and pancreatic cancer [16]. Recent experiments, using genetic techniques, allowing the tracing, of cancer cells within tumors strongly argue in favor of the presence of tuntor stem cells within GBM [17], skin [18] and adenoma [19] tamors is vive. These cancer seem cells (CSGs), also, termed tumor stem cells, tumor initiating cells, tumor propagating cells or stem-like cancer propagating cells are considered as the with responsible for throw multi-tenance and relayer after requirent. Glassical radiotherapies and chemotherapies which often induce tumor regression are thought to act preferentially on the non-stem cancer cells sparing CSCs and thus eatining cancer recorrence. In addition, CSCs are thought to be able to enter a quasi-quiescent state compared to the rest of the turnor cells and thus escape recarments often designed to act on highly preliferating cells. CSCs have thus because the cells to target in order to increase cancer therapy efficacy. Numerous reviews are highlighting this point [for the must recent ones are [20,21,22,23,24,25,26]).

In the present study, we focused our attention on G-proxincoupled receptors' (GPCRs) expression in cancer cells with stem. and tamor propagating properties indated from kaman GBM biopsies [27] and called herein glioblastomia stem-like cells (CSCs) The approach relied on the pivotal role played by this large family of membrane receptors in most key physiological functions including cell communication, cell signalling, cell migration, cell proliferation and apoptosia. These seven trans-mentiorane domain receptors convey information from outside the cell to inside by binding a variety of physiological compounds of wide chemical diversity. Their parametant importance in cell activity places GPCRs arrang the most appealing pharmacological targets. Fais has been extensively exploited to develop maker drugs of therapeutic interest for a variety of pathologies including cardiovancular diseases, psychological disorders, allergies, so that nowadays '90-56% of current drugs target GPCRs [28,29,30,21] Recently, GPCRs also gained anothin in anti-tumor drug discovery due to the promittent role they can play, directly or indirectly through aranactivation of other receptors. In cancer cell pathophysiology including proliferation, migration/metastacia, angingenesis and metabolian [31,32,33,34,93,36]. The SMO integralst vismoticgib has recently been FDA-approved in basal cell careinuma [37] and several molecules targeting GPCRs are inclinical trials as adjuvants of chemotherapies framely Bosentan, an Endorhelin A/li subtype receptor antigonist for melanome an BK P140, a CXCR4 untagonist for multiple travelomal. In addition, the possible use in paper therapy of monoclonal unribudies paragring GPCRs or their ligands has been reviewed in the literature [33,30].

In order to get a dupper insight into the pathophysiology of GSCs and find new potential therapeutic targets, we undertook a descriptive study of the set of GPCRs expressed in CSCs isolated from patient primary GBMs in comparison with the GPCR expression reperiodes of the GBM cell fine US7 MG, nonconcernan human from neural stem cells (F NSCs) and primary turnan astrocytes (HA). This set of cells was chosen as a first step to compare cancentus and non-cancerous neural cells with memproperties or in a more differentiated mate. The study was performed both at the transcriptomic and proteomic levels. The expression profile of this family of proteins appears finely regulated despite karyotype alterations and changes in DNA ploidy [27]. The exquisitely tuned GPCR expression changes observed in the different cell, types tested iconsisting of concernus and noncancerous cells, item and non-steen cells lead to a molecular signature evidenced by hierarchical clustering. Finally, the study discloses overal GPCRs with high expression specificity in GSCs compared to non-cancerous stem cells or the U-07 GBM cell line. In addition, GPCRs related to stemmess have been highlighted. Those GPCRs may give a hook to modify the fate of cancer stemilite cells and more differentiated cancer cells.

Results

Global analysis of endo-GPCR gene expression in human GSCs, fetal NSCs, astrocytes in primary culture and GBM U-87 MG cells

Expression of GPCRs was studied in five different human cell rytes comprising TG1 and OB1 GSCs isolated from OBM biopxies of two patients, the GBM cancer cell line U-87 MG, fetal neural stem cells (FNSCs) and human astrocytes (HA) in primary cultures, Expression studies were performed by RT QPCR using the GPCR low density microarrays (Applied Biosystems) in the 384-well plate format. These microarrays allow testing 355 different GPCRs, 2 members of the LANCL family (LANCL) and LANCL2, which are not considered as GPCRs, 14 different housekeeping genes (with 18 a nisosoanal RNA present in quadruplicate) and 11 other genes not related to GPCRs. The list of genes present on the microarray is presented in Table S1. To analyze GPCR capression in the different cell types, data were normalized taking RPLP0, one of the most stable housekeeping genes in our experiments, as reference (Figure S1). The use of RPLIN alone gave results similar to those using geometric averaging of multiple internal courtof genes [39]. The results were also similar to those obtained after normalization against TBP previously reported as being an adequate boosekeeping gene for expression mudies in GBM [40]. In the present experiments, the cycle threshold (Cr) value of RPLP0 was 21,1±0.28. RPLP0 is expressed at a ~6000 fold lower level compared to the ribosomal RNA 18 a The most highly expressed GPCRs in each cell type are given in Table 1. GPR::6 is highly expressed in all rumor cells hur also and even at a higher level, in 6-NSCs, the non-turnor stem cells of fetal origin. its expression in astrocytes is reduced (Cr = 11.2; ratio over RPLP0 = 0.0009). For comparison, low levels of GPR56 were also observed in HEK293 cells, another non-new cell line (Cr=90.6 Jaker normalization); ratio over RPLP0 = 0.001) (data not shown)

Considering the whole set of 356 GPCRs (list in Fuble SI), we tocused our attention on those expressed at Gr values \leq 11.5 (i.e. expressed down to 1.33×10^{-7} fold the level of RPLPO in at least one of the tive cell types tested. This stringent condition gives the best signal to noise ratio, although it may leave used; some interesting genes expressed at lower levels. Out of the 356 different GPCRs present on the array, 158 satisfy this criterion (see list and expression values in Table SF). Expression of these 138 GPCRs in the different cell types is represented in Figure 1, where GPCRs are listed, in alphabetical order, as a function of their expression level texpressed as 2⁻¹⁰ + 10⁻¹⁰ (arbitrary units). Among these 138 GPCRs, 90 genes were expressed above the cutoff level in OBI cells, 63 genes in TABLE 77 genes in finSCs, 51 genes in Table 1. GPCRs most highly expressed in the five cell types.

Cell type	GPCR	Ct.	Deite Ct (Ctorce - Clanura)	GPCR expression compared to RPLP6 ifeid
101	UPHM2	24:03	185-0.58	7,3611.40
	89950	2427864	8 08 - 0.32	8461125
DUI	\$UP	343::#E1	8.18:0.20	9061122
	699356	24410.01	8.28 = 0.29	0.71±1.22
	(EDF	245:008	138-031	10.41+1.24
	LP1002	246.10.04	848-0.92	11.16+1.25
INSC	G2936	226+0.00	1.48=0.36	2,79+1,20
	FZD3	20.7-0.18	158-040	12.38+1.38
	GPRC58	248:0.15	3.05-0.40	1309+135
116.)	1201	25±0.06	1.68=0.36	1472:+128
	1207	25=01	5.60-030	3472+13
087	DORNOE	245502	138-0.50	10-41-51-49
	5755	24.9 18.13	1.70-04	1374-1.35

GPCRs with Drivatures 525 are indicated. TCT and CBT correspond to the CRM cancer stem like cells. FINSC, HA and U-87 stand for final neural stem cells human introgenes and first a 87 GRM cell into respondency. Et correspond to the CPCR cycle threshold correlated to the Cr of BPLPB (C1 = 21, 12, CPCR has expression corresponds to the expression of a given SPCR in a given cell type correlated to the expression of BPLPB cax anted as first+2 no finite 1 to decide don't 127 (journal.pone)(91519)(01)

human asprosytes and 57 genes in the Li-67 MG GBM cell line. See expression data in Table SU.

Hierarchical clustering of GSCs, f-NSCs, human astrocytes and GBM U-87 MG cells using endo-GPCR gene expression

The 136 GPCRs significantly expressed (with C) \$37.5 or expression level >329 units) in at least one of the five cell types studied were used to perform unsupervised hierarchical clustering. Three main clusters could be observed (Figure 2). A first cluster gathers the GSCs TG1 and OB1, the second assembles human estrorytes (HA) and GBM U-87 MG cells and the third cluster corresponds to ANSCs, which appeared closer to the tumor stem cells than to the astrocytes and GBM U-87 MG cells. The same three clusters are obtained when using all GPCRs present on the intercorray without filtering (data not shown). The clustering clearly points to sets of genes specifically expressed or overenpressed either is a given cell type or common to two in more cell types. GPCR expression pattern thus constitutes a signature specific to a given cell type and allows clustering cells as a function. at their physiclogical or pathophysiological states. Of note, the GBM U-87 MG cella clumer apart from the GSGs 1331 and OB1.

Comparative analysis of the differences in GPCR expression moving the five cell types, with comparation on GPCRs specifically expressed as the GRM CSCs will be performed in the following paragraphs.

Analysis of the core of GPCRs expressed in all of the five cell types

Among the 136 GPCRs retained in our midy, 26 are present at levels above the cutoff value (expression level ≈529 units, i.e. Gr ≈ 3).5) in the five rell types 0 ignre 3A and 3B, Recepturs of the family of adhesion GPCRs, including BA12, GD97, CE15R4, GPR125, LPHN1, LPHN2 and GPR96, are the most highly represented (7726), followed by members of the Frizzled receptor family (5726) comprising FZD1, FZD2, FZD5, FZD5 and FZD1. The someronasal GPCR VN1R4, is also a member of this group of "common GPCRs". Although expressed in all five cell types. must of the genes present a differential expression level between the five cell types.

As anorementioned, GPR36 is one of the most highly expressed genes in the three cancer cell types tested [TG1, OB1 and U-87 MG). Figure 2 shows that this gene is also highly expressed in f-NSCs. In expression level in this cell type is respectively 3, 3.6 and 4.8 fold higher compared to that in TG1, OB1 and U-87 MG cells and largely exceeds its expression level in human aspocytes, which is close to the limit fixed in our study. Besides GPR56, the thrombin receptor F2R/PAR1 and to a lesser extent RAI2, GABBR.) and the orphan receptor GPR159 show significantly higher expression in the cells with stem cell properties (f. NSCs, TG1 and OB1, compared to the two other cell types. Only one gene in this group, LPHN2, appears to be overexpressed in the GSCs TG1 and OB1, but not in FNSCa, not in the GBM L 40 MG cells or in human astrocytes. Its expression in these two cell spes exceeds the mean expression in the three other cell types HA, FNSC and U-87 MG by 13 fold. On the overall, astrocytes and U-87 MG cells express the "commonly expressed" GPCR. genes at the lowest level (with the exception of FZD) and FZD? in astrocytes,

GPCRs with expression specificity in TG1 and OB1 GSCs.

Expression data analyses enveil nine GPCRs with expression specificity in TG1 and OB1 tells (Figure 4). LPHN2, one of these GPCRs, belongs to the group of "commonly expressed" genus (Figure 3 and previous section). However, LPHN2 appears significantly overexpressed in the two GSC cell types compared to the GBM 11467 MG cells or to the non-cancerous cells (Figure 4).

Seven other genes are expressed with specificity in TGI and OBI cells. These include CALORL, GPR37, GPR73, HR112, GPR103 and GPR128, the levels of the latter two being close to the limit set in our study (Figure 4). The caldionin receptor-like receptor CALORL for CRLR or CLR is expressed above, but close to the cotoff level in astrocytos and FNSCs, whereas it is downregulated in U-87 MG cells. Six genes, GPR37, HR12, GPR73, EDG8, GPR128 and GPR103 are expressed above the cutoff level only in TGI and OBU cells, GPR37 in expressed well





Figure 1. GPCR expression in TG1, OB1, F-NSC, HA and U-87 -MG cells. GPCR expression was determined by IIT-OPCR. GPCR are presented in alphabetical order. Expression levels are related to the cycle threshold value and expressed as 2^{-CL} * 10⁻¹¹, where Ct corresponds to the cycle threshold of a given GPCR. A (1 of 31.3 corresponds to an expression level of 329 (arbitrary units). Dotted lines indicate the cutoff level (Ct - 31.5). Expression levels are presented on a logarithmic scale. All data were normalized using RPLP0 as housekeeping gene. doi:10.1371/journal.core.co91519.g001

show the mutoff value in TG1 and OB1 cells and is mongly apregulated in these cells in comparison to FNSCs, HA and U-87 MG cells GPR73 expression is increased in both TG1 and OB1 cells, with highest amplitude in TG1 cells. The last these morphors of the group, EDG3, GPR328 and GPR103 are specifically expressed in TG1 and OB1 cells, but at levels close to the curoff value fixed in the present mudy, GPR103, although expressed in the lower range level, shows total specificity for TG1 and OB1 cells.

Among the 138 selected GPCRs, only one, FZD5, appears downregulated in TG1 and OB1 cells FZD6 shows a rather high expression in HA cells and i-NSCs. It is downregulated in U-87 MGcc2s and absent in the two GSC types, FZD6 belongs to the fetaded family of GPCRs that counts a total of we receive (FZD1-10]. Nine FZD genes (FZD1-9) have been analyzed in the present study (Fgtor 1), FZD10 mRNA could not be detected at a significant level in any of the five cell types tested. Among the nine, remaining FZD genes, two may be noticed, FZD3 which shows the highest expression in the cells with stem properties and FZD6, the expression of which is almost completely unned down in the GSCs tested.

GPCRs showing expression specificity in cells with stem cell properties

Besides the nine genes with specific changes in TG1 and OB1 cells compared to f NSCs, astrocytes and U-87 MG cells (Figure 4), other genes show more specific expression in cells with stem properties. Lon genes show expression higher or in the same order of magnitude in (-ASC compared to TG1 and OB1 cells. These include BAD, CXCR4, F2R, GABBR) and GPRC5B (Figure 5A) and EDNRB (Figure 5B), BAB, CHRM4, GPR19, and GPR82 (Figure 5C). Among these genes, CXCR4 appears to be the more specifically expressed in cells with dem properties. Its expression at similar in f-NSCs and TG-1 cells, increased in OB1 cells, lower in-HA cells and largely downregulated in U-87 MG cells (Figure BA). Similarly to CXCR4, E2R/PAR1 shows the highest expression in OBT relis. F2R belongs to the Proteinase activated receptors (PAR). also called Farranthin receptors of Goagulation factor II receptors. Two out of the four PARs, namely FR2 (PAR 1) and F2RL1 (PAR-2) are significantly expressed in loca (PAR-2) and all PAR- of the five cell types muscl, respectively (Figure 1C). Both E2R7 PAR-1 and F2RLU/PAR-2 show overexpression in TG? and OB1 cells, but F2R/PAR 1 has also increased expression in FNSCs, whereas F2RL1 (PAR-2) has higher expression in HA cella.

Firree genes, CHRMB, GPR171 and P2V5, although expressed in SNSCs, three higher expression in TG1 and OH1 cells (Figure 3C).

Three more genes LGR4. CNR1 and GPR51 (GABBR2, although expressed in TG1 cells, appear more specific to I-NSCs and OB1 cells (Egure 5B and C)

Fanally, CELSR2 expression is also upregulated in these tells, with the highest expression in OB1 cells (Figure 5B).

GPCRs with higher expression in the cancer cells TG1. OB1 and U-87 MG compared to HA and f-NSCs

We previously showed that OPR56 was overexpressed in TG1, OB1, U-87 MG and FNSG cells (Figure 2), Further analysis of dar GPCR manuferiptome indicates that the expression of one GPCR, CD97, appears more specifically related to the cancer phenotype. Among these cancer cells, CD97 expression appears upregulated in cancer cells with seem cell properties compared to U-87 MG cells.

GPCRs characteristic of a given cell type

Analysis of Figure 1 also points to GPGRs that appear highly expressed in only one of the five cell types (Figure 6). Thus, HA cells are characterized by the specific expression of OXTR and DRD4, ENSCs by BAIL, GPR37L1 and U-87 MG cells by BDKRB1 and to some extent BDKRB2 (although this GPCR is also expressed at low levels in HA cells.

Proteomic analysis of GPCR expression in human GBM CSCs, f-NSCs, HA and GBM U-87 MG cells

One step further in our investigation was to study GPGR expression at the protein level. Antihodies are often used as tools to investigate protein expression and localization. However the use of antibodies a cumbersome if a great number of proteins have to be analyzed. Moreover, the use of antibodies and especially those conjecting GPGRs is often hampered by their lack of specificity. This has been reported for several receptors [41] including %1 attendergie [42], dopamint [49], beta adrenergie [44], morecarine receptors [45] and histamine H4 receptors [46]. To overcome the relatest steps needed for generation and validation of reliable antibodies, other approaches are needed. In recent years, high throughput protein profiling, even in complex biological system, has gained considerable interest thanks to the development of mass spectrometry techniques (M8) coupled to liquid chromatography and bioinformatics.

Thus, in parallel to transcriptomic analysis, we developed a mais spectrometry-based proteomic approach to investigate the expression of GPCRs at the protein level. This task appeared challenging as GPCRs are membrane proteins mostly expressed at low levels. Therefore, a dedicated membrane proteomic approach based on 1D gel protein separation, followed by reduction, alk-lation and enzymatic digestion prior to nanoLC-M5/MS analysis of peptide mixtures was developed (see material and methods). With a 1% false discovery rate (EDR), between 3000 and 5000 unique proteins were identified for each cell type image precisely 4090 for f NSCs, 3997 for 13(7), 3960 for OB1, 3758 for U-87 MG and 3216 for HA cells). This led to more than 7000 non-redundant protein identifications when the reads from the five different cell types were stendined. Among those proteins, about 20% were announced at plasma membrane proteins according to their GO annotation 1043 for f-NSCs, 976 for OB1, 966 for 11/87 MG, 963 for TG1 and 837 for HA cells. A final list of seven GPCRs was obtained, among which five (GPR56, LPUN2, 12R/PAR1, GPRC58 and CD97) being to the filteen most expressed transcripts (expression level >20000 utini) (Table 2). Interestingly, CELESR2 which is expressed at a lower mRNA level (7542 anias maximum in OB1 cells) was identified with at least 2 popules in FNSCs, TG1 and OB1 cells. A detailed analysis of proteomic results was performed in order to explain why some highly abundant gene transcripts were not detected at the protein level, whereas less abandant ones were Bused on in depth GPCR armino acid sequence analysis, the number of MS detectable peptides was estimated (Table 2). To be



Figure 2. Hierarchical clustering of TG1, OB1, F-NSC, HA and U-87 MG cells based on GPCR expression. The set of 138 GPCRs with C1 values ±31.5 for expression levels expressed as 2⁻⁵⁵ × 10⁻¹² ±329 unital was used for the clustering. For a given cell type, mean expression values (m) from at least two experiments were used for the clustering. Clustering was performed using the OChip software (180), doi:10.1373/journal.pone.0091519.g002

heat deterted in MS, peptides should later: () molecular weights comprised between 1000 and 3000 Da; ii) extracellular or cytoplasmic regions exposed to tryptin digestion and characterized by lower hydrophobicity than trans-membrane domains and ii) no posttraindational modifications. Considering those criteria, our analyses suggest that growly, GPGRs with more than 5 potentially detectable peptides and with gune expression levels over 20000 units were observed in the present proteomic mady.

To obtain emi-manifiative information on proteins identified by man spectrometry, we performed spectral and peptide counting analysis. For GPR56, one of the hest identified GPCRs by proteomic analysis, spectral counting led to an expression pattern similar to that observed at the transcript level, i.e. expression of GPR56 being higher in (NSCs than in TG1, OB) and U-87 MG cells and not detected in HA (Table 2). LPHN2 which shows high manacrint levels specifically in OB1 and TG1 cells, exhibits similar results at the protein level (LPHN2 is desected with a high number of peptides and spectra in both TG1 and OBT cells and is not detected in 6-NSCs, U-87 MG cells or in astrocytes) [Table 2]. Interestingly, all the MS/MS selected peptides are located in the extracellular domain of LPHN2 even if 34 peptides could have been expected from the cytopiannic domain. This observation could be consistent with cytoplasmic domain processing which eliminates part of the C-terminal domain of the receptor. CD97 is another GPCR for which protentnics follows the trend of transcriptomics. CD97 transcript was found only in the rancer cells with overexpression in GSCs. At the protein level CD97 appears highly averegnessed in TG1 (9 peptides), OBI (10 peptides) and U-07 cells (6 peptides) while it was not identified in FNSCs and HA cells [Table 2]. Also, CELSR2 which showed a transcript level in OB1>4-NSC>TG1>IIA was detected with the same expression hierarchy) at the processit, level with OHD>FNSC>TG1>HA (Table 2), F2R (PAR 1), GPRC58 and BAE belong to the group of GPCRs prerexpressed at the mRNA level in cells with stem properties. With only five potentially detectable peptities, F2R was identified by proteomic analysis only in OBJ cells that present the inglust mRNA level for the GPCR (Table 2). Despire a lower level of transcript and few peptides detectable by MS/MS, GPCR5B was identified in f-NSCs. OB1 and TG1 cells in agreement with the RT-QPCR analysis (Table 2). Surprisingly, BAI2, a 173 kDs. protein for which 40 unique penddes could be expected by MS. analysis and with a mRNA level similar to that of CD97 (Table 2). was identified by a single peptide in f-NSCs (the cell type which showed the highest transmist level (Table 2).

Discussion

This paper presents the first exhaustive study of GPCR expression at both the transcriptomic and proteomic levels in GSCs. Analysis of the difference in GPCR expression between several cell types of neural origin highlights potential functioning specificities. Investigating the GPCR proteome was challenging as most of these membrane receptors are expressed at low levels. Besides the expression level, receptor accessibility to proteolytic enzymes, which can be related to the length of the extra and intracellular domains and post transcriptional modifications, must



Figure 3. Ensemble of GPCRs expressed in all of the five cell types tested. GPCRs expressed with a cycle threshold (Ct) \approx 10 31.5 in GSCs (TC1 and CB1) furnish fets ineutral stem cells (P-NSCs), human astrocytes (HA) and U-87 MG CBM cells (U-87) are represented. Ct = 31.5 for expression level expressed as 2 $^{-0.5}$ to 10 \pm 329 units) was taken as the lowest limit for expression. All data were normalized using RPLP0 as housekeeping grass. Ordinate indicates the fold change in expression of a given GPCPI relative to the Ct value of 31.5. Relative fold change is calculated as 2 $^{-0.5}$ CPCPI corresponds to the cycle threshold of a given GPCPI in a given cell type. Values correspond to the mean of a least 2 experiments (from 2 to 4), GPCRs are presented in alphabetical order. Note the ordinate scole change for GPR 56. doi:10.1371/journal.cone.0091519.g003

be considered, Seven GPCRs were detected by MS based proteomics. For all GPCRs, the BAI2, detection by mass spectrometry correlates with their transcript level and number of potential proteolytic peptides. These results that demonstrate that MS - based proteomic approaches networks allow both identification of proteoms in complex maximum of theoreards of proteins and quantification with good confidence. It also reinforces transcriptonaic data by showing for the receptors that could be detected a good contribution between levels evaluated by RT Q-PCR and mass spectrometry, i.e. the highest protein levels being observed for the highest mRNA levels. Due to the lack of selectivity of most commercial GPCR – directed antibodies, MS appears as an atmactive methodology for GPCR expression profiling.

The different GPGRs presented in the result section, with expression specificity in entrer GBM cancer cells, GBM cancer cells and £NSCs, GSCs and GSCs/£NSC) are presented in Table 3 along with their knows figurals), class, function and chromosome focalization. In the discussion we will focus our attention on the most highly expressed genes detected by proteomits and on some GPGRs with specific expression in TG1 and OBT cells. The relevant GPCRs will be discussed in order to highlight their main known functions and, if the uncert

Genes with specific overexpression in GBM cancer cells

One gene, CD97, emerges for its specificity in GBM cancer cells This GPGR shows significant expression change in the brain espece cells or non-cancer cells and its expression is highest in cancer cells with stem cell properties (TG1 and OB1). This expression specificity is observed both at the mRNA and protein levels. GD97 is a group II adhesion GPCR, member of the

epidermal growth factor seven transministrate (EGF TM7) family. Aberrant expression of this gene has been reported in various cancers, mencly thyroid, gastric, papercatic, and esophageal carcinemas [47] and capression scents to be related to tumor aggressiveness: Recently, CD97 was shown to be apregulated in three different **CBM** cell lines and to be one of the targets of the transcription factor WT-1 (Wilms tumor protein), the expression of which is also upregulated in glamas [40]. CD97 was found to be involved in invasiveness and metastasis of prostate concer, (where it forms beterodimens with the hupphosphatidic add receptor LPAR1 [49,50]) and more recently of GBMs [49,51]. Inoverexpression is correlated with decreased survival in patients [51]. The present study clearly shows the expression specificity of this receptor in GBM cancer cells compared to non-cancerous. neural cells. Further studies need to be performed to establish which of the possible splice variants [52] are upregulated. So far there are no reports on the physiological role of C1297 in brain. The low expression of this receptor in astrocytes and f-NSCs. compared to cancer cells places it as a good candidate for further investigation of its role in cancer in general and GSC cells in particular.

Genes expressed in GBM cancer cells with and without stem properties and in f-NSCs

GPR56, mother achiesion GPCR belonging in class VIII is expressed in GBM cells, but its expression is even higher in J-NSCs. GPR56 is known for its expression in cancer cells including glonnas [09]. In several contert inclanome, prosiste cancer [04.05,56], the level of GPR56 expression appears to be inversely correlated to malignancy and metastasic potential. Physiologically, GPR56 plays a key role in brain development, being involved in corrical development and radial migration of neural progenitors.



Figure 4. GPCRs proferentially expressed in TG1 and OB1 GSCs. GPCR exercision was determined by RT QPCR. Expression levels are presented as 2 ^{-1,1,1} × 10⁻¹², where Ct corresponds to the cycle threshold of a given GPCR AI and 3) present CPCRs overexpressed in TG1 and QB1 cells and GPCRs are presented at a function of decreasing expression level in TG1 cells: C) presents the GPCR specifically underexpressed in TG1 and QB1 CSCs. Data correspond to the mean of 4 experiments.

dol:10.1371/journal.cone.0091519.g004

(NPG/NSC) from the lateral venericles to the contral plate Collagen has been reported to be its major signed for this function [97]. GPR36 has been shown in be highly expressed in restinpositive neural stem/progenitor cells in the venericolar/univentricular zone of human and mouse tetal brains as well as in cultured interopheres derived from both human and mouse fetal brains [98]. Its expression is downrogalated during differentation [59].

The high expression of GPR56 in I-NSCs and its low expression in estrucytes are in agreement with the pre-sited studies performed in metal sum/program cells. However the present study which compares the expression of GPR56 in GBM cells and 5 NSCs shows for the first time that GPR55 can be expressed at the same and even higher level in normal (non-cancerous) stem cells than in cancer cells.

GPCRs showing expression specificity in cells with stem cells properties TG1, OB1 and f-NSC cells

At the transcriptomic level, 17 GPCRs show specific expression in cells with stem properties (Figure 5A–C; Table 3). Four of them, BAP2, F2R, GPCR3B and CELSR2 are detected at the protein level. Information relative to the role of these receptors in stem cells is limited and their role in CSCs remains to be explored.

BAI-2 is a member of the brain angiogenesis inhibitor family (BAb) which belongs to group VII of adhesion GPCR1 and counts 3 members, BAI1 to 3, located on chromosomes 8, 1 and 5 respectively. BAIs are mainly expressed in brain. This group exhibits an N-terminal CUB (for complement Clr/Cla, Uegf, Borp1) domain, 3 to 5 thrombospondin type 1 repeats (TSR) discovered to regulate the anti-angiogenic activity of thrombospondin-), one hermone-binding domain, the evolutionary conserved GPCR preservivic and (GPS) and multiple glycosylation sites. The three receptors are involved in neu-vascularization and have been reported to be involved in apoptosis and regulation of tumor progression for review are [60]). The antiangiogenic activity of BAII in normal and pathological states is well documented [61,82,63]. It is triggered by vasculostatin-40, a 40 kDa fragment induced by matrix metalloproteuse cleavage [63]. Turnor-suppressor activity has thus been attributed to BAII and its use in cancer gene therapy has been proposed [62]. The angiostatic effect of BAP2 (and BAP3) is less documented. Activation through N-terminal cleavage has been reported for BAI2 [64]. Concerning a role of this receptor family in high grade gliomas, data are scarer and concern global levels of expression measured on tissue tamples composed of a mixture of cells [65]. The present study which gives a comparative overview of the transcription expression pattern in five different cell types shows that I NSCs express HAI1 [] at the highest level (Figure 1), BAI2 3 are overexpressed in cells with stem properties compared to more differentiated cells. Such observations have not yet been reported in the literature. Only the lack of expression of BAH in various GBM cell lines, including the U-87 MG cells has been documented [61], which is in agreement with the results of the present study (Figure 1). The different members of the family and namely BAI2 and BAI3 may be involved in functions different from neuvascularization, related to stemmest maintenance or regulation of apoptosis. Further experiments are necessary to ancover the role of these receptors in GBM and in nancer, more generally. Of the three BAIs, the transcription level of BAI2 is highest. Despite its high molecular weight and high level of mRNA in FNSCs, TGI and OBI cells, BA12 is only scarcely detected (one peptide) at the proteomic level in FNSCs (Table 2). This raises further questions concerning the expression of the gene at the protein level or receptor processing in the stem like cancer cells.

12R is a second GPCR detected by mass spectrometry with expression specificity in cells with trem properties. F2R belongs to the Proteinase activated receptors (PAR) also called Thrombin receptors or Coagulation factor II receptors which count four nembers. Two PAR receptors, namely FR2 (PAR 1) and F2R11 (PAR-2) are significantly expressed in, respectively, four (PAR-2) and all (PAR-1) of the five cell types result (Figure 1) Both F2R7 PAR-1 and F2RL1/PAR2 show overcoagression in TG1 and OB1 cells. F2R, but not F2RL1 is also overcoagressed in F-NSCs. PAR receptors have placed effects on neural cells. FAR receptors and namely F2R/PAR 1 and F2RL1/PAR 2 are expressed in most turners. for review see [FB,67]] and are known for their



Figure 5. GPCRs overexpressed in the GSCs TG1 and OB1 and the fetal neural stem cells If-NSCs). The ordinate represents the expression level of the different GPCRs shown as (2⁻¹⁰ + 10⁻¹⁰) where CI corresponds to the cycle threshold of a given GPCR. Note the difference in scale between A, 8 and C. HA corresponds to human astrocycles and U-W7 to the GBM cell line U-87 MG doi:10.1371/journal.cone.0091519:0005



Figure 6. GPCRs specifically expressed in one of the five cell types. Expression of the given CPCR is compated between TG1 and CB1 GSCs, fintal neural storm cells (FNSCs), human astronyces (HA) and the GBM cell line U-67 MG. The ordinate represents the expression level of the different GPCRs shown as (2 ⁻¹⁷ * 10 ⁻¹) where Ct corresponds to the cycle threshold of a given GPCR. Note the difference in scale between Al and B). TC1 corresponds to GSCs, HA to human astropytes and U-87 to the CBM cell line U-87 MG, doi:10.1371/journal.cone.0091519.g005

cooperation with EGFR signaling [60], F2R1.1/PAR-2 triggers proliferation, migration, invasion of GBM cells and activation of downsmears MAPKs including ERKs after stimulation by the HIF-inducible tissue factor (TV) [69,70], V2R/PAR-1, the principal threenhin-activated receptor involved in platelet aggregation and endothelial cell proliferation, has been shown to be overexpressed in various lovative and metastatic tumors and its expression levels directly correlate with the degree of invasiveness. of the cancer. A link herween angiogenesis and EXWR (via the Signed independent LGI RyIII mutant), tissue factor (11) and PAR receptors has recently been established in GBM cell lines [71]. In melanoma, cell signaling through PAR releases several factors, such as cytolones, proteases, adhesion molecules and growth factors causing changes in the tumor microenvironment [72]. This has not been shown so far for GBMs. PAR receptors probably play a major role in GBM, and even more generally in cancer, linking the rurnor microenvironment, hypoxia and angiogenesis to tumor cell proliferation, migration and rissue invasion. However, PARs also play a major usle in normal cell functioning and are expressed, us shown in the present study, in astrocytes and feral neural stem cells. The overexpression of these teceptors in cancer stem line cells has not been reported so far. F2R is detected by mass spectrometry in OBI cells that have the highest mit NA level tor this receptor [Fable 2].

Table 2. GPURs detected by proteurals analysis and comparison to thuse most highly expressed at the transcription is level.

				Ĩ		161		D2N1		HA		CEN	
GICH Name	Access	Maincular weight (KD	Wh of expected unique b poprides	Transcript Investigation	Nb of unique protide (nb of spectrum)	framerica based (2 Cyra0 ¹⁰	No of underse peopledie (n.b.	Transcript David 12 Oprilo ¹²	Wh of unique the standard in the	Transcript Linual	Mb of unique peptide (ht) of spectrum(Tanada Tanada IP Openo	No of unique puptide (nb
CONTRACT	GUNDA		2	07975	a (10)	19425	· 1011	123521	1000	2	P	12464	100 1
CUMUS .	UNIVERSITE OF	10.	34	EINCE.	150.0	allene a	12 (24)	81.2	2	1251	2	Note:	- And
1.20	\$21120	2		Eddar.	2 (8)	1seat		1097.0		100	8	inset	- Inter
C SHOWCH	TTHE	5		e	E		1		E	1655	8	+znes	I
1021	00500	10		9461.5		10101	T	14700	-	Ilean	Pa	inter i	hd
GPRCSIF	CHANNED	4		2495.8	1 (3)	2005	1 (1)	NIMS OF	101	1988	-	-	a.
LASANA	Distanti	\$	*	15 205	8	101	- In	Anni	8		Par	1245	a de
CXCIEA	650033	40		Mere		1011	1	11154	-	100	1	10	-
and a	ONDAL	-	40	BERS 1	- pos	19851	1	THOSE .	101	0505	8	in the second	and a
EDIGIE1	(states)	10		*	2		1		2		1	1000	m
GP9153	CONTRACTOR OF STREET,	8	1	11.00	101	9600	I	1163		14.16	-	141	-
CDM	Section.	10	2	14512	1000 01	NSRE	0.00	-	Z	-	1	111	1105
LGRe	QBM637	104	-92	22756	- Part	4155	ad .	19525	-	1604	-	18	111
CNR1	P21554	5		185.02	-	3161	TH.	14332	-	8	1	-	eet.
CERSER?	MC196D	222	R	THE	2 (2)	1.20	2.03	2507	6.7.2	alle	- por	215	and the

ware calculated after it share over 1 growing on the second of the rest of the compared to the compared to the compared of the second of the s

Table 3. Summary of the GPCRs expressed with the highest specificity in different subgroups of cells comprising at least the GSCs. TG1 and QB1.

Subgroup	Function	Ligand	Ciass	Chromosomal localisation
TOU				
6097	tumat engogenesis sell migration. (M)	6053	8 AchestoryEGF like femily	19018
NTOU				
GP958	man development tumor metallosis del plasticity	collagen II	B Adhesion	16013
τα				
CA.CPL/CPL4	anglogenesis, suit proliferance, ant apoptotic, resultance ta hyposia	appromotulin, CORP	B Calctovin group	2632.1
EDG8/5195	call migration/avol/toration	ysophosphatidic acid, samingation 1-phasphate	4	14013.2
1216	tumer suppressor	witte	@ Friened	8622.3-623.2
A79.03	paie. IF amide Receptor	CEFF family populdes	4	4037
575128	imphan en redat	ingstan	8 Adhesion	30123
02837	macroautophagy, gile and neuronal protection	provapover/ProvapoprideT	*	7451
G997349681	orgiagenesis, cell proliferation, indexed in poin such as GPS101	prokenation 1 and 2		2013 I
H7-2	anglugenesis, cel profileration	historrine	Alexand 1	5075.2
THNS	EMT is heart development	Incomedia	B Adhesion	1p3E.I
TO				
0482	unclear (neovescularization, apotosis)	orphan	8 Adhesion	1025.2
0412	sympte formation, description morphogenesia	Stallive proteins (CtalT-II) /	9 Adhesion	de12
ausia	plane cell plority	Cadherin domains - homophilic binding	P Adhesion	110113
Q IIIM2	Cell provieration differentiation, survival, Link, with Clark activation, implicated in cancer	sostylcholme	*	10ID
SHIRE	Cell proliferation, differentiation, survival, Imprivated in cancer	scetylchaline	X	110112
CHIEF	mengy metaboling glucow oxidation, lengeneds, apostosis, automogy sem gene expression	erandemide, 2 eachidony: giyanal	*	figit git
CHL-M	ct-1 migration, angingenesis, invativness hypexis controlled, member of the CRG (choperation regulatory genes)	DELTE	A	26221
LINOO	self renewal, migration, prespondute	endothelins 1 to 3	*	139223
E26/PAR I	Various asthophysiological processes, Participates in USH signating and thus involved in caronical III inducipie.	proceedysic creatings of N terminal	A 5	5613.8
6600R1	cel protification	GABA	C Metabotropic GABADIR	60221
SADDHE (GPRS1)	cel prolferation	GABA	L Metabotropic GAUAIDIN	9622.1-22.3
avera	Into with stampes	prohan	٨	120123
a*-82	orphan food intake, not essential	orphan	*	ApTI-6
599/71		ngdan	*	3625.1
679CHE/Bernold acid Induced gene 2 proceite2	ticknows; estricic and instand	ng#an	E Glucamone menalizariopie	16p12.8
LCR4	sten tell publication/differentiation, twosteness metastass	Bagandia	*	11014-013
P25V6/ P452	Sparse information, involved to concer-	akey Lalaha hyephesphalitic acid	14	\$50142

SYCRs will expression specificity in the different subgroups of cells are block together with it their reported function in causes on their physiological implications (if known) it their ignori(s). In the GPER class they being to and by their composition knowledges 7, 0, 1, N, stands for TCP, 081, 0.87. MB and 1.550, respectively, G-X,Rs in 10 thus stands for the receptors specifically expressed in TGP and OVP GSUs compared to their expression in the three other cell types 100 for these expressed in 1615, C01 and 0-07 We she spin.

doi 10 1371 (ournal pone.0091319.6003

GPRC5B for RAIG-Fi, a reginoic acid inducible orphan GPCR. is a member of the group C of metabolropic glutamate receptur family proteins with short N-termini. It is expressed in human brain [33,79,74]. Studies performed on Xempus suggest a signaling though the non-canonical Witt/frizzled pathway and a possible cross-talk between the two pathways [75]. This receptor may play an important role in brain maturation and neural citcultry building during brain descropment. Espression variants, due to alternative splicing have been reported in mouse brain [76]. GPRC5B-v1 is ubiquitously expressed, whereas GPRC5B-v2 is more specific to brain. Nevertheless, besides its implication in behavioral abnormalities, information concerning this receptor family is limited. GPRC5B is shrapet absent from U-87 MG cells. In mRNA level is highere in F-NSCs. TG1 and OB1 cells with f-NSC>OBI~TGI (Figure 1). Interestingly, mass spectrometry confirms its presence at the protein level with the same relative abundance in the three cell types.

GELSR2 (Cadherin EFG LAG seven-pass G-type receptor 2) is a non-classical earlherin adhesion receptor (group IV of adhesion GPCRs), member of the flamingo-mbfamily (finit characterized by the presence of a seven transmembrane domain [77]. The three members of the family, CELSR 1-3, have multiple functions in epithelial and nervous systems and are among the core planar cell polarity (PCP) receptues [78,79,80]. A role in maintaining quiescence of long term hematopisetic stem cells has been reported [81]. They play a pivotal role in contact mediated communication. PCP regulation appears to take place through cooperation with the Frizzied receptors and the non-canonical Wat pathway [81,82]. Aberrant regulation of these signaling pathways has been suggested to be involved in cancer invasion and metastasis [83,84]. Although expressed in HA nells. CELSR2 mRNA is overexpressed in cells with stem properties with levels in UB(>FNSC>TG). The same order of expression is also found at the protein level. The overexpression of this receptor in CSCa deserver further investigation.

Several other highly expressed GPCRs, namely CXCR4, GABA/B/Rs, LGR4 and CNR1, although not detected by mass spectroscopy, will be discussed.

CNCR4 presents the same relative expression as F2R/FAR1 at the mRNA level (Figure 4A) and similarities in functional properties. CXCR4 is a member of the chemokine receptor family and its endogenous ligand CXCL12 has been implicated in tumor development, including glioman, facilitating angiogenesis, infiltration and metanaxa through modulation of VECF signaling. PAF1 (plasminogen activator inhibitor () production and membrane type 2 matrix metalloproteinase expression (reviewed in (85,86°). In agreement with the results of the present study, overexpression of CXCR4 in GRMs has been recognized as an attribute of cells with progenitor/stem properties and CXCEJ2 promotes specifically the proliferation of these cells compared to more differentiated cancer cells [\$7,88]. Of note, the micro-RNA cluster miR 302-367 has recently been shown to halabit day CSCs'self-renewal and infilmative properties through CXCR4 repression [89]. Recent studies also show a rule of the CXCR4/ CXCL12 axis in origering interaction of causer cells with microvascular endoduciial cells and GBM cancer atom celli grandd/Remutation into pericytes [90,91]. The prominent role of this axis in turns growth and pancer stem-like cells' intersection with their encroenvironment and the perivasedar space, designed CXCR4 as a potential target for adjuvant chemotherapies. So far the CXCR4 am agonist BKT140 is in phase I/IIA of a clinical trial for multiple. myeloma (http://www.clinicaltrials.gov NCT010E0380; for review see [06]). Expression of CXCR4 in neuval stem cells has also recently been reported [92]. The present

study shows that the expression level of GXCR4 in ENSCs can reach that observed in GSCa. Using antibodies, CXCR4 was found to be expressed in U-87 GBM cells. Our study indicates low expression of the receptor at the mRNA level in U-87 MG cells (below the cutoff level used in the study (Table S1). Despite its high transcription level in F-NSCa, TG1 and OB1 cells, the protein could not be detected by mass spectrometry.

GABBR1 and GABBR2 (GPR51) which helong to the metabotropic GABA/B) receptors (class C GPCRs) present a relatively high expression in f-NSCs (Figures 5A and 5C). These two receptors are largely distributed in the central nervous system. (CNS) and are particularly present on neurons where they play a role in neurotransmission both at the presynaptic and postsynaptic level. The two receptors function by forming heteromeric complexes of GABA/B R1/R2 subunits [93,94,95,96], but homodimers [97], higher order oligomers [98] and complexes with other GPCRs have also been reported (e.g. the clusely related extracedular calcium sensing receptor CaR [99], the muncarinit receptor M2 [100], as well as with the non GPCR GABA A receptors (Balamitramanian, 2004 #242]. GARA/A/R and GABA/B/R have been shown to exert opposite effects on rodent. NSCs. GABA/A/R activation restricts NSC proliferation [101,102], whereas GABATER activation promotes in vitro neurospheren' development [103]. Besides neurons, GABA/B R1 and R2 are also present in astrocytes [104] and cells outside the CNS [105,106,107]. GABA/B) receptors have been involved in various cancers and the GABA/B) receptor agonist baclofen was shown to reduce cancer development in various animal models [106,109,110,111]. However, GABA signaling remains extremely complex and the multiple possible interaction of GABA/B) subunits with other partners, as well as the regulatory role played by the GABA/B/R2 in receptor trafficking (11/2)renders assessing a clear out rule of these receptors in cancer difficult. The high expression of the two GARA'R) receptors in FNSCs may suggest a role in nem cells.

Similarly to GABBR2 (GPR5), LGR4 and CNR1 present an increased mRNA level in f-NSCs and (JB1 rells

LGR4/GPR48, a class A receptor, belongs to the family of leacine-rich repeat (LRR)-containing C protein-coupled receptors (or LGRs) composed of air members. LGR1-8 are hormone receptors, LGR4-6 were deorphannesi in 2011 when De Lau and Carmon [113,114], working on intestinal crypt cells, showed that these receptors hand R-spondin, a molecule secreted by the crypt cells and known as a positive regulator of West signaling. In the study of Garmon, LGR4 and 5 were also down to interact with the Wat-binding LRP/Frizzled receptor complex. LCR4-6 have been found in various tissues [115,116,117,118], where day regulate stem cell proliferation and differentiation. Inactivation of the LGR4 coding gene decreases cell proliferation and strongly reduces terminal differentiation of Paneth cells in postnatal motas: intestinal crypts [119]. Physiologically, LCR4 appears to play a key role in organism and tissue development [100.120.121.122]. Expression of LGR4 was also associated with invasiveness and instastatic activity of colon and cervical cancer cells [129,124]. So tur no information is available on LGR 1 expression in gliomas. Of note, in our murly, among the three R spondin hinding receptors, only LOR4 is expressed at a significant level in 'EGI and OBI cells.

CNRJ, which encodes the CB1 cannabinoid receptor (CB1), exhibits an expression profile comparable to LOR4 (Figure 3B). CB1 has a widespread distribution in various brain regions [125] and has two known endogeneous ligands (unundamide and 2) arachidoxyl givernd). Several genetic audies have been performed to link CNRJ mutations to psychiatric but also metabolic disorders

[126,127,128]. In par asymptes CBI plays pivota) roles in energy metabolism and activation of this receptor increases the rule of glucose oxidation and ketogenesis, two mechanisms involved in energy samply of the CNS (for review see [125], CNB.) expression has been reported in various glorna cell lines and receptor agonists trigger apoptosis and autophagy of these cells [129,180]. However cannabinoids' effect is complex and relies on both ligand supcentrations and receptor levels [121]. In gluma stem like cells. C21 againsts have been reported to modulate the expression of even genes [132]. In human glioma tissues, increased expression of rannabiositi receptors (CB1 and CB2) has been reported to correlate with higher tamor grades [133]; but this cemains controversial [134,135,136]. In other tumors, a role of CNR.] in invasion and metamasis has been reported [197, 38] and the enducanabisoid system has been reported as a promising tool to: improve the officiety of sternids in colon cancer [199]. Globally, the cannahinoid system appears to present anti-proliferative, antiangiogenic and pro-apoptotic properties. Nevertheless, its potential use for treating gluma and may be cancer more generally. pouts further analysis and is hindered by add effects such as anxiety and depression.

Several less abundant GPGRs of the adaptoop of genesexpressed in cells with stem properties [Table 3], show specific aprogulation in GSGs. These include CHRM3, GPR171 and P2RY5. As for F2R/PAR-1 and CXCR4, CHRM3 activation may synergatically act on the EGFR signaling pathway. Much less is known for P2RY5 and GPR172 and their relation to cancer.

GPCRs specifically expressed/overexpressed in TG1 and OB1 GSCs

At the transcriptomic level, eight GPCRs appeared specifically appropriated and one downergulated in TG1 and OB1 GSCs (Figure 4 and Table 3) compared to their expression in HA or 5-NSCs

LPHN2 shows the highest expression among the different GPCRs of this group. The specific apregulation of LPHN2 as the inRNA level is corroborated at the protein level and both transcriptontic and proteontic data are in agreement with a level in-TG1>OB) LPHN2 is an adhesion GPCR (group I) belonging to the family of haraphilins composed of three members (LPHN1-3) (for review see [140]). Expression of introphilin 1 and 3 is mainly. found in the central nervous system, whereas LPHN2 is more abiguitous [140,141,142,143], LPHN2 shares with the two other members a large N-terminas composed of lectin, olfactionedin and hormone hinding domains. The receptors hind a labotoxin, the black widow spater ventors and this binding triggers strong exosymptic at neuron synapses. LPHN2 however shown lower binding affinities than the LPHN1 and LPHN3 isoforms. Not much is known about the functional role of these receptors in verebrates. Through their large N-terminus, latrophilins may establish interactions with the extracellular matrix. Such interactions have been reported recently for LPHN1 [144,145] and LPHNS [146]. Information on the function of LPHN2 is scarce. It has been reported to play a role in the epithelial mesenchymal mansition (EMT) necessary for heart value development during embryogenesis [143]. In addition, one report indicates a higher expression of the gene in lineast turnom [147]. More recently, in a genome wide association study approach ained at identifying genes involved in the response of tumor cells to pachtaxel, a microtubule cytotoxic used in chemotherapies, a SNP located in the intronic part of the LPHN2 coding gene was identified as being associated with the cellalar response to this compound [148]. However there is no further information as to how an inmonic SNP in LPHN2 may interfere with the cellular effect of

paclitated. In the current state of knowledge, one may speculate that the overexpression of LPHN2 in TG1 and OBI GSCs may be related to EMT, the developmental program often activated during cancer metastasis and regulating the equilibrium between GSCs and the non-seem cancer cells [149]. A recent study using in silico analysis and ulming at finding genes under p53 control, designed LPHN2 as a novel target gene of p53 [150]. LPHN1 and LPHN3 are also upregulated in TG1 and OB1 cells, but both receptors appear less specific than LPHN2 and we did not detect them by mass spectrometry.

Other receptors, namely the parkin-associated endothelin B-like receptor (GPR37 or PAEL-R), the calcitonin receptor-like receptor (GALCRL or CRL), the histornine receptor HRH2, the prokinecirin receptor (GPR73 or PKR1), the endothelial differentiation G-protein coupled receptor 8 (EDG8 or S1P5), GPR128 and GPR103, show specific increase in their mRNA levels in TG1 and OB1 GSCs (Figure 4 and Table 3). However their expression is too low to be detected by man spectrumetry.

Concerning the histamine receptors, only changes in HRH2 could be observed in the present study, HRH), HJ and H4 were expressed below the threshold level used in the study. HRH2 has a large tissue distribution and is involved in a plethora of physiological functions as reviewed in [151,152]. As other members of the histamine receptor family [153] it has been reported to play a role in cell prohibitation, differentiation energy creation and thus to be potentially involved in cancer. HR812 are found to human mammary and gateric carcinoma cells and several human melanoma cell lines and the HRH2 antagonist circetidine appears to be endowed with anticancer properties, although its action is not exclusively mediated through HRH2 [154,155]. Clinical trials using HRH2 untagonists in adjuvant treatment in reserved colorcetal cancer have also been reported ([156]; for review see [157]), but their real benefits need to be assessed. One additional report points to an antiproliferative activity of histamine mediated through HRH2 in pancreatic cells (PANC-1), with a G0/G1-phase arrest and a modulation of the Bel-2 family proteins [158] In our hands, two HRH2 agonists (anthamine and dimapert) and five antagonists (currenticine, zolandine, ranitidize, thiodidize and famotidize) tested at 3 and 50 µM for 24 hours did not show a significant effect on TG1 GSCs' proliferation and survival. The specific overexpression of this histamine receptor subtype in TGI and OBJ GSCs suggests its potential involvement in the cells' pathophysiology that needs turther and deeper investigation.

The function of the calcinonin receptor-like receptor CALCRL depends on the sub-type of RAMP (receptor activity modulating protein) to which it is associated. It functions either as a receptor for calcitonin gene related pepride (CGRP) when associated to RAMPT or for advenomorfullin (AM) when associated to RAMP2 or RAMP3 [159]. AM has vasorelaxation properties and in expression is controlled by the hypoxis inducible factor (HIF), Gels overexpressing AM exhibit higher resistance to hypexia anduced apoptosis [160]. AM induces overcapression of antiapoptotic factors and decreases expression of pro-apoptotic factors [160,161]. The location of AM close to neeronic zones in tunnors suggests a major role of this populity in the resistance of tumor cells to hypoxis. Numerous data are available on AM and its expression in tennors. However data on its receptor are scarce. A recent work shows that CALCRL and its partners RAMP2 and RAMP3 are present at the mRNA and protein levels in GBM tumors isolated from several patients [162]. Moreover, systemic injections of AM receptor antibodies in animals were shown to inhibit both namor growth and neo vascularization of UB7 venografied cells in a dose dependent manner [163]. Nevertheless, information on the

distribution, regulation and function of endogenous AM receptors remains poor. Overall, data from the literature suggest a role of AM and its receptor in the survival of tumor cells within the hypothic regions of addid tumors. AM may induce theoreeularization and premise tumor growth. However, in the absence of functional data, it remains difficult to assess the exact relationship between AM. hypoxia, cell preliferation, cell survival and CALCR.

Concerning EDG8/81P5, the role of the ligand S1P (golungosine 1-photphate) in rancer has recently been reviewed [164]. For the other receptors of the subgroup, information relative to their implication in cancer is rare time report for GPR37 [165]) or lacking.

Concluding Remarks

GPCRs, which mediate extracellular to intracellular signaling, are key receptors in cell functioning in both physiological and disease conditions. Over the years, a great number of GPORs have successfully here developed as pharmacological targets in various diseases. However, the complexity of GPCR signaling offered by the possible formation of homo- or hetero origomers, interactions with a wealth of other proteins, including growth factor receptors, [166,167,163,169] and downstream effectors, and in regulatory role in several pathways including the Hippo national which coordinates time borneostasia [170], unveila bewildering opportunities to target new discusses and fuel drug discovery [31]. Oncology is one of the sectors that may benefit from these new developments as decegulation of GPCR dependent cell signaling sustains and may even drive runnongenesis [32,35,36]. Exploration of the comparative expression of \$56 GPCIRs (among which 128 were retained in the present analy/in OSCs and in non-nancer neural cells with stemcell properties (human fetal neural stem cells) or without stem cell. properties (human autocynes) and to the established GBM L 37 MC cell line, unvelle differences in GPCR expression between the five cell types of neural origin. Several genes, including GPR-17, GPR73 (PKR1), GPR103, GPR128, EDG8 (S1P5) and HRH2 appear as the most specifically curiched in TG1 and OB1 cells. LPHN2, which is expressed in the five cell types, is predominantly apregulated in TG1 and OB1 cells LPHN2 in the only GPCR of the group detected by mass spectrometry. The specific anderexpression of FZD6 in TG1 and OB1 cells in noteworthy as FZD6 as the only GPCR showing such a profile. The GPCRs emerging from our analysis are related to metabolic functions, pro-anglogenic artivities, rell problemation, resistance to hypoxic and interactions with the microenvironment (Fable 3), an ensemble of obstacteristics. which endow these cancer cells with properties allowing them to be maintained and develop in the specific microeoutcoment created by the turnor and which may induce death of the normal neural cells. USCs may originate from differentiated cells that acquired atem properties or from stere/immature progenitor cells that lost their normal regulatory capacifies to become concercios. Whatever the origin, the GSCs may have acquired or netained gene expression found in normal stem/progenitor cells. In this GPCR moscriptume. analy, several GPCRs show a differential expression pattern in F NSOs, TGT and OB) cells compared to HA or U-87 MG cells. Some GPCRs are already known for their involvement in GBMs. Uthers have been reported for their involvement in different cancers, but not in brain cancers. To our knowledge, this is the first exhaustive report presenting compandie expression profiler of the whole set of GPURs in cells from GRM rumors and non-cancerous tissues at the manaziptomic and proteomic levels. Not many GPCRs have so far been reported for their role in GSCs. I or those genes that are already documented, our findings mostly correlate.

with the reported trudies obtained using other techniques such as use of agonists and antagonists, or 'cooclout/innockdown experiments. GPCRs specific to GSCs or U-87 MG cells constitute the most appealing ones for cancer therapy. In addition to changes in the level of expression, genomic modifications with mutations that can alter the integrity of the receptor, namely its arracture, interaction with partner proteins, affinity for its ligand(s) and downstream signaling have to be considered [171]. Protein altering mutations affecting several GPCRs as well as G protein subunits. have been reported in a mudy of 441 breast, hing, ovarian, panerottic, prostate cell types and subtypes [172]. Targeting the finely tuned-GPCR dependent signaling with biased agonists or antagonists or allosteric effectors [173] selected to act on the identified deregalated pathways opens new avenues for more efficient and personalized multi-target oriented chemothemptes. Gening deeper insight into turnor pathophysiology, identifying cancer subtypes and developing system frielogy approaches to simulate cell intra- and intercellular communication networks will pave the route for disputive innovation in openings. The present descriptive presentation of GPCRs exhibiting specific expression changes in GCSs is a first step that calls for future studies at the functional level in order to decipher the precise role of these receptors in sustaining the cancernus phenotype.

Materials and Methods

Ethics statement

The himmedical research was conducted according to the declaration of Helsinai, to the French laws and was approved by the institutional review board of Ste Anne Hospital, Paris. Patients have given written informed consent. Isolation and characterization of neural term cells from human field brain at embryonic day 50–55. (Carnegie stage 19–22) were performed under ethical approval from the University Paris Descartes internal review hourd using tissue donated with written informed consent after elective termination of pregnancy.

Cell Cultures

"Buients' derived cells were isolated from surgical reservions of juman primary GBMs provided by the Neurosurgery department. of Sainte Anne Hospital in Paris, Patients' number were diagnosed as GBMs according to the World Health Organization (WHO) classification system [174] and as malignant glio-neuronal tumor cells according to the Sainte Anor's classification and grading system [175]. Malignum glip-neuronal numor cells (TG) and OD) cells, with stom cell properties were isolated from those biopoles as described in [27]. Their characterization was previously reported [27,176] TP57 and ID117 were not mutated in these cells and SHIII and NOTCH pathways some active. TGI and OBI cells were able to differentiate and to induce tumors when orthotopically gratted (<500 cells) in immune compromised mice. Cells were expanded in Dulbecco's modified Eagle's: 1-12 medium (1-0) supplemented with N2, G5 (containing bFGF and EGF) and B27 (all from Invitrogen, France) at a density of 3.10⁴ cells/em². Human fetal unural stem cells T-NSCs/NSC XXIV) were derived from human fetal brain and characterized as previously described [177]. Odla were cultured in "Neurocult"® NSC Proliferation Medium supplemented with basic fibroblast growth factor (10 ng/ inl, bFGF, Peprotech, Rocky Hill, NJ, and with epideranal growth factor (20 ng/ml. EGF, Peprotech, Rocky Hill, NJ). Under the culture conditions used. TG1, OB1 and f-NSC cells grew as neurospheres. For cell expansion, once a week, neurospheres were merhanically dissociated into a single cell suspension and 90% of their miture medium was renewed. Human Astronyte primary neils (HA cells, ScienGell Research Laboratories) were expanded in Astrocyte Mediara [ScienCell Research Laboratories] according to the manufacturer's histractions. Human brain tumor cells U-87 MG (American Type Culture Collection, ATCC) were expanded in ATCC complete growth mediam according to the manufacturer's instructions. For all cell lines, Master Cell Banks were established and Working Cell Banks were derived from these Master Cell Banks for Earther experiments.

G-protein-coupled receptor transcriptome

Total RNA was isolated from 10° cells of each cell type with FRI Reagent ¹³¹ (Europedex, France) according to the manufacturer's instructions and further purified with RNeasy runi kit columna-(Qiagen), RNA purity was assessed by absorption meetrs analysis using a NataDrop ND-1000 apparatus (Lahrech). Absorption ratics A260/A280 and A260/A230 were comprised between 1.8 and 2.1. RNA integrity and noncentration were checked using an Agilent 2100 Bioanalyzer and the RNA 6000 LabChip kir. Only-RNA with a RNA Integrity Number (RIN) higher than 8.5 was processed (2100 expert astware, Agilent Technologies). 10 ug of total RNA were revente transmitted to single-stranded cDNA using the High Capacity cDNA Revense Transcription at Applied Rosystems). Real-time PCR analysis was performed using TaqMan⁶ Low Density Arrays (Applied Biosystems). TanMan⁶ GPCR Gene Expression Arrays correspond to quantitative PCR. /Q-PCR) assays sported onto a 394-well card, cDNA (850 ng) was carefully mixed with 850 µL of TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Bosystemis), Real-time &T PCR was performed using an ABI Prism 7900H11' apparants (Applied Biosystems, Foner City, CA: Thermal cycling was carried out for 2 min at 50°C to activate tracil-DNA giventylase, 10 min at 96.5°C (activation) and 40 cycles of 50 a at 97 C and 60 a at 59.7 C. Fachreaction well contained cDNA derived from about 1.5 ng of total RNA. Experiments seve performed in triplicates for ENSCs and duplicates for the four other cell types.

Cell membrane preparation, protein extraction and separation

Cells grown as neurospheres were disactored, washed in PBS and suspended in huffer A consisting of 10 mM Hepes order pH 7.1, 2 mM EDTA and protease inhibitors (complete proteases inhibitors cocktail from Rocke). Cells were mechanically based by pipeting the solution up and down with a PDD0 pipeter and pressing the solution through a 22G ascells mounted on a syringe several times (~1.5) and 90% of the cells were lysed. Cell debuis were removed by a 10 min centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected and centrifugation at 1560 g. The supermatant was collected at the cells were spin the supernet of the piper superspin the supermatant of 100 mM Tris pH % buffer for 2 min, protein samples were standed on 110 SOS PAGE, gradient gel (§ 15%). Gela were valued at 20°T prior to rough spectrometry analysis.

Mass spectrometry proteomic analysis

In get digestion of get alices was performed as previously described [178]. The resulting peptide extracts were analysed by C18 reversed phase nanoHPLC on a nanoHPLC Chip/MS system (Agilem Fechnologies, Palo Alro, USA) coupled to an ion map amaZon Braker Daltonics, Beernen, Germany, mass spectrometer Peptide mixtures were loaded on a 40 m enrichment column and separated on a 75 µm x150 mm column packed with Zontox 2008B C18 5 µm material (Agilent Fechnologies, Palo Alto, USA). Trapping was performed during 5 min, at 3.75 pL/ min, with solvent A [98% H₂O, 2% ACN and 0.1% FA). Elution was performed using two solvents, A [98% H2O, 2% ACN and 0.1% FA] and B [98% ACN, 2% H2O and 0.1% FA] at a flow tate of 300 nL/min, using a 2-24% B gradient over 45 min and a 24-40% B gradient over 16 min, inflowed by 70% B over 5 min.

For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The 8 most abundant peptides, preferably doubly and triply charged some were selected on each MS spectrum for further isolation and CID insumentation. Then, selected ions were excluded during 0.6 min. The MS/MS scanning was performed in the altraican resolution mode at a scan rate of 32 300 m/z per second. The complete system was fully opatrolled by Hystar 3.2 (Braker Daltonics).

Proteomic Data Analysis

Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were processed and converted into *.mgf peak list format with DataAtawas 4.0 [Bruker Dahnmics]. MS/MS data were interpreted using two search enginew Mascot (version 2.3.02, Matrix Science, London, UK) installed on a local server and OMSSA (Open Mass Spectrometry Search Algorithm version 2.1.9, [179]; interfaced for grid computing on an in-house developed and finely available software suite thttps:// mada.unintra.lt). Searchus were performed against a composite targetdecoy UniProtKB-SwissProt human entries (Tax11) = 9608, 10 fuly 2012, 42500 total entries). Searches were performed with a talerance on mass measurement of 0.2 Da for precursor and 0.3 Da for imgment ions. Carbamidomethylation of cysteine residues, conduction of methionine residues and propionamidation of cysteine residues were searched as variable modifications. Up to one trypsin missed cleavage was allowed. Scallold software (version 3_6_5 Protestere Science, Portland, USA) was used for validation and false positive rate estimation of protein identifications. For each sample and each search engine, peptides were filtered out according to the cutoff set for protein hits with 1 or more peptides and a false positive identification. rate less of than 1%. Further data manipulations were performed with Microsoft Excel. Semi-quantification was performed by peptide and spectral counting.

Supporting Information

Figure S1 Expression of 14 housekeeping genes present on the TaqMan GPCR Array Card (Applied Biosystems). Expression distribution for each housekeeping gene, in the different experiments performed, is given as how plots. Ordinates represent the type threshold (Ci) of the quantitative PCR experiment for each housekeeping gene indicated. The middle line in the boxes corresponds to the median. The end of the wishers corresponds to the lowest and highest values within 1.5 IQR (interquarrile range) of the lower and upper quartile. Outliers are represented by stars, Abbreviations: 18 s, 16 s ribosomal RNA, GAPDH, giveralde avite 3 phraphare dehydrogenase ; POLR2A, DNA dependent RNA polymerose 2A subunit, ACTEB, actin S; PPIA, peprinty/propyl lromerast A: PGK1, phophoglycerat: kinast 1, B2M, \$2-microglobalin; GUSB, glacaronidase B; HPRT1, hypoxanthine phosphonitoryleranderase 1; TBP, TATA-box binding protein, TFRC. transferrin receptor; HMBS, hydroxymethylbilane synthase; IPOS, importin 8; PHGDH, phosphoglycerate dehydrogenase. (DOCX)

Table S1 Gene assays present on the GPCR microarray plates and their expression values in five cell types. 381 different assays are present on the GPCR microarray, allowing the analysis of the expression of 356 GPCRs, 14 different house keeping genes (rRNA-13 a in in quadruplicate) and 11 other genes (among which two genes of the LANCL family). Expression data are presented in four groups. Group I corresponds to GPCRa expressed with Cit values 12.91.5 (158 genes) in at least one of the five cell types, group II to GPCRs expressed at Cr>31.5 in all five cell types, group III to the housekeeping genes (14 genes) and group IV to eleven genes not related to houndaceping genes or GPCRs. In each group, genes are inted in alphabetical order. Expression values are indicated as cycle threshold values (Ct) and at 25-12 * 10 12 (arbitrary units). The cutoff level was set at Ct ≤31.5 f.r. expression level ≥329 units. For GPCRs which did not show amplification. Gt values were arbitrarily set at 40. XLSX:

References

- 1. Dolocik TA, Propp JM, Stroop NE, Kractiko G (2013) CETHUS national report, primary must and created percent system largery diamouth in the United States in 2005 2009, Neuro Cheval 14 (heppil 5 of 49).
- witcher CB (1996 Re. Rean and other crosses better concern representations and movaley.) Natl Cancer less '15 2000-2001 2
- Supp. 3. Maan WP, ter die Bert MJ, Wefer M, Tidue B, et al. (2008) π. Reductionary the concentrate and achievant respondential for discharges. N End J Mar 182, 207, 606
- 1. Hokinoli M, Generatini SA (29.1) Congressions in the actionate therapy of igt-grade glomas, Chemingst 16-511-255
- Yas AA, Cheng JX, Zhang X, Liu BL (2013) The unational of gliptications in 18 symmute option on efficient Price Till male Cert Rey (Need Remaind 07-284)-202
- in pp R. Hop ME, Mason WP, and den Ben MJ. Turburer MJ, er al. (2002). 1 Effects of individuality with concommant and adjustant emicanhonide cersus milliotherapy about or stores all all charters as a number and phase III study Symposition of the NORTE-NERCIFIEL Lance Oracl. 0, 499-466.
- L. Bonnet D, Dick JL (1997) Elianam acade mortos: huarmas is organized as a tararchy that originate from a minuter homotoprione of a Mar Med 5 730-237.
- 6 Resa T. Morrace SJ, Ellaria MF, Weisenan H. (201). Stee cola, countr, and contra num toda Nature 114: 105-11.
- 9 Hormaci HD, Nalama I, Lasareff JA, Manamar-Sware M. Goodnerse 109, ra ar (2003) Canceron ages offs can also from peciatric must tanen. And Not Appl. Sci 17 5 A 100 16170-10103
- Sum SK, Chale ED, Tanashi M, Bona VI, Hawane C, et al. (2003) birmification of a cancer new rall \pm hornor basis newsy Cancer Res (3). 110 5258-15828
- 4-Haj M. Wata MS, Brow-Hornwiles A. Monrous SJ. Clarke MF (2003) H. Programy: Renefication of the organic brook conservation Proc Nati Asiati Se L 9 A 100 (1993 (S988
- D. Brieda, P. Dis BW. Clarke MP (2007) Clarers area offic methols and concepts. Annu Rev Mird 50, 267–284.
- 15 O'Bloen GA, Pollett A, Collinger S, Dick (h. 2005) A homize online tenter cell capille of initiating mation growing in instance forest miles, Nature 1451 65-1.6.
- Schutzen 1, Frank Mai (2005) Cancer dess ords and human malayaan 11. webreum Fenrin Gel Meaners Ra () 9-55 Science I March 17 Brick SV Vision & Wangel and XVI and
- 10. 2008 Mentilization of reds intrating human melanotant. Name 451, 345 Sch.
- 111. Herman PC, Hohm M, Herrer F, Asim A, Elward JW, n at (2007) Diama papelerons of construction of a determine tensor gravity and meterality activity in homon paremark concern Call Stren Col (313-323
- 17. Chon J. D. V. Y. 78, McKey RM, Barro DK, et al. (2017) A reservated with
- republican rearrangens dicibliarente greech after chomotherapy. Nature 10 Drissens G, Beck R, Causse A, Sinney 3D, Biamain C (2012) Defining by
- sight of thematic power in cloud readyres. Noner-Schenere Ad, Support HJ, Storge DF, one due Born M, son Fa JH, et al. 10
- (2).2) Lineage uncarrier forms 12(5); mini-out activity of mouse interaction inferences. Science 537: 730–735.
- 29 Janua SY, Schutten T, Lunia ME1 (2010) The merupertur promise of the mon ann oil connut J Cin hrost (22/11/90)
- 21 Aison 508, Ian Wit, Ian 535, Netschon Id (2952) Canton non-cette in die and of Lot, Canon Long Arts 39, 569 (598
- Statics 5], Jones RJ, Chur O, June XY (2012) Flatpotent state oil based catery therapy premier and challenges, Sc. Trand Med 6, 127p3125.
- Let U. Durn MJ, Vip 5 (2012) Stem cells in Italia numera development and therapy, newsilo, of the num order Con J Neural Sci 30, 145-158 10.2
- Ndoon LS, filochonnys (35, Van Mer, 10, 2012, filochatoria cancer 11
- non-lite offer replications for pathogenesis and manyors. Conset J 18, 194-06
- Medi R, Ne R (1619) Contration alls and mainteen traditional software dense. Rever Reads The R4 4 (144), 2140.

Acknowledgments

We thank Dr Rend Fryderan (Hopital Autoine Bécline, Clamar), France) and Dr Hurvi' Collipy for provaling letal imain tissurs and the Sainst Arme neuromapory team for providing glichlamma times.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments, JMS CO AVD HC SC JH MCK. Performent the experimental MF JMS MZ St. JD. Analyzed the data: MF JMS MZ SL CC JD JH MCE. Contributed reagetas/materials/ analysis tools. MPJ HC, Writer the paper: JMS SL CC SC JH MCK. Revised the paper critically; HC AVD MPJ HC.

- 25. Terrano L. Remparzo E. Bono G. Vinia G (2013) Glioblanoma ranovr somcells role of the tolenomitronium and therapoutle togeting. Blochem Parmand 65, 612 622
- 27. Pars C. Romao L. Variet P. Goudonnet L. Ropent E. et al. 2010 CD131. CD11/885.A.1, CD21 or ide populations do not resum tamot millaring properties of long-come cultured cancer wars cells from human malignane gline national income 1860; Camera 10, 06,
- Dress J (2008) Drug docurry a Harried property. Science 2017 1965. 10.1
- Hopkins AL, Gomers CR (2007) The druggable genome: Not Rev Drug Discov 01 11 727-130
- Jacoby E., Brazoni B., Greepaccan M., Browni K. 2000. The 7-TM Orpotene compact werplace surger Jacobs. Chem-Med/Chem 1: 761-702. THE.
- Gadard SL (2003) Are GPCR, 558 a Searce of New Targen? J Bound 34. **Beller**
- 32. Tappaner B.: Magginizzi N (2011) 17 princip-scapited receptore neuroi nargen for ogt theoremy in contour. Nat Res Drug Discov 10: 47-40.
- 95. Henr 198, 1912) Personial use of G protein-coupled receptor-thocking numbered authorities as demonstrate agrees for concerts, but Rev CoT Mel-Box 207, 45-101
- 11. Durum RT, Guikine JS 2007 Geneticity-musical receptors and cancer Na-Ber Camer 7: 79-94
- 31. Audiator Y. Piczell J.X. Chines-Annano C. Mari B 2013 G Protein-Goupled Beception in GLORT botchemical intreactions and thig design. Frog Mol Biol Trinsl Sci 11th 143-178.
- 91. Featur MS 49178 Hannesona the genome by characterization of GPGRs in canner pathogenesis, PESS J. Astrone M. Lin R. Jineg X. He K. Wareg J. et al. (2013) 125. Food and Trong
- 85. Administration approval: canodegit for economic locally advanced or recursarily hand off environment file Contact Res 19 (2020) 2000.
 Widd DR, Handel TM, Kreis-Rammel A, Savera RC (2010) Opportunities.
- for functional advectation in OPCR antibotion. Biochem Phantiacol 03, 147
- 31 Vaniframpele J. Dr. Frence K, Parys F, Pappe R, Van Roy N, et al. (2000) Accurate annihilation of real time quantitative B.T PCR time by genuetra averaging of analogic internal powers genera field 2: RE-SEARCHOD4
- 10. Valente Y, Linnara SR, Neder L, Chanana OK, Obe Shinjo SN, et al. (2010) Schwiese of soundate topic forging group for experision analysis in globlocom-ming quantizative XT PCA. Dote Mol Back (0: 17). • Markell [] (2004) Generation, or, and exhibition of economous location.
- anniodes, Methods Mcl. Birl 209, 57 65.
- 42. Jouan M., Swiger PM, Simpon W. (2000) Ten commercial antibodics for aph- -- un tergie recepter elegres as: conspecific. Notice Schedulierge Arch Phannacol 178-109-112.
- Boda'S, Arrigei N. Sports F. Sigsle 5 (2009) Resuld via he continue on discourof territorially conlable methodics to disjumine reception? Names Sciencedebrigs Arch Chermonol 375: 111-115.
- 44 Harobes X can der Velden J 2000 Lack of marillers of antibacture diversal against human brassetwaregie surgeon. Names Schmidtlang: Arch. Phannacol 378, 465, 407,
- 45 Benfilmetrop W. Seiller J. Labrigen WT, Daldmanda SF, Michel MC, 11 at 2000 Each of specificity of commercially available annurs agains mentarbieren und arbenergin versporte. Nampen Schmiersberge Arch Pharmond 375-397-470.
- 45 Reservanto S. Seifer R. National D (2017) Communitally available antibodies analist framm and matter heliculter (EE) everyon hole specificity. Summa Scientificity, Arct. Planmard 552: 125-135
- Ann G. Forder W. Lang S. Lebrann I. Helder NF, et al. (1997) (2007) w cetificrentiation market in human liquidid cardinanus. Camera Res 57, 1798-170.00
- SE. Chelaschaum A. Filmore HL, Van Metter TL, Damas CL, Broaddas WC (2012) Novel report of experision and Leavien of CD97 in malianing glicumconclusion with Wilms some 1 expression and glions call manyorium J Nonmairy 116: 843-853

- Want Y, Laar K, Yin JJ, Heger CD, Baffrid M, et al. (2013) LPA receptor benerodimentary with CD07 for empiric LPA-initianal RHV-dependensizating and analysis in prototy samety cells. Control Res 72: 235–231.
 Want Y, Lake B, Marco W, Killer R, Stelema P, et al. (2013) CD57 amplifies
- (a) Ward Y, Lake B, Marce PL, Killine R, Salerna P, et al. (2013) CD97 amplifies UPA systeme signaling and promously dryphil mover programming in a momemulal Ouropeur 22, 2720–2730.
- Solans M, Clack AJ, Oh MC, Jons ME, Blant O, et al. (2017) Overcopersons of CDW modes in hyperbolic physics in globblocome of h and is associated with decreased analysis of globblocome payment. PLoS One 0: 667765.
- with decrement strategy of global series particular. PLoS One 0: 065705.
 Lin D. Tegeneookiz B. Radensok V. F. T. Hummin K. et al. (2010) Rise of CE05 isoforms in gammin communication of Occod 36: 1001–1006.
- Scaddiffian B. Lorenze G. Nagawampe U. Networ A. Kuto J. et al. (2004) OP320 a a OPCR that is occurrency word in globins and functions in nance coll adjustom. Discogram 34, 1075–1082.
- Xu, J., Began S. Hears [D], Hours RO (2006) GPR56, an argumal G processsimpled mergine bands dot a mange manifastr. TER, and Exclusion metanomic tumor growth and metanomy. Proc Nucl Acad. 5(4): 5 A 103 (9:23) 0020.
- 35 Xu L, Began S, Barry M, Crowity D, Yang L, et al. (2010) GPR16 plays entrying roles in endogenous cancer progression. Clin Exp Measures 17: 241– 269
- Yang L. Cam G. Mohamm S. Scor, G. Fanal F. et al. (2011) 679056 Regulation VEOP perchasion and appropriets during melanatra programm. Current Rev. 21, 5530–5560
- 57 Luc B, Joong SJ, Jin Z, Senson X, Li B, et al. (2011) G processempled compose 56 and collarges Ed. a recenter-ligant part, regulates control scyllopment and limitation. Inter Natl Acad Soci U-15, 101 (1996) 2220.
- Dewikik AV, Fastersky MC, Li L, Pheed J, Kawikher, HI, et al. (2004) From an anti-policies to principalities while in of correlapping process programs. *Roc.* Nat. Acad. Sci. U. S A 99, 7934–7949.
- Bui Y, Du L, Shen L. Zhang Y, Zhang L (2009) 039830 in rag/or approach in mount approveds one downround during efficientiation. Neurosciplet 20: 1310-029.
- Gardi SM, Van Meir EG (2017) Energing roles for the BAD provin bunity in the regulation of physicsness, symptopessis, communications, and theory constrainment, J Mot Med (Berl) 05, 253–252.
- Raor & Brat DJ Calaba CC. Van Mirir EG (2003) Beam angingenesis additional 1 is differentially expressed in montal local and discharges independently of \$25 exercision. Art. J Partiel 150: 10–97.
- Karaj X, Xiao X, Haruta M, Bai Y, Niskataki Y, et al. (2007) Annuaregeneranney of SAD is visu implications for gene therapy of Science glidblast mas-Canon. Gene Thur, 13: 105–202.
- Gardi SM, Karr R. Dez, NS: Compar L. Saltz JH, et al. (2012) A presentation convertient 2050? H. geometrys: case of reference a cover 40 kDs vession taking from humor metarcose. RAch. Operagene.
- 64 Usajina D, Xude G, Yokon H (2017) Durin petidi multiprintia addente 2 (2022) may be actioned by generative processing J Recept Speed Transition Res Sci 143-153
- Kay HJ, A.= KV, Cher KC, Wen Sung J. Han T, et al. (2004) Expression of transmission and any approach sub-State 1 (2013) in neuroscillators and implementation for 6045 an address indicate State anglogenesis and many any phone. J 1205 Log 1007 307, 115.
- 65 Garca Lapace MT, Occurrer Rompure M, Hermer R (2019) Throaton antword memory providing strain for carear disrept? Cart Med Chem. 71: 63–158.
- 61 Bao SP, Proven J 2010, Sepression of processors and emptor —4 (252, 1-3) in human cancer. J Mix Hans 61, 99-95.
- 66 Artini P. Carves R7), Rossi A. Jalense GJ. Torpi J. (2006). Premium manufacture of 1220-8. arXiv:10.0007101303 for another mediated symptom U genuites From concurrence Linearum, Changene 27, 0314–0510.
- Gender F. Ven V, Thormann S. Suffer V. Gerlach R. and (2010) head-line of mean harm/protecte activated receptor 2 signaling limits proceedings, expension and meaning of minimum glowin cells. *Neuroscience* (65): 512– 829.
- 70 Dominant S. Center, F. Christi, PN, Gerach R. Minifordin, M, et al. (20, 0) The recomprising and pre-invariant role of the press-spring time fields in magnetic gluona. Coll Add. May 4: 315–322.
- 71 Magnas N. Gurrari D. Bak J. (2016) Grasspein epiderstal growth fourreceptor to remain multiply elements of the same factor spinning and with intensor giometric. Bised 116: 313–306.
- 72 Zight M, Karden T, Bruntley MG, Villarer G, Dar Lii M (2011) 2008 1 and formulant the disk that block the manufactured to inclusion computer Change Res 31, 6561–6566
- 75 Brickins MJ, Martalewićy D, Hill J, Caher AR, Midhawi AB, et al. (2000). Molecular doming and characterization of 669 novel resinces and incurtibuorgana C protect complex receptors (DPROSD and GPRCSC). Uncomics 67, 8–10.
- 71 Branner Oshmure H. Keiseprare Larsen F. 2003 Securities and expression sciences of a scient bound orginal Copyrighted and security CPRCOR in annual Security with a start space in much security Constraints, 129–140.
- Junio Conceptor with a cost analystemmini communic Generalizeds (2): 128–128
 Harsch V, Values C, Harses R, Strande DC, He N (2007) Periodic activation of a position receptory and to disability receptory and metrics are more relevant construction. When equality, Biachera Baptico Res Commun 339: 168–175.

and the second second

GPCRs and GBM Cancer Stem-Like Cells

- Th. Gant HE, Chan GP, Lev L, Ottima J, Martor GM, et al. 2010; A flashing grav problem leads to the discovery of a Genelly splits variant productivativity expressed in C50/R09[] mouth brain and in maturing meanure. PLoS One in e19241.
- Ulvi T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Bargese RW, et al. (1999) Elamingia a invest-pair manufantumine cadhorin, regulates planat tell polarity under the renural of Ericalusi, Call '99, 505 (195).
- Bouin O, Coffinst AM, Yinir F (2012) Gene i-5 cadherine in POP and brain development, East Tap Dec Bat 101, 381-103.
- Tanti T, Gollinit AM (2000) Expression of planar cell pointing development of the monar \$335. Ear J Secaraci 22: 997–002.
- 00 Tome F, Qe Y, Minestroupard M, Zhiei L, Kernami K, et al. (2010) Lack of cadriction Centri and Geney measure operational ediogenesis loading or faint hydrocephalus. Nat Neuronal 15, 300–307.
- Sugimura B, Hr XG, Venkarianan A, Anit P, Bui A, m al. (2002) Nascametra: We signaling malacatio beamspoors: som offs in the urbatisti (30) 201–305.
- Wants H, Terraka B, Nakawara S, Iwawaki M, Okamura H (2000) Prizziedla and Celor? function in the negrophicitian in regulate improton of field motor university the developing orthogon hundresis. Development 130: 4747– 4739.
- Basish M (2003) WNT/PUP ignifing pathway and human canon preired Chiral Rep. 10 (1983) 1588.
- 101 Hutag, H., Genth, J., Statey Mana, S., Havennen, L., Bull, N. et al. (2009) Mercura expression of savel and previously described off membrane markets in human terms cancer off lates and names. Clin Gamer Res 13: 1257–1361.
- Tersanici M, Sugin Y, Assizowa F, Okasin Y. Okashimu K, et al. (2011) USACL12/USACR9 signaling to marginan brain sumocy a potential pharmasolutional cosmologies inspire from 1 antise Pathol 20, 407–407.
- Durnanska UM, Krainings RE, Nagengan WR, Tammer-Boacha H, Man G, et al. (2013) A services on CXCR07/CXCI (2 and in successfy no plane so high Eur.J Canaer 49: 219–230
- Direction M, Manuel KY, Stevenson UB, Thompson RC (2009) CXCR4 mechanis the problemation of glubinational progenities with Univers Left 273-205, 412
- 81. Schuler A. Gundher HN, Publics LH, Kemming D, Martens T, et al. (2911) A chalant output of gloma cell lines with neuroschleike properties officies the seconditional physicages of globlacomus and successperates CNCR4 as manapoints target. Gla 29: 390–902.
- B1 Farry M, Tundri L, Vende V, Betregere D, Alexande J, et al. 2011) The well 302 887 channel dissolitably affects addressional and inferences properties of geometanithering eeds through CNCR1 represents and consequent disreguous of the Sittle GLI NANOG persons, Cell Deam Datu. 10, 202 214.
- Oreng L, Huang Z, Zhue W, Wu Q, Dimmili S, et al. (2015) Effoldaments intro cells generate suscillar generates to support ornet hancion and manugrowth. Coll 155: 120–120.
- Rav S, Sengupia R, Ghor LJ, Woman XM, Janison L, et al. 2012 UXCL12 institutes in option interactions between emissibilities and tamor reduction gradieness. PLoS One 2: e20203.
- Li M, Chang G, Lathia JD, Wang L, Pinema HL, et al. (2011) Chemosane receptor GXV 84 signaling mechanics the growth factor induced cell your of softwarving and multiparent muscal progenitor with Gibbs 39: 108–118.
- Ph. Jones KA. Borowsky B. Tamm JA, Ching DA, Durkin MM, et al. (1998) GABAR: morphony function are a functioneric assertibly of the solution GABAR/RFI and GABA/RR2, Nature 395, 674–679.
- 10 White JL, Wite A, Main MJ, Gesen A, Ream NJ, et al. (1999) Neuronismetication is weatherd for the Secondary of a functional GABA/B receptor. Nature 396 679-665.
- W. Kaujurteni, K. Mathachel, H. Schuler, V. Hent J. Freend, W. et al. (1994). GAMAS receipts adrepting another into functional heterophysics, Numer 105, 602–657.
- 36 Billinom, A., Iao AO, Waor A. Wane JH, Dianos CH, et al. (2009) GABA/B protypes hetwoodness compensate localization in human lease. Beam Res Mol Brain Res 77: 111–124.
- Valuman Jr. Adami L. Buran M. Orning K. Chemin S. et al. (2005) Solucillare doublection of VABAB, asymptot human and history-dialogic Biochard J 208 47–58.
- Mauret D. Comp. Jame L. Biock C. River ML, Bouernet L, et al. (2000 Cell method provide protocol interaction analysis sock runs-sendined VRET and maging technologies. application on GPCR eligenterization. Nat Medicale & 161– 307.
- 60 Drang W. T., D. Drang Z. Bedrigter L. Chen TH, et al. (2002) Gamples formation with the Type B gamma-animalianysts and memory affects the supression and squad transformer of the estimational calcium removas weapone Studies with HEX-220 cells and memory J Biol Chem 282, 2020.02043.
- [90] Boyer SS, Chiney SM, Teraconne M, Beyrika Sandire B, Hormas SM, et al. (2009) Dimer microscon of GABAS receptors with MD missionitie receptors induces missionitie apparing. J Neurosci 30 (15708), 15890.
- 10. Fernandin R.N. Elenteri & Abdelhade S. Nasseneweig A. Andama M. et al. (2011) 124 cash: contextum in termine H2AX limits problemation of adult organi same cash. From New York, Sci V. S A 100, 2017 2012.
- (0) Kroppeir AB (200) GARA pair the broke on some offic Net Verman II (132-133)

- 45 Likes M. Nakamasa N. Yaneyama M. Darwa S. Fahamer S. et al. (2000) Multi-larger of oclubar predifferences and differences on damage CABA/R receptors expressed by availler mixed annual progenices cells achieved from feed manual larger. J Col. Physical 2 (6):502–500.
- Das, M. Wals, M. Wardy, Yamanokov A, Fujim T (2000) Functional expression of metalantroph. GASAD assessment in primary rate over of transition from a science, control. Solution Displays 365 Continuum 341: 074–081
- Mante X, Ukowa Y, Mix and J, Xu D, Londa CW (2009) Paperture responsion of CABAS integrate to alwing spithelauti. Am J Repp. Cell Med Bec 39:230 504
- B) Tannen 5, Weismige M, Kandora S, Vanagaos T, Wisande S, et al. (2006) Exercisist, and dochastics of GABArrays system in rat knoc some sprevial coefficient. Having that 24: 1009–1010.
- Zhua Z, Sun H, Li X, Li Y, Zhao S et al. (2010) A local GABArepic scores a functionally expressed in terma. Information take. Biochem Sophys Rev. Generation 30():237–244.
- [60] Jing X. Su L. Zhang Q. Hi G. Zhang Z. et al. 2012 GARAB Receiver Osimples as a Prennial Target for Tunice Theory, J Hotochem Concellent 60 160:220.
- 89 Roberts SS, Mendoust-Torris MC, Jessen K, Franzie GE, Vanas V (2009) GABA receptor expression in beingt and marginan digraid mesons Pathol Open Res 78 60, 400
- 10 Wang T. Huang W. Chen F (2000) Bachelin, a GARAD receiptor agreest relative bound between of balance and generic to stars, and in Vest 1.42 (5), 92–99, 541.
- (1) Tatura M, Itan H, Bato M, Tangren H (1992) Attenuation by the OASA, receptor agrees: bacterio of continuental carritogenesis in sar other syactorycommun. Character 49, 201–205.
- [12] Haman B, Wildon ME, Debatani Tahi L. Thomas P. Judileke We, et al. (2011) GARAS entrypic increasioning is registered by the R2 admin. J Web Chem.
- (15) Carmon NS, Gung X, Lee Q, Thomas A, Ehr Q (2011) R-standard function in James of the original receipton 1978b; and LGR5 in regulate Wor/betaenterin signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 198: 11401–11403.
- [14] die Lins W, Backer N, Lew TV, Kan BK, Li VN, et al. (2014) Ligh boundary associate with West tempton and mechanic R-spectrality signalizing. Nature 470: 1995-207.
- 15 Bitchinsen W (2014) Seen only Orphan overprox find a frozen Names (76) 107–238.
- [19] Sono T. van Zu JH, Support HJ, Stange DJ, Very RG, et al. (2011) Parents with constraint the single for Lgr2 and cells in moment region. Nature 44th 415:4246.
- 117 Support, IQ, Cleves II (2014) Hawing soul and only CM00 Rep 12, 115 92
- [19] Backet A, yan In JH, Kanjun J, Kujah P, yan and Baon M, et al. (2007) Identification of term order to small turners: and order by market grave Light. Nature 469, 2004 (2007).
- [19] Monata RG, Van Leis J, Lebor A, Libert F, Stoalo S, et al. (2010) Last a menined for Franch and difference and matrix space of standard corn only uniden adMRO Rep 12, 158–264.
- [22] Kson S. Materiash M., Maima T., Mehre Y., Kazama J. et al. (2006) Learning in horizon community G process coupled cospeter 4 (LGR). Opt 98 a manual for coupl development in more Nephron Ess. Nephrol. 104, 607–70.
- [21] Danne K, Mahr Y, Sene M, Nassi A, Nichinstei K (2011) forefittunal anotasus of Layt lease to anymose control abspaces and branching marglung-risks in many marginary glands. See East 3: 203–212.
- (22) Wang Z. In C. Li H. Li G. Hon O. et al. 2010 CPR00 Educed by managements conditioned control changes 103-2039 mechanical ECER Engineerics (11:18) Log 504 (Eq. 4562)
- 125. Use Y. Kangawa K. Haramara Y. Xianchi H. Isobe T. et al. 2000. Using disclose of LPRAP reduced by discovery guidation of p27Kiyl industries carefulness of metabolic Gaussy Sci U. 19622 (1965).
- (2) Geo Y, Shan ZY, Wang Li, Zhong HM, Teng WP (2009) initiation effect at doRNA tempting GPRaB on treasing and memorals of human devical curvations, cell has binline At Zhong 20, 105 (107).
- Sola V 2017 Constantial and combined line mapping in manifest accords, and an occurring Can St. 2017 1930.
- (26) Zhanne M, Yung Y, Can P, Lu M, Wang X, et al. (2012) Associations of environment of CNR1 with standay and characterization of make in Chinese sciences. Gene 495, 185–196.
- [25] Varde Z. Sarongu G. Rachiguz Generics-Mera 2M. de Luiss Romas P. Lopis Marine S. et al. (2014) "Sucking graw": a granter metamological probability of the probability of the probability of the PLoS Control (2016) 2014.
- (2) Smith SD, Maxim DW, Friingan XD, Saide G, Oracely RH, et al. (2012) Large confidence gene assertioned and a model genetic risk flavour and democrate targets for Electronyalan. Automa Riscan 91, 591–595.
- 29 Garanesto A. Lorente M. Zan, A. Bazepez C. Contai S. et al. (2009) Lize annour-regulated proving phenolitical control biological and appendix of supervisita Canzer Cell 9, 501–512.
- 39 Solose M. Comunin A. Solomores II, Humanitas-Fuerre S. Lorenz M. et al. (2009) Commissional action against antiphage metalossi will confident antiphage minufactors of FR action in horizon giver a cells. J. Conclineer, U.S. 1859, 4 809.

- Camman E, Marri W, Morlin T, Stella N (2010) The expression level of CB1 and UB4 receptory dimensions then efficient at inducing apoptimic momentumes, PLoS One 5 (4)(2).
- 132 Agado T. Caracedo A. Jakis, B. Vilario G. Militan G. et al. (2007) Canadalizada induce glicera comedia cell differentiation and infiling glocoagenesis. J. Bai Chem. 202: 6054–6002.
- 101. Wu, X. Hao, L. Zhang, X. Li, L. Jiang, G. et al. (2012) Alteration of endocomorbiosic system in Sumar globula, J.Neurochem 120, 842–849.
- 101 Heid-Fronk J. Downs L. Satan G. Mehilaw HM, Menileu B (2006) Claunabineid receptors in hartant artrugial summer. J Neurachem 90: 685–093.
- 10. Scillov M, Scindat S, Seriar J, Vajkocav P, Schapfer G, et al. (200). Performance CB2 reserves expensions in realisticities cells of globilations. In Journal, Berlin Rev Bull '9: 331–337.
- 156 Dr. Jens, ME, Hastaset C, Garlin JM, Balter J, Missine JJ, et al. (2010) Oppoint characteristic annulation (IRI) and CIRI receptor expression in Suman glasman Neurochem Int. 16, 1029–1035.
- Marshall AD, Laganna J, Gruevid GE (2011) FAXI-FOXO1 induces cannatizedd receptor 1 to enhance rell measies and normanis. Cancer Res 71: 7471–7409
- Kimisory J, Bank, B, Mark A, Vargo N, Tovan J, et al. (2012) Revising CH1 Berripuse as Drog Yanges in Human Melanemo. Pathoi Ourol Res.
- 196 Proto ME, Gigmerro P, Di Etnor L, Samoro A, Mafinano AM, et al. (2012). Interaction of surfaceareadriand system and arenid hormones in the current of oche, cancer-onligrowth, J Cell Physics 227, 290–200.
- [40] Shu P. Mikawaw VA (2010) The lamphiline, "oplogreenmatics," scorptore Sdv Exp Meth Biol 706, 19–75.
- Musindrins H. Lehanova WG, Ushkarpov YA. (1990) The hemolicilin family multiply spaced G protein coupled receptors with differential tanas distribution. F208 Lett 445, 549–552.
- 141. Educatio K, Binore MA, Resonanceso V, Ende AR, Chepanny CL et al. (1999) A novel association of experiment dipta-harvenedic memory in a member of the CERL family of Geprantin-coupled computer. J Sol Chem. 374, 2491–2490.
- 141 Dayle SE, Sende NJ, Gener SA, Habiard AD. Davidi DB, et al. (2000) Laterstütte 2 in a morel compensate of the spatiarhal meson-local transition within the arrivariantic conductive arrivariation charges beam. Dec Dys 236: 3214–320.
- 144 Boscard AA, Ko J. Sodher TC (2012) High Alfinity Neurona Bunding to Unit Adhesion Discontinuencedial Riscourse (CBR) (Autophiline) Produces on International Antiencea Complex J Bod Chem 201: 9009–9013.
- 141. Schu, JP, Lubascou, VG, Lundvik, YS, Vynakov N, Hintern PG, et al. (2011) Lanorhiller 1 and its rendergenenis lighted hostochementined form a high-affensiv traineormptic receptor pure with signaling rapidition. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12110.
- 146 O'Bullwan MT, dr Wu J, Sanas JN, Granaleni D, Ora-Hin B, et al. (2017) 1140-1 Positian Art Endogenous Lanophilis Launah and Regular Launantey Synapse Development, Neuron 73–953–910.
- [44] White GR. Vieley JM. Hoghway J (1930) Isolation and characterization of a learner instructory of the interdition grow from a region of 1931 1 implicated in Securi cancer. Charagene 32: 3513–3519.
- 146. Log La Escalute and L Jacanasi H, Sacas S, Méssiano M, et al. (2011) Bioalectoria analysis densities asset protein coding plantine-periodic markets assessed with pullicate evaluation SVD60 summer cell logic RMC Med Generation 4 15.
- 155 Yang G, Qiani S, Wang W, Fu Q, Wu J, et al. (2012) Dynamic equilibrium between current with only and removing current citle in human SW620 and MCR-5 current ord superiorizes. In J Current.
- Omrianty S, Juan A, Comgnani F, Landi S (2013) More targets more performed and more class for moment ph3. One openeds 2: eld.
 Ort Yashe J, Camer 1 (1991) Nexet tengths turn futuration 40 mergines tenange.
- Ort Yale J. Canes 1 (1997) New Heights into Informatic 407 weapon biology. Am J. Parcial 275, 0587–996.
- (6) HD SJ, Gamilla CB, Tamarenan H, Sebware JC, Stockky NP, et al. (1907) International Union of Proceedings. XIII. Chambarine of Internet processes. Proceedings 49: 229–279.
- 151 Maline VA, Baera ZS (2016) Planature to prose and cancer plantmandage Br J Planmand 161: 251–587
- 151 Kalminez M, Konsteink A, Barnices D, Kaupinak D, Bolwa V (2011) Communities an antiperson sharp? Ear J Phase Sci 42: 459–444.
- 151 Zhung Y, Xu M, Li X, Jia J, Fan X, et al. (2013) Canetalane asperates have tannon growth in mice through prospondor of method-denses's asperatio or "in Med Turn-and 54: 74–83.
- Lie K (2019) Hammer type I program assignment as adjurnal dominant in several adjurnal mesory Tile J Ours? Nats. 17, 211–212.
- Devices, Jamesco M (2012) Homonie cycle 2 receptor integration in adjustant craminent for respond competial sincer. Continuite Database Soc Rev 8, CD002054
- 156. Carra G. Marcas G. Medica V. Naera M. Mohamad N. et al. (2006) Horannia: infrats cell prodernario and modulates die expression of Bel 2 Service process via the H7 receptor in human parameter concert only. Automates Res 29, 1111–1150.
- McLateline LM, Ferner NJ, Man MJ, Wier A. Brown J, et al. (1990) RAMPergelate the non-spectrated specificity of the endertance-resonance-linnetworks. Nature 299, 331–339.
- (6) Orbite MR, Ninhurs C, Hagar S, Brox MG, Beitroll R (2001) Administraindite lebbins hypothered death by opergelation of 36(4) in continuous).

- Maximum A, Ver M, Goossen L, Kaur G. Dhen Z, et al. (2002) The efforts of advectoreduction recompression in terrat tumor cells. J Nucl. Concrection 90, 2205–2205.
- 62 Mentina P, Ventanov-Perchr B, Nonne-Mentha L Colm C, Pint F, et al. (2011) Administratile: expression and organized in human dissignments, educed training globactomic cell intermetiphisgets are systems. *Eur. J Cancert* 42: 1027–1715.
- 163 Kastanzii I, Fernander-Moner S, Berongner C, Chines O, Deffine G, et al. (2009) Targeting international line receptors with exercise informy of neuroscing analystics white incore anglegenesis and expressive geowth of humantarities aerografic at more [ANG3.] 20 (494-300).
- [64] Pene NJ, Torodi F, Lan KO. Long JK. Educatio J, et al. (2017) Splittegramm in principlicity agricultury in current Biochem Nuc. Texas 40: 044–100.
- [65] Huang X, Wang Y, Nan X, He S, Xu X, et al. 2019. The role of the ordina of program in exploit symptote 50. [0173227] in multiple marketine rolls. Lond. Res.
- Bion NE, Brandii JB (2009) Grannich between C protein computer receptors and quidering growth factor computer in second Facto Benet 15, 1857–1966.
 Bio R. H., Wege PJ, Walanch C, Chindr A (1999) Role of transactivation of the
- 67 Dir, E.H., Wege PU, Warkerh C, Chindi A (1999) Role of transactivation of the ECF receptor in signaling by G-proton-coupled companies. Name 329, 527– 369.
- 60 Deboard N. Berkaert J. Martn P (2007) GPUR partial from a new route to KTK signaling or a new running in GPUR arthratics. Toront Pharmacia Sci 20: 622–662.
- 10 Lappens 2, the Marca P. the Innormal LM. Observes & Boos V. et al. (20.3) Crusterill Invision (2020), and gravely have regarding. J. Semiil Booseen Mol. Ref.
- [79] Y. D. Guni, KI. (2015) The Hipper pathway significant and significant forms Dec 77 (355–37).

- O'Harre M, Vanuer Pinite J, Kaliosov I, Starvali EW, Hamisi TM, et al. (2013) The energing maintanal inclusion of G proteins and G proteins coupled weepton in success No. Rev Cancer 18, 412–424.
- 172. Kan Z. Jaiwai D. Shimm J. Januariannan V. Bhat D. et al. (2019) Decrease scenaric magnitum patients and pathogy directions in January Nature 102, 003–013.
- [71] Woorny D. Christopolite A, Sterrer PM (2013) Entering providgen in GPCB allowery: highlications for drug diametery. Nat Rev Diag Diameter 12, 630–646.
- 174 Lota DN, Ohgait H, Wienier OD, Currens WK, Barger PC, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tummars of the strainal network system. Acta Neuropathal 11(): 47–109.
- Varier P, Scot D, Mirjoel C, Boux FX, Menter JF, et al. (2004) New tratance of multiplatin glucer-second transition a characteristical study of 40 rates. Neuroscoppy 52: 1207–1205. diamatics, 1391–1102.
- Galaz-Moya EM, La Guerzo A, Linux Fernandes E, Thurans C, Dovser J, et al. (2014) Secreted former from bran endocted at collemannian glubinosome meslike self regaring on dataget die in DOR pathway. EMBO: Rep. 12, 470–476.
- 192 Tritum C. Benever B. Varlet P. Pager B. Gattanena J. et al. (2014). Clinical relevance of nature cells with neurSile properties in pediante brain ramon. PLoS One 6: p10575.
- 128. Migues L, Bechaile G, Forursker L, Zizk E, Folken C, et al. (2009) Programma analysis. of multiplicit B-cell derivert microparticles. reveals. CD140 as a parentially asche acogenic biomarker für maeille cell lymphoma diagnosis. J Processes Res & 3546–3354.
- 176 Theory V, Markoy MP, Keardon JA, Wagner L, No M, et al. (2000) Open-mangenerations association. J Processor Rev 5: 200–564.
- 101 Li C, Wong WH (2011) Model based analysis of ulgenucleoscie arrays expression index correspondence of under detection. Proc Natl Acad Sci USA, 50: 51–56.

8.2. Annexe II Articles en cours de rédaction

8.2.1. Annexe II.1

Bisacodyl and its cytotoxic activity on glioblastoma stem-like cells in vivo and in vitro in a tumor-like microenvironment.

Jihu Dong^a, Suzana Assad-Kahn^b, et al.

^aLaboratoire d'Excellence Medalis, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg / CNRS, UMR7200, Faculté de Pharmacie, 74, route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France;

^bInstitute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford, CA 94305

^cNeuroscience Paris Seine, Institut de Biologie Paris Seine, Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR8246, Inserm U1130, UMCR18, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France,

Corresponding author's contact information:

Marie-Claude Kilhoffer

Laboratoire d'Innovation Thérapeutique Université de Strasbourg, CNRS UMR7200 Laboratoire d'Excellence Medalis Faculté de Pharmacie 74, Route du Rhin BP 60024 67401 ILLKIRCH Cedex France 33 (0)3 68 85 42 65 mckilhoffer@unistra.fr

Keywords: Glioblastoma, spheroid, 3D cell cultures, tumorospheres, bisacodyl, cancer stem-like cells, tumor acidity, tumor microenvironment.

Abstract

Tumors in general and glioblastoma in particular are difficult to treat due to heterogeneity at the cellular level, particularities of the microenvironment as well as metabolic specificities and plasticity of the cancer cells. Identification within tumors of cancer stem like cells endowed with stem properties and able to propagate the tumor *in vivo* in animal xenografts has opened a new paradigm in cancer therapy. Indeed to increase efficacy and avoid tumor recurrence, therapies need to target not only the cells of the tumor mass, but also the cancer stem-like cells. These therapies also need to be effective on cells present in the hypoxic, slightly acidic microenvironment found within tumors. Such a microenvironment is known to favor more aggressive undifferentiated phenotypes and a slow-growing "quiescent state" that preserves the cells from chemotherapeutic agents, which mostly target proliferating cells. Based on these considerations, we performed a differential screening of an approved drugs chemical library on both proliferative and quiescent glioblastoma stem-like cells. This led to the identification of the stimulatory laxative molecule, bisacodyl, as the only molecule with cytotoxicity on GSCs grown under quiescence inducing conditions. We further showed that in the culture medium bisacodyl is cleaved into DDPM (4,4'-(dihydroxy-diphenyl)-(2-pyridyl) methane or deacetyl bisacodyl), its known active deacetylated metabolite. DDPM induced cytotoxicity on GSCs isolated from tumors of four different patients with EC50 in the micromolar range (0.5-1 μ M). In the present study, we perform further characterization of bisacdyl activity on GSCs and show its activity both in vitro on large clonal tumorospheres which recapitulate several aspects of tumors and in vivo in orthotopic GMB mouse model.
8.2.2. Annexe II.2

Proteomic cell surface immunophenotyping of Glioblastoma Cancer Stem-like cells reveals CD205 and CD109 as differential biomarker.

Lennon S.^{1*}, Saliou J.-M.^{1*§}, Dong J.^{2*}, Audran E.², Zeniou M.², Carapito C.¹, Van Dorsselaer A.¹, Ronald Rook⁴, Nathalie Accart⁵, Junier M.-P.³, Kilhoffer M.-C.², Chneiweiss H.³, Haiech J.², Cianférani S.¹

¹ Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg/CNRS, UMR7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

² Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg / CNRS, UMR 7200, LABEX Medalis, Faculté de Pharmacie, 74, route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France;

³ Neuroscience Paris Seine – IBPS, CNRS UMR 8246/ Inserm U1130/ UPMC, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France.

⁴ ElsaLys Biotech, 400 Blvd Gonthier d'Andernach, 67405 Illkirch Graffenstaden, France

⁵NOVARTIS Institutes for biomedical research global imaging group, Postfach, CH-4002 Basel, Switzerland.

* These authors have equally contributed to the work.

§ present address : Plateforme de Protéomique et Peptides Modifiés (P3M), Institut Pasteur de Lille, CNRS, Université Lille Nord, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France.

Corresponding authors :

Dr Sarah Cianférani, phone: +33 (0)3 68 85 26 79, fax: +33 (0)3 68 85 27 81, e-mail: sarah.cianferani@unistra.fr

Prof. Jacques Haiech, phone: +33 (0)3 68 85 42 70, fax +33 (0)3 68 85 42 10 e-mail: <u>haiech@unistra.fr</u>

Abstract

Glioblastomas are among the most common and aggressive form of gliomas in

adults. Once detected, the prognostic is poor due to lack of efficient treatment. Recently, cancer stem-like cells were suspected to be the cells fueling the tumors and sustaining their recurrence. They are therefore considered as attractive targets for new and more efficient cancer therapies.

We present here a study comparing the proteome of glioblastoma stem-like cells TG1, OB1, TG10B and TG16 isolated from four patients to those of human astrocytes, U87-MG glioblastoma cell lines and human fetal neural stem cells considered as standards. Using nanoLC-MS/MS, we were able to identify more than 7000 proteins, amongst them circa 1500 membrane proteins and 117 clusters of differentiation. Quantification based on spectral counting and biological relevance study allowed us to highlight 29 clusters of differentiation. Among those, we were able to validate the expression of 12 markers using immunohistochemistry.



Jihu DONG



Physiopathologie de cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes primitifs et évaluation pré-clinique de molécules « tête de série » par une approche de biologie et de chimie médicinale

Résumé

Les glioblastomes sont des tumeurs primaires du cerveau les plus malignes. L'identification des cellules souches cancéreuses de glioblastome (CSGs) a transformé notre vision globale des glioblastomes en révélant une hiérarchie cellulaire au sein de ces tumeurs. Les CSGs sont douées de propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation et peuvent entrer en quiescence. Elles sont considérées comme les cellules entretenant les tumeurs, responsables de leur dissémination et des rechutes après traitement. La découverte des CSGs a conduit à un changement de paradigme dans le développement des thérapies anticancéreuses, avec la nécessité de cibler dans le traitement non seulement les cellules de la masse tumorale, mais aussi les CSGs. Un criblage différentiel de la chimiothèque Prestwick réalisé au laboratoire a permis d'identifier le bisacodyl comme une molécule présentant une cytotoxicité spécifique sur les CSGs en quiescence.

Cette thèse présente un travail sur la caractérisation des CSGs, la compréhension du mode d'action du bisacodyl, ainsi que l'évaluation de son potentiel thérapeutique sur un modèle 3D *in intro* et des modèles *in vivo*.

Mot clés : Glioblastome, Cellule Souche Cancéreuse, Bisacodyl, Microenvironnement Tumoral, Acidité Tumorale, Quiescence, Hypoxie, tumorosphères, sphéroides.

Summary

Glioblastomas are the most malignant primary brain tumors. The identification of glioblastoma stem cells (GSCs) has transformed our comprehension of those tumors by revealing a hierarchical organization. GSCs can self-renew, differentiate and enter into a quiescent state. They are considered as cells which fuel and as the main culprits of tumor relapse. The discovery of GSCs triggered a change in paradigm for cancer therapy. Indeed to gain in efficacy, therapies need to target, not only the cells forming the bulk of the tumor, but also GSCs particularly resistant and endowed with a high tumorigenic potential. Chemical screening of the Prestwick chemical library in our laboratory, unveiled bisacodyl with a specific activity on quiescent GSCs.

This thesis presents work on the characterization of GSCs, study of the mode of action of bisacodyl on GSCs, as well as a preclinical evaluation of bisacodyl on a 3D model *in vitro* and animal models *in vivo*.

Keywords : Glioblastoma, Cancer Stem Cell, Bisacodyl, Tumor Microenvironment, Tumor Acidity, Quiescence, Hypoxia, tumorospheres, spheroids.