



Rôle de l'activation de STAT3 dans l'agressivité des glioblastomes. : Cancérologie expérimentale.

Zangbewende Guy Ouedraogo

► To cite this version:

Zangbewende Guy Ouedraogo. Rôle de l'activation de STAT3 dans l'agressivité des glioblastomes. : Cancérologie expérimentale.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I; Université Joseph Ki-Zerbo (Ouagadougou, Burkina Faso), 2014. Français. NNT: 2014CLF1MM26 . tel-01546075

HAL Id: tel-01546075

<https://theses.hal.science/tel-01546075>

Submitted on 23 Jun 2017

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
BLAISE PASCAL

2014

UNIVERSITÉ
D'AUVERGNE

UNIVERSITÉ DE
OUAGADOUGOU

N° d'ordre : 26-Doc

**ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

Thèse

En cotutelle internationale

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 Juillet 1984)

Spécialité : Cancérologie Expérimentale

Soutenue le 19 Décembre 2014

Zangbéwendé Guy OUÉDRAOGO

Rôle de l'activation de STAT3 dans l'agressivité des glioblastomes

Pr. Marc BERGER	Codirecteur de thèse - invité
Pr. Philippe BOUGNOUX	Rapporteur
Pr. Olivier CHINOT	Rapporteur - invité
Dr Charlemagne GNOULA	Invité
Pr. Innocent Pierre GUISSOU	Codirecteur de thèse
Pr. Jean-Marc LOBACCARO	Examinateur
Pr. Jacques SIMPORE	Examinateur
Pr. Pierre VERRELLE	Directeur de thèse - invité

Résumé

Les gliomes sont des tumeurs du système nerveux central. Leur plus haut degré de malignité est le glioblastome (GBM), le plus fréquent des cancers du cerveau. Les patients atteints de GBM sont d'abord opérés (si possible) puis traités par la radiothérapie avec témozolamide concomitant et adjuvant. Ce traitement n'est cependant pas curatif, en partie en raison d'une radiorésistance primaire élevée des cellules de GBM. La voie de signalisation JAK/STAT3 (*Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) semble contribuer à la gravité des GBM. STAT3 est une protéine intracellulaire de transduction du signal. Elle est activée par phosphorylation de ses résidus tyrosine 705 (pSTAT3-Y705) et sérine 727 (pSTAT3-S727). L'activation de la tyrosine 705 se produit en aval du signal induit par la liaison de la cytokine interleukine 6 (IL-6) à son complexe récepteur transmembranaire gp130-IL-6R α . Les mécanismes d'activation de la sérine 727 sont moins bien caractérisés. Le rôle de l'activation de STAT3 dans la radiorésistance des GBM a été ici étudié. Une évaluation du niveau basal de pSTAT3-Y705, pSTAT3-S727 et de la radiorésistance intrinsèque a été faite sur un panel de 15 lignées de GBM humain. L'activation de STAT3 dans les lignées cellulaires de gliomes a été évaluée par *western blot* et la radiorésistance par la survie cellulaire à l'irradiation. En plus de la description de l'état basal d'activation de STAT3 dans les lignées cellulaires de gliomes, cette étude a mis en évidence pour la première fois, une corrélation de pSTAT3-S727 avec la radiorésistance intrinsèque des GBM. Une stratégie de blocage pharmacologique de STAT3 nous a permis d'identifier le Gö6976 comme inhibiteur la phosphorylation Y705 de STAT3 dans les cellules de GBM. Celui-ci s'est avéré inhibiter aussi la phosphorylation S727 mais seulement dans les lignées de GBM pSTAT3-Y705 négatives. Le traitement par le Gö6976 ralentit la croissance des cellules de GBM, indépendamment du statut d'activation de STAT3. De façon intéressante, le Gö6976 a montré un pouvoir radiosensibilisant très significatif sur les lignées pSTAT3-Y705 négatives, ce qui est concordant avec la baisse du niveau de pSTAT3-S727. La pertinence de ces résultats est confortée par un marquage immunohistochimique sur des échantillons cliniques de GBM, montrant la présence à des degrés variables de pSTAT3-S727 dans toutes les cellules cancéreuses de tous les patients. En parallèle, une étude *in vitro* des fonctions de pSTAT3-S727 utilisant des dominants positif et négatif est en cours. En somme, nous avons démontré que pSTAT3-S727 participe à la radiorésistance intrinsèque et que pSTAT3-Y705 est un marqueur prédictif négatif de la réponse des cellules de GBM au Gö6976 à la fois comme inhibiteur de pSTAT3-S727 et radiosensibilisant. L'ensemble de nos résultats conforte l'intérêt d'une inhibition spécifique de pSTAT3-S727 pour radiosensibiliser les GBM et ainsi améliorer le traitement des patients.

Abstract

Gliomas are tumors of the central nervous system. The highest degree in glioma malignancy is Glioblastoma (GBM) that is the most frequent of the brain cancers. GBM patients are treated by surgery at first (if it is possible), followed by radiotherapy and concomitant and adjuvant temozolomide. However, this treatment is not curative in part because GBM cells display an outstanding primary radioresistance. The JAK/STAT3 (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3) signaling pathway seems to be involved in the GBM aggressiveness. STAT3 is an intracellular signal transducer protein. It is activated by phosphorylation on its tyrosine 705 (pSTAT3-Y705) and serine 727 (pSTAT3-S727) residues. The tyrosine 705 activation is produced downstream the signal induced by the binding of interleukine-6 (IL-6) cytokine to its gp130-IL-6R α transmembrane receptor complex. The mechanisms of the serine 727 phosphorylation are less characterized. The role of STAT3 activation in the radioresistance of GBM was studied here. Basal levels of pSTAT3-Y705, pSTAT3-S727 and intrinsic radioresistance were evaluated in a panel of 15 GBM cell lines. Activation of STAT3 in the glioma cell lines was assessed by western blotting and radioresistance through cell surviving fraction to irradiation. In addition to the description of the basal activation of STAT3 in the glioma cell lines, this study evidenced, for the first time, a correlation between pSTAT3-S727 and GBM intrinsic radioresistance. Using a pharmacological inhibition strategy, we identified Gö6976 as a chemical blocking Y705 phosphorylation of STAT3 in GBM cells. Gö6976 also inhibited pSTAT3-S727 but only in the pSTAT3-Y705-negative cell lines. Treating GBM cell with Gö6976 slowed their growth regardless of STAT3 activation status. Interestingly, Gö6976 showed a highly significant radiosensitizing effect on pSTAT3-Y705-negative cell lines that was consistent with the down-modulation of pSTAT3-S727. The relevance of these results is strengthened by immunohistochemical assay performed of GBM clinical samples that showed a variable level of pSTAT3-S727 positive staining in all tumor cells of all the patients. Furthermore, we are currently running on an *in vitro* study of the pSTAT3-S727 biological function by the mean of STAT3 dominant positive and dominant negative proteins. In summary, we showed that pSTAT3-S727 is involved in the intrinsic radioresistance and that pSTAT3-Y705 is a negative predicting marker of GBM cell response to Gö6976 as both a pSTAT3-S727 inhibitor and a radiosensitizer. Altogether, our results strengthen the clinical relevance of a specific inhibition of pSTAT3-S727 to radiosensitize GBM and then improve the patient treatment.

Remerciements

Je remercie le Professeur Pierre Verrelle de m'avoir admis dans son équipe pour mon stage de Master II Recherche puis pour cette thèse. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir choisi parmi d'autres candidats, de m'avoir encadré avec science, enthousiasme et sympathie. Je retiens qu'il m'a accompagné à réaliser mon projet en créant progressivement toutes les conditions nécessaires à ma réussite et aussi à mon épanouissement au cours de ces 4 années. Il a été attentif à mes besoins spécifiques au-delà même de ce que je n'osais attendre de mon directeur de thèse. Je lui prie de bien vouloir accepter que je lui dise « merci CHEF ! », même s'il a toujours refusé par humilité d'être appelé ainsi. Je suis honoré d'avoir travaillé avec lui et je reste marqué de sa sympathie et de sa générosité.

Je remercie le Professeur Guissou. Je le remercie doublement de m'avoir encadré au cours de mes études de Médecine et pour cette thèse. J'ai beaucoup bénéficié de son enseignement en Pharmacologie et Pharmacothérapeutique. J'ai bénéficié aussi de ses recommandations lorsque j'initiais mon projet de formation en Physiologie il y a une douzaine d'années. Et quand je l'ai sollicité pour la cotutelle internationale, il a accepté malgré les contraintes (désagréables) que cela comportait. Merci aussi de s'être déplacé pour moi. Merci de cette générosité ! Il reste un exemple parmi les pionniers de la recherche thérapeutique au Burkina Faso.

Je remercie le Professeur Marc Berger, codirecteur de cette thèse. Merci d'avoir accepté de m'accompagner dans ce projet, merci de son estime et de sa sympathie à mon égard. Je m'en veux de n'avoir pas pu faire mieux pour le versant hématologique du sujet initial. Je souhaite quand même que nos efforts soient valorisés un jour. Merci Professeur !

Je remercie les professeurs Philippe Bougnoux et Olivier Chinot d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci Professeurs !

Je remercie le Professeur Jacques Simporé d'avoir accepté d'examiner ce travail. Merci d'avoir trouvé du temps pour moi et d'être venu malgré ses lourdes charges d'enseignement et de recteur d'université. Je lui suis reconnaissant pour la considération qu'il a eue pour moi.

Je remercie le professeur Jean-Marc Lobaccaro. Merci pour l'immense soutien que je bénéficie tant de lui sur les plans scientifique, technique et moral...Il m'a accordé une attention bienveillante depuis mon admission en Master I et il répond toujours présent chaque fois que j'ai besoin d'aide. Sans son appui, plusieurs étapes de mon aventure n'auraient pas été accomplies. Merci pour tout, professeur !

Je remercie le Docteur Charlemagne Gnoula pour son soutien inconditionnel. Merci pour tous les échanges fructueux et tout le partage d'expériences. Merci de sa présence à la soutenance et merci de me guider si sagement !

Je remercie le Professeur Laurent Morel pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils, son investissement physique et intellectuel dans ce travail. Cette thèse s'est en grande partie déroulée sous sa supervision bienveillante et clairvoyante.

Je remercie le Professeur Jean-Louis Kemeny pour son implication dans ce travail au début comme codirecteur, puis dans toutes les analyses immunohistochimiques et la rédaction

Je remercie Emmanuel Chautard pour tout ce qu'il a fait pour moi et tout ce qu'il a partagé avec moi. Il a eu une contribution décisive dans tous mes travaux depuis le Master II ; et ce n'est pas encore fini. Merci de m'avoir accepté et intégré dans ce milieu professionnel. Merci pour les bons moments partagés amicalement au travail et en dehors du travail. Pour lui faire plaisir, je n'oublie pas d'écrire : « merci petit CHEF ! » car un chef, même petit, reste un chef ! Et pour tout couronner, je le rassure qu'il aura son passeport burkinabè et son diamant, même si pour l'instant il n'est pas dit que la pierre sera plus grosse que celle que je donnerai à son épouse Ameline. Merci à tous les deux !

Je remercie Mélanie Barthélémy. Merci d'avoir apporté son génie à ce travail. Sa contribution a été continue depuis son arrivée au labo et décisive pour passer les durs moments. Merci pour toute la sympathie partagée au travail et aussi en dehors du travail, avec elle et son mari. Je n'oublie pas qu'ils méritent aussi chacun un diamant ; c'est promis. Merci Mel et Jeffrey !

Je remercie Dominique Chadeyron par sa sympathie et sa grande contribution à l'organisation de la soutenance. Merci à Dominique, du sacrifice consenti.

Je remercie Véronique Dedieu pour sa contribution à toutes les expériences d'irradiation. Merci de la sympathie et de la disponibilité.

Je remercie Alexandre Machu pour sa contribution technique très importante et pour la bonne ambiance partagée au bureau. Merci aussi pour la complicité ; disons plutôt « solidarité » puisque les causes qui nous mobilisaient étaient nobles !

Merci à Julian Biau pour la collaboration et les échanges. Merci aussi pour sa contribution très importante à mon épanouissement.

Je remercie Dr Michel Lapeyre, chef de service de Radiothérapie, les manipulateurs en radiothérapie, l'ensemble du service de Radiothérapie pour leur contribution au bon déroulement de mes travaux. Merci aussi aux voisins de service : Eric, Bruno, Nicolas et Pascal.

Je remercie la direction du Centre Jean Perrin et tout le personnel de m'avoir accepté pour accomplir ce travail et d'avoir facilité son déroulement. Merci pour les avantages professionnels reçus.

Je remercie les autres membres de l'Equipe CREaT pour les discussions scientifiques et techniques et pour le partage de matériel et de réactifs. Merci au Pr. Jacques Olivier Bay, au Pr. Olivier Tournilhac, au Pr. Andrei Tchirkov, à Patrick Merle, à Richard Veyrat-Masson, à Romain Guieze et à Alexandre Janel.

Je remercie Céline Bourgne pour le travail accompli ensemble. Merci de la sympathie.

Je remercie le Professeur Claude Beaudoin pour sa participation aux discussions scientifiques concernant mon travail ainsi que ses précieux conseils techniques. Merci aussi pour la grande sympathie à mon égard.

Je remercie Angélique DeHaze et Jean-Paul Saru pour leur participation technique et leur contribution à la réussite des manipulations. Merci aussi pour la bonne humeur et la sympathie.

Je remercie le personnel du GReD, ceux avec qui j'ai le plus interagi (Pierre Val pour sa contribution très éclairante à mon comité de thèse, Sylvère Baron, David Volle, Gaëlle Loubeau), et tous les autres que je ne cite pas explicitement et à qui je pense pourtant. Merci à tous de m'avoir bien intégré dans votre magnifique laboratoire. Je garde en mémoire votre sympathie à mon égard.

Je remercie la Ligue Contre le Cancer (Comité du Puy-De-Dôme) pour le financement des travaux

Je remercie le Ministère des enseignements Secondaire et Supérieur du Burkina Faso pour le soutien dont j'ai bénéficié au cours de mon parcours universitaire..

Je remercie l'Université de Ouagadougou et les Universités Clermontoises : l'Université d'Auvergne et l'Université Blaise Pascal.

Je remercie mes collègues doctorants et promotionnaires Rafik Boudra, Coralie Drelon, Marine Baptissart, Coline Goriaux, Heidi Serra, pour les bons moments passés ensemble et pour la bonne collaboration. Je pense que la thèse a beaucoup diminué la fréquence des soirées ; ou peut-être ai-je été moins présent à ces soirées. Il faut qu'on se rattrappe alors!

Je remercie mes amis qui m'ont beaucoup soutenu : Francis Kinda et sa conjointe Célia Julhiard, Rémi Kaboré, Judicaël Compaoré, Aristide Parcouda, Alassane Drabo et son épouse Aïssata, Romaric Méda, Romuald Kinda, Omar Diallo et son épouse Sandrine. Merci pour tout.

Je remercie la communauté Burkinabè vivant à Clermont-Ferrand et ailleurs en France, M. Salif Ouédraogo et Mme Thiombiano Awa en particulier. Merci pour les services que vous m'avez rendus.

Je remercie Jean-Pierre Thevenon dit Naaba pour son soutien inconditionnel et ses précieux conseils pour la vie.

Je remercie ma marraine Chantal Terrisse pour son immense soutien. Merci pour l'amour dont elle m'entoure.

Je remercie ma famille au sens africain du terme : ma famille biologique et les familles alliées, pour l'amour et le soutien matériel. Un merci supplémentaire à Gill et à Gaston de leur présence physique à la soutenance. Un merci supplémentaire à Bernard pour son soutien de grand-frère « complice ». Un merci supplémentaire à ma belle-mère maman Jeannette pour son soutien affectif. Mille mercis à maman Monique pour la vie, l'éducation et les prières adressées à Dieu à mon intention.

Enfin merci à Marie-Christelle pour l'amour et la présence à mes côtés aux bons et difficiles moments. Cette thèse s'achève ; ce n'était qu'un chapitre de notre aventure car nous en ouvrirons bientôt un autre que je souhaite encore plus aisé à rapporter.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique	CHK1 : Checkpoint Kinase 1
ADP : Adenosine DiPhosphate	CHK2 : Checkpoint Kinase 2
AIF : Apoptosis-Inducing Factor	CIC : Capicua transcriptional repressor
ALT : Alternative Lengthening of Telomeres	CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
AP: Apurinique/apyrimidique	CLC : Cardiotrophine-Like Cytokine
Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor-1	CNTF : Ciliary NeuroTrophic Factor
APC : Adenomatous Polyposis Coli	CS : Cowden Syndrome
Ara-C : 1-β-D-arabinofuranosylcytosine	CSB : Cassure Simple Brin
ARN : Acide RiboNucléique	CT-1 : CardioTrophine-1
ATCC: American Type Culture Collection	CtIP : C-terminal binding protein-Interacting Protein
Atg6 : protéine Becline-1	DBD : DiBromoDulcitol
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	Diablo : Direct IAP binding protein with low pI
ATP : Adenosine TriPhosphate	DISC : Death-Inducing Signaling Complex
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related	DNA-PKC : DNA-activated Protein Kinase C
ATRIP : ATR interacting protein	DNase: DéoxyriboNucléAse
AUC : Area Under Curve	DR3 : TNFRSF25, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 25
Bad : BCL2-associated agonist of cell death	EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
Bak : BCL2-antagonist/killer 1	ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementing group 1
BAX : BCL2-Associated X protein	EXO1 : EXOnuclease 1
BBC3 : BCL2 binding component 3	FADD : Fas-Associated Death Domain
CCDC26 : CCDC26 long non-coding RNA	FAMMM : Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome
Bcl-2 : B-cell lymphoma protein 2	FAP : Familial Adenomatous Polyposis
Bcl-XL : BCL2-like 1	FAS : Fas cell surface death receptor
BCNU : BisChloroethyl- Nitroso-Urée	FDA : Food and Drug Administration
BER : Base Excision Repair	FEN1 : Flap structure-specific Endonuclease 1
BHE : Barrière HématoEncéphalique	FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
Bid : BH3 interacting domain death agonist	FGFR1 : Fibroblast Growth Factor Receptor 1
Bik : BCL2-interacting killer	FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor 3
Bim : Bcl-2 interacting mediator of cell death	FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
BIRC1 : NAIP	FOXO : Forkhead bOX protein O
BLM : Bloom syndrome, RecQ helicase-like	GABRA1: Gamma-Aminobutyric acid (GABA) A Receptor, Alpha 1.
BMX : Bone marrow X-linked	FUBP1 : Far-Upstream Binding Protein 1
BRAF : B-raf protein	GBM : Glioblastome
BRCA1 : BReast CAncer 1	G-CIMP : <i>Glioma-CpG Island Methylator Phenotype</i>
BRCA2 : BReast CAncer 2	GEN1 : GEN1 Holliday junction 5' flap endonuclease
BRRS : Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome	GER : Global Excision Repair
Caspase : Aspartic-Acid-specific Cystein Proteases	GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
CCND2 : Cycline D2	gNMF : genomic Nonnegative Matrix Factorisation
CDB : Cassure Double Brin	Gy : Grays
CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase 4	H2AX : H2A histone family, member X
CDK6 : Cyclin-Dependent Kinase 6	HA: hemagglutinin A
CDKN : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor	HIF : Hypoxia Inducible Factor
CDKN1b : Cyclin-Dependent Kinase iNhibitor 1B	HIF1α : Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha
CGH : Comparative Genomic Hybridization	hMLH1 : human mutL Homolog 1
CHI3L1 : CHitinase 3-Like 1	hMSH2 : Human MutS Homolog 2

hMSH6 : Human MutS Homolog 6	OER : Oxygen Enhancement Ratio
hPMS1 : human PostMeiotic Segregation increased 1	OLIG2 : OLigodendrocyte lineaGe transcription factor 2
HR : Homologous Recombination	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
HRK : HaRaKiri, BCL2 interacting protein	OSM : Oncostatine M
hTERT : human TElomerase Reverse Rtranscriptase	p14 ^{arf} : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein	p15 : INK4B
IC50: half maximal inhibitory concentration	p16 : INK4A
ICAD : Inhibitor of Caspase Activated DNase	p18 : INK4C
ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule 1	p27 : CDKN1b
IDH : Isocitrate DéHydrogénase	p53BP1 : p53 Binding Protein 1
IL-6 : InterLeukine-6	PARG : poly (ADP-ribose) glycohydrolase
IL-6R: InterLeukine-6 receptor	PARP1 : poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
INA : InterNexine Alpha	PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
INK4A : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	PCV : ProCarbazine, Iomustine, Vincristine
INK4B : cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor
INK4C : cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	PDGFRA : Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha
IR : irradiation	PE: Plating Efficiency
IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique	PEPVIII : EGFRvIII-specific peptide
JAG1: JAGged 1	PHLDB1 : Pleckstrin Homology-Like Domain, family B, member 1
JAK : JAnus Kinase	PHTS : PTEN Hamartoma Tumor Syndrome
KDa : Kilo Dalton	PI3K : PhosphatidylInositol 3-Kinase
Ku 70: Protéine codée par le gène XRCC6	PIAS : Protein Inhibitors of Activated STAT
Ku 80: Protéine codée par le gène XRCC5	PKC : Proteine Kinase C
LFS : Syndrome de Li-Fraumeni	PKC ϵ : Proteine Kinase C epsilon
LIF : Leukemia Inhibitory Factor	PMAIP1 : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
LMDS : Locally Multiple Damage Site	PMS2 : PostMeiotic Segregation increased 2
Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1	PNET : Primitive Neuroectodermal Tumors
MDM2 : Mouse Double Minute 2	PNKP : PolyNucleotide Kinase 3'-Phosphatase
MDM4 : Mouse Double Minute 4	Pol δ/ϵ : Polymérase δ/ϵ
MDR1 : Multidrug Resistance Protein 1	pSTAT3-S727 : phosphoSTAT3 serine 727
MGMT : O-6-MethylGuanine-DNA MethylTransferase	pSTAT3-Y705 : phosphoSTAT3 tyrosine 705
MIB1 : MIndbomb E3 uBiquitin protein ligase 1	PTEN : Phosphatase and Tensin homolog
MMP9 : Matrix MetalloPoteinase 9	PTPRD: Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type D
MMR : Mismatch Repair	PUMA : BBC3
MRE11 : Meiotic REcombination 11	RB : RetinoBlastoma
MUTYH : MUtY Homolog	RBPJ : Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region
NAIP : NLR family, Apoptosis Inhibitory Protein	RCF: Replication Factor 1
NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome 1	RISC : RNA –Induced Silencing Complex
NEFL : NEuroFiLament, light polypeptide	RMN : Resonance Magnetique Nucléaire
NER : Nucleotide Excision Repair	ROS : Reactive Oxygen Species
NF1 : NeuroFibromatose 1	RPA : Replication Protein A
NF2 : NeuroFibromatose 2	RTEL1 : Regulator of Telomere Elongation heLicase 1
NFkB : Nuclear Factor of kappa B	RTK : Recepteur à activité Tyrosine Kinase
NHEJ : Non-Homolgous End Joining	RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
NHEJ1 : nonhomologous end-joining factor 1	SBLA : Sarcoma, Breast, Leukemia, and Adrenal Gland
NOXA : PMAIP1	SDSA : Synthesis-Dependent Strand Annealing

SEM: Standard Error of the Mean

SLX1/4: endonucléase

SLC12A5 : SoLute Carrier family 12, member 5

SMAC : Second Mitochondria Derived Activator of Caspase

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SOCS : Suppressor of Cytokine Signaling

SOD : SuperOxyde Dismutase

SSA : Single Strand Annealing

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

STB : Sclérose tubéreuse de Bourneville

SYT1 : Synaptotagmin 1

TACC : Transforming Acidic Coiled-Coil

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TCR : Transcription Coupled Repair

TDM : Tomodensitométrie

TEL : Transfert d'Energie Linéique

TEMP : Tomographie d'émission monophotonique

TEP : Tomographie par Emission de Positron

TFIIC : Transcription Factor IIH

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1

TNFRSF25 : Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily, member 25

TP53 : Tumor Protein 53

TSC1 : Tuberous Sclerosis Complex 1

TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex 2

TTF1 : Transcription Termination Factor, RNA polymerase I

UTR : Untranslated Regions

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

WRN : Werner syndrome, RecQ helicase-like

WT: Wild Type

XLF : NHEJ1

XPA : Xeroderma Pigmentosum complementation group A

XPF : Xeroderma Pigmentosum complementation group F

XRCC1 : X-ray Repair Cross Complementing protein 1

XRCC4 : X-ray repair complementing protein 4

YKL40 : CHI3L1

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. LES GLIOMES.....	2
1 <i>Le système nerveux central : histogenèse et aspects histologiques.....</i>	2
2 <i>Histopathologie et classification anatomopathologique des gliomes</i>	4
2.1. Les tumeurs astrocytaires.....	6
2.1.1. Les astrocytomes de grade I	6
2.1.2. Les astrocytomes de grade II	8
2.1.3. Les astrocytomes de grade III ou astrocytomes anaplasiques.....	8
2.1.4. Les astrocytomes de grade IV ou glioblastomes.....	8
2.2. Les oligodendrogiomes	10
2.2.1. Les oligodendrogiomes de grade II	10
2.2.2. Les oligodendrogiomes de grade III ou oligodendrogiomes anaplasiques	10
2.3. Les gliomes mixtes	10
2.4. Les épendymomes	12
3 <i>Altérations (épi)génétiques et profils transcriptomiques dans les gliomes.....</i>	12
3.1. La codélétion 1p/19q dans les oligodendrogiomes	12
3.2. Méthylation du promoteur <i>MGMT</i>	14
3.3. La mutation des gènes <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> dans les gliomes de grade II, grade III et dans les glioblastomes secondaires.....	16
3.4. Les mutations du promoteur <i>TERT</i>	18
3.5. Les altérations de <i>BRAF</i>	18
3.6. Les altérations génétiques dérégulant les voies de signalisation intracellulaires dans les glioblastomes primaires ou <i>de novo</i>	20
3.7. Les sous-types de glioblastomes selon le profil d'expression génique	22
3.7.1. Les GBM de profil classique	22
3.7.2. Les GBM de profil mésenchymateux	22
3.7.3. Les GBM de profil neural	22
3.7.4. Les GBM de profil proneural	24
3.8. Les altérations géniques redondantes dans les sous-groupes de GBM	24
3.9. Les microARNs dans les gliomes	26
3.10. Classification histomoléculaire et biomarqueurs utiles au cliniciens.....	28
4 <i>Epidémiologie et facteurs de risques</i>	28
4.1. Epidémiologie descriptive.....	28
4.2. Facteurs intrinsèques	30
4.2.1. Les prédispositions héréditaires et familiales aux gliomes.....	30
4.2.1.1. Les mutations germinales des gènes <i>MSH2/MLH1/PMS2/MSH6</i>	30
4.2.1.2. Les mutations germinales du gène <i>APC</i>	32
4.2.1.3. Les mutations germinales de <i>CDKN2A</i>	32
4.2.1.4. Les mutations des gènes <i>TSC1/TSC2</i>	34
4.2.1.5. Les mutations germinales de <i>PTEN</i>	34
4.2.1.6. Les mutations germinales de <i>TP53</i> ou de <i>hCHK2</i>	36
4.2.1.7. Les mutations des gènes <i>NF1</i> ou <i>NF2</i>	36
4.2.2. Les polymorphismes alléliques conférant une susceptibilité héréditaire aux tumeurs gliales.....	38
4.2.3. Terrains allergiques / atopiques	40
4.3. Facteurs extrinsèques	40
4.3.1. Alimentation, mode de vie (tabac, ...)	40
4.3.2. Infections	40
4.3.3. Médicaments	40
4.3.4. Toxiques	40
4.3.5. Radiations électromagnétiques	42
4.3.5.1. Les radio-fréquences	42
4.3.5.2. Les radiations ionisantes	42
5 <i>Traitements actuels du glioblastome</i>	46
5.1. La radiothérapie	46
5.2. La chimiothérapie	46
5.3. Biothérapies	48
5.4. Thérapies alternatives	48
II. CIBLER LA RADIORÉSISTANCE : UN ENJEU THÉRAPEUTIQUE DANS LE GLIOBLASTOME	50
1 <i>Généralités sur les radiations ionisantes.....</i>	50
1.1. Les effets primaires de l'irradiation	50

1.2. L'effet radiosensibilisant de l'oxygène	52
2 <i>Les cibles des radiations ionisantes</i>	54
2.1. L'ADN	54
2.1.1. Les dommages d'ADN.....	54
2.1.2. La signalisation des dommages de l'ADN	56
2.1.3. Réparation des dommages de l'ADN.....	58
2.1.4. La réparation des cassures double-brin.....	60
2.1.5. Les inhibiteurs de la réparation des dommages de l'ADN	64
2.2. Lipides et Protéines	66
2.2.1. Altération des lipides et des protéines.....	66
2.2.2. Activation des voies de survie cellulaire ou amplification de l'activité de voies de signalisation initialement actives	66
3 <i>Engagement vers les processus de mort cellulaire radio-induits</i>	68
3.1. La mort cellulaire immédiate	68
3.2. La mort cellulaire par sénescence	68
3.3. La mort cellulaire mitotique et la mort cellulaire différée.....	70
3.4. L'apoptose	70
3.4.1. La voie intrinsèque d'apoptose	72
3.4.1. La voie extrinsèque d'apoptose.....	74
3.4.2. La voie d'apoptose dépendant des céramides	74
3.5. L'autophagie	76
4 <i>Evaluation de la survie clonogénique à l'irradiation et radiosensibilité intrinsèque</i>	78
5 <i>Déterminants de la radiorésistance des glioblastomes</i>	80
5.1. Hypoxie et angiogénèse.....	80
5.2. Cellules souches.....	82
III. LA PROTÉINE STAT3 DANS LES GLIOMES	86
1 <i>La famille des protéines STATs</i>	86
2 <i>Du gène au facteur de transcription STAT3</i>	88
3 <i>Rôle de STAT3 dans le développement</i>	90
REVUE DE LA LITTERATURE EN PREPARATION	92
TRAVAUX PERSONNELS	134
ARTICLE SOUMIS A PUBLICATION	138
TRAVAUX COMPLEMENTAIRES	220
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	226
PUBLICATION ANNEXE	236
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	260

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Architecture histologique du système nerveux central.....	1
Figure 2. Marquage GFAP.....	3
Tableau 1. Classification anatomopathologique des gliomes (OMS 2007)	3
Figure 3. Répartition des tumeurs malignes du SNC selon le type.....	5
Figure 4. Marquage Ki67.	5
Figure 5. Astrocytome pilocytique.....	7
Tableau 2. Grading des astrocytomes diffus.	7
Figure 6. Astrocytomes de grade II.....	9
Figure 7. Glioblastome.	9
Tableau 3. Grading des oligodendrogiomes et des oligo-astrocytomes.....	11
Figure 8. Oligodendrogiome de grade II.....	11
Figure 9. Oligodendrogiome anaplasique.	11
Figure 10. Oligo-astrocytome anaplasique biphasique.	13
Figure 11. Théorie génétique des gliomes.	17
Figure 12. Altérations génétiques fréquentes des trois voies de signalisation intracellulaires importantes dans la gliomagenèse.....	19
Tableau 4. Classification histomoléculaire des gliomes diffus.	21
Figure 13. Biomarqueurs consensuels utiles aux cliniciens	27
Tableau 5. Marqueurs moléculaires d'intérêt clinique dans les gliomes	27
Figure 14. Incidence des glioblastomes selon le sexe et l'âge, en Gironde (France).....	29
Figure 15. Effets primaires de l'irradiation.	49
Figure 16. Dommages de l'ADN radio-induits.....	53
Figure 17. Schéma des cascades de signalisation initiées après endommagement de l'ADN..	55
Figure 18. Systèmes cellulaires de réparation des dommages d'ADN.....	57
Figure 19. Réparation des cassures doule-brin par recombinaison homologue.	61
Figure 20. Réparation des CDB par religation non homologue (NHEJ).	63
Figure 21. Voies intrinsèque et extrinsèque d'apoptose.	71
Figure 22. Courbe de survie clonogénique au rayonnement gamma de cellules humaines irradiées en dose unique.	77
Figure 23. Interconnexion des voies de signalisation STAT3 et HIF dans l'hypoxie.	81
Figure 24. Structure de la protéine STAT3 avec ses domaines fonctionnels.....	85
Tableau 6. Différentes approches de thérapie anticancéreuse ciblant STAT3.....	87
Figure 25. Contrôle d'expression des vecteurs plasmidiques par immunofluorescence.....	223
Figure 26. Contrôle d'expression des vecteurs plasmidiques par western blot.	223

ENONCE DU PROBLEME

Les gliomes sont des cancers du système nerveux central (SNC) touchant les cellules gliales. Lorsqu'ils concernent les astrocytes, on les appelle astrocytomes. Le plus haut degré de malignité des gliomes est le grade IV ou glioblastome multiforme (GBM) selon la classification de l'OMS. Les GBM, représentent 80% des tumeurs malignes primitives du cerveau et sont les plus fréquents et les plus agressifs de ces cancers. Il s'agit de cancers incurables, avec une survie de 15 mois chez des patients sélectionnés malgré un traitement standard bien codifié (Badaoui et al., 2014; Stupp et al., 2005). Ce traitement standard des glioblastomes associe à la chirurgie la radiothérapie avec temozolamide adjuvant et concomitant (Stupp et al., 2005). Malgré un traitement optimal, les récidives sont constantes dans les cas de GBM. Elles ont la particularité de se produire dans le volume irradié et d'être plus résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Chan et al., 2002; Lee et al., 1999; Oh et al., 2011; Yin et al., 2013). Du fait de cette radiochimiorésistance et de lourds effets secondaires, la recherche de thérapie ciblée qui serait plus efficace et/ou mieux tolérée reste un défi concernant les GBM (Yin et al., 2013). Une hétérogénéité biologique caractérisant les GBM complique le choix des cibles thérapeutiques (Patel et al., 2012). Ces tumeurs expriment en effet certains marqueurs biologiques variables d'un patient à l'autre et chez un même patient entre sous-clones tumoraux. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) est une protéine de régulation de signaux intracellulaires identifiée depuis plus d'une décennie comme une cible thérapeutique dans les GBM (Brantley and Benveniste, 2008; Kim et al., 2014). Notre travail se veut être une contribution à l'affinement du ciblage de STAT3 pour radiosensibiliser les glioblastomes et ainsi améliorer le pronostic de cette maladie.

*Introduction
bibliographique*

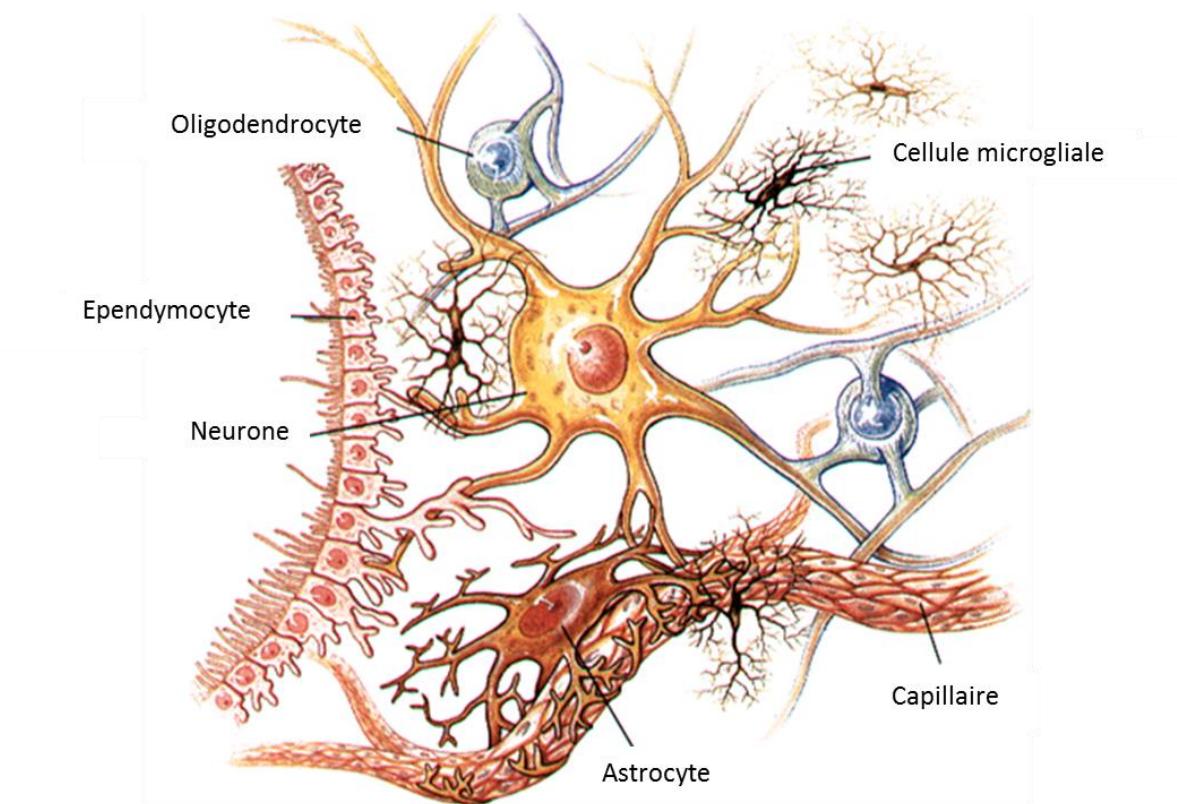


Figure 1. Architecture histologique du système nerveux central.

Le neurone et les cellules de soutien constituent les cellules du tissu nerveux central. Les capillaires constitués de cellules endothéliales font la vascularisation du SNC. Dessins de Pascal Fya.

I. LES GLIOMES

1 Le système nerveux central : histogenèse et aspects histologiques

Le système nerveux central (SNC) ou névraxe est la partie du système nerveux logée dans le crâne et le canal vertébral. Il est formé de l'encéphale (hémisphères cérébraux, tronc cérébral et cervelet) et de la moelle épinière. Il a deux composants histologiques qui sont le tissu fonctionnel fait de neurones et le tissu de soutien. Les neurones peuvent se définir comme des cellules spécialisées faites d'un corps cellulaire ayant des prolongements polarisés appelés axones et dendrites qui assurent la propagation de potentiels d'action et forment des jonctions synaptiques (synapses) avec d'autres neurones, espaces de libération de neurotransmetteurs (Morest and Silver, 2003). Les neurones possèdent des récepteurs aux neurotransmetteurs répartis de façon bien organisée sur le corps cellulaire, les dendrites et les axones. Les cellules de soutien (Figure 1) sont de 4 types : les astrocytes et les oligodentrocytes qui forment une entité histologique appelée neuroglie, ainsi que les épendymocytes et les cellules microgliales. Les cellules de la neuroglie et les cellules microgliales ont un corps cellulaire de morphologie variable, avec des extensions lamellaires ou fibrillaires qui s'insinuent entre les enchevêtements des corps et des prolongements cellulaires (Morest and Silver, 2003). Les épendymocytes quant à eux forment des épithélia simples de types cuboïde à cylindrique, tapissant la paroi des ventricules. Ils ont un appareil ciliaire au pôle apical, et sont reliés entre eux par des complexes de jonctions avec des jonctions serrées au niveau apical. Même si on les appelle cellules de soutien, ces 4 types cellulaires ont des fonctions spécifiques qui leurs sont dévolues :

- les cellules microgliales ont un rôle immunitaire comme cellules présentatrices d'antigènes. Cette fonction immunitaire n'est pas leur seule activité puisqu'il a été démontré que les cellules microgliales participent à la construction du système nerveux et à sa plasticité ainsi qu'au processus mnésique principalement par l'élagage synaptique, processus d'élimination des synapses inutilisées (Salter and Beggs, 2014) ;
- les épendymocytes constituent une interface fonctionnelle entre le parenchyme et le liquide cérébrospinal. Au niveau du plexus choroïde, ils sécrètent le liquide cérébrospinal ;
- les oligodendrocytes synthétisent la myéline et participent ainsi à la conduction nerveuse ;

Introduction bibliographique

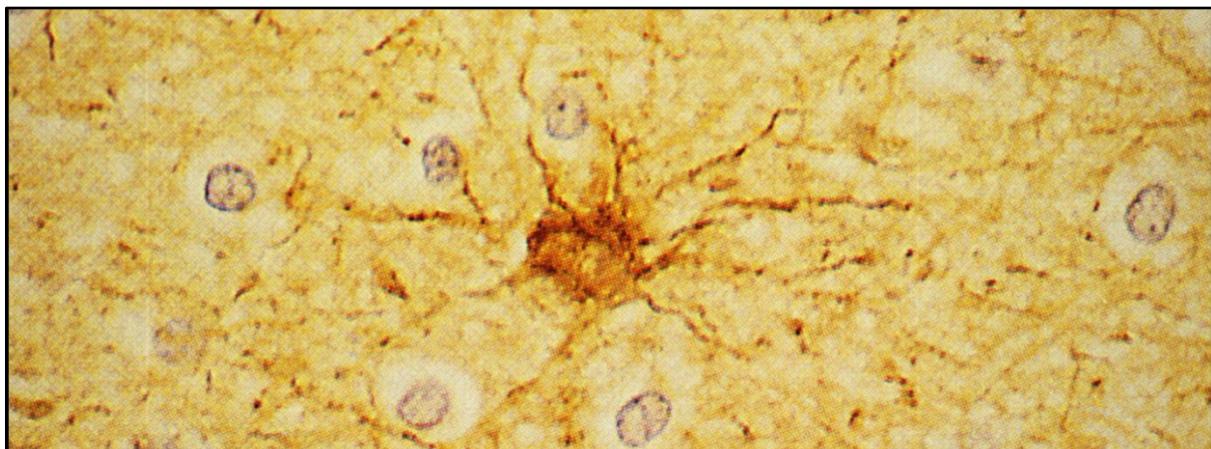


Figure 2. Marquage GFAP.

Le GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) marque le cytoplasme des cellules de lignée astrocytaire. Un astrocyte normal se distingue de la cellule devenue maligne par ses longues dendrites. Les oligodendrocytes non marqués par le GFAP se distinguent par un halo périnucléaire. Source : CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

Tumeurs astrocytaires	I	II	III	IV
Astrocytome subependymal à cellules géantes	•			
Astrocytome pilocytic	•			
Astrocytome Pilomyxoïde		•		
Astrocytome diffus		•		
Xanthoastrocytome pléomorphe		•		
Astrocytome anaplasique			•	
Glioblastome				•
Glioblastome à cellules géantes				•
Gliosarcome				•
Tumeurs oligodendrogliales	I	II	III	IV
Oliodendrogiome		•		
Oliodendrogiome anaplasique			•	
Tumeurs oligoastrocytaires	I	II	III	IV
Oligoastrocytome		•		
Oligoastrocytome anaplasique			•	

Tableau 1. Classification anatomopathologique des gliomes (OMS 2007)
D'après Louis *et al.*, 2007.

- les astrocytes interviennent dans le développement du cerveau et la physiologie de la conduction nerveuse par dépolarisation transitoire de la membrane neuronale et par recapture des neuromédiateurs libérés au niveau des synapses. Il est maintenant établi que les astrocytes et des cellules apparentées à des oligodendrocytes ou leurs précurseurs participent activement à la transmission de l'influx nerveux dans le cerveau comme classiquement décrit pour les neurones. Les astrocytes prennent part aussi aux échanges entre le secteur cellulaire et les secteurs liquidiens sanguin et cérébrospinal en participant à la formation de la barrière-hématoencéphalique et en constituant la couche périphérique d'astrocytes marginaux.

Au plan développemental, ces quatre types de cellules gliales n'ont pas la même origine histologique (Morest and Silver, 2003). Les cellules microgliales proviennent d'une colonisation à partir de la moelle osseuse et sont d'origine mésodermique. Les astrocytes, les épendymocytes et les oligodendrocytes dérivent d'une cellule souche qui est d'origine neuroectodermique. Cette cellule est également le précurseur des neurones.

2 Histopathologie et classification anatomopathologique des gliomes

Les gliomes sont des tumeurs primitives affectant les cellules gliales. Ils représentent environ 30% des tumeurs du SNC et 80% des tumeurs malignes primitives du cerveau (Goodenberger and Jenkins, 2012). La classification de référence (Tableau 1) des gliomes est celle de l'OMS 2007 (Louis et al., 2007). Les gliomes sont distingués selon plusieurs critères anatomopathologiques incluant la morphologie cellulaire et les marqueurs de différentiation exprimés par les cellules tumorales en astrocytomes, oligodendrogiomes et oligoastrocytomes ou gliomes mixtes. Les tumeurs astrocytaires (astrocytomes et glioblastomes, (Figure 3), représentent 75% des gliomes (Ostrom et al., 2013). Deux marqueurs de différentiation, GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) et OLIG2 ont longtemps servi à distinguer les tumeurs gliales avant l'inclusion progressive d'autres marqueurs immunohistochimiques pour leur sous-classification. GFAP est exprimée par les tumeurs astrocytaires ou épendymaires et rarement par les oligodendrogiomes (Figure 2). OLIG2 est un facteur de transcription impliqué dans la différentiation oligodendrocytaire. C'est un marqueur des cellules souches ou progéniteurs et de la lignée oligodendrogliale. Il est spécifique du SNC, est exprimé en grande quantité par tous les gliomes diffus. Il peut être exprimé par les autres gliomes ou tumeurs non gliales mais à des quantités moindres que dans les gliomes diffus (Ligon et al., 2004; Rousseau et al., 2006). Olig2 n'est jamais exprimé par

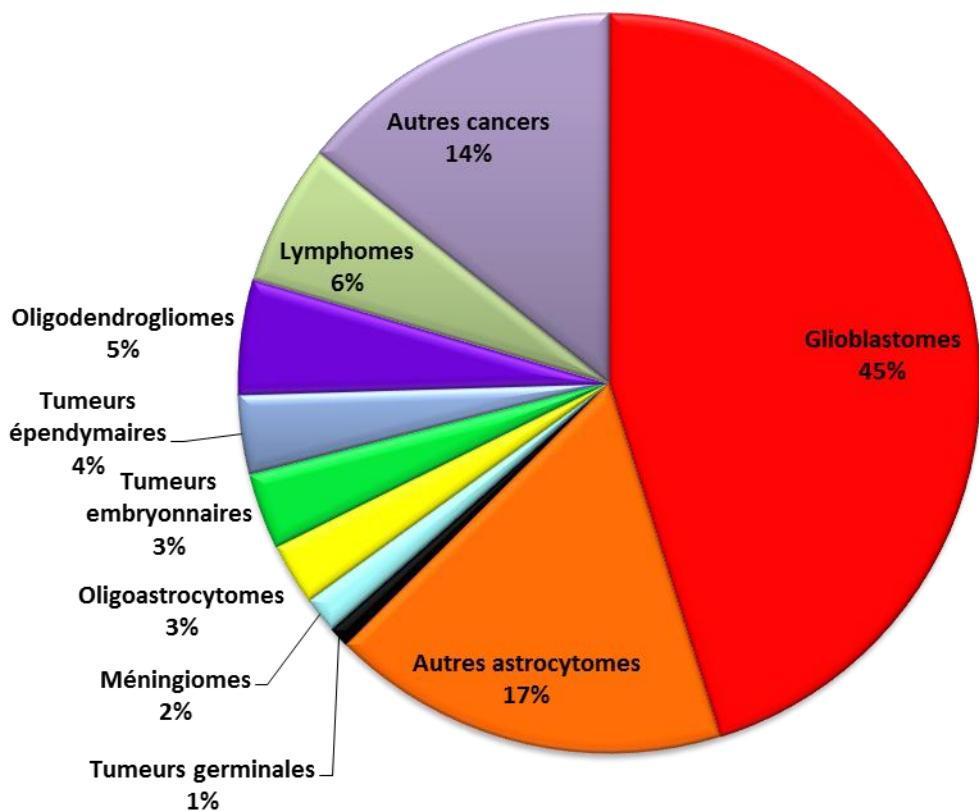


Figure 3. Répartition des tumeurs malignes du SNC selon le type

Le glioblastome représente à lui-seul presque la moitié de tous les cancers du SNC.

Adapté d'Ostrom *et al.*, 2013

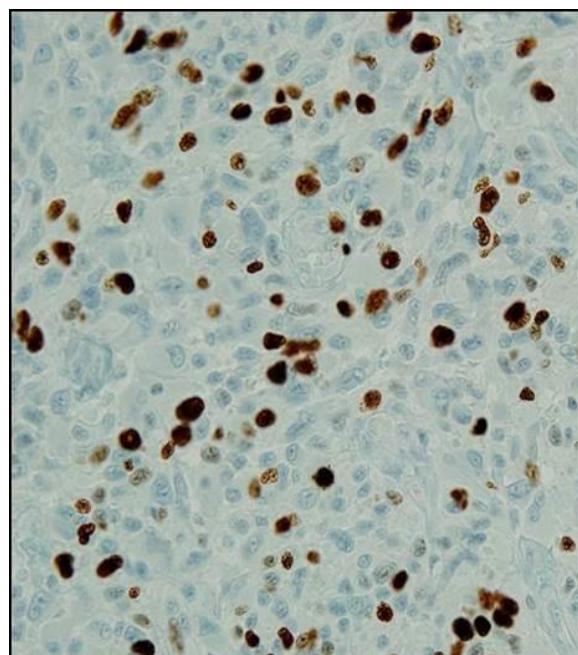


Figure 4. Marquage Ki67.

Ki67 est un marquage nucléaire de prolifération. Seules les cellules dans le cycle sont marquées. Il permet de déterminer l'indice de prolifération. Source : CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

Introduction bibliographique

les épendymomes ni les tumeurs neuro-ectodermiques primitives (PNET, *Primitive Neuroectodermal Tumors*). Ces deux marqueurs demeurent des outils efficaces pour l'identification des gliomes et sont en routine complétés par des marqueurs (Figure 4) comme Ki67/Mib1 (Rathi et al., 2007) et d'autres marqueurs moins bien consensuels (Figarella-Branger et al., 2010).

Cinq critères histopathologiques permettent la définition des grades (I à IV) de gliomes selon la classification de l'OMS (Louis et al., 2007) : la densité cellulaire, les atypies nucléaires, l'importance de l'activité mitotique, le degré de prolifération endothélio-capillaire et la présence ou l'absence de nécrose. Les atypies nucléaires décelables sont des variations de taille et de forme des noyaux, une majoration du rapport nucléocytoplasmique, et l'hypercromasie nucléaire. La prolifération endothélio-capillaire est définie par la présence d'une double assise endothéliale sur l'ensemble de la section vasculaire. Elle ne doit pas être confondue avec l'hyperplasie vasculaire (turgescence endothéliale) ou l'hyperdensité vasculaire. La nécrose se dispose en microfoyers ou en nappes. Elle se caractérise par la présence des silhouettes cellulaires et une disposition pseudopalissadique des cellules tumorales autour du foyer nécrotique. La présence de nécrose signe le grade IV regroupant des variantes de glioblastomes. Le grade histopathologique est corrélé directement au degré de malignité qui tient compte de la réponse au traitement et de la survie des patients. Ce grading sépare clairement les astrocytomes de grade I, tumeurs définitivement bénignes dans la grande majorité des cas, des astrocytomes de grades plus élevés regroupés sous le terme de gliomes malins, difus ou infiltrants.

2.1.Les tumeurs astrocytaires

2.1.1. Les astrocytomes de grade I

Ce sont les astrocytomes pilocytiques (Figure 5) et les astrocytomes sous épendymaires à cellules géantes (Louis et al., 2007). Ils sont de bon pronostic après exérèse chirurgicale au point d'être assimilés à des tumeurs bénignes. L'astrocytome pilocytique atteint le plus souvent l'enfant avec une localisation cérébelleuse de préférence. Il peut cependant affecter les structures anatomiques allant du nerf optique à la moelle allongée ou myélencéphale (voies optiques, hypothalamus, tronc cérébral). En général, ces tumeurs restent localisées et ne progressent pas mais des disséminations sont quelques fois rapportées (Bian et al., 2013). Leur évolution vers une tumeur de plus haut grade est très rare.

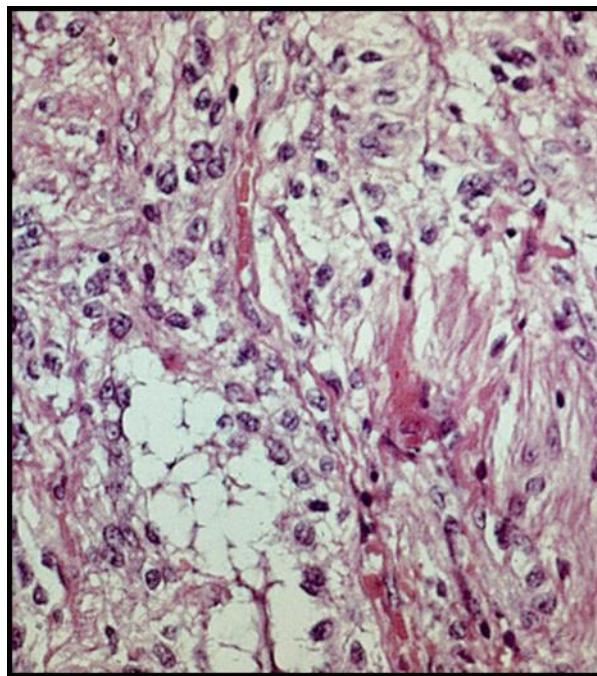


Figure 5. Astrocytome pilocytique.

Il est fait de cellules astrocytaires au noyau allongé, piloïde, avec la présence de fibres de Rosenthal. Le corps cellulaire est granuleux, éosinophile ; GFAP et Olig2 positifs, Ki67<3%.
Source : CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

Type de Gliome	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Mitoses	Prolifération vasculaire	Nécrose
Astrocytome diffus grade II	+	+/-	- ou 1	-	-
Astrocytome anaplasique Grade III	++	+	++ ou 1 et index Ki67 élevé si biopsie en conditions stéréotaxiques	-	-
Glioblastome Grade IV	++	+++	+++	+	+

Tableau 2. Grading des astrocytomes diffus.

2.1.2. Les astrocytomes de grade II

Les tumeurs astrocytaires de grade II sont : l'astrocytome pilomyxoïde, l'astrocytome diffus et le xanthoastrocytome pléomorphe. Ils sont aussi appelés astrocytomes de bas grade (Tableau 2, Figure 6). Ils représentent environ 1,6% des gliomes et ont un taux de survie à 5 ans qui atteint 50%. Ils peuvent cependant évoluer vers des gliomes de plus haut grade. Les astrocytomes pilomyxoïdes sont d'emblée de mauvais pronostic lorsqu'ils sont localisés dans la région hypothalamo-chiasmatique.

2.1.3. Les astrocytomes de grade III ou astrocytomes anaplasiques

Les astrocytomes anaplasiques peuvent arborer trois des critères histopathologiques des gliomes à l'exception de la nécrose qui est caractéristique du grade IV (Louis et al., 2007). Ils contiennent le plus souvent une prolifération endothéliale en plus d'un pléomorphisme nucléaire et une activité mitotique élevée. Ils représentent 6,7% des gliomes et ont une survie à 5 ans d'environ 26,5%, (Ostrom et al., 2013), la plupart évoluant en glioblastomes.

2.1.4. Les astrocytomes de grade IV ou glioblastomes

Ce grade regroupe 3 sous-types tumoraux qui sont : le glioblastome (Figure 7), le glioblastome à cellules géantes et le gliosarcome (Louis et al., 2007). Cependant, on les désigne tous communément par le terme glioblastome ou glioblastome multiforme. Le glioblastome représente 15% des tumeurs primitives du SNC, 55 des gliomes et 45% des cancers du SNC. Au plan anatomopathologique, il y a de la nécrose et une prolifération endothéliocapillaire dans le glioblastome. 65% des patients atteints de glioblastome meurent dans l'année du diagnostic (Ostrom et al., 2013). La survie à 5 ans est de 5%. Les glioblastomes sont classés en glioblastomes primaires ou *de novo* et glioblastomes secondaires résultant de l'évolution d'un gliome de grade III, classiquement un astrocytome. La majorité des glioblastomes (80 à 85%) sont des glioblastomes primaires qui se manifestent par des signes cliniques et des symptômes qui s'aggravent rapidement dans les 6 mois après le diagnostic. A l'anamnèse, il y a peu d'indices faisant évoquer l'évolution d'une tumeur de grade inférieur. A l'inverse, les glioblastomes secondaires ont en général une histoire de la maladie évocatrice de la progression d'un gliome de bas grade (Goodenberger and Jenkins, 2012). La caractérisation biologique des gliomes a permis de nos jours de distinguer ces 2 catégories à partir des marqueurs tumoraux.

Introduction bibliographique

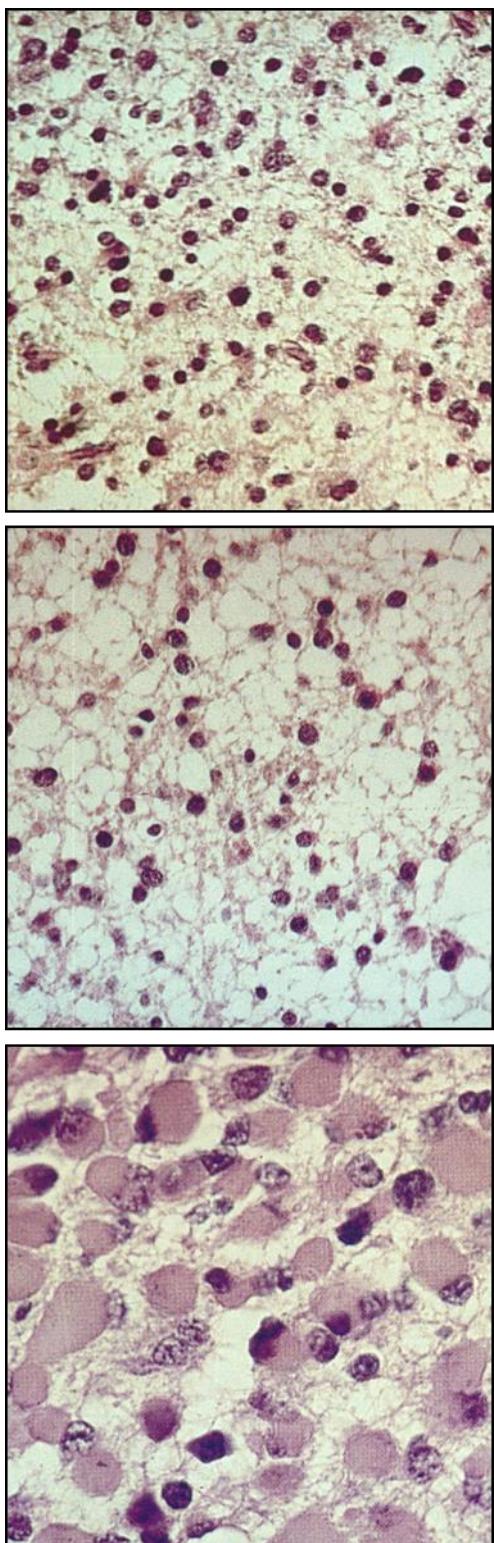


Figure 6. Astrocytomes de grade II.

- en haut, astrocytome diffus
 - au milieu, astrocytome protoplasmique kystique
 - en bas, astrocytome gémistocystique.
- Source : CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France

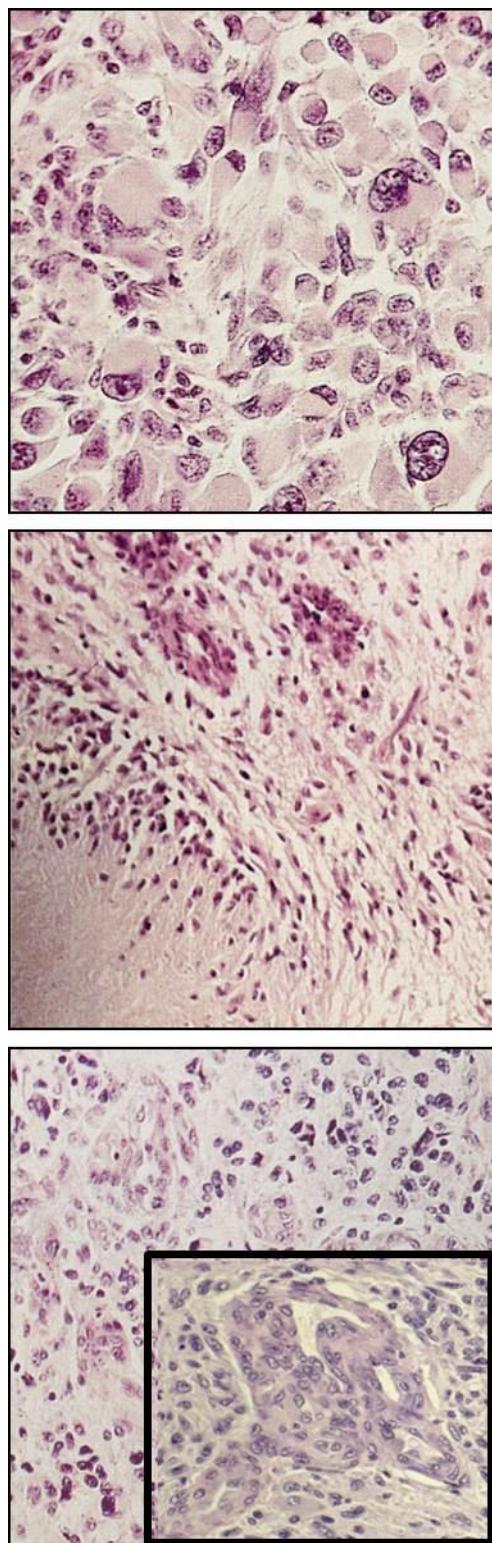


Figure 7. Glioblastome.

- en haut, atypies nucléaires dans le GBM
 - au milieu, nécrose et pseudopalissades
 - en bas, prolifération endothéliocapillaire.
- Source : CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

2.2. Les oligodendrogiomes

Les oligodendrogiomes comptent pour 6,5% des gliomes (Ostrom et al., 2013). Ils sont faits de cellules bien différenciées, monomorphes avec un noyau rond uniforme et un halo périnucléaire donnant l'apparence de nids d'abeilles sur les coupes histologiques (Alentorn et al., 2012). Ce sont des cancers qui ont une croissance comparable à celle des astrocytomes. On les catégorise en grade II et grade III (Tableau 3, Figure 8, Figure 9).

2.2.1. Les oligodendrogiomes de grade II

Ce sont des gliomes de bas grade faits de cellules qui ressemblent aux oligodendrocytes, sans prolifération microvasculaire. Les patients atteints de ces tumeurs ont 79,1% de survie à 5 ans.

2.2.2. Les oligodendrogiomes de grade III ou oligodendrogiomes anaplasiques

Les oligodendrogiomes anaplasiques ont une activité mitotique et une prolifération microvasculaire importantes ; contiennent parfois de la nécrose (Figarella-Branger et al., 2014). Ils sont les moins agressifs des gliomes anaplasiques ou gliomes de grade III (Weller, 2011).

2.3. Les gliomes mixtes

Selon les institutions, leur proportion atteint 3,3% des gliomes (Ostrom et al., 2013). Ce sont les oligoastrocytomes de grade II et les oligoastrocytomes anaplasiques (grade III). Comparativement au grade II, les oligoastrocytomes anaplasiques ont une activité mitotique forte et contiennent parfois une prolifération microvasculaire et/ou de la nécrose. Ils ont des caractéristiques communes aux oligodendrogiomes et aux oligoastrocytomes au point que les critères de leur diagnostic sont établissement-dépendants et d'ailleurs sujets à controverses (Goodenberger and Jenkins, 2012; Maintz et al., 1997). Ils peuvent prendre un aspect biphasique (Figure 10) ou diffus selon la disposition des cellules des deux composantes. Cependant, l'utilisation récente de marqueurs chromosomiques et génétiques (Tableau 4) permet de rapprocher ces tumeurs soit des oligodendrogiomes, soit des astrocytes (Sahm et al., 2014).

Introduction bibliographique

Type de Gliome	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Mitoses	Prolifération vasculaire	Nécrose
Oligodendrogiome grade II	+	+/-	+	-	-
Oligodendrogiome anaplasique Grade III	+++	++	++	+	+/-
Oligo-astrocytome Grade II	+/-	+/-	+	-	-
Oligo-astrocytome Grade III	+//+	++	+++	+	-
Glioblastome à composante oligodendrogliale (GBMO)	+++	+++	+++	+	+

Tableau 3. Grading des oligodendrogiomes et des oligo-astrocytomes.

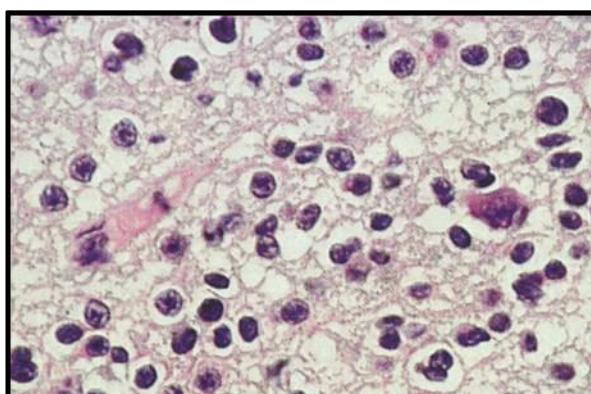


Figure 8. Oligodendrogiome de grade II.

Halos périnucléaires donnant un aspect en nids d'abeilles. Source : CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

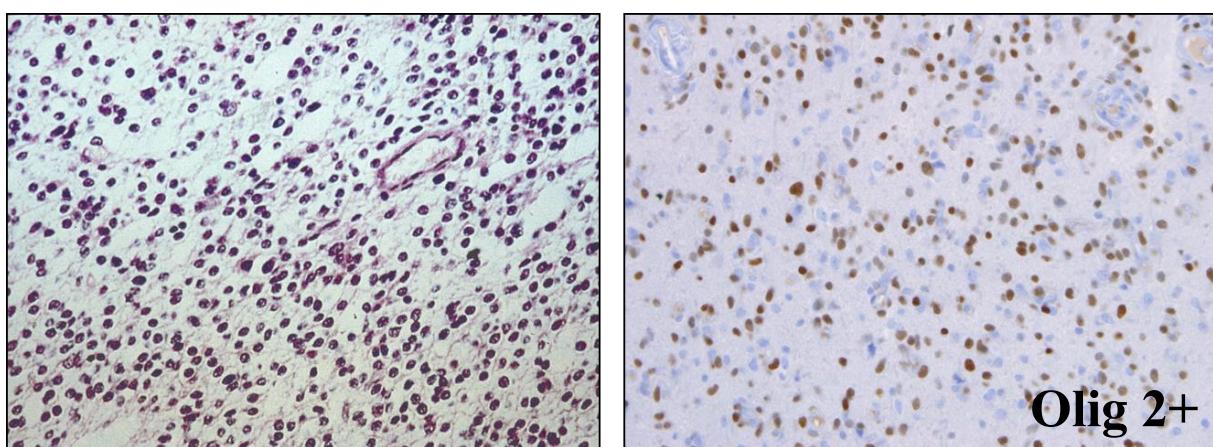


Figure 9. Oligodendrogiome anaplasique.

- Densité cellulaire élevée avec présence de nombreuses atypies nucléaires
- Marquage positif à l'Olig2. Source : CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

2.4. Les épendymomes

Les épendymomes représentent 6,8% des gliomes (Ostrom et al., 2013). Ils atteignent avec préférence les enfants. Ce sont de tumeurs habituellement d'allure bénigne avec une faible croissance tumorale. Dans certains cas ils peuvent être malins et de mauvais pronostic. Les patients atteints d'épendymome ont une survie à 5 ans de 60% (Iqbal and Lewis, 2013). Cette survie atteint 95% lorsqu'on ne considère que les épendymomes de bas grade. Les épendymomes de grade I regroupent les subépendymomes et les épendymomes myxopapillaires, le grade II les épendymomes proprement dits, et le grade III les épendymomes anaplasiques.

3 Altérations (épi)génétiques et profils transcriptomiques dans les gliomes

3.1. La codélétion 1p/19q dans les oligodendrogiomes

Elle est le résultat d'une translocation réciproque déséquilibrée $t(1;19)(q10;p10)$ décrite dans les oligodendrogiomes tous grades confondus, dans une proportion pouvant atteindre 57% (Cairncross et al., 1998; Jenkins et al., 2006). Elle est aussi retrouvée dans un tiers des gliomes mixtes. Au plan génomique, elle correspond à la perte totale des bras chromosomiques 1p et 19q, à ne pas confondre avec la perte partielle de la partie distale du bras court du chromosome 1 (1p36) associée à un mauvais pronostic des astrocytomes (Idbajah et al., 2005, 2008; Vogazianou et al., 2010).

La codélétion 1p/19q est aussi associée dans 60% des cas à la mutation du gène *CIC* (*Capicua transcriptional repressor*) et à 15% des cas à celle de *FUBP1* (*far-upstream binding protein 1*). *CIC* et *FUBP1* sont des gènes situés respectivement sur les bras chromosomiques 19q et 1p (Bettegowda et al., 2011; Jiao et al., 2012; Yip et al., 2012). Dans les gliomes avec codélétion 1p/19q, on retrouve constamment la mutation du promoteur du gène *TERT* responsable d'une surexpression de télomérase (Arita et al., 2013; Killela et al., 2013; Liu et al., 2013). Le fait que la codélétion 1p/19q et donc la mutation du promoteur de *TERT* et la mutation d'*ATRX* soient mutuellement exclusives suggère que ces mutations confèrent le même avantage dans la tumorigenèse et souligne le rôle des télomères dans la carcinogenèse (Killela et al., 2013).

L'expression de l'alpha internexine (INA), un gène du contingent proneural, a été proposée comme alternative à la recherche de la codélétion 1p/19q (Buckley et al., 2011).

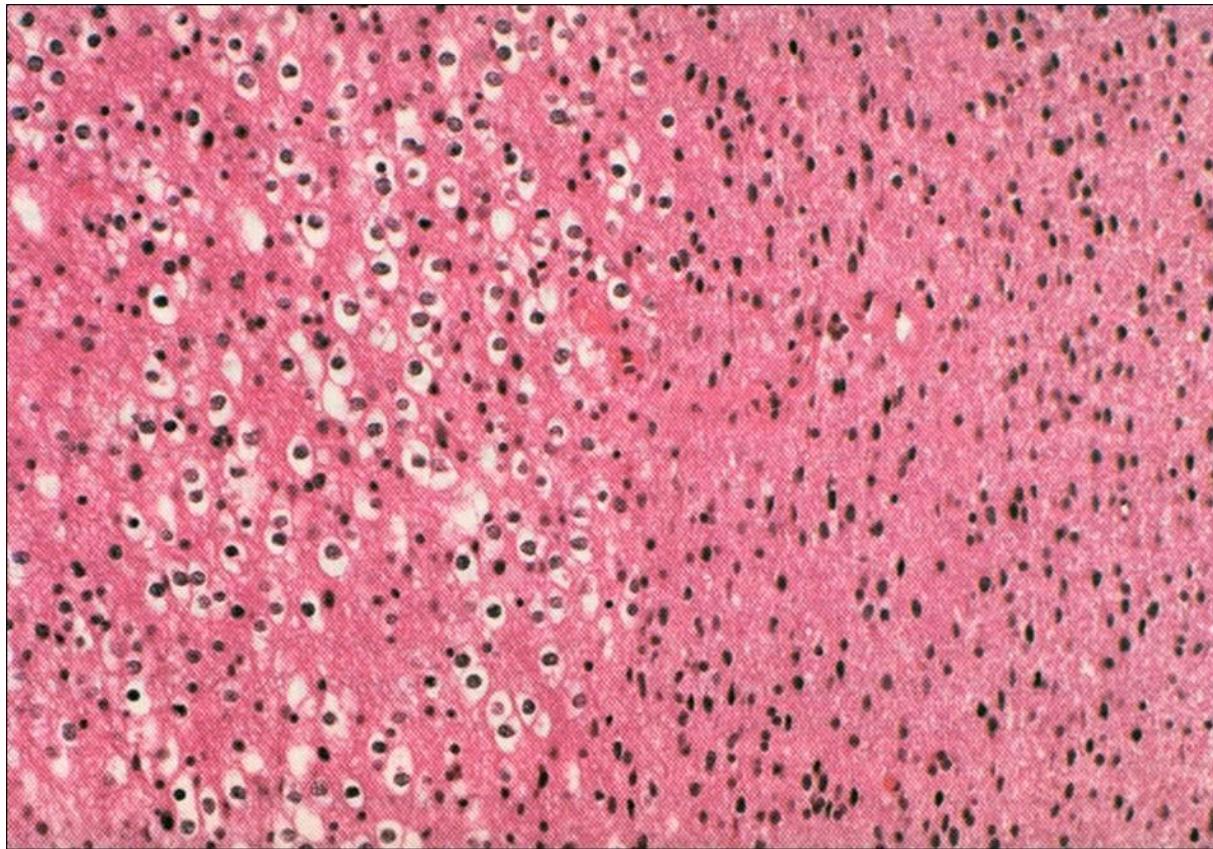


Figure 10. Oligo-astrocytome anaplasique biphasique.

A gauche la composante oligodendrogliale, à droite, la composante astrocytaire. Source : CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

En termes de pronostic, la codélétion 1p/19q ou ses marqueurs de substitution sont associés à un bon pronostic des gliomes. Dans les oligodendrogiomes anaplasiques, en plus d'être un facteur de meilleur pronostic, elle est aussi prédictive d'un bénéfice de la chimiothérapie adjuvante PCV (procarbazine, lomustine, et vincristine) (Bent et al., 2013; Ducray et al., 2011; Mokhtari et al., 2011). En effet, la radiothérapie plus chimiothérapie par PCV augmente plus la médiane de survie sans progression et de survie globale des patients avec codélétion 1p/19q comparativement au groupe sans codélétion 1p/19q (Bent et al., 2013). D'autres études prospectives avec de plus grandes cohortes devront aider à élucider la valeur pronostique de la codélétion 1p/19q (Thomas et al., 2013), d'autant plus que son association à la mutation IDH1/2 serait de meilleur pronostic que la mutation seule.

3.2. Méthylation du promoteur *MGMT*

On décrit dans les GBM la méthylation du promoteur *MGMT* dont la recherche est désormais systématique dans le diagnostic des GBM du fait de son rôle prédictif d'une bonne réponse à la chimiothérapie adjuvante avec agent alkylant. *MGMT* code pour un enzyme intervenant dans la réparation des lésions d'ADN par retrait des groupements alkyles situés en position O⁶ des résidus guanine. (Nakamura et al., 2001; Paz et al., 2004; Pegg and Byers, 1992; Watanabe et al., 2005). L'hyperméthylation du promoteur *MGMT* survient de façon indépendante du statut G-CIMP (Goodenberger and Jenkins, 2012). L'hyperméthylation du promoteur *MGMT* est responsable d'une répression du gène. Elle a été associée à un bon pronostic des gliomes (Hofer and Lassman, 2010) puis identifiée comme un facteur prédictif d'une meilleure réponse des GBM à l'association radiothérapie-témozolamide (Hegi et al., 2005). Récemment, il a été démontré que l'hyperméthylation du promoteur *MGMT* est un marqueur prédictif d'une meilleure réponse du témozolamide seul par rapport à la radiothérapie seule dans les GBM du sujet âgé (Malmström et al., 2012; Wick et al., 2012). Ces résultats ne sont pas encore définitivement admis ; il faut encore les confirmer. Aucune étude à ce jour ne démontre une supériorité du témozolamide seul par rapport à l'association radiothérapie plus témozolamide chez les patients des tranches d'âges inférieures (Hofer et al., 2014).

Introduction bibliographique

3.3. La mutation des gènes *IDH1* et *IDH2* dans les gliomes de grade II, grade III et dans les glioblastomes secondaires

IDH1 est le gène codant pour l'isocitrate déhydrogénase, enzyme catalysant la décarboxylation oxydative de l'isocitrate pour produire du 2-oxoglutarate. Sa mutation est oncogénique (Vogelstein et al., 2013).

Elle entraîne une accumulation de 2-hydroxyglutarate qui est structuralement proche de l' α -cétoglutarate. Le 2-hydroxyglutarate accumulé inhibe de façon compétitive plusieurs enzymes utilisant l' α -cétoglutarate comme substrat. Il en résulte une hyperméthylation des protéines histones et de l'ADN, responsable d'une perturbation de la différentiation cellulaire et une suractivation d'enzymes intervenant dans la dégradation de facteur inducible par l'hypoxie (HIF, *Hypoxia Inducible Factor*) (Koivunen et al., 2012; Lu et al., 2012; Turcan et al., 2012). Le gène homologue d'*IDH1*, *IDH2* peut être altéré par des mutations pouvant produire des phénotypes identiques à celles d'*IDH1*; ces mutations ont été retrouvées dans des gliomes sans mutation *IDH1* (Yan et al., 2009). La protéine IDH1 est détectée dans le cytosol alors qu'IDH2 est de localisation mitochondriale.

La mutation d'*IDH1* a été retrouvée surtout dans les gliomes de bas grade mais aussi dans les GBM secondaires (Balss et al., 2008). Les proportions de gliomes contenant cette mutation sont de 68% pour les astrocytomes diffus, 69% pour les oligodendrogiomes et 78% pour les oligoastrocytomes et 88% pour les GBM secondaires. Puisque cette mutation est rare (moins de 10%) dans les GBM primaires et très fréquente dans les gliomes de bas grade, elle serait un événement précoce dans la transformation maligne. La mutation *IDH1* a donc une valeur diagnostique différentielle entre GBM primaires et secondaires (Balss et al., 2008) mais aussi entre astrocytomes pilocytiques (*IDH* non muté) et astrocytomes diffus (Lewandowska et al., 2014).

En plus de cette valeur diagnostique, la mutation *IDH1* a été associée à un meilleur pronostic des gliomes (Lewandowska et al., 2014; Sanson et al., 2009). Il reste cependant à déterminer si elle a une valeur prédictive de la réponse tumorale à une chimiothérapie adjuvante précoce au PCV ou au témozolomide chez les patients sans codélétion 1p/19q (Bent et al., 2013; Thomas et al., 2013). Le rôle oncogénique de la mutation d'*IDH1* a souligné un potentiel intérêt thérapeutique des inhibiteurs spécifiques de la protéine mutée.

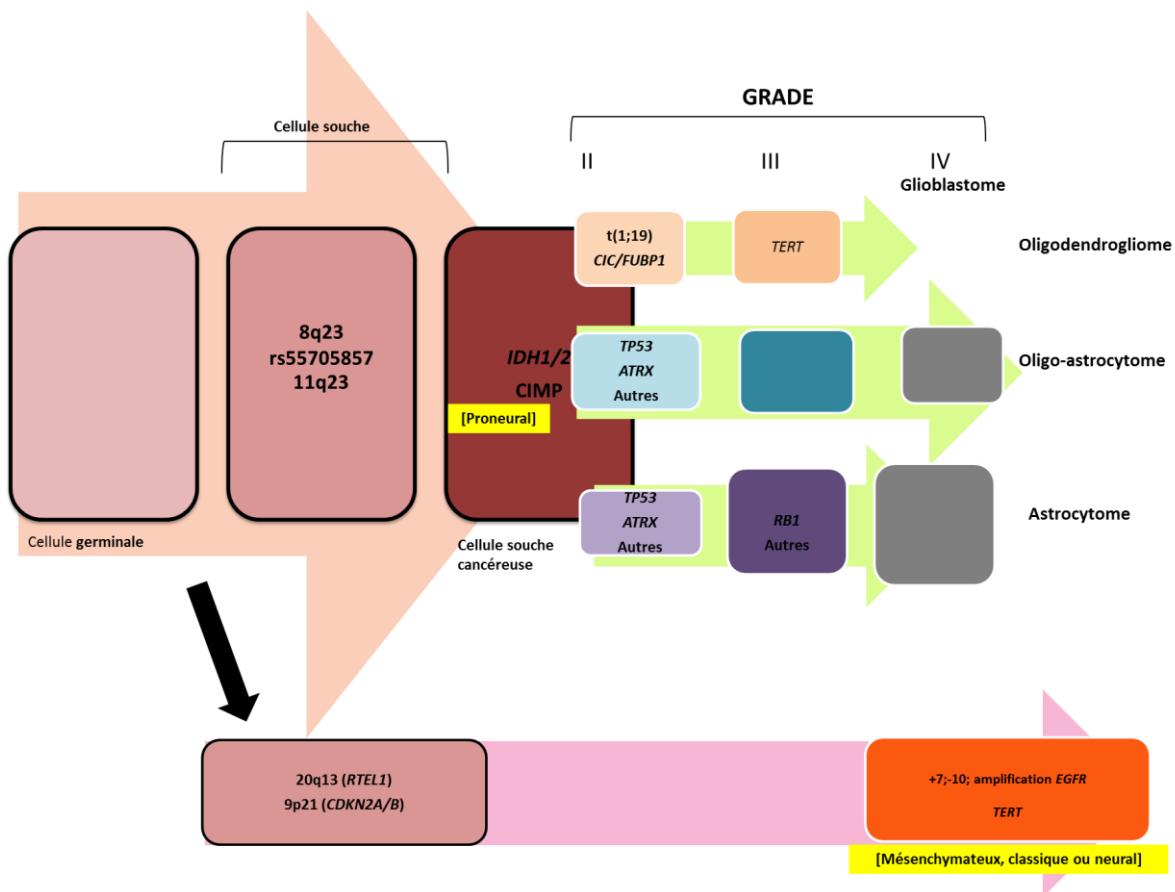


Figure 11. Théorie génétique des gliomes.

La genèse des gliomes se fait par des altérations génétiques progressives débutant parfois au stade germinal. Les glioblastomes primaires représentent 80% des glioblastomes. La mutation *TERT* est mutuellement exclusive de celle d'*ATRX* qui confère un avantage de croissance similaire.

Les travaux pionniers sont encourageants puisque l'AGI-5198, inhibiteur spécifique d'IDH1 mutée version R132H-IDH1 a démontré un pouvoir inhibiteur de la croissance tumorale et promoteur de différentiation des cellules dérivées d'un oligodendroglome anaplasique (Rohle et al., 2013). La codélétion 1p/19q coexiste dans les gliomes avec la mutation d'un des gènes *IDH1* ou *IDH2* (Labussière et al., 2010). Mais la réciproque n'est pas vraie puisqu'il existe des gliomes avec mutation *IDH* sans codélétion 1p/19q (Kannan et al., 2012), ce qui suggère que la mutation *IDH* précède la translocation t(1;19)(q10;p10) dans la genèse des gliomes. Ces dernières contiennent une mutation du gène *ATRX* (*α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) qui est corrélée avec celle de *TP53*. La mutation d'*ATRX* est retrouvée dans les gliomes de différenciation astrocytaire ou oligoastrocytaire. Elle est responsable du phénotype ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*, Figure 11).

3.4. Les mutations du promoteur *TERT*

Ces mutations sont retrouvées dans environ ¾ des GBM mais seulement 20% des astrocytomes de grades II et III. L'information pronostique de ces mutations *TERT* est défavorable en l'absence de mutation IDH1/2 car elle s'adresse dans ce cas-là à des GBM primaires ; elle devient par contre favorable en cas de gliome de grade III avec mutation IDH1/2 car elle est fortement associée au type oligodendrogial par rapport au type astrocytaire (Killela et al., 2014).

3.5. Les altérations de *BRAF*

Les astrocytomes pilocytiques ont dans 66% des cas une duplication en tandem-réarrangement de la région chromosomique 7q34 qui contient l'oncogène *BRAF* (Jones et al., 2008). Ces altérations produisent des transcrits fusionnels KIAA1549-BRAF (Sadighi and Slopis, 2013). Par ailleurs, des mutations ponctuelles de *BRAF* telles que *BRAF V600E* conduisent aussi à la formation des astrocytomes pilocytiques.

Dans 65% des xanthoastrocytomes pléomorphes (astrocytomes de grade II), il y a la mutation oncogénique de *BRAF* notée *BRAF V600E* (Dias-Santagata et al., 2011; Schindler et al., 2011).

Dans d'autres gliomes, il existe des mutations de *BRAF* et notamment dans les oligodendroglomes avec codélétion 1p/19q (Badiali et al., 2012; Horbinski, 2013).

Introduction bibliographique

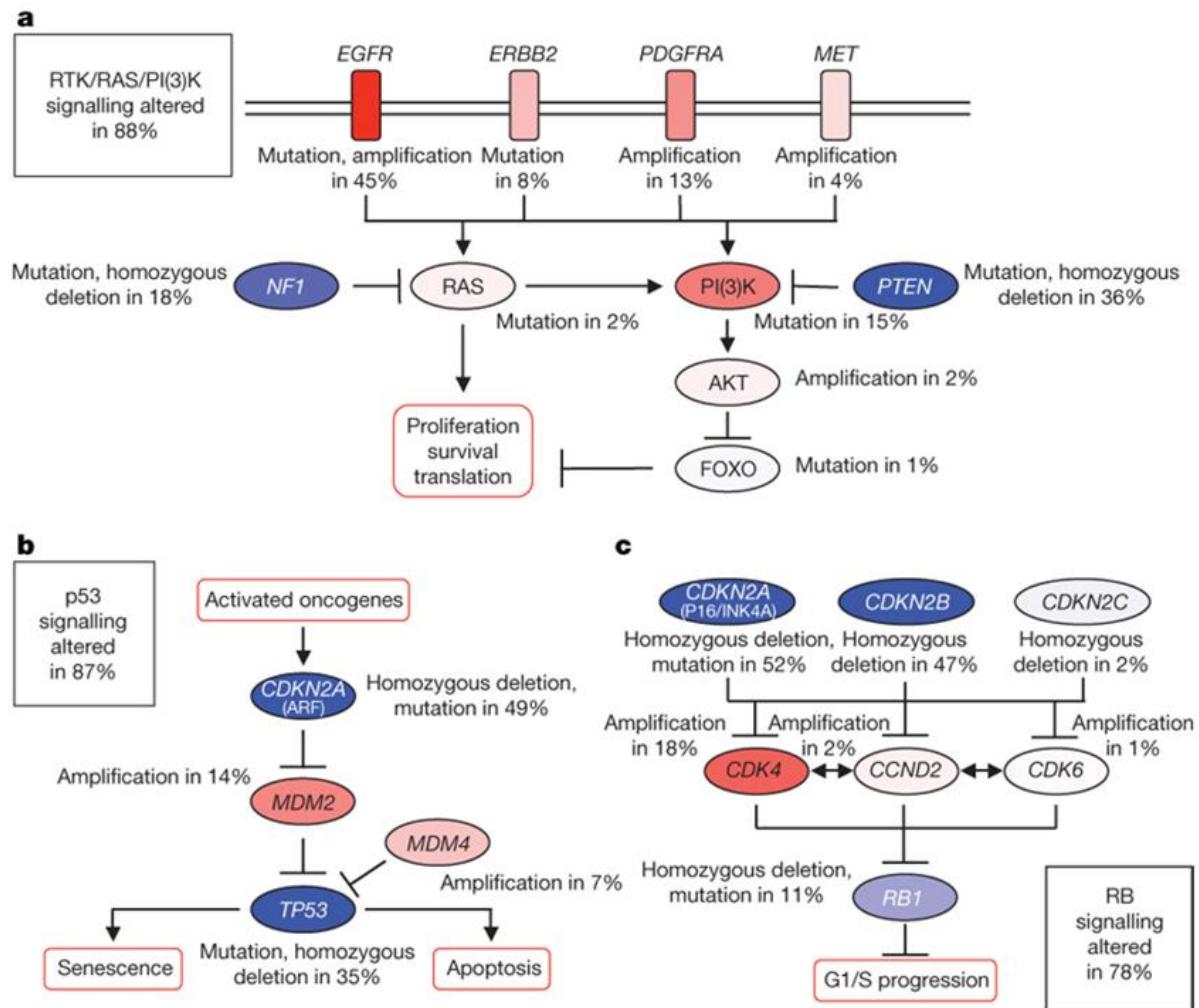


Figure 12. Altérations génétiques fréquentes des trois voies de signalisation intracellulaires importantes dans la gliomagenèse.

a-la voie RTK /RAS/PI3K

b-la voie p53

c-la voie RB

En rose, les altérations résultant en une activation ou suractivation, en bleu, les altérations inactivatrices. La couleur foncée indique une fréquence élevée.

(Cancer Genome Atlas Research Network, 2008)

L’existence de mutation *BRAF* dans les gliomes avait suggéré un intérêt thérapeutique des inhibiteurs spécifiques de cette oncoprotéine (Sadighi and Slopis, 2013).

3.6. Les altérations génétiques dérégulant les voies de signalisation intracellulaires dans les glioblastomes primaires ou *de novo*

La plupart des anomalies se retrouvent dans les deux catégories *IDH1/2* sauvage et muté même si des événements non-redondants existent (Figure 12). Elles concernent les récepteurs transmembranaires aux facteurs de croissance et à activité tyrosine kinase (RTK) ainsi que les voies de signalisation en aval de ceux-ci, l’activation de la voie PI3K, l’inactivation des voies des protéines suppressives de tumeurs p53 et Rb.

Les GBM surviennent à 90% *de novo* et plus fréquemment chez les sujets relativement plus âgés que ceux atteints de GBM secondaire qui ont en général moins de 45 ans. En faisant une analyse intégrée des données cliniques et des anomalies concernant le nombre de copies des séquences d’ADN, l’expression des gènes, la méthylation de l’ADN et les altérations nucléotidiques retrouvées dans les GBM (en majorité) primaires, le TCGA (The Cancer Genome Atlas) a confirmé les altérations des voies de signalisations antérieurement identifiées. Il a aussi indexé les acteurs moléculaires dérégulés. Il a en plus confirmé le rôle de *NF1* comme gène suppresseur de GBM et établi un lien fonctionnel entre mutation du promoteur *MGMT* et hypermutation somatique par transition C:G à A:T dans les sites non-CpG des gènes MMR (Mismatch Repair) des patients traités. La synthèse des données issues de ces analyses a permis de résumer que les GBM primaires contiennent à 88% une altération de la voie des RTK/RAS/PI3K, et une altération fonctionnelle de la voie p53 dans 87% et de RB dans 78% des cas. L’identification des altérations génétiques dans les gliomes a permis d’élaborer une théorie génétique de la gliomagenèse et de proposer une classification histomoléculaire en cours d’évolution (Figure 11, Tableau 4).

Introduction bibliographique

Classification histomoléculaire		
2 grands types de gliomagenèse	<ul style="list-style-type: none"> Gliomagenèse IDH-dépendante 	<ul style="list-style-type: none"> Gliomes de grade II et III Glioblastome secondaire
	<ul style="list-style-type: none"> Gliomagenèse IDH-indépendante 	<ul style="list-style-type: none"> Gliome de grade II triple négatif Gliomatose primitive de grade III Glioblastome de <i>novo</i>
4 grands sous types de gliomes de grade II	<ul style="list-style-type: none"> Gliome IDH⁺/p53⁻/codel 1p19q⁻ Gliome IDH⁻/p53⁻/codel 1p19q⁻ Gliome IDH⁺/p53⁻/codel 1p19q⁺ Gliome IDH⁺/p53⁺/codel 1p19q⁻ 	
Quelques constantes moléculaires	<ul style="list-style-type: none"> codel 1p19q⁺ sont toujours IDH⁺ Dans les grades II, les mutations de <i>TP53</i> et la codélétion de 1p19q sont mutuellement exclusives Dans les grades III et IV, l'association codélétion de 1p19q et amplification de l'<i>EGFR</i> est exceptionnelle 	

Tableau 4. Classification histomoléculaire des gliomes diffus.

La mutation *IDH1*, la codélétion 1p/19q, la mutation de *Tp53* et la mutation d'*EGFR* permettent de décrire les grandes lignes de la genèse des gliomes et de distinguer des sous-types de gliomes selon les mécanismes de carcinogenèse probables

3.7. Les sous-types de glioblastomes selon le profil d'expression génique

3.7.1. Les GBM de profil classique

Ils associent de façon conjointe des amplifications du chromosome 7 et des délétions du chromosome 10. Ils ont le plus souvent une amplification d'*EGFR*, des mutations de *PTEN* et des délétions homozygotes 9q21.3 touchant le gène *CDKN2A* codant *p16INK4A* et *p14ARF* (Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010). Ces délétions homozygotes sont mutuellement exclusives des autres altérations inactivant la voie RB telles que les mutations de *RB1*, *CDK4*, et de *CCDN2*. Ces GBM ont rarement une mutation de *TP53*, de *NF1*, *IDH1* ou *PDGFRA* (Brennan et al., 2009; Verhaak et al., 2010).

3.7.2. Les GBM de profil mésenchymateux

Le profil mésenchymateux s'associe à une délétion 17q11.2 sur un chromosome emportant le gène *NF1*. Il y a un faible niveau d'expression de *NF1* dans les tumeurs classées dans cette sous-catégorie. En revanche, il y a une forte expression de marqueurs mésenchymateux dont *YKL40* (ou *CHI3L1*) et *MET* (Phillips et al., 2006) ou une hyperactivité à la fois de marqueurs astrocytaires et mésenchymateux tels *CD44* et *MERTK* compatible avec une transition épithéliomésenchymateuse (Thiery, 2002). Dans les gliomes mésenchymateux, l'hyperactivation de la voie du TNF est associée à la présence de nécrose intratumorale (Verhaak et al., 2010).

3.7.3. Les GBM de profil neural

Ils se caractérisent par une expression de gènes neuronaux dont *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* and *SLC12A5* et une différentiation cellulaire proche des neurones (Verhaak et al., 2010). Ils ont une amplification d'*EGFR* et rarement une mutation *PDGFRA*, *TP53*, ou *IDH1*, ce qui les rapproche du profil classique ; en termes de survie, ils sont comparables aux sous-groupes mésenchymateux et classiques.

Introduction bibliographique

3.7.4. Les GBM de profil proneural

Selon l'expression génique, la codélétion 1p/19q est associée à un profil proneural et une expression des gènes impliqués dans le développement neuronal, ce qui permet la classification des oligodendrogiomes avec cette codélétion dans le sous-groupe « proneural » de gliomes (Ducray et al., 2008; Phillips et al., 2006).

Ce sous-groupe comprend la plupart des GBM secondaires. Ces GBM surviennent à un âge plus jeune et les patients ont une plus longue survie comparativement aux autres sous-groupes (Noushmehr et al., 2010; Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010). Au plan génétique, ils contiennent des mutations ponctuelles dans les gènes *IDH*. Comparés aux autres sous-groupes, une plus grande proportion d'entre eux contient une amplification de *PDGFRA* accompagnée d'une forte expression génique. De façon mutuellement exclusive avec l'amplification-expression de *PDGFRA*, il y a souvent une mutation de *PI3K* (Verhaak et al., 2010; Yan et al., 2009). Dans ce sous-type de GBM, on trouve en plus grande fréquence la perte hétérozygote de 17p et *TP53* et en revanche dans une moindre proportion l'association d'une perte d'un fragment du chromosome 10 et un gain d'un fragment du 7 (Verhaak et al., 2010).

Dans les gliomes comme dans bien d'autres cancers, il a été décrit une hyperméthylation des îlots CpG (G-CIMP, *Glioma-CpG Island Methylator Phenotype*) au niveau des promoteurs de gènes chez certains patients (Esteller, 2002; Kim et al., 2006; Noushmehr et al., 2010). Environ 30% de ces G-CIMP sont des GBM proneuraux, définissant ainsi une sous-catégorie de GBM proneuraux G-CIMP-positifs qui se distingue des autres GBM proneuraux par un âge de survenue relativement plus jeune et une meilleure survie des patients (Noushmehr et al., 2010). Ce phénotype serait étroitement lié à la mutation d'*IDH1* qui réprimerait la déméthylation des promoteurs (Lu et al., 2012; Nobusawa et al., 2009; Noushmehr et al., 2010; Turcan et al., 2012).

3.8. Les altérations géniques redondantes dans les sous-groupes de GBM

Certaines altérations génétiques sont communes aux GBM sans distinction de sous-catégorie. Parmi elles, se trouvent les délétions homozygotes 9p21.3 qui emportent le gène *CDKN2A* et *CDKN2B* retrouvées dans les GBM et les gliomes de bas grade. Il y a aussi les délétions de *NFKB1A*, gène dont le produit agit normalement en aval de l'EGFR. Ces délétions sont retrouvées dans les GBM de profil non classique de façon mutuellement exclusive avec l'amplification d'*EGFR* (Takeuchi and Nawashiro, 2011).

Introduction bibliographique

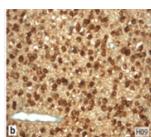
Enfin, des oncogènes de fusion entre *FGFR* (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) et *TACC* (*Transforming Acidic Coiled-Coil*) résultant de translocation chromosomique surviennent dans 3,1% de GBM (Singh et al., 2012). Elles produisent des protéines de fusion FGFR1-TACC1 et FGFR3-TACC3 qui sont des kinases oncogéniques agissant par dérégulation de la dynamique du fuseau mitotique à l'origine des aneuploïdies qui les accompagnent. Ces tumeurs sont en général *IDH1* et *IDH2* non-mutés, donc de profil autre que proneural.

3.9. Les microARNs dans les gliomes

Les microARNs (miARNs) sont des ARNs d'environ 22 nucléotides qui ne sont pas transcrits en protéines. Ils sont des acteurs participant à la régulation de l'expression des gènes en se liant aux 3'UTR (*untranslated regions*) des ARNm pour empêcher leur traduction ou les engager dans un processus de dégradation sous le contrôle d'un complexe appelé RISC (*RNA -Induced Silencing Complex*) (Gillies and Lorimer, 2007). Ils peuvent donc participer à la carcinogenèse puisque leur activité peut cibler un oncogène ou un gène suppresseur de tumeur. Dans ces cas, ils sont eux-mêmes considérés comme tels (oncogènes ou suppresseurs de tumeurs) (Zhang et al., 2012). Dans les cancers, les mutations génétiques et épigénétiques incluant des amplifications, des délétions et des hyperméthylation telles que décrites dans les gliomes n'épargnent pas les régions codant les miARNs. Les gènes codant ces miARNs sont d'ailleurs fréquemment localisées au niveaux de points génomiques fragiles (Calin et al., 2004) ou sujets à répression (Lujambio et al., 2007). Dans les gliomes, plus d'une centaine de miARNs ont été associés à la tumorigenèse (Zhang et al., 2012). Parmi eux, miR-21 est surexprimé et participe à la promotion du phénotype hyperprolifératif et invasif et la résistance à la mort cellulaire (Papagiannakopoulos et al., 2008; Zhou et al., 2010). miR-222 et miR-223 sont codés par le chromosome X et participent au contrôle de la prolifération en régulant *p27* ainsi que *BIRC1* qui appartient à la famille des protéines IAP (*Inhibitors of Apoptosis Protein*) (Gillies and Lorimer, 2007; Lukiw et al., 2009). L'amplification de la région chromosomique 12q13 concerne miR-26a qui est un répresseur direct de l'expression

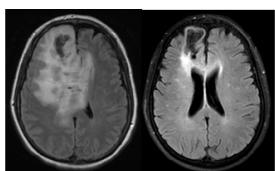
Introduction bibliographique

Un marqueur diagnostique:



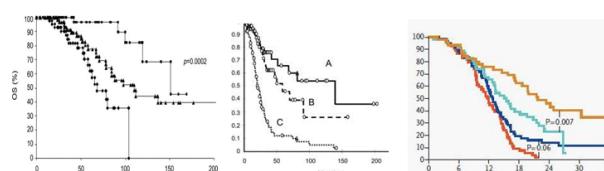
mutation d'IDH1(présente = gliome)

Deux marqueurs de chimio-sensibilité:



codélétion 1p/19q (grades II et III)
méthylation MGMT (GBM)

Trois marqueurs pronostiques:



mutation d'IDH1 (grades II, III, IV)
codélétion 1p/19q (grades II et III)
méthylation MGMT (GBM)

Figure 13. Biomarqueurs consensuels utiles aux cliniciens

Synthèse de François Ducray.

Marqueurs moléculaires	Intérêt clinique	Technique diagnostique
Méthylation du promoteur MGMT	<ul style="list-style-type: none"> Prédicteur d'une meilleure réponse des GBM aux alkylants. Associée à une survie prolongée pour les gliomes anaplasiques et les GBM traités par radiothérapie et/ou agent alkylant. 	<u>Pyroséquençage</u> MS-PCR Immunohistochimie HRM Methylight
Codélétion 1p19q	<ul style="list-style-type: none"> Marqueur diagnostique des oligodendrogiomes et des oligoastrocytomes. Marqueur de meilleur pronostic de la radiothérapie et/ou chimiothérapie 	<u>CGH</u> FISH
Mutation IDH1/2	<ul style="list-style-type: none"> Marqueur diagnostique pour les gliomes infiltrants de grades II et III, et les GBM secondaires de l'adulte. Marqueur de bon pronostic dans ces mêmes groupes. 	<u>Immunohistochimie</u> (R132H) Séquençage direct
Duplication BRAF/fusion BRAF-KIAA1549	Marqueur diagnostique de l'astrocytome pilocytique.	<u>FISH</u> RT-PCR

Tableau 5. Marqueurs moléculaires d'intérêt clinique dans les gliomes

Les techniques diagnostiques de choix sont soulignées. Les techniques non soulignées sont des alternatives.

de *PTEN* dans les gliomes. Comme une perte d'hétérozygotie de *PTEN* accompagne en général cette amplification 12q13, la surexpression de miR-26a contribue à l'inactivation fonctionnelle de *PTEN* dans les gliomes humains de haut grade (Huse et al., 2009; Kim et al., 2010). Il a récemment été démontré que miR-142-3p est impliqué avec l'IL-6 dans une boucle de rétrocontrôle qui participe à l'entretien de la malignité des GBM (Chiou et al., 2013). miR-142-3p est réprimé dans les GBM par hyperméthylation de son promoteur entretenue par l'IL-6. La levée de cette inhibition constitue alors une piste thérapeutique intéressante.

L'exploration du profil d'expression des miARNs chez les patients atteints de gliomes pourrait participer à la définition de sous-types tumoraux d'intérêt clinique (Srinivasan et al., 2011). Cette exploration est possible non seulement dans les tumeurs (Kim et al., 2011) mais aussi dans le sang périphérique (Roth et al., 2011). Les travaux en cours sur les mi-ARNs pourraient dans l'avenir enrichir les connaissances sur la pathologie cancéreuse gliale ou ouvrir des pistes thérapeutiques intéressantes.

3.10. Classification histomoléculaire et biomarqueurs utiles au cliniciens

En intégrant les résultats de la recherche, il a été possible de proposer une synthèse utile aux cliniciens. Ainsi, de façon consensuelle, on décrit la mutation d'*IDH1* comme un marqueur diagnostique des gliomes. De même, 2 marqueurs de chimiosensibilité sont à retenir : dans les gliomes de grades II et III : la codélétion 1p/19q ; et la méthylation du promoteur *MGMT* dans les GBM. Ces 3 marqueurs ont aussi une valeur pronostique selon le grade tumoral (Tableau 5, Figure 13).

4 Epidémiologie et facteurs de risques

4.1. Epidémiologie descriptive

L'incidence des gliomes dans la population varie selon les sources. Il y a des différences significatives selon le type histologique, l'âge au moment du diagnostic, le genre, la race, le sexe et la région géographique. L'incidence standardisée varie entre 4,67 et 5,73 pour 100 000 personnes. Le GBM à lui seul a une incidence comprise entre 0,59 et 3,69 pour 100 000 personnes (Ostrom et al.). L'incidence des gliomes a beaucoup augmenté les 30 dernières années du fait non seulement des changements des conditions et des critères diagnostiques mais aussi dû au vieillissement de la population (Baldi et al., 2010). C'est d'ailleurs dans les tranches d'âge au-delà de 60 ans que l'on observe le pic d'incidence et l'augmentation significative des 30 dernières années.

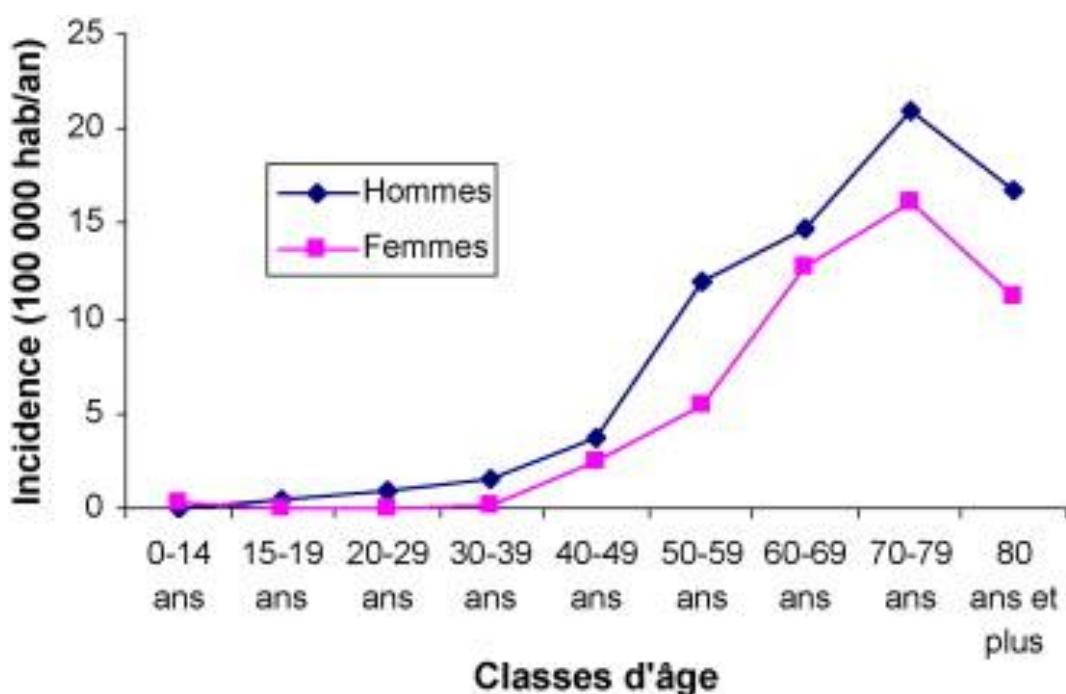


Figure 14. Incidence des glioblastomes selon le sexe et l'âge, en Gironde (France).
Les sujets de sexe masculins sont plus atteints, et le pic d'incidence se situe autour de 75 ans.
La Gironde est choisie pour la qualité de son registre (Baldi *et al.*, 2010).

4.2. Facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques augmentant le risque de gliomes sont :

- l'appartenance ethnique ; l'incidence est plus élevée chez les Blancs (3,99 pour 100 000) que chez les Noirs (1,91 pour 100 000) ;
- l'âge : le risque augmente avec l'âge sans être négligeable pour l'enfant. Le pic d'incidence se situe autour de 70 ans (Figure 14) ;
- le sexe : le sex-ratio est estimé à 1,51 ;
- l'existence d'un syndrome de prédisposition génétique ;
- certains polymorphismes génétiques ;

4.2.1. Les prédispositions héréditaires et familiales aux gliomes

L'histoire familiale et les études génétiques ont permis d'identifier des altérations héréditaires prédisposant à des cancers incluant des gliomes. Ces syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers sont rares si bien que leur contribution au risque de gliome est faible (Robertson et al., 2010). Dans les gliomes, une histoire de cancer familial concerne environ 5% des cas. Les mutations germinales impliquées appartiennent à 7 catégories principalement.

4.2.1.1. Les mutations germinales des gènes *MSH2/MLH1/PMS2/MSH6*

Les gènes *MSH2/MLH1/PMS2/MSH6* appartiennent au système MMR (*Mismatch Repair*), complexe de réparation des mésappariements de bases de la double hélice d'ADN lors de la réplication. La mutation d'un de ces gènes peut entraîner une instabilité génomique produisant principalement des anomalies de longueur des séquences répétées d'ADN. Ces anomalies sont regroupées sous le terme d'instabilité microsatellitaire. L'instabilité microsatellitaire est responsable de 95% des cas de syndrome de Lynch ou syndrome HNPC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancers*) et de 15% des cancers colorectaux sporadiques. Elle est aussi responsable d'un spectre de cancers incluant des leucémies, des lymphomes et des astrocytomes pouvant être des GBM (Vos et al., 2006). Cliniquement, la maladie est hétérogène ; les patients ont des taches hyperpigmentées café-au-lait sur la peau.

Introduction bibliographique

4.2.1.2.Les mutations germinales du gène APC

Le gène *APC* est un gène suppresseur de tumeurs codant pour une protéine du même nom (*APC, Adenomatous Polyposis Coli*) dont les variantes anormales sont associées à des troubles rangés sous le terme de pathologies intestinales par mutation du gène *APC* (*APC-Associated Polyposis Conditions*). Ce groupe pathologique comprend la polypose rectocolique familiale (FAP, *Familial Adenomatous Polyposis*), les formes atténuees de la polypose recto-colique familiale, le syndrome de Gardner et le syndrome de Turcot (Jasperson and Burt, 1993). Ce sont des pathologies héréditaires transmises sous un mode autosomique dominant. Les néomutations concernent 20 à 25% des individus atteints. Le diagnostic différentiel de FAP se fait essentiellement avec la polypose familiale due aux mutations des gènes *MUTYH* (MAP, *MUTYH-associated polyposis*) qui est autosomique récessive. Les pathologies intestinales par mutation du gène *APC* sont associées à un risque élevé de cancers variés mais c'est dans le FAP et le syndrome de Turcot surtout que surviennent les cancers du SNC. Le risque de cancer cérébral associé au FAP est inférieur à 1% ; il s'agit en général de médulloblastomes. Le syndrome de Turcot se définit cliniquement par l'association de la polypose ou du cancer du côlon avec un cancer du SNC. On distingue cependant le syndrome de Turcot dû à une mutation d'*APC* de celui dû à un Syndrome de Lynch donc à une mutation d'un gène MMR (Hamilton et al., 1995). Alors que les cancers du SNC dus aux mutations d'*APC* sont des médulloblastomes en grande majorité, il s'agit surtout de GBM dans les mutations des gènes MMR (Jasperson and Burt, 1993). Le syndrome de Turcot et le syndrome de Gardner ont été considérés comme des entités cliniques à part entière mais il est désormais admis que toute personne ayant une mutation du gène *APC* est à risque de cancer du SNC.

4.2.1.3.Les mutations germinales de *CDKN2A*

Le gène *CDKN2A* est situé dans la région génomique 9p21.3 et code pour les protéines structuralement proches p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, ou p18^{INK4c} ainsi que la protéine p14^{ARF} qui leur est structuralement différente (Eckerle Mize et al., 2009). Les 3 INK sont des protéines inhibitrices de kinases dépendantes de cyclines (CDK) à la transition G1/S du cycle cellulaire alors que p14^{ARF} stabilise p53 à la phase G1. Les mutations de *CDKN2A* sont responsables de syndrome FAMMM (*Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome*).

Introduction bibliographique

Il s'agit d'une génodermatose autosomique dominante se manifestant par de multiples nævi mélanocytaires avec une histoire familiale de mélanomes. Il s'accompagne d'un risque élevé de cancers, principalement pancréatiques (Eckerle Mize et al., 2009). Les cancers du cerveaux ont été rapportés dans les familles FAMMM avec ou sans altération de p16^{INK4} (Vasen et al., 2000).

4.2.1.4.Les mutations des gènes *TSC1/TSC2*

Ce sont des gènes suppresseurs de tumeurs dont la mutation est responsable de la Sclérose tubéreuse de Bourneville (STB) encore appelée Syndrome de Bourneville (CIM-10 : Q85.1. ; OMIM : 191100, 613254). C'est une maladie génétique autosomique dominante ayant une prévalence de 1 à 9 pour 100 000 et une incidence d'une naissance sur 10 000 (<http://www.orpha.net/>). Dans plus de la moitié des cas, il s'agit cependant de maladie sporadique, donc due à des mutations spontanées. Dans 69% des cas diagnostiqués, la STB est due à une mutation de *TSC2* (Northrup et al., 1993). La pénétrance de la maladie est de 95% et l'expressivité est variable même au niveau intrafamilial. Les gènes *TSC1* est situé en région génomique 9q34 et *TSC2* en 16p13. *TSC1* code pour l'hamartine (ou *Tuberous Sclerosis Complex 1*), et *TSC2* pour la tubérine (ou *Tuberous Sclerosis Complex 2*). Les deux protéines forment un complexe régulant mTORC1 principalement. Les signes cliniques de la STB sont dus à des atteintes de plusieurs organes incluant des angiofibromes faciaux, des tumeurs de Koenen, des plaques fibreuses du front et du cuir chevelu, des angiomyolipomes rénaux, des nodules sous-épendymaires ou des tubers corticaux multiples et des hamartomes rétiniens. L'épilepsie, et le retard mental en font partie respectivement dans 60% et 50% des cas.

4.2.1.5.Les mutations germinales de *PTEN*

Elles sont responsables de maladies regroupées sous l'appellation Syndrome tumoral hamartomeux lié à *PTEN* (ou PHTS, *PTEN Hamartoma Tumor Syndrome*). Sont inclus dans ce groupe, le syndrome Cowden (CS), le syndrome Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS), syndrome de Protée lié *PTEN* (PS, *PTEN-related Proteus syndrome*), et le syndrome pseudo-Protée. La prévalence est difficile à évaluer car le diagnostic n'est pas aisés ; elle est estimée à 1 pour 200 000. Le diagnostic clinique inclut deux critères pathognomoniques, des critères majeurs et des critères mineurs (Eng, 1993). Les critères pathognomoniques sont la présence de gangliocytome anaplasique cérébelleux appelé Maladie de Lhermitte-Duclos et des lésions

Introduction bibliographique

cutanéomuqueuses à type de trichilemmomes, de kératose acrale, ou de lésions papillomateuses ou muqueuses variées. Les tumeurs cérébrales sont de survenue occasionnelle, dans le Syndrome de Cowden essentiellement.

4.2.1.6.Les mutations germinales de *TP53* ou de *hCHK2*

La mutation germinale de *TP53* est retrouvée dans 70% des cas de Syndrome de Li-Fraumeni (LFS) encore appelé Syndrome SBLA (*Sarcoma, Breast, Leukemia, and Adrenal Gland*) ou dans les maladies évocatrices de ce syndrome (CIM-10 : D48.9, OMIM : 151623, 609265, 609266). C'est une maladie autosomique dominante à prévalence estimée à environ 1 à 9 pour 100 000 (<http://www.orpha.net/>). Dans de rares familles avec ce syndrome, c'est la mutation de *hCHK2* qui a été retrouvée. Le spectre de tumeurs occasionnées par ce syndrome est large et l'âge de survenue variable. Les tumeurs sont en grande majorité des sarcomes, des leucémies/lymphomes, des tumeurs cérébrales et des corticosurrénalomes. Le risque de cancer associé à la mutation de *TP53* est de 15% à 15 ans ; à 50 ans, il est de 40% pour les hommes et 80% pour les femmes du fait du nombre élevé de cancers de sein. Le risque de développer une deuxième tumeur surtout radio-induite est très élevé dans le LFS (Schneider et al., 1993).

4.2.1.7.Les mutations des gènes *NF1* ou *NF2*

La mutation de *NF1* est responsable de la Neurofibromatose de type I (NF1), encore appelée Maladie de Von Recklinghausen (CIM-10 : Q85.0. ; OMIM : 162200, 162210, 613675). C'est une maladie neuro-cutanée héréditaire à transmission autosomique dominante de prévalence variant entre 1 et 5 pour 10 000 (<http://www.orpha.net/>). Elle se manifeste en période néonatale ou à l'enfance. Elle est cliniquement hétérogène ; des taches café-au-lait, des nodules de Lish, des lentigos sur les aisselles et sur la région inguinale, de multiples neurofibromes ou bien-sûr des gliomes peuvent en être les manifestations.

Le gène *NF2* est situé en région génomique 22q12 ; il code pour la schwannomine, protéine cytoplasmique sous-membranaire, interagissant avec les protéines du cytosquelette. La mutation de *NF2* est responsable de la neurofibromatose de type II (NF2) appelée aussi neurinome de l'acoustique familial ou neurome de l'acoustique familial ou encore schwannome vestibulaire familial (Code CIM-10 : Q85.0. ; OMIM : 101000). Comme la NF1, elle est tout aussi héréditaire à transmission autosomique dominante, mais dans la moitié des cas, il s'agit plutôt d'une nouvelle mutation qu'une transmission héréditaire. Elle est beaucoup plus rare que la NF1 ; sa prévalence est de 1 à 9 pour 100 000 avec une incidence

Introduction bibliographique

estimée à 1 pour 50 000 (<http://www.orpha.net/>). Elle peut survenir à tout âge. Trois groupes de manifestations sont possibles dans cette maladie : (1) dans 50% des cas, des schwannomes bilatéraux multiples des nerfs crâniens ou d'autres tumeurs du SNC dont des méningiomes ou plus rarement des épendymomes. (2) Des schwannomes sous-cutanés et des neurofibromes sont possibles. (3) Des manifestations oculaires dites opacités cristalliniennes apparaissant dès l'enfance le plus souvent.

4.2.2. Les polymorphismes alléliques conférant une susceptibilité héréditaire aux tumeurs gliales

Des polymorphismes de simple base (SNP, *Single-Nucleotide Polymorphism*) ont été associés au risque de développer des gliomes. Certains SNPs sont à l'intérieur ou proches de séquences codant des gènes tels *TERT* (5p13.33), *CCDC26* (8q24) , *CDKN2A/CDKN2B* (9p21.3), *RTEL* (20q13.3), *EGFR* (7p11.2) et *PHLDB1* (11.q23), *TP53* (17p13.1) (Andersson et al., 2010; Egan et al., 2012; Sanson et al., 2011; Schwartzbaum et al., 2010; Stacey et al., 2011). Les SNPs de la région 8q24.4 proches de *CCDC26* ont été associés aux oligodendrogliomes avec codélétion 1p/19q (Jenkins et al., 2011) et mutation *IDH* (Sanson et al., 2011). Quant aux SNPs contigus à *CDKN2B* et à *RTL1*, ils sont associés à un risque élevé de GBM plutôt que d'oligodendrogliome (Egan et al., 2011; Jenkins et al., 2011; Simon et al., 2010). Ils ont d'ailleurs été impliqués dans des gliomes de haut grade alors que *CCDC26* et de *PHLDB1* sont plutôt relatifs à des gliomes de bas grade (Simon et al., 2010). L'étude du polymorphisme au locus 8q24.21 a identifié le SNP rs55705857 comme très étroitement lié au développement de gliome puisque l'allèle associé au risque est retrouvé dans 40% des patients atteints de tumeur oligodendrogliale et de gliomes avec mutation *IDH1/2*. De façon intéressante, la séquence concernée a été conservée au cours de l'évolution et code pour un miARN, suggérant un potentiel rôle dans d'autres fonctions importantes (Goodenberger and Jenkins, 2012; Jenkins et al., 2011). Ces découvertes pionnières suggèrent que ces SNPs et les régions qu'ils concernent ont peut-être encore des secrets à dévoiler. Ils apportent néanmoins un niveau supplémentaire de compréhension des mécanismes de la physiopathologie des gliomes et d'autres cancers ou maladies multigéniques multifactorielles incluant une participation de l'environnement.

Introduction bibliographique

4.2.3. Terrains allergiques / atopiques

Les terrains atopiques et les maladies entraînant une activation de système immunitaire ont été associés à une diminution du risque d'être atteint de gliome (Brenner et al., 2002; Linos et al., 2007; Schlehofer et al., 1992; Wang and Diepgen, 2005).

4.3. Facteurs extrinsèques

4.3.1. Alimentation, mode de vie (tabac, ...)

Rien de probant n'a été retrouvé. La consommation de fruits et légumes et les traumatismes psycho-affectifs semblent influencer le risque mais cela n'a pas été confirmé (Cabaniols et al., 2011). Le tabac, quant à lui, semble avoir été disculpé par plusieurs études alors que d'autres trouvent une augmentation du risque de gliome pour le tabagisme chronique (Holick et al., 2007; Mandelzweig et al., 2009).

4.3.2. Infections

Un rôle protecteur de certaines infections virales (varicelle-zona, autres herpès virus, etc...) a été retrouvé (Wrensch et al., 2005). Cependant les infections survenues *in utero* ou en période néonatale, augmenteraient le risque de GBM (Brenner et al., 2004).

4.3.3. Médicaments

Il y a un rôle protecteur de la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens au long cours entraînant une réduction de 33% du risque de gliome (Scheurer et al., 2008).

4.3.4. Toxiques

Plusieurs toxiques ont été soupçonnés comme augmentant le risque de tumeurs cérébrales. Les analyses sont cependant peut concluantes du fait de biais difficilement éliminables. Parmi ces toxiques, le plomb et les pesticides font un peu consensus.

- Le plomb augmente le risque en cas d'exposition prolongée (van Wijngaarden and Dosemeci, 2006).
- Les pesticides sont incriminés parce qu'on a décrit une incidence augmentée dans les populations agricoles utilisant les pesticides. Mais les molécules mises en cause n'ont pas été précisées (Provost et al., 2007).

Introduction bibliographique

4.3.5. Radiations électromagnétiques

4.3.5.1. Les radio-fréquences

L'éventuel risque de tumeurs associé aux champs électromagnétiques des radiofréquences les radio-fréquences générées par les téléphones portables et les télécommunications par micro-ondes a fait l'objet de plusieurs études dont celles de Hardell *et al.* en Suède et l'étude internationale appelée Interphone (Hardell *et al.*, 2004; Minder and Pfluger, 2001). Les résultats sont non concluants et restent sujets à controverses. C'est pourquoi la question du risque de gliomes associé à l'usage des appareils émettant ces radiofréquences notamment les téléphones mobiles, reste sans réponse convaincante (Aydin *et al.*, 2011; Corle *et al.*, 2012; Frei *et al.*, 2012, 2012; Swerdlow *et al.*, 2011). Face à ces résultats discutables, les experts du CIRC n'ont pas pu répondre à la question. Ils ont cependant opté, par mesure de précaution, de classifier les champs électromagnétiques des radiofréquences dans le groupe des carcinogènes possibles pour l'humain (groupe 2B).

4.3.5.2. Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes sont des rayonnements qui produisent des ionisations dans la matière en arrachant, grâce à l'énergie qu'ils transportent, des électrons aux atomes ou molécules de la matière. Ces atomes et ces molécules deviennent des particules de charge positive et sont appelés cations. Les électrons arrachés peuvent être captés par d'autres atomes qui se chargent négativement et sont alors appelés anions.

Les radiations ionisantes provoquent des gliomes ou d'autres cancers chez les animaux et chez les humains (D'Elia *et al.*, 2009; Salvati *et al.*, 2008). L'irradiation thérapeutique est incriminée dans la carcinogenèse radio-induite. Les critères diagnostiques de tumeur radio-induite ont été définis par Cahan en 1948 (Cahan *et al.*, 1998):

- la tumeur doit être localisée dans une région antérieurement irradiée ;
- la période de latence doit être suffisamment longue (1 à 26 ans ; 10 ans et demi en moyenne) entre l'irradiation et l'apparition de la tumeur ;

Introduction bibliographique

- le type histologique de la tumeur radio-induite doit être différent de la tumeur primitive pour laquelle le sujet aurait été traité ;
- le patient ne doit pas souffrir de syndrome tumoral héréditaire.

Les gliomes radio-induits seraient en grande majorité de grade d'emblée élevé (D'Elia et al., 2009; Salvati et al., 2008).

La radiographie diagnostique a été associée à une augmentation du risque de gliomes chez des sujets adultes ayant subi plusieurs radiographies standard ou des scanographies de la tête et du cou (Davis et al., 2011; Schlehofer et al., 1992). Concernant les radiations cosmiques et nucléaires, le biais de confusion diminue la pertinence des études épidémiologiques qui permettraient de les incriminer sans équivoque (Cardis et al., 2006; Preston et al., 2002). Des résultats sont attendus avec les études mises en place pour évaluer les conséquences de la catastrophe de Fukushima (Walsh et al., 2014).

Introduction bibliographique

5 Traitements actuels du glioblastome

Dans les gliomes diffus, de haut grade surtout, une résection ne serait-ce que subtotal est importante pour diminuer la masse tumorale, lever l'hypertension intracrânienne et améliorer la survie (Chandana et al., 2008; Fadul et al., 1988; Hentschel and Sawaya, 2003; Hess, 1999; Simpson et al., 1993). Une controverse existe toujours sur le bénéfice d'une extension (maximale) de la zone réséquée. Cependant la plupart des auteurs restent favorables à cette stratégie dans les glioblastomes surtout pour son impact positif sur la qualité de vie (Kubben et al., 2011; Stendel, 2009; Stummer and Kamp, 2009; Stummer et al., 2008; Tsitlakidis et al., 2010; Vuorinen et al., 2003; Yin et al., 2013). La biopsie stéréotaxique conserve tout de même son intérêt pour le diagnostic anatomopathologique.

5.1. La radiothérapie

Elle utilise des photons X délivrés selon une balistique longtemps de type conformationnel à plusieurs faisceaux et actuellement de plus en plus en modulation d'intensité. Le protocole standard des GBM délivre une dose d'irradiation totale de 60 Gy à raison de 5 séances de 2 Gy par semaine, couplée à une chimiothérapie (Stupp et al., 2005).

5.2. La chimiothérapie

L'addition concomitante et adjuvante du témozolomide à l'irradiation a permis d'améliorer la survie des patients de façon modeste mais significative (Stupp et al., 2005). Le témozolomide est administré *per os* à la dose de 75mg/m²/jour d'abord en prise quotidienne qui commence et finit avec la radiothérapie et dure 40 à 49 jours. Puis la chimiothérapie adjuvante comprend généralement 6 cycles de traitement. Chaque cycle utilise 150 à 200 mg/m² de témozolomide répartis en 5 jours successifs tous les 28 jours et répétés 3 fois. Le premier cycle adjuvant commence 5 à 6 semaines après la fin de la cure concomitante. Le témozolomide est désormais inclus dans le traitement standard des GBM. Lorsque l'état clinique des patients est incompatible avec cette association radiochimique, le traitement peut être réduit à du témozolomide seul, à une irradiation hypofractionnée ou à des soins de support.

Introduction bibliographique

5.3. Biothérapies

Sur la base de résultats d'essais non randomisés de phase II (Friedman et al., 2009; Vredenburgh et al., 2007), le bérvacizumab, un anticorps monoclonal neutralisant le VEGF a obtenu une approbation accélérée de la FDA pour être utilisé dans les GBM récurrents. Deux essais randomisés n'ont pas montré d'augmentation de la survie globale des patients (Chauffert et al., 2014; Chinot et al., 2014), mais le traitement par bérvacizumab peut être très actif sur les symptômes déficitaires réfractaires à la corticothérapie. Dans tous les cas, les glioblastomes résistent tôt ou tard au traitement anti-VEGF (Soffietti et al., 2014).

Les premiers travaux ciblant la forme mutée d'IDH1 avec un inhibiteur spécifique (AGI-5198) sont encourageants (Rohle et al., 2013).

Dans le cadre de l'essai français ACSE (Médecine de précision) la surexpression/amplification de *c-Met* sélectionne les patients pouvant bénéficier d'un inhibiteur spécifique.

Un essai clinique ayant utilisé un vaccin à base de cellules dendritiques matures immunisées par PEPvIII (*EGFRvIII-specific peptide*), un peptide immunogène d'EGFRvIII a été réalisé chez des patients atteints de glioblastome. Cette vaccination a donné une survie médiane ayant atteint 22,8 mois autorisant l'initiation d'autres essais cliniques (Sampson et al., 2009, 2010, 2011) .

5.4. Thérapies alternatives

Un traitement innovant attendu est une approche utilisant des courants alternatifs appelés TTFs (*Tumor Treating Fields*) de 100 à 300 KHz (Kirson et al., 2009). Cette stratégie a été testée avec succès dans les récidives des GBM puisqu'elle a donné des résultats comparables à la chimiothérapie en termes d'efficacité mais sans les effets systémiques indésirables (Stupp et al., 2012). Les seuls effets indésirables étaient des dermatoses de contact sur le cuir chevelu, facilement résolues par des dermocorticoïdes. Des essais cliniques utilisant ces dispositifs seuls ou en association avec le témozolamide sont en cours dans les GBM naïfs de traitement spécifique (ClinicalTrials.gov, NCT00916409) ou dans les récidives (ClinicalTrials.gov, NCT01954576, NCT01925573).

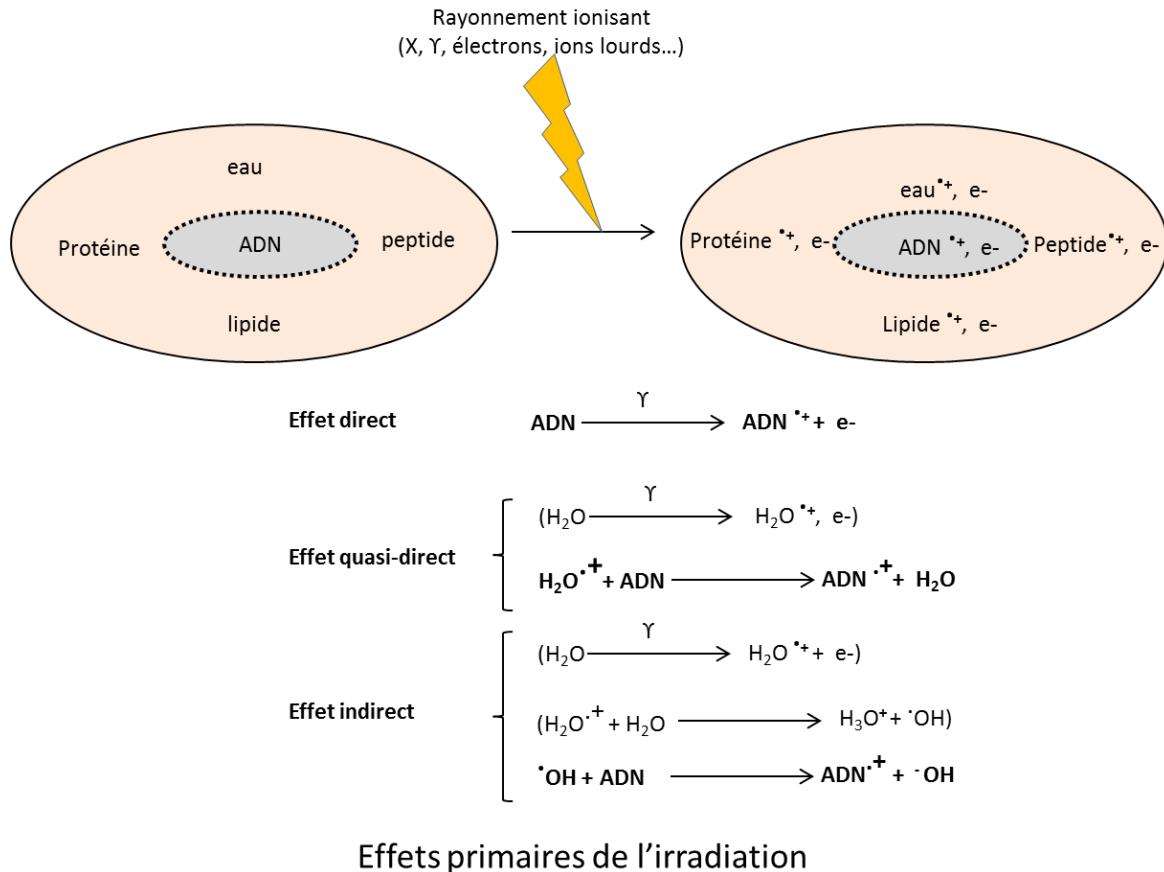


Figure 15. Effets primaires de l'irradiation.

Les différents composants des cellules peuvent être altérés par l'irradiation ionisante. Les effets primaires ciblant l'ADN ont été développés en exemple. D'après Gardès-Albert 2008.

II. CIBLER LA RADIRESISTANCE : UN ENJEU THERAPEUTIQUE DANS LE GLIOBLASTOME

La radiothérapie allonge la survie des patients. Elle n'entraîne pas une guérison du patient puisque des récidives surviennent tôt ou tard après le traitement. Elles ont la particularité de se produire le plus souvent dans le volume irradié (Chan et al., 2002; Lee et al., 1999). Cette particularité souligne la radiorésistance primaire élevée du GBM et suggère qu'une amélioration de l'efficacité de la radiothérapie prolongera la survie des patients. Pour ce faire, notre équipe de recherche a adopté la stratégie qui consiste à identifier et neutraliser les acteurs moléculaires impliqués dans la radiorésistance. Il s'agit de mécanismes inhérents aux cellules (radiorésistance intrinsèque) ainsi que des interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement (Amberger-Murphy, 2009; Barcellos-Hoff et al., 2009).

1 Généralités sur les radiations ionisantes

1.1. Les effets primaires de l'irradiation

L'irradiation de la matière vivante produit chronologiquement des perturbations physiques (ionisations et excitations) des atomes et molécules, des réactions physico-chimiques puis chimiques et finalement des effets biologiques (Tubiana M et al, 2008). Ces événements se succèdent dans le temps avant la première seconde ($1/10^{16}$ seconde) suivant l'irradiation pour ce qui est des excitation-ionisations, jusqu'à des années après l'irradiation pour la cancérisation par exemple. Certains effets ne seront manifestes que dans la descendance des êtres irradiés. Le phénomène primaire qui correspond à l'arrachement d'un électron du cortège électronique, i.e. l'ionisation produit un radical libre qui est une espèce très réactive quelle que soit la molécule ionisée (Figure 15). Dans la matière vivante, les molécules sont : l'eau, l'ADN, les protéines, les lipides et les peptides principalement. Ils produisent après irradiation des radicaux-cations notés eau^+ , ADN^+ , etc.

Introduction bibliographique

Dans l'organisme humain adulte, l'eau occupe une proportion qui atteint 65% du poids. Elle est une cible privilégiée de l'irradiation qui induit la formation du radical-cation H_2O^+ et sa base conjuguée qu'est le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$. Ces deux radicaux issus de l'eau sont des espèces radicalaires très néfastes pour l'organisme. On définit l'effet quasi-direct de l'irradiation qui résulte de la réaction entre les radicaux H_2O^+ et les molécules voisines autres que l'eau. L'effet quasi-direct forme d'autres radicaux libres tels que l' ADN^+ .

L'effet indirect est issu de la réaction entre les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et les autres molécules comme l'ADN ; il forme aussi des espèces radicalaires oxydées (de l'ADN par exemple). Les radicaux libres réagissent à la chaîne avec les molécules de l'organisme. Les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et les radicaux superoxydes O_2^- sont produits par la radiolyse de l'eau et sont à l'origine du stress oxydant. Ils génèrent aussi d'autres radicaux libres tels les peroxydes RO_2 et les alkoxydes RO^\cdot qui vont amplifier le phénomène.

1.2. L'effet radiosensibilisant de l'oxygène

L'oxygène présent dans le milieu au moment de l'irradiation potentialise son effet. Pour les réactions à faible TEL (Transfert d'Energie Linéique), il faut 2,5 à 3 fois la dose d'irradiation en anoxie pour obtenir le même effet qu'en milieu bien oxygéné. C'est ainsi qu'on définit l'OER (*Oxygen Enhancement Ratio*) qui est le rapport des doses produisant le même effet en anoxie et en présence d'oxygène en quantité suffisante. Cet effet radiosensibilisant de l'oxygène, peut s'expliquer (du moins en partie), par plusieurs mécanismes. Le premier mécanisme est le pouvoir électrophile élevé de l'atome d'oxygène. Cette électrophilie est due à la présence de 2 électrons célibataires périphériques dans son nuage électronique. L'oxygène se comporte donc comme un biradical qui, lorsqu'il capte un électron issu de l'ionisation, empêche toute recombinaison immédiate avec un cation. La deuxième raison est liée au fait que plusieurs réactions avec les produits de la radiolyse de l'eau ne se font qu'en solution oxygénée. En outre, les peroxydes et les hydroperoxydes produits en quantité dans les réactions radicalaires ajoutent leurs lésions à celles provoquées initialement par l'irradiation.

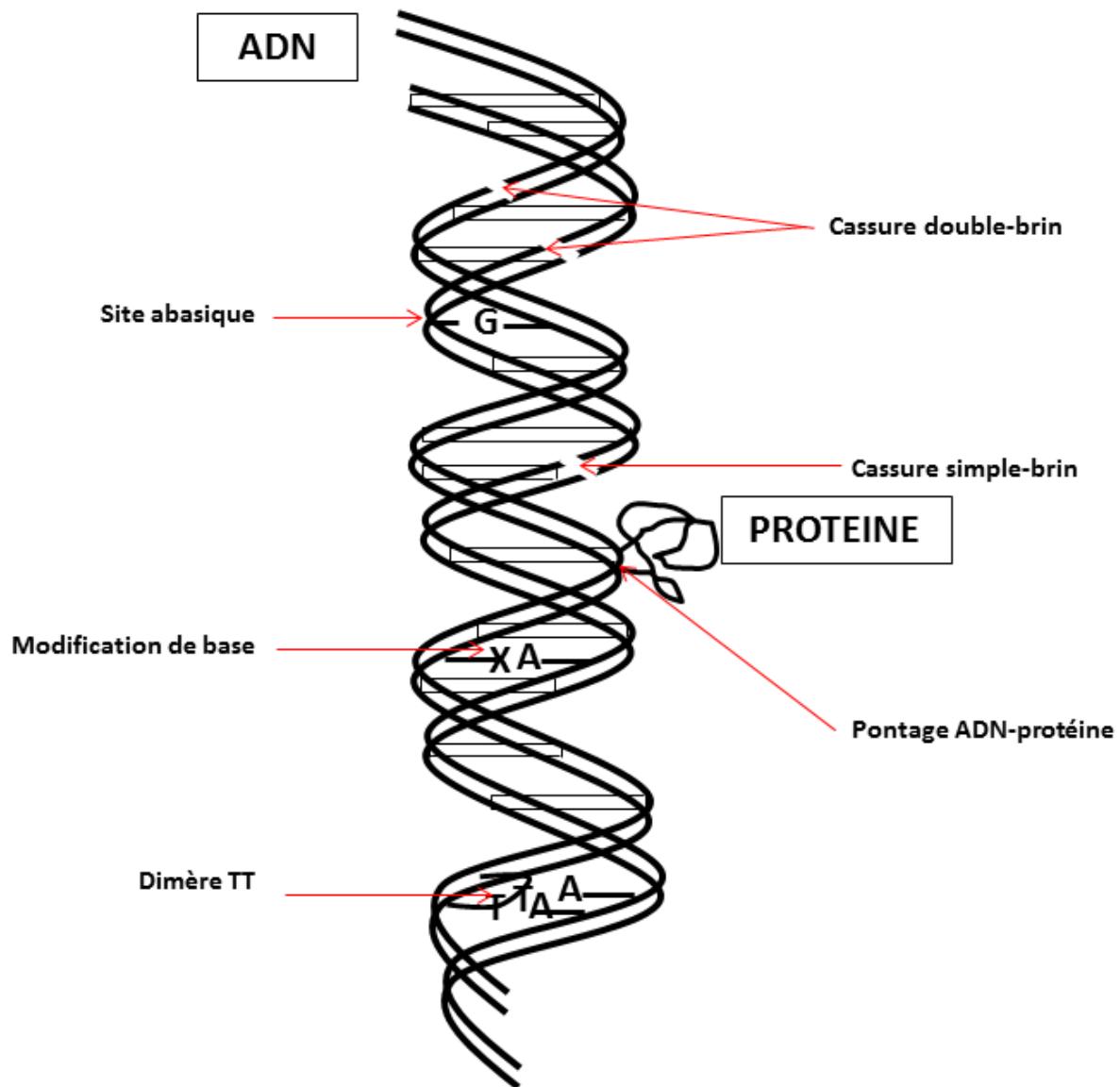


Figure 16. Dommages de l'ADN radio-induits.

2 Les cibles des radiations ionisantes

2.1. L'ADN

2.1.1. Les dommages d'ADN

Les rayonnements altèrent sans distinction les macromolécules biologiques : acides nucléiques, protéines, lipides et glucides. Du fait de son rôle central dans le métabolisme par l'intermédiaire des protéines codées et dans la transmission de l'information génétique, les dommages dans l'ADN ont des conséquences qui peuvent être gravissimes lorsqu'ils ne sont pas réparés. Les agents physiques comme les radiations ionisantes et les ultraviolets mais aussi les agents chimiques peuvent provoquer la stérilité, la mort cellulaire, des mutations, une instabilité génomique et des transformations malignes qui peuvent s'expliquer par les lésions dans l'ADN. Les atteintes de l'ADN sont diverses. Chaque type d'agent génotoxique induit avec préférence certaines lésions des molécules d'ADN selon les composants qu'il touche directement ou indirectement. Les radiations ionisantes peuvent provoquer (Figure 16):

- des altérations de bases par destruction partielle ou modification chimique ;
- des destructions du désoxyribose ;
- la formation de dimères de bases intracaténaires ou interchaînes, des pontages entre molécules d'ADN et des protéines ;
- des dommages multiples localisés (LMDS, *Locally Multiple Damage Sites*) (Goodhead, 1994; Ward, 1995) ;
- des cassures simple-brin de l'ADN (CSB) ;
- et des cassures double-brin de l'ADN (CDB).

Tout comme les rayonnements ionisants, les UV peuvent induire des lésions d'ADN. Les lésions plus ou moins spécifiques des UV sont les dimères de bases pyrimidiques, et les photoproducts 6-4. Ces photoproducts 6-4 peuvent subir un réarrangement moléculaire qui résulte en la formation de photoproducts Dewar ou isomères de valence Dewar. En dehors des facteurs exogènes physiques ou chimiques, le métabolisme normal en présence d'oxygène (métabolisme oxydatif), sans oublier les phénomènes épigénétiques, sont tous responsables de nombreuses lésions d'ADN que les cellules réparent au quotidien. En moyenne, le métabolisme normal produit 8 CDB par jour par cellule contre 40 CDB pour 1 Gy d'irradiation (Burkart et al., 1999; Ward, 1988).

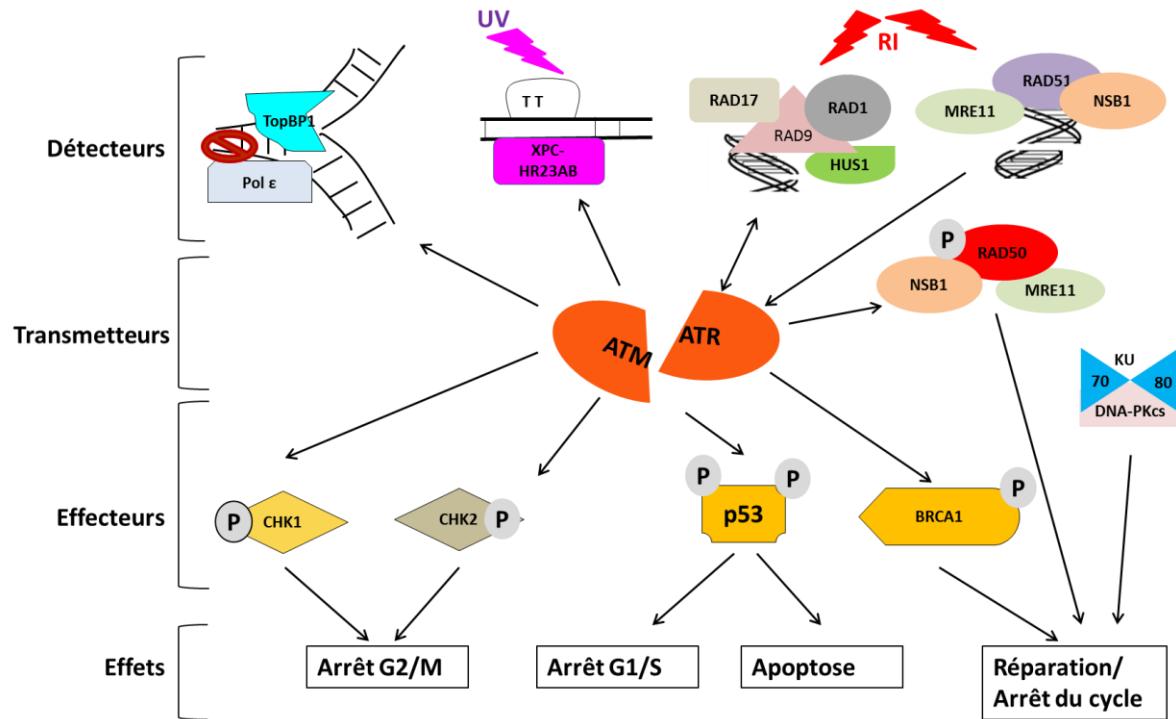


Figure 17. Schéma des cascades de signalisation initiées après endommagement de l'ADN.

ATM et/ou ATR sont les kinases qui transmettent aux protéines effectrices les informations concernant les dommages d'ADN détectés par les systèmes de surveillance. Selon la nature du dommage, les protéines de détection sont différentes. En fonction de l'ampleur du dommage et de la capacité de la cellule à réparer, les effecteurs imposent soit un arrêt du cycle et/ou la réparation, soit une entrée en apoptose. D'après Kara A. Nyberg et al., 2002.

2.1.2. La signalisation des dommages de l'ADN

Les dommages subcellulaires, en particulier les dommages de l'ADN, activent des voies de signalisation modulant la réponse cellulaire. La réponse aux dommages de l'ADN est l'une des réactions cellulaires les plus étudiées du fait non seulement de son ampleur et de sa complexité suite à l'exposition aux rayonnements ionisants, mais aussi de ses conséquences pour la cellule et l'organisme. De façon schématique, la signalisation des dommages de l'ADN se fait en plusieurs étapes successives (Figure 17) :

- la détection des lésions ;
- la transmission du signal ;
- l'activation des effecteurs ;
- l'exécution de la réponse cellulaire proprement dite.

Dans cette signalisation, l'étape initiale de détection est fonction de la nature de la lésion. Elle implique plusieurs protéines détectrices en général non-redondantes. Dans le cas des CDB, la détection est assurée par les complexes MRE11/RAD50/NBS1 qui reconnaissent la CDB ou le remodelage de la chromatine associé. La transmission passe par les protéines kinases ATM et ATR. Le choix entre ces deux dépend du type et du nombre des lésions. En général, ATM est activée par les CDB qui modifient la conformation de la chromatine et entraînent l'activation de complexes impliquant certaines protéines comme MRE11. Quant à ATR, elle est activée dans les lésions complexes comme les pontages ou par les blocages de la fourche de réPLICATION. Cependant, ces deux kinases de transmission du signal agissent le plus souvent ensemble puisque les lésions sont le plus souvent associées. Ensemble ou séparément, ATM et ATR phosphorylent un ou plusieurs résidus aminoacides des protéines effectrices pour les activer (Bakkenist and Kastan, 2003, 2004; Shiloh, 2001, 2003; Yang et al., 2003).

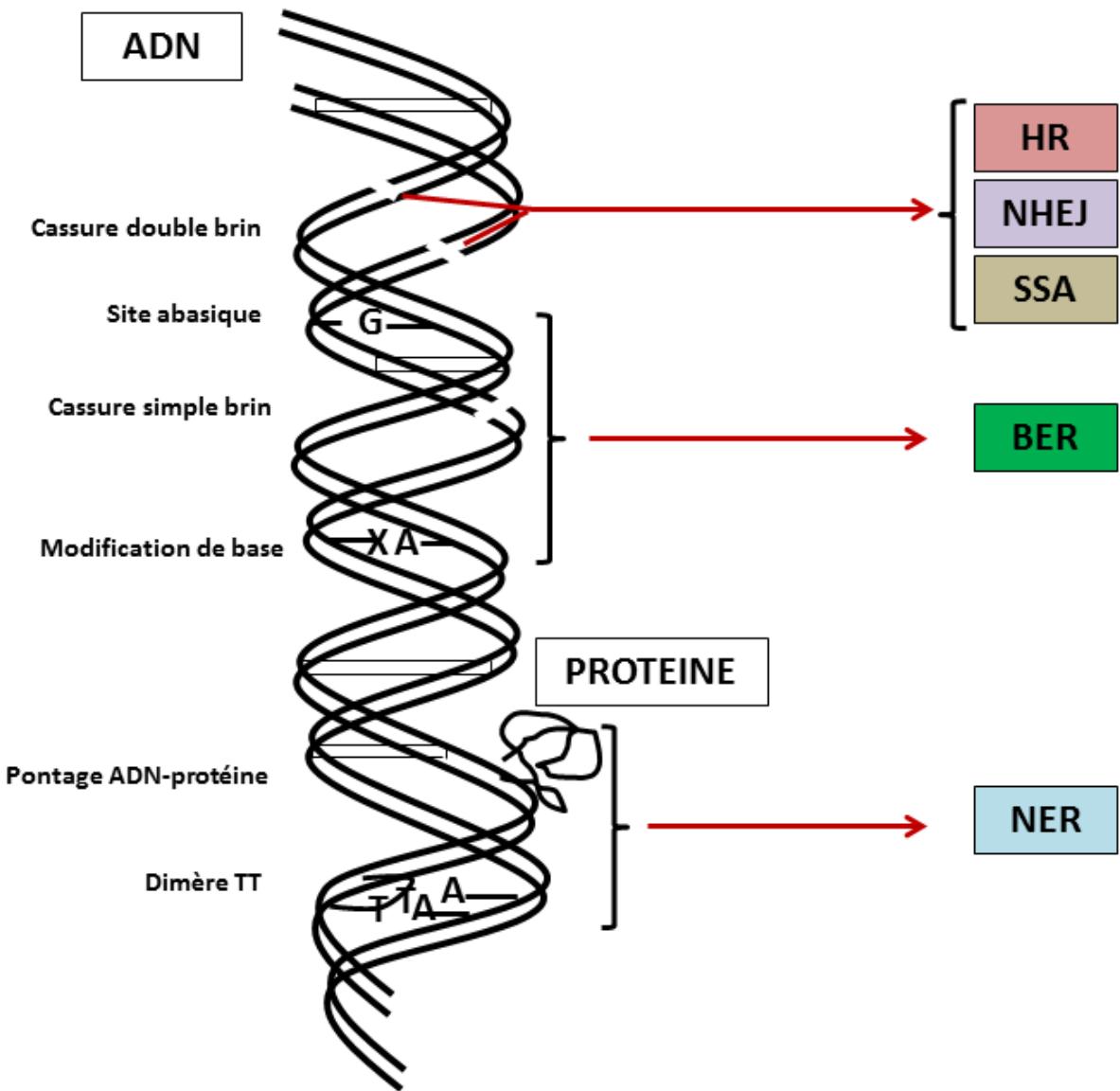


Figure 18. Systèmes cellulaires de réparation des dommages d'ADN.

A chaque type de lésion, un système de réparation est activé et ce en fonction de la phase du cycle cellulaire.

Introduction bibliographique

La phosphorylation de la protéine histone H2AX par ATM forme des γ H2AX qui se localisent au niveau de ces CDB où viennent aussi s'associer p53BP1 activée aussi par ATM (Marková et al., 2007; Scully and Xie, 2013). Les effectrices les plus connues sont : la protéine p53 qui gouverne le choix entre l'arrêt en G1/S et l'apoptose, les protéines CHK1 et CHK2 qui régulent l'arrêt en G2/M, les protéines impliquées dans les complexes de réparation des dommages d'ADN : MRE11/RAD50/NBS1, BRCA1 et les DNA-PKcs. Le résultat de ces activations peut être un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de la lésion. Mais lorsque la réparation est inopérante, il y a activation d'un mécanisme de mort cellulaire pour éliminer la cellule lésée.

Dans l'exécution des cascades, il y a l'activation de certains facteurs de transcription dont STAT3 et NF- κ B qui régulent l'expression de certains gènes dont les produits prennent activement part aux phénomènes impliqués (Kesanakurti et al., 2013). En plus de son rôle régulateur de la transcription, STAT3 activée par phosphorylation sérine 727 (pSTAT3-S727) participe physiquement à la protection contre le stress oxydatif en agissant dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Capron et al., 2014).

2.1.3. Réparation des dommages de l'ADN

Plusieurs systèmes de réparation des dommages de l'ADN ont été identifiés dans les cellules. Leur activation dépend en grande partie de la phase du cycle au cours de laquelle les dommages surviennent. Leur défaillance peut induire la mort cellulaire, des anomalies développementales, des dégénérescences tissulaires, le vieillissement, des instabilités génétiques et des cancers. La réponse des cellules tumorales à la radiothérapie dépend en grande partie de leur capacité à réparer les dommages radio-induits. En fonction de la complexité des lésions, le système enzymatique impliqué dans la réparation est mono-enzymatique ou multienzymatique (Figure 18). Les cassures les plus complexes comme les CDB peuvent impliquer plusieurs systèmes enzymatiques. En fonction de la voie utilisée, la réparation est plus ou moins fidèle. Les systèmes de réparations décrits sont spécialisés pour prendre chacun en charge des types de lésions bien particuliers :

- la réversion directe du dommage *in situ* répare les fragments d'ADN simple-brin ayant des groupements 3'OH à leur extrémité, les lésions photoréactions dues aux UV,

Introduction bibliographique

et les bases alkylées. Ce sont des systèmes monoenzymatiques qui s'en chargent. MGMT est l'enzyme réparant les bases alkylées ;

- la réparation des bases mésappariées est faite par le système Mismatch Repair (MMR) ;
- le système de réparation par excision de bases (BER, *Base Excision Repair*) prend en charge les CSB, les sites abasiques et les bases modifiées ;
- le système réparation par excision de nucléotides (NER, *Nucléotide Excision Repair*) s'occupe des lésions entraînant une déformation de l'ADN.
- la réparation des CDB est critique pour la survie cellulaire à l'irradiation. Elle sera donc plus détaillée ici.

2.1.4. La réparation des cassures double-brin

La réparation des CDB est indispensable à la survie et à l'intégrité de la cellule (Pfeiffer et al., 2000). Elle doit s'opérer avant la répartition du matériel génétique entre les cellules filles issues de la division cellulaire. Elle fait appel à trois mécanismes qui sont : la recombinaison homologue (HR, *Homologous Recombination*), la resoudure simple de l'ADN dite SSA (*Single Strand Annealing*) et la ligation non homologue ou NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*). Ces systèmes de réparation ont été très bien décrits chez la levure avant leur caractérisation chez l'humain. Contrairement à la levure qui privilégie la recombinaison homologue, les mammifères utilisent de façon préférentielle (80%) la voie NHEJ pour la réparation de CDB radio-induites (Kakarougkas and Jeggo, 2014). Le choix entre la recombinaison homologue et le NHEJ est orchestré par plusieurs acteurs dont p53BP1 et BRCA1 principalement (Daley and Sung, 2014). Le SSA reste un mécanisme minoritaire, utilisé principalement pour la réparation des séquences répétées comme *Alu* ou l'ADN ribosomal (Iyama and Wilson, 2013). Il est souvent rapproché à la recombinaison homologue mais il en diffère cependant du fait en partie de l'infidélité de la réparation qui en résulte (Haber, 2000).

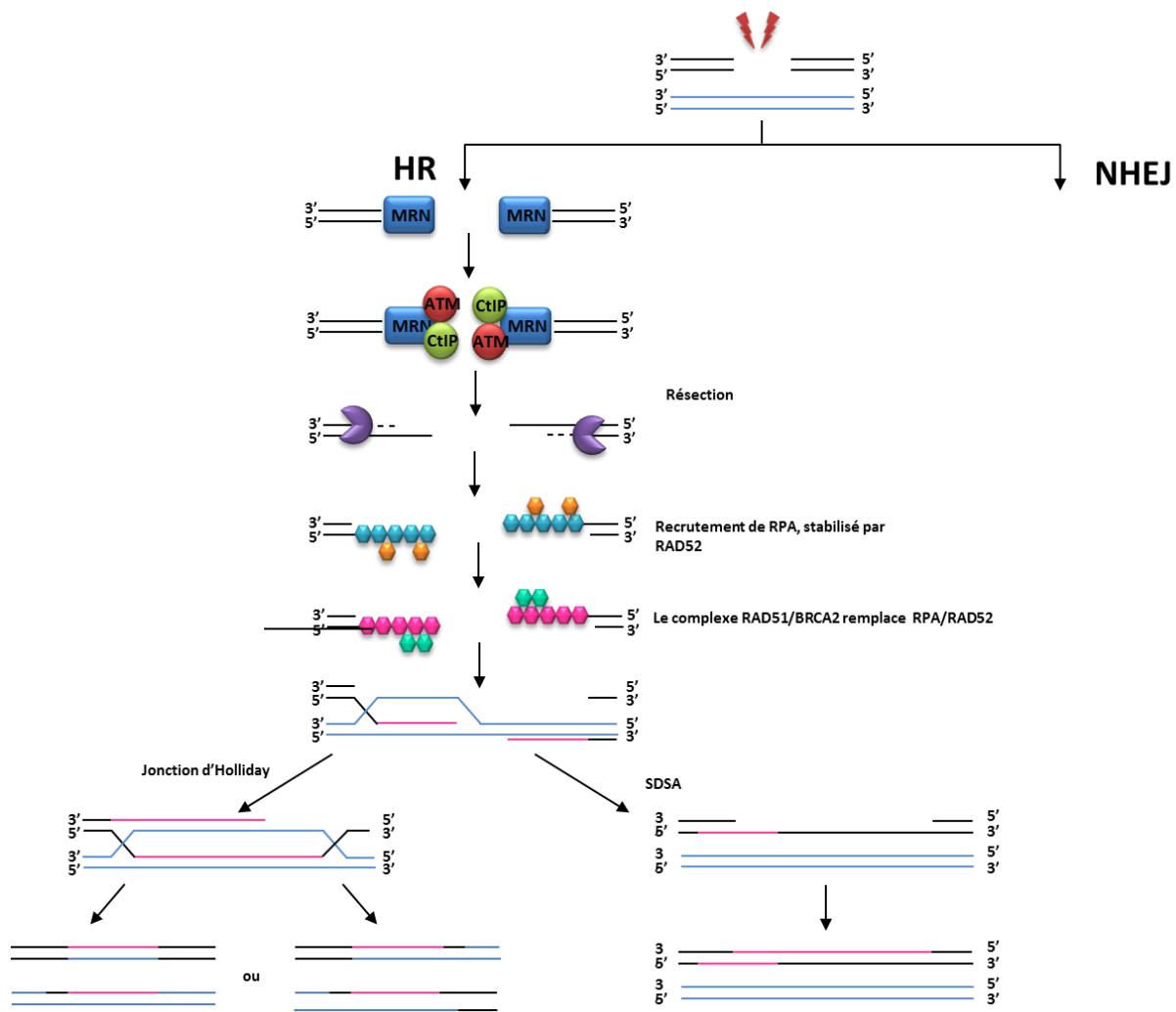


Figure 19. Réparation des cassures doule-brin par recombinaison homologue.

La recombinaison homologue est le système de réparation qui permet une restauration fidèle des cassures double brin. Elle n'est cependant opérable qu'aux phases S ou G2. D'après Teruaki Iyama et David M. Wilson III, 2013.

La recombinaison homologue

Elle répare les CDB au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire car elle nécessite une copie intacte de la séquence à reconstruire. Ce sont donc les séquences situées sur les chromatides sœurs ou les chromosomes homologues qui servent de modèle dans ce mécanisme (Figure 19). La recombinaison homologue se fait chez les mammifères selon des étapes moins bien connues que chez la levure. La reconnaissance de la cassure est faite par le complexe protéique MRN composé de MRE11, RAD50, NBS1(*Nijmegen Breakage Syndrome 1*) (Stracker and Petrini, 2011). MRN recrute ATM et ensuite CtIP (*C-terminal binding protein-Interacting Protein*) pour initier la résection 5'-3' des bouts d'ADN et libérer ainsi une extrémité débordante 3'. D'autres exonucléases comme EXO1 assistée de l'hélicase BLM participent à la résection. RPA stabilise ensuite le segment simple-brin libéré et recrute ATR par l'intermédiaire d'ATRIP. Puis RAD52 remplace RPA par RAD51 sous le contrôle de BRCA2. Les étapes suivantes impliquent la formation et la résolution des jonctions d'ADN dites jonctions d'Holliday qui font intervenir les nucléases GEN1 et SLX1/SLX4 et les hélicases WRN et BLM. Il en résulte des échanges de séquences d'ADN entre chromatides. Une alternative à la formation de jonctions d'Holliday est le mécanisme SDSA (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*) qui aboutit à une réparation sans échanges de segments entre les séquences d'ADN (Heyer et al., 2010).

La resoudure simple de l'ADN

C'est le SSA (*Single Strand Annealing*) qui répare l'ADN ribosomal et des éléments répétés non codants ; il n'a pas besoin de chromadide sœur. Elle implique RPA et RAD52, sans pour autant dépendre de RAD51(Iyama and Wilson, 2013; Rothenberg et al., 2008). Les nucléases ERCC1–XPB qui interviennent dans le système NER semblent participer aussi au mécanisme SSA.

La religation non homologue

C'est un système utilisé pour la réparation des CDB, mais aussi pour la recombinaison V(D)J assurant la diversité des immunoglobulines (Soulas-Sprauel et al., 2007) et pour la protection des télomères (Denchi and de Lange, 2007). Sa cinétique est assez simple dans la réparation des CDB: une reconnaissance des cassures, suivie d'un façonnage des extrémités altérées et finalement une ligature des bouts adéquats (Iyama and Wilson, 2013).

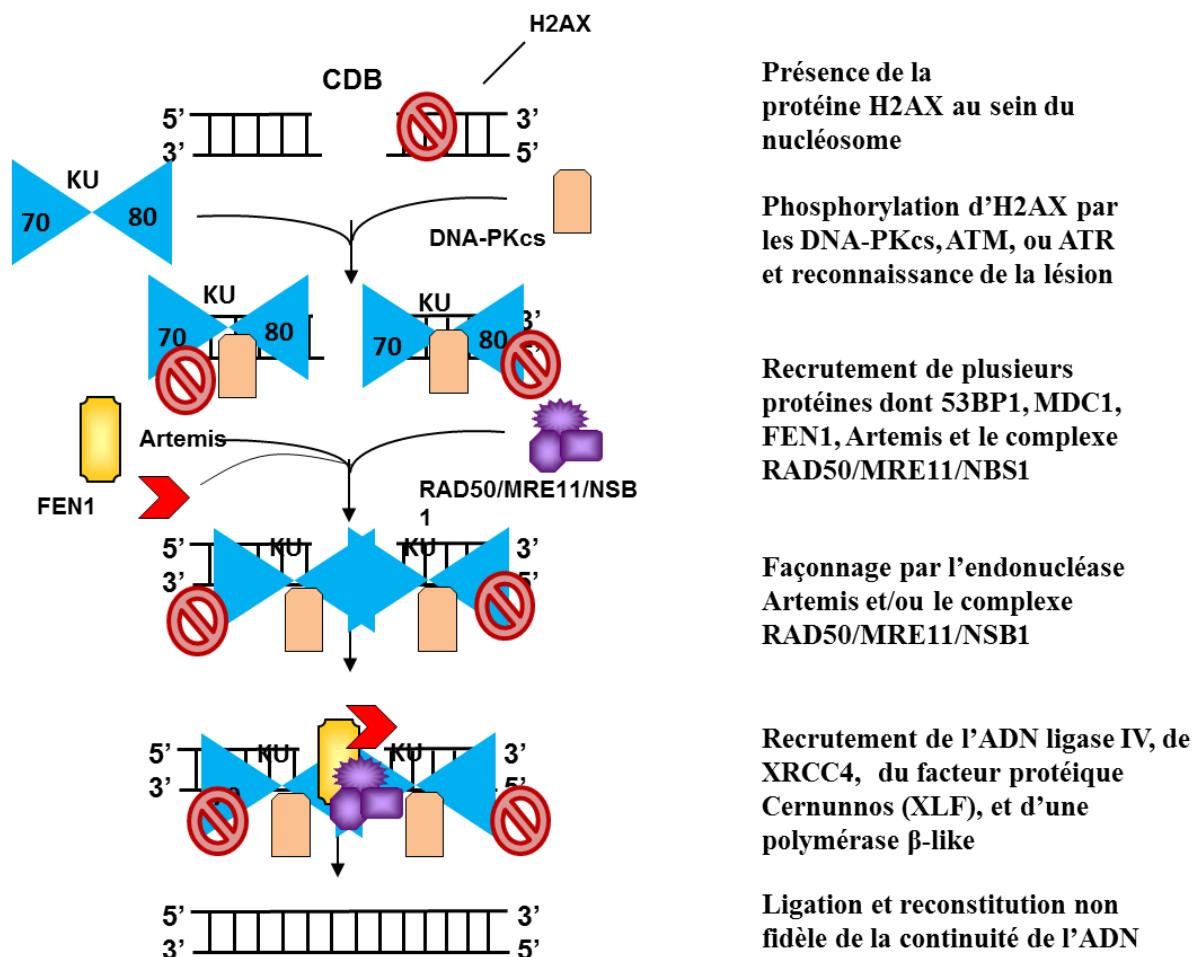


Figure 20. Réparation des CDB par religation non homologue (NHEJ).
D'après Stephen P.Jackson, 2002

Il a l'avantage d'être fonctionnel à toutes les phases du cycle mais a l'inconvénient d'occasionner une perte d'information génétique. Dans son déroulement (Figure 20), ce sont les héterodimères Ku70/Ku80 qui reconnaissent les bouts de cassures, s'y lient en premier et recrutent ensuite les sous-unités catalytiques des DNA-PKcs pour stabiliser et positionner les extrémités (Getts and Stamato, 1994). Dans certains cas, c'est l'endonucléase Artemis qui digère les extrémités 3' et 5' pour donner des bouts convenables. La ligature est assurée par le complexe XRCC4-ligase IV qui apporte PNKP pour enlever au préalable les groupements phosphates 3'P et 5'P résiduels. Les polymérasées μ et λ interviennent éventuellement pour combler les brèches (Andrade et al., 2009; Capp et al., 2006). A la fin du processus, XLF-Cernunnos se lie au complexe XRCC4-Ligase IV pour stimuler la fermeture complète du segment réparé (Ahnesorg et al., 2006).

2.1.5. Les inhibiteurs de la réparation des dommages de l'ADN

Les inhibiteurs de la réparation de l'ADN présentent un intérêt thérapeutique car ils sont potentiellement utilisables comme adjuvant à la radiothérapie ou à la chimiothérapie anticancéreuse. Ils peuvent être regroupés en quatre groupes:

- Ceux qui agissent au niveau du flux de précurseurs des nucléotides utilisés pour la réparation. C'est le cas de l'hydroxyurée.
- Ceux qui interfèrent avec les enzymes de la réparation ou de la réPLICATION ; l'1- β -D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C) appartient à cette catégorie.
- Ceux qui perturbent la signalisation des dommages ; les inhibiteurs de PARP en sont un exemple.
- Ceux qui diminuent ou bloquent les apports énergétiques nécessaires à la réparation: le 2-déoxy-D-glucose ou les autres antimétabolites du métabolisme énergétique.

Introduction bibliographique

2.2. Lipides et Protéines

2.2.1. Altération des lipides et des protéines

Les phospholipides membranaires et les lipoprotéines cellulaires peuvent subir des réactions de peroxydation à la chaîne avec les radicaux hydroxyles. Cela entraîne entre autres une diminution de la fluidité des membranes. (Albanese and Dainiak, 2003; Rhayem et al., 2008). Les acides aminés subissent quant à eux des réactions d'oxydation avec les radicaux hydroxyles. Il en résulte des fragmentations (en présence d'oxygène) ou des polymérisations (en absence d'oxygène) des chaînes peptidiques ou protéiques (Bonnefont-Rousselot et al., 1997). Ces réactions peuvent activer ou inactiver les sites catalytiques des enzymes cellulaires ou influencer l'activité des voies de signalisation intracellulaire partant ou non de la membrane plasmique.

2.2.2. Activation des voies de survie cellulaire ou amplification de l'activité de voies de signalisation initialement actives

L'irradiation peut induire une activation de récepteurs membranaires par action directe ou en entraînant une expression des ligands. Parmi les récepteurs radio-activables, l'EGFR ou ses variantes peuvent activer la cascade de signalisation pro-survie PI3K/Akt ou la voie des MAPK (Schmidt-Ullrich et al., 1996). L'importance de la voie Akt dans les gliomes a été développée dans notre article qui se trouve en annexes. L'activation de MAPK aboutit à la synthèse-relargage de TGF α qui peut induire la mort cellulaire par apoptose ou au contraire prolonger la survie cellulaire par activation de NF κ B. Un autre récepteur transmembranaire radio-activable est le récepteur de mort DR4, récepteur de TRAIL, (*TNF-Released Apoptosis-Inducing Ligand*) participant à la voie extrinsèque d'apoptose (Guan et al., 2001).

Les ligands comme les IL-1, 6, 8 et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) sont libérés en grandes quantités en période post-irradiation (Guan et al., 2001; Verrelle and Bourhis, 1997; Yang et al., 2006) et participent à l'activation des récepteurs ou à l'amplification des signalisations déjà actives.

Il y a des facteurs de transcription qui sont induits par les signalisations induites par l'irradiation : SRF (Serum Responsive Factor), TCF62, ELK1, AP1 et CREB. L'irradiation peut aussi activer des facteurs de transcription comme NF κ B et pSTAT3-Y705 qui interagissent physiquement pour induire ICAM-1 et ainsi activer la migration des cellules de GBM et favoriser l'invasion du tissu environnant (Kesanakurti et al., 2013).

En plus de ces effets de l'irradiation, il y a ceux qui sont dus aux espèces réactives de l'oxygène (*ROS, Reactive Oxygen Species*) qui augmentent à la suite de l'irradiation et activent d'autres mécanismes amplifiant les signaux radio-induits.

Introduction bibliographique

Enfin, l'irradiation active des enzymes comme les sphingomyelinases qui sont les principaux producteurs de céramides qui peuvent alimenter la voie d'apoptose portant leur nom, la voie des céramides (Kolesnick and Fuks, 2003).

3 Engagement vers les processus de mort cellulaire radio-induits

L'irradiation des cellules normales entraîne une diminution de la croissance cellulaire due à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort cellulaire radio-induite. Le mode de mort cellulaire radio-induite dépend de l'équipement génétique de la cellule et de la dose de radiation. On en décrit plusieurs modalités : la mort cellulaire immédiate, la mort par senescence, la mort mitotique, l'apoptose, l'autophagie et la nécrose.

De ces modalités, seules la mort immédiate et la mort mitotique ne sont pas génétiquement programmées. Etant donné que les cellules cancéreuses ont accumulé des mutations perturbant plusieurs voies de signalisation, l'exécution des cascades de signalisation de certains programmes de mort cellulaire sont tout aussi dérégulées dans ces cellules. C'est pourquoi les cellules cancéreuses ont en général une sensibilité différente des cellules normales vis-à-vis de certaines modalités de mort cellulaire. En particulier, dans les cancers avec inactivation de la voie p53 (>50% des cancers), l'apoptose est un mécanisme inopérant (Eriksson and Stigbrand, 2010; Hollstein et al., 1991; Soussi and Béroud, 2001). L'inactivation de la voie p53 accroît l'intérêt de l'étude des autres mécanismes de mort cellulaire non régulés par p53 comme la catastrophe mitotique et l'autophagie (Eriksson and Stigbrand, 2010).

3.1. La mort cellulaire immédiate

C'est une mort par épuisement de l'énergie disponible survenant quelques minutes à quelques heures après irradiation. Elle est amorcée par la suractivation de PARP-1 suite aux dommages de l'ADN et de ce fait s'apparente à un suicide cellulaire (de Murcia and Ménissier de Murcia, 1994; Schraufstatter et al., 1986). Elle reproduit des aspects morphologiques retrouvés dans la nécrose : la perte de l'intégrité de la membrane plasmatische, l'activation des lysosomes, la dégradation des mitochondries et d'autres organites intracellulaires.

3.2. La mort cellulaire par sénescence

C'est plus un arrêt irréversible du cycle cellulaire à la phase G1 qu'une mort cellulaire proprement dite. Elle est cependant considérée comme telle car les cellules perdent définitivement leur pouvoir de prolifération clonogénique. Elles restent cependant métaboliquement actives et peuvent rester dans cet état pendant longtemps.

Introduction bibliographique

Elle est initiée par l'accumulation de p53 qui induit la surexpression de *p21^{Waf1}*. C'est donc un mécanisme suppresseur de tumeur important dans la réponse aux traitements anticancéreux (Schmitt, 2007).

3.3. La mort cellulaire mitotique et la mort cellulaire différée

L'irradiation induit certains dommages comme les chromosomes dicentriques qui sont incompatibles avec la survie cellulaire et qui ne risquent pas d'être transmis aux cellules issues des divisions post-irradiation puisque ce sont des lésions d'emblée létales. Leur nombre va donc diminuer avec la succession des mitoses. En revanche, certaines lésions moins graves comme les translocations, les inversions et les courtes délétions sont compatibles avec la survie cellulaire. Au fil des divisions cellulaires, ces anomalies sont transmises aux cellules-filles mais une proportion variable de cellules issues des mitoses après irradiation meurt. C'est la mort cellulaire différée qui est responsable de colonies naines dans les tests de survie clonogénique.

La mort mitotique survient par perte de la possibilité de mitose symétrique due à la présence de dommages chromosomiques non réparés. Les cellules accumulent des micronoyaux ou deviennent binucléées ou géantes. Les micronoyaux se forment avec les chromosomes acentriques ou une multiplication inappropriée des centrosomes (Sato et al., 2000). L'élimination des micronoyaux par exocytose entraîne une perte fatale du matériel génétique. Un autre mécanisme de catastrophe mitotique a été décrit concernant les cellules avec inactivation de la voie p53. Dans celles-ci, l'abolition du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire entraîne une entrée des cellules en mitose malgré l'existence de dommages d'ADN non réparés (Ianzini et al., 2006). Ces deux mécanismes coexistent le plus souvent car l'absence de p53 inhibe l'induction de p21 qui devrait bloquer, lors des dommages d'ADN, l'activation des complexes CDK2-cycline A/E qui sont les initiateurs de la multiplication des centrosomes (Fukasawa, 2007, 2008; Hanashiro et al., 2008). L'aspect morphologique de la catastrophe mitotique est proche de la nécrose.

3.4. L'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire génétiquement programmée dont l'exécution passe par l'activation d'enzymes appelées caspases (*aspartic-acid-specific cystein proteases* ou *cysteinyl-aspartate-cleaving proteases*) qui dégradent des substrats indispensables à la vie de

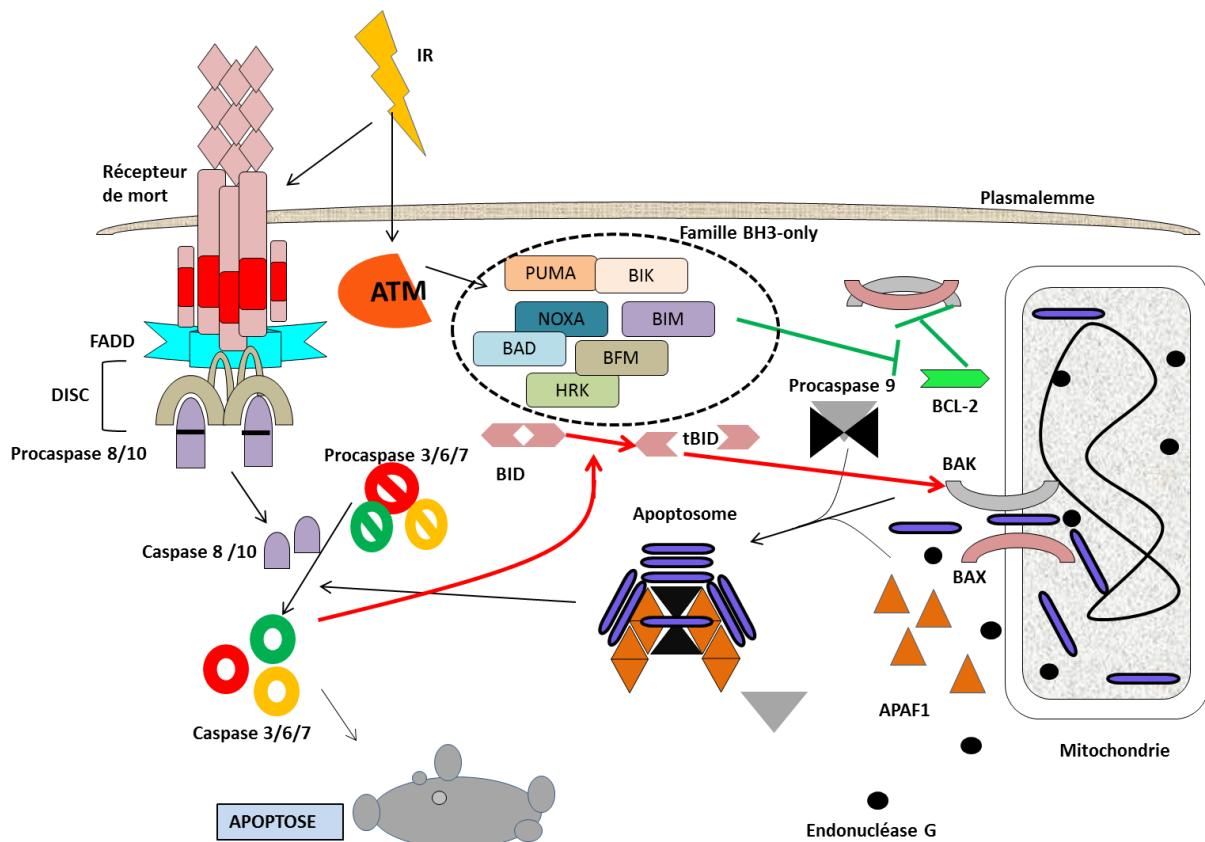


Figure 21. Voies intrinsèque et extrinsèque d'apoptose.

L'irradiation peut activer la voie intrinsèque, extrinsèque ou des céramides (qui ne sont pas représentée sur le schéma) pour induire l'apoptose. Elles aboutissent toutes à l'activation des caspases effectrices de mort. La protéine Bid permet le couplage entre ces deux voies. L'endonucléase G est libérée avec HTRA/OMI et Smac/DIABLO (non représentés) pour participer à la régulation de l'apoptose.

la cellule. Ce programme permet la régulation de l'homéostasie. L'irradiation peut activer le programme apoptotique selon trois mécanismes :

- l'activation de la voie intrinsèque d'apoptose ou voie mitochondriale ;
- l'activation de la voie extrinsèque d'apoptose ;
- l'activation de la voie des céramides.

L'activation de ces voies de signalisation aboutit à l'activation des caspases exécutrices qui clivent de nombreux substrats dits « de mort » : la vimentine, la lamine, et les protéines ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated Dnase*). Le clivage des ICAD lève leur inhibition sur les DNAses activables par les caspases. Ces DNAses fragmentent l'ADN cellulaire pour contribuer à la mort cellulaire. Les cibles des caspases incluent aussi PARP1, DNA-PKcs, la topoisomérase I et les ADN polymérases qui agissent dans la réparation des dommages de l'ADN et la conformation de la chromatine.

3.4.1. La voie intrinsèque d'apoptose

Elle est aussi dite voie mitochondriale car son mécanisme passe par des perturbations de l'intégrité de ces organites (Figure 21). La mitochondrie joue un rôle critique dans la survie cellulaire. La stabilité de la membrane mitochondriale dépend grandement d'un équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. De nombreux signaux pro-apoptotiques agissent par l'ouverture de pores dans la membrane mitochondriale externe. A l'inverse, les signaux anti-apoptotiques agissent en maintenant les pores de la membrane mitochondriale externe fermés. Toute perturbation entraînant l'ouverture de ces canaux provoque le relargage de nombreuses molécules parmi lesquelles le cytochrome C et les Smac/DIABLO. Les molécules de cytochrome C forment avec Apaf-1, un complexe moléculaire appelé apoptosome. L'apoptosome attire et convertit la procaspase 9 en caspase 9 activée. La caspase 9 activée clive les procaspases 3, 6 et 7 pour les convertir en caspases exécutrices. Dans les conditions normales, un certain nombre de protéines appelées IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*) est attaché aux procaspases et les inhibe. Cependant, les protéines Smac/DIABLO libérées de la mitochondrie lors du relargage du cytochrome C, antagonisent les IAPs pour empêcher l'inhibition des procaspases.

Suite à l'irradiation, la détection de CDB active ATM et/ou les DNA-PK qui phosphorylent p53 pour empêcher sa dégradation par le protéasome. p53 s'accumule, induit l'expression de *p21^{Waf1}*, et réprime l'expression des gènes de protéines anti-apoptotiques de la

famille Bcl-2 comme Bcl-2 et Bcl-X_L, tout en stimulant l'expression des protéines pro-apoptotiques de la même famille comme Bak et Bax.

Le déséquilibre en faveur des protéines pro-apoptotiques ouvre les pores mitochondriaux, laissant fuir non seulement le cytochrome C qui va activer la cascade des caspases, mais aussi l'endonucléase G et AIF qui vont dégrader l'ADN. Ces deux DNAses forment une voie d'apoptose intrinsèque, mitochondriale indépendante des caspases (Eriksson and Stigbrand, 2010; Riedl and Shi, 2004).

3.4.1. La voie extrinsèque d'apoptose

Elle est aussi appelée voie des récepteurs de mort. Les récepteurs de morts sont des récepteurs transmembranaires comme Fas, DR4, TNFR1, DR3 exprimés par certains types cellulaires. La liaison de chaque sous-unité du récepteur avec son ligand entraîne la formation d'un complexe actif. Chaque sous unité possède une région transmembranaire ayant un domaine appelé FADD (*FAS-associated death domain*). L'irradiation active certains récepteurs de mort comme Fas et TNFR1 pour induire majoritairement l'apoptose dans certaines cellules comme les lymphocytes ou certaines lignées de gliomes (Praveen and Saxena, 2013; 2001). Lorsque le récepteur est activé, les domaines FADD recrutent des protéines pour former un complexe appelé DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) qui attire et convertit les procaspases 8 et 10 en caspases initiatrices actives. Ces caspases initiatrices activées clivent directement les caspases exécutrices comme le fait l'apoptosome dans la voie intrinsèque. Le couplage des voies intrinsèque et extrinsèque d'apoptose peut se faire aussi un peu en amont des caspases exécutrices car les caspases activées par les récepteurs de mort peuvent cliver Bid en tBid. Ce dernier va à la membrane mitochondriale pour s'associer avec Bak ou Bax pour former les pores libérant le cytochrome C. Bid peut cependant être aussi activé par clivage par des protéases, notamment le granzyme B, la calpaïne, et les cathepsines.

3.4.2. La voie d'apoptose dépendant des céramides

Les céramides sont des sphingolipides formés d'une association d'un acide gras et de la sphingosine par une liaison amide. Ils entrent dans la constitution de la membrane plasmique. Les céramides sont impliquées dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires dont l'apoptose (Lahiri and Futerman, 2007; Ruvolo, 2003). Les voies de signalisation intracellulaires activées par les céramides aboutissent à un déséquilibre dans l'accumulation des protéines de la famille Bcl-2 pouvant expliquer leur mécanisme d'activation de l'apoptose.

En plus de ce mécanisme, les céramides peuvent activer aussi les récepteurs de mort et vice-versa (Grassmé et al., 2007; Gulbins and Grassmé, 2002; Ruvolo, 2003). Après l'irradiation, il y a des vagues d'accumulation de céramides dépendantes ou non d'ATM (Andrieu-Abadie and Levade, 2002; Gulbins and Kolesnick, 2002; Kolesnick and Fuks, 2003; Vit and Rosselli, 2003). Le rôle du métabolisme des céramides semble être important dans la radiochimiothérapie mais il a été récemment démontré que dans certaines lignées cellulaires de gliomes, l'apoptose induite par irradiation ou les alkylants ne passe pas par la voie intrinsèque des céramides (Gramatzki et al., 2013).

3.5.L'autophagie

Après irradiation, les cellules cancéreuses qui échappent à la mort immédiate ou à l'apoptose peuvent encore mourir par autophagie. Dans cette modalité de mort, les cellules dégradent leurs organites. Cette dégradation passe par l'internalisation des organites cellulaires dans des vésicules membraneuses intracellulaires formant des autophagosomes qui fusionnent avec des lysosomes pour former des autophagolysosomes (ou autolysosomes) dans lesquelles la digestion a lieu. La mort cellulaire par autophagie est une forme de mort cellulaire programmée puisqu'elle passe par l'exécution d'un programme génétiquement coordonné, tout comme l'apoptose (Denton et al., 2014). La mort par autophagie se caractérise morphologiquement par: une vacuolisation massive du cytoplasme, une accumulation des vésicules autophagiques délimitées par une double membrane biologique, une absence de condensation de la chromatine. Elle active peu ou pas la phagocytose lorsqu'elle survient *in vivo*. La protéine Becline-1 (appelée aussi Atg6) est considérée en pratique comme le marqueur d'activation de l'autophagie. Elle régule l'autophagie en jouant un rôle dans l'assemblage des autophagosomes (Kaza et al., 2012). L'autophagie peut cependant favoriser la survie cellulaire puisqu'elle permet parfois aux cellules de recycler leurs métabolites en cas de stress privatif. Les molécules ainsi recyclées leur assurent l'énergie et les métabolites intermédiaires suffisants pour maintenir leur viabilité. L'autophagie apparaît alors dans ces conditions comme un programme pour échapper à la mort immédiate radio-induite ou toute autre mort par privation (Zou et al., 2014). Elle pourrait alors jouer un rôle important dans les récidives tumorales. Becline-1, marqueur d'autophagie, est une protéine capable d'interagir par un domaine BH3 avec les protéines Bcl-2 et Bcl-XL. Cette interaction, observée dans certaines tumeurs, ne régule pas l'apoptose mais empêche Becline-1 d'activer l'autophagie.

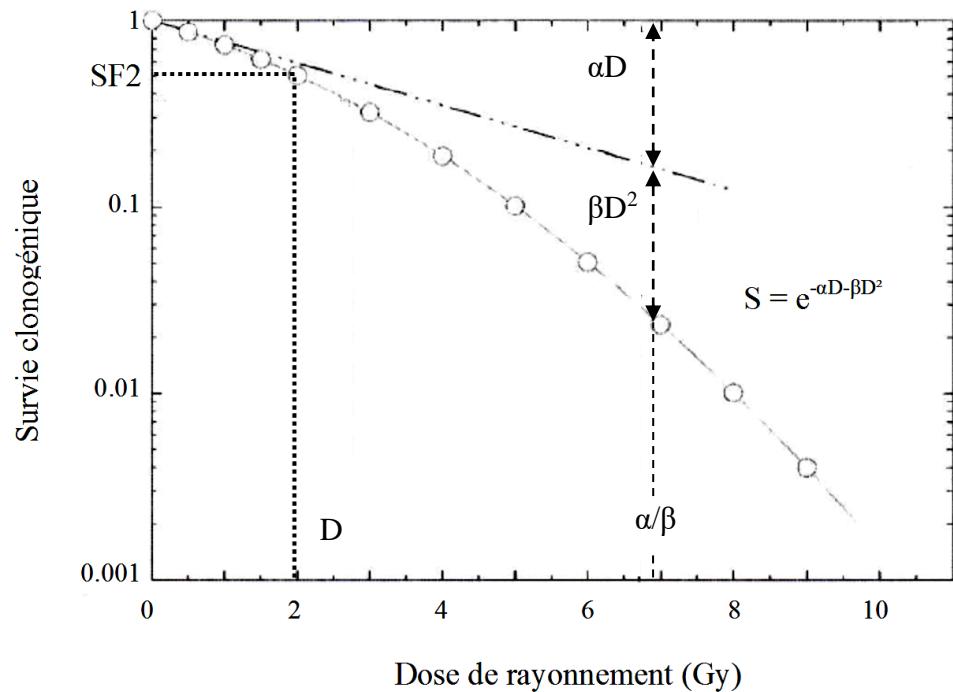


Figure 22. Courbe de survie clonogénique au rayonnement gamma de cellules humaines irradiées en dose unique.

D'après Favaudon 2008.

C'est pourquoi, en fonction de la tumeur ou de l'état métabolique des cellules, toute interférence avec le programme autophagique peut favoriser la survie ou à l'inverse entraîner la mort cellulaire (Levine, 2007; Yuan et al.).

4 Evaluation de la survie clonogénique à l'irradiation et radiosensibilité intrinsèque

Il est possible de décrire la réponse cellulaire au rayonnement à partir d'une évaluation de la survie cellulaire clonogénique à l'irradiation. Puisqu'il s'agit d'une survie clonogénique, elle n'est applicable qu'aux cellules capables de se diviser durant un certain nombre de générations. Cette évaluation rend directement compte de la capacité des cellules à générer un clone ou une colonie. Les techniques utilisées sont nombreuses et de plus en plus adaptées aux paramètres que l'expérimentation cible. Pour évaluer la radiosensibilité intrinsèque des cellules, une des techniques consiste à cultiver des cellules ensemencées à faible densité avant ou après irradiation à dose unique. On dénombre ensuite les colonies qui en résultent après un temps de culture suffisant pour la formation de colonies viables. En pratique, on dénombre les colonies d'au moins 50 cellules, correspondant au nombre moyen de cellules issues de 6 divisions successives. Un nombre inférieur correspondrait à des cellules engagées dans un processus de mort mitotique. La constance de la densité cellulaire à l'ensemencement est un paramètre à maîtriser pour une même expérience. Le taux de survie est mesuré pour chaque dose d'irradiation en dose unique, en faisant le rapport entre le coefficient de clonage après irradiation à cette dose sur le coefficient de clonage sans irradiation (dose zéro). La représentation de la diminution des taux de survie pour des doses croissantes d'irradiation établit une courbe de survie cellulaire. Par convention, elle est représentée en coordonnées semi-logarithmiques (Figure 22) : la dose en abscisses sur une échelle linéaire et la survie en ordonnées sur une échelle logarithmique. Elle suit alors une incurvation continue, et peut être ajustée au modèle linéaire quadratique selon l'équation: $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$; S étant la survie et D la dose de rayonnement. Le paramètre α est la tangente à l'origine de la courbe (droite en pointillés). Elle représente la part des lésions létale d'emblée, dues aux dommages non réparables comme les aberrations chromosomiques. Le paramètre β détermine la mortalité liée au carré de la dose. C'est le facteur quadratique ; il représente en partie, la contribution des lésions sub-létales telles que deux cassures chromosomiques relativement proches ($\leq 0.01\mu\text{m}$) pour favoriser un dommage létal. Une saturation des mécanismes de réparation est prise en compte dans ce paramètre.

Introduction bibliographique

En radiothérapie, on pratique habituellement des séances d'irradiation délivrant 2Gy par jour, jusqu'à atteindre la dose maximale tolérée par les tissus sains ; c'est le fractionnement. Il est possible donc de faire une extrapolation entre la fraction survivant à 2Gy (SF2) et la réponse à la radiothérapie.

La dose moyenne d'inactivation \bar{D} , c'est à dire l'intégrale de l'aire située sous la courbe de survie ou AUC (Area Under Curve) est un deuxième paramètre habituellement utilisé en radiobiologie. Lorsque la courbe suit un modèle linéaire quadratique, l'aire sous la courbe est définie par l'intégrale :

$$\bar{D} = \int_0^{+\infty} e^{-\alpha D - \beta D^2} dD$$

Les paramètres influençant la survie cellulaire à l'irradiation sont liés à la radiorésistance intrinsèque des cellules mais aussi à l'environnement. C'est pourquoi, l'irradiation des cellules isolées permet de s'affranchir au mieux de l'effet du contact intercellulaire qui influence la sensibilité des cellules (Guichard et al., 1983). En plus de l'effet contact, un phénomène connu sous le nom d'« effet bystander », ou « effet de proximité » met en évidence une participation de l'environnement à la réponse cellulaire ou tissulaire à l'irradiation. En effet, des cellules non irradiées situées à une distance relativement proche des cellules irradiées présentent ou subissent les effets de l'irradiation. La sécrétion de facteurs solubles comme les facteurs de croissance, les chimiokines et autres cytokines, les ROS, le cytochrome C et bien d'autres médiateurs ont été proposés pour expliquer ce phénomène mais des interrogations subsistent toujours (He et al., 2012; Suzuki and Yamashita, 2014).

5 Déterminants de la radiorésistance des glioblastomes

5.1.Hypoxie et angiogénèse

L'hypoxie se définit comme une baisse de la concentration ou de la pression partielle en oxygène (pO_2) dans un tissu en deçà de la limite inférieure normale. Dans le cerveau, la concentration en oxygène normale varie entre 2,5 et 12,5%, correspondant à une pO_2 comprise entre 20 et 100 mmHg. En revanche dans les GBM, la concentration en oxygène varie dans un intervalle très nettement inférieur à ces valeurs ; elle peut même descendre jusqu'à 1% (0,75 à 4 mmHg). L'hypoxie est donc une caractéristique de ces tumeurs. Il a même été démontré qu'elle s'aggrave avec le grade tumoral (Bar, 2011; Evans et al., 2004). De façon générale, la vascularisation tumorale est telle qu'on distingue un réseau vasculaire plus dense en périphérie qu'au centre. La croissance cellulaire cancéreuse plus rapide que

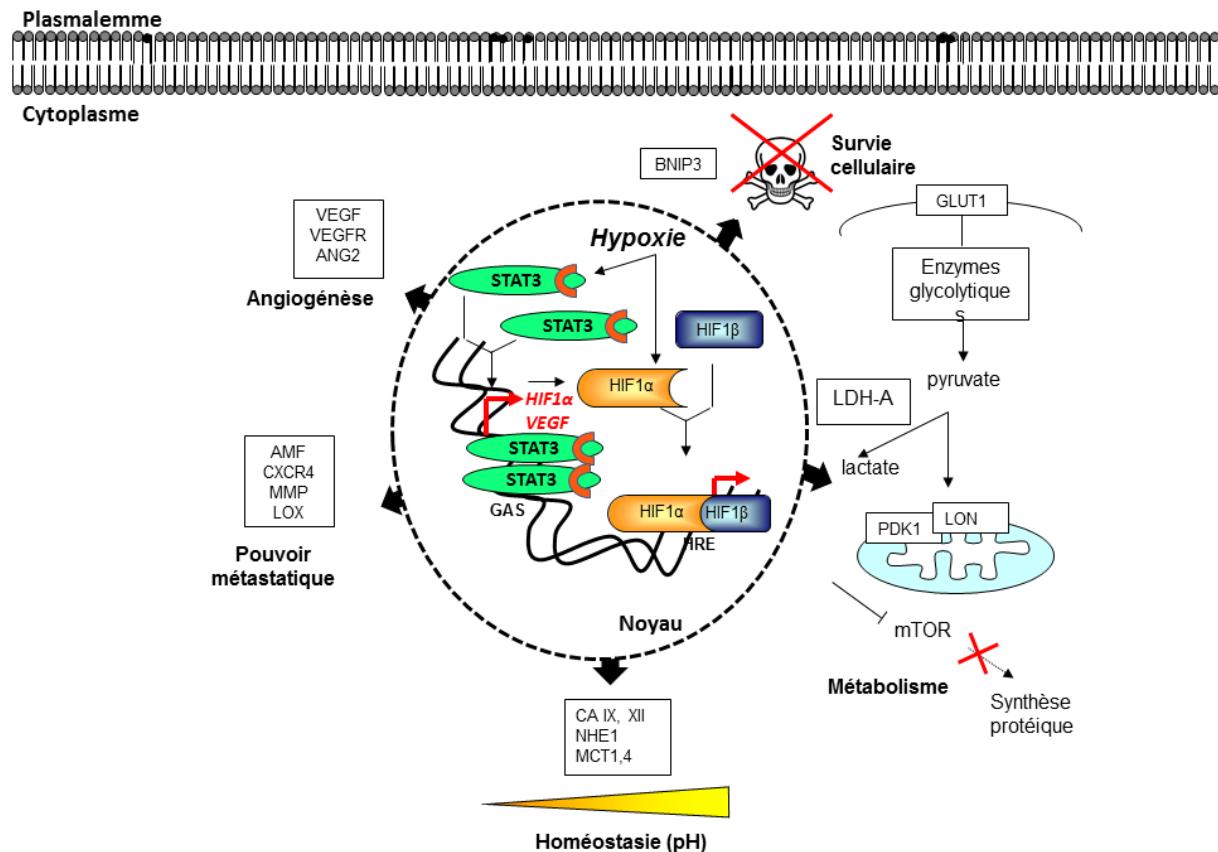


Figure 23. Interconnexion des voies de signalisation STAT3 et HIF dans l'hypoxie.

L'hypoxie entraîne une accumulation de pSTAT3-Y705 et active HIF. Les dimères STAT3 et HIF régulent sont transférés au noyau où ils se lient aux éléments de réponse GAS et HRE respectivement. STAT3 induit l'expression de VEGF et de HIF1 α . HIF induit l'expression de VEGF et de bien d'autres gènes impliqués dans des fonctions biologiques variées.

Introduction bibliographique

l’angiogenèse (péphérique) éloigne progressivement certaines cellules des apports en oxygène. Ces cellules finissent par se retrouver au-delà de la limite de diffusion de l’oxygène qui est de 150 µm, donc en zone hypoxique. La croissance tumorale n’explique pas à elle seule l’hypoxie tumorale, les métabolites libérés par les cellules y contribuent. L’hypoxie très sévère est responsable en partie des nécroses centrotumorales habituelles dans les GBM et d’autres cancers. Cependant, les territoires tumoraux hypoxiques sont avec les périphéries vasculaires les 2 principales niches des cellules souches cancéreuses de GBM (Calabrese et al., 2007; Filatova et al., 2013). Les cellules de GBM soumises au stress hypoxique y répondent de diverses façons. L’hypoxie entraîne l’activation (dans les cellules) d’un facteur de transcription hétérodimérique appelé HIF (Hypoxia-Inducible Factor). HIF est constitué de 2 sous-unités HIF1 α et HIF1 β . C’est un facteur de transcription qui, normalement, subit un cycle futile (synthèse-dégradation continue) induite par l’hydroxylation de la sous-unité HIF1 α . En condition hypoxique, il y a inhibition de l’hydroxylation, ce qui stabilise le dimère et entraîne son accumulation puis son transfert vers le noyau pour se lier aux éléments de réponse HRE (*Hypoxia Response Element*) et réguler des gènes-cibles impliqués dans le contrôle de la survie cellulaire, du métabolisme des lactates, des glucides et des protéines, de l’homéostasie, du pouvoir métastatique et de l’angiogenèse (Brahimi-Horn et al., 2007). Il a été démontré que l’activation de HIF est amplifiée par celle de STAT3 car l’hypoxie induit également pSTAT3-Y705 qui augmente l’expression de *HIF1 α* et de *VEGF* (Kang et al., 2010). L’expression de *VEGF* subit alors un double contrôle positif en condition hypoxique, par HIF et par pSTAT3-Y705 (Figure 23). C’est pourquoi l’hypoxie est un puissant stimulateur de la néoangiogenèse tumorale. La néoangiogenèse tumorale est aussi soutenue par d’autres facteurs comme Foxm1(Forkhead Box m1), facteur de transcription exprimé par les GBM et qui induit aussi l’expression de *VEGF* (Zhang et al., 2008). La néoangiogenèse met cependant en place une vascularisation anormale du fait de la présence de shunts anormaux. L’anomalie de la néovascularisation tumorale réside aussi dans la vasculature qui perturbe les échanges, contribuant ainsi à entretenir l’hypoxie (Mustafa et al., 2013).

5.2. Cellules souches

Les glioblastomes sont des tumeurs hétérogènes. Pami les sous-populations cellulaires qui les composent, on décrit les cellules souches tumorales ou cellules initiatrices qui ont la capacité de former ou régénérer la tumeur. Elles possèdent certaines capacités propres aux cellules souches neurales : autorenouvellement, différenciation en neurones, astrocytes et

Introduction bibliographique

Introduction bibliographique

oligodendrocytes. Elles ont en plus la capacité de former des tumeurs phénotypiquement identiques à celle d'origine lorsqu'elles sont injectées à des souris immunodéficientes (Singh et al., 2003). Elles expriment des marqueurs CD133 ou *prominin-1*. Il a cependant été décrit une sous-population tumorale n'exprimant pas le CD133 mais qui est capable de générer des tumeurs en xénogreffe intracrânienne chez des souris (Chen et al., 2010). Les cellules souches de GBM sont entretues dans les niches vasculaire et hypoxique (Calabrese et al., 2007; Filatova et al., 2013). L'étude de cette sous-population est importante parce qu'elle a la particularité d'être plus résistante à la radiothérapie et à la chimiothérapie (Bartek et al., 2012) que les autres populations cellulaires tumorales. Du fait de cette résistance, elles constituent la sous population cellulaire qui résiste au traitement pour ensuite proliférer et constituer la récidive. Leur grande capacité à réparer les dommages d'ADN radio-induits explique en partie leur résistance à la radiothérapie. Ces cellules activent en particulier la voie STAT3 surtout pSTAT3-S727 pour résister à l'irradiation avec témozolomide (Villalva et al., 2011).

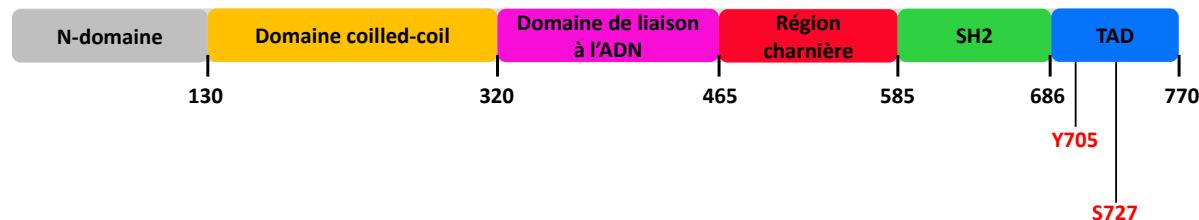


Figure 24. Structure de la protéine STAT3 avec ses domaines fonctionnels.

- Le domaine N, permet la dimérisation des monomères de STAT3, la translocation nucléaire, la déphosphorylation, la phosphorylation médiée par le récepteur ;
 - Le domaine coiled-coil permet l'interaction protéine-protéine ;
 - Le domaine de liaison à l'ADN, est impliqué dans la fixation de STAT3 sur les promoteurs des gènes cibles ;
 - Le domaine SH2 permet la dimérisation entre deux protéines STAT3 ;
 - Le domaine de transactivation (TAD) active la transcription des gènes cibles.
- D'après Aggarwal *et al.*, 2006.

III. LA PROTEINE STAT3 DANS LES GLIOMES

1 La famille des protéines STATs

Les protéines STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) forment une famille de transducteurs de signaux et de facteurs de transcription comprenant 7 membres appelés STAT1 à 4, STAT5a, STAT5b, STAT6 (Furqan et al., 2013a). Elles sont activées par des tyrosine-kinases comme les JAKs associées aux récepteurs membranaires et par les récepteurs membranaires à activité tyrosine-kinase comme PDGFR, EGFR, FLT3. Elles sont activables aussi par les tyrosine-kinases intracellulaires non associées à des récepteurs, comme c-Src, Bcr-Abl, et Brk (Breast tumor kinase) (Buettner et al., 2002; Weaver and Silva, 2007).

La phosphorylation des protéines STATs sur des résidus tyrosine spécifiques provoque leur homo- ou hétérodimérisation, puis ces dimères subissent un transfert les localisant dans le noyau où ils interagissent avec l'ADN pour réguler l'expression de gènes spécifiques. Les protéines STATs sont codées chacune par un gène différent. Elles ont cependant une structure similaire avec 6 domaines conservés. De l'extrémité N- à l'extrémité C-terminale, on distingue (Figure 24) :

- un domaine d'oligomérisation ;
- un domaine dit « coiled coil » ;
- un domaine de liaison à l'ADN ;
- un domaine charnière ;
- un domaine SH2 ;
- un domaine de transactivation (Aggarwal et al., 2006).

Pour les STAT1, 3 et 5, il existe des isoformes tronquées appelées STAT β qui sont produites par épissage alternatif ou clivage protéolytique et qui sont des régulateurs négatifs des isoformes complètes notées STAT α (Furqan et al., 2013a).

Sur un plan physiologique, les STAT2, 4 et 6 sont des régulateurs du système immunitaire alors que STAT1, 3 et 5 sont impliquées dans la régulation de fonctions biologiques variées. En particulier, elles régulent l'expression des gènes de prolifération comme *c-Myc*, du cycle cellulaire comme les *Cyclines D1 et D2*, et de survie tels *Bcl-xL*, *Bcl-2* et *Mcl-1*. Elles régulent aussi les gènes comme *HIF1 α* et *VEGF* impliqués dans l'angiogenèse. Du fait de leur participation au contrôle de fonctions physiologiques très importantes, les protéines STATs sont finement régulées et subissent un cycle d'activation-désactivation en fonction des besoins. Toute perturbation à un quelconque niveau des mécanismes de

Introduction bibliographique

Moyens	Mécanisme d'action
Acide oléanolique	Suppression de la sécrétion de l'IL10 qui empêche la polarisation M2 des macrophages associés aux tumeurs.
LLL12 LLL3	Supprime la phosphorylation de STAT3, inhibe la liaison de STAT3 à l'ADN.
WP1193	Inhibiteur de la voie JAK2/STAT3 dans les cellules souches de GBM, induisant un arrêt du cycle en G1.
RNAi	Inhibent l'accumulation de cycline D1 dans les cellules de gliomes.
Oligodéoxynucléotides	Induisent l'arrêt du cycle et l'apoptose en mimant les éléments <i>cis</i> -régulateurs spécifiques fixant les dimères STAT3.
AG490	Inhibe JAK2 entraînant une diminution de l'activation de STAT3 ainsi que l'expression des gènes <i>MMP-2</i> et <i>MMP-9</i> . Inhibe l'invasion tumorale.

Tableau 6. Différentes approches de thérapie anticancéreuse ciblant STAT3

Les oligodeoxynucléotides sont les premiers inhibiteurs sélectifs de STAT3 à avoir été utilisés en essai clinique chez l'homme (www.clinicaltrials.gov, NCT00696176). D'après Kim *et al.*, 2014

contrôle en amont ou de rétrocontrôle négatif peut entraîner une suractivation anormale de ces protéines pouvant favoriser ou provoquer des pathologies cancéreuses. En l'occurrence STAT3 et 5 sont hyperactivées dans certains cancers où elles participent à la carcinogénèse (Furqan et al., 2013b; Lavecchia et al., 2011; Yu and Jove, 2004) ou simplement à la survie des cellules déjà transformées (Catlett-Falcone et al., 1999). L'inhibition des protéines STAT3 et 5 a souvent été associée à un arrêt de croissance des cellules cancéreuses. Les cellules normales en revanche ne semblent pas dépendre d'un haut niveau d'activation de ces protéines pour leur croissance normale (Yu and Jove, 2004). De ce fait, ces protéines ont été proposées comme des cibles intéressantes (Tableau 6) pour le développement de thérapies anticancéreuses (Furqan et al., 2013b; Kim et al., 2014).

2 Du gène au facteur de transcription STAT3

Le gène *STAT3* est situé dans la région génomique 17q21.31 et s'exprime de façon ubiquitaire chez l'humain au cours du développement et dans les étapes ultérieures de la vie. Un épissage alternatif et/ou un clivage protéolytique par des enzymes comme la calpaïne permettent l'existence de l'isoforme complète STAT3 α ayant une taille de 89 kDa et constituée de 770 aminoacides et celle de l'isoforme STAT3 β tronquée des 48 aminoacides C-terminaux (Hendry and John, 2004). Cette isoforme tronquée agit comme un modulateur de l'activité de l'autre en tant que dominant négatif (Caldenhoven et al., 1996). C'est en réponse à des stimuli variés intracellulaires ou provenant de l'environnement que la protéine latente dans le cytoplasme est activée par des modifications post-traductionnelles. Il est décrit une activation canonique par phosphorylation du résidu tyrosine 705 (pSTAT3-Y705) qui autorise l'homodimérisation STAT3-STAT3 et l'hétérodimérisation STAT3-STAT1 suivi du transfert nucléaire (Vallières and Rivest, 2000). Cette activation canonique succède à l'activation principalement des récepteurs aux cytokines de la famille de l'interleukine-6 (IL-6R), des récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGFR, le PDGFR ou à celle des kinases intracellulaires. Au niveau de l'ADN, les dimères de STAT3 se fixent aux éléments de réponse de séquence consensus TTN₄₋₅AA appelés GAS (*Interferon Gamma-Activated Sequence*) contigus aux promoteurs des gènes qu'ils régulent (Darnell et al., 1994; Hervas-Stubbs et al., 2011). En plus de cette activation canonique, la phosphorylation du résidu sérine 727 (pSTAT3-S727) a été récemment associée à des fonctions biologiques importantes dans les gliomes et plusieurs autres cancers, indépendamment de l'activation canonique pSTAT3-Y705 (Qin et al., 2008; Villalva et al., 2011). Ces nouveaux résultats suggèrent de prendre

Introduction bibliographique

en compte cette forme d'activation de STAT3 dans les stratégies de ciblage à but thérapeutique. Pour ce faire, il est important de reconsidérer l'activation de STAT3 sur ces deux résidus pour mieux comprendre leur contribution à la pathologie cancéreuse gliale.

3 Rôle de STAT3 dans le développement

Des mutations hétérozygotes inactivant *STAT3* ont été décrites chez l'homme et associées au Syndrome d'hyper-IgE autosomique dominant (AD-HIES, *Autosomal Dominant Hyper-Immunoglobulin E Syndrome*) plus connu sous l'appellation syndrome de Job (Buckley et al., 1972; Davis et al., 1966; Holland et al., 2007; Minegishi et al., 2007). Ce syndrome congénital est caractérisé par un déficit immunitaire touchant les lymphocytes Th17, Tfh, mémoires B, et T CD8+. Il comporte aussi une susceptibilité à des lymphomes B et à des infections diverses ainsi qu'une hyper-immunoglobulinémie E (Tangye, 2014).

Des travaux ultérieurs démontrent que l'invalidation (*Knock out*) homozygote de *STAT3* chez la souris est létale à la période embryonnaire du développement par dégénérescence entre les jours 6,5 et 7,5 (Takeda et al., 1997), confirmant le rôle fondamental de STAT3 dans le développement. Ces travaux suggèrent cependant que chez l'humain, l'expression d'une seule copie normale de *STAT3* était suffisante pour un développement normal mais insuffisante pour une bonne fonction immunitaire. L'invalidation conditionnelle de *STAT3* dans les lignées lymphocytaires reproduit partiellement le phénotype AD-HIES. De plus les souris transgéniques exprimant une mutation *STAT3* retrouvée chez l'homme manifestèrent le phénotype AD-HIES complet, confirmant ainsi le lien entre les mutations de *STAT3* et le syndrome AD-HIES (Kane et al., 2014; Steward-Tharp et al., 2014). De la même façon, l'hyperactivation congénitale de STAT3 chez l'homme par des mutations localisées dans le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de dimérisation de la protéine a récemment été décrite comme établissant un phénotype anormal associant des manifestations auto-immunes de plusieurs organes à plusieurs désordres immunitaires. Cette découverte confirme le rôle de STAT3 dans le développement et particulièrement dans la maturation fonctionnelle des cellules immunitaires (Haapaniemi et al., 2014). Cependant, ces données n'ont pas permis de comprendre le rôle de l'activation de STAT3 retrouvée dans les pathologies comme le gliome où l'anomalie immunitaire n'est pas la manifestation principale.

Nous sommes préparons une revue de la littérature concernant le rôle de l'activation de STAT3 par phosphorylation S727 et Y705 dans les gliomes. Elle résume les mécanismes impliqués dans ces phosphorylations activatrices ainsi que les conséquences de celles-ci dans la gliomagenèse et l'échappement des glioblastomes aux défenses immunitaires et au traitement standard.

Revue de la littérature en préparation

Role of STAT3 activation in glioblastoma aggressiveness

Zangbéwendé Guy Ouédraogo, Pierre Verrelle and Emmanuel Chautard

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and malignant type of gliomas, the most common primary tumors of the central nervous system. The first line setting of GBM patient treatment encompasses surgery with concomitant and adjuvant chemotherapy with temozolomide (Stupp et al., 2005). Despite such a complex therapy, recurrence is unavoidable, due to GBM cell radiochemoresistance (Chan et al., 2002). Management of GBM patients at recurrent disease state is not unanimously codified because of an enhanced aggressiveness (Yin et al., 2013). Several pathways have been reported as involved in the pathogenesis of GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Some of them have been reported as prognostic markers or therapeutic targets. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) has been identified as a therapeutic target in glioma because of its involvement in several hallmarks of glioma aggressiveness (Brantley and Benveniste, 2008). It is well established that this intracellular cell signaling protein is activated by canonical phosphorylation on its tyrosine 705 residue, which induces its transfer to the nucleus for target gene regulation (Darnell et al., 1994; Hervas-Stubbs et al., 2011; Vallières and Rivest, 2000). In addition to glioma, many other human cancers display activated STAT3. Therefore, the study of STAT3 role in cancer provided rationales for use of STAT3 inhibitors as anticancer targeted therapy (Miklossy et al., 2013; Szelag et al., 2014). However such inhibitors have not yet been approved for treatment of glioma patients because of toxicity or inefficiency. Future clinical trials of STAT3 inhibitors in glioma should take in account its demonstrated ambivalent role in glioma as oncogene or suppressor of tumor depending of tumor genetic background (de la Iglesia et al., 2008). This caution strengthens the necessity to refine the strategy of targeting STAT3 in glioma. This task was made more difficult since recent concordant evidences attributed biological functions to serine 727 phosphorylated STAT3 in addition to or independently from the canonical Y705 activation (Fan et al., 2010; Qin et al., 2008; Villalva et al., 2011). However all investigators did not always assess STAT3 activation through detection of both Y705 and S727 phosphorylation. It is thus interesting to summary the biological events implicating STAT3 activation on S727 and/or Y705 to better understand the role of each of them in glioma aggressiveness and furthermore improve their therapeutic targeting.

This review focusses on S727 and Y705 phosphorylations of STAT3 and their involvement in the biological processes that contribute to GBM escape to standard treatment components. After a brief description of STAT3 pathway activation in glioma, the upstream events inducing STAT3 hyperactivation in glioma are identified. The prognostic value of

activated STAT3 in glioma is then examined before description of STAT3 involvement in mechanisms that lead to cell transformation as well as tumor growth and escape to both immune control and standard treatment.

Constitutive activation of STAT3 in human glioma

Constitutively phosphorylated STAT3 has been detected by immunohistochemistry assays performed on frozen or paraffin-embed glial tumour sections and immunoblotting of tumour tissue samples. The early studies reported positive detection of STAT3-phosphotyrosine 705 (pSTAT3-Y705) in a variable proportion of glioma ranging from 9% to 98% of the studied cohorts (Abou-Ghazal et al., 2008; Kohsaka et al., 2012; Lo et al., 2008; Mizoguchi et al., 2006; Wang et al., 2004a). This variability might be due to the cohort size and the limits of sensitivity and specificity of the diagnosis and detection methods. Moreover, comparison of the published results should consider that the cutoff point of positive staining was different. The detected phosphotyrosine was located in the nucleus of a variable number of glial tumour cells or some tumour-associated lymphocytes or vascular endothelial cells (Kohsaka et al., 2012; Lo et al., 2008; Wang et al., 2004a). Normal brain tissue was negative for pSTAT3-Y705 staining except in one over 5 specimens reported by Lo et al. (Lo et al., 2008). Considering the group of specimens in which the section shows $\geq 20\%$ pSTAT3-Y705 positively stained cells, Lo et al. found a positive correlation of pSTAT3-Y705 and glioma grade. However, in a study evaluating pSTAT3-Y705 in 111 glioblastoma (WHO grade IV glioma) cases and 25 WHO grade III glioma, Birner et al. did not find any correlation with the disease grade among cases that showed more than 5% positive cells (Birner et al., 2010). Using other methods such as electrophoretic mobility shift assay and western blotting, greater proportion of pSTAT3-Y705 expressing tumours or higher level of pSTAT3-Y705 have been positively correlated to glioma tumour grade (Brantley et al., 2008; Schaefer et al., 2002).

The detection of serine 727 phosphorylated STAT3 (pSTAT3-S727) in U87-MG and U373-MG glioma cell lines has been achieved by western blot (Aoki et al., 2007). The first description of pSTAT3-S727 in glioma tissues has been reported by Brantley et al. (Brantley et al., 2008). Two years later, this constitutive phosphorylation of STAT3-S727 residue has been confirmed in GBM patient and stem cells (Fan et al., 2010; Villalva et al., 2011). This study of Villalva et al. evidenced that disruption of the serine 727 phosphorylation impairs proliferation and neurosphere formation. Recently pSTAT3-S727 has been described by immunohistochemistry in 70.5% of 88 glioblastoma cases (Lin et al., 2014a).

Even though phosphorylated serine 727 was found in the cytoplasm, the main subcellular location was the nucleus of the neoplastic cells and some vascular endothelial cells. Normal brain tissue did not show any expression of pSTAT3-S727. More interestingly, this study evidenced a statistically significant association of STAT3-S727 Y705 phosphorylations.

Several studies have established STAT3 expression and phosphorylation on its Y705 and S727 residues in human glioma tissues. Those phosphorylations have been correlated to glioma tumour grade. Because normal brain cell express neither pSTAT3-S727 nor pSTAT3-Y705, STAT3 constitutive activation might be involved in the pathogenesis of glioma as a tumour-driving or a secondary mutation of transformed cells.

The mechanisms driving to STAT3 constitutive activation in human glioma

Mutations in STAT3 gene have been described in human pathology. Those occurring in the DNA binding domain or the SH2 domain trigger functional inactivation of STAT3 and lead to the autosomal dominant hyper-immunoglobulin E syndrome (AD-HIES) (Holland et al., 2007; Minegishi et al., 2007) previously called Job's syndrome. Functional activation of STAT3 due to punctual mutations in SH2 domain has been observed in chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia (Jerez et al., 2012; Koskela et al., 2012). To date, no gain-of-function mutation in human STAT3 gene has been reported in glioma (Brantley and Benveniste, 2008). The observed constitutive activation of STAT3 could be due to an aberrant signal from upstream regulators. This includes, on one hand, any gain-of-function mutation or increase in activation of an upstream activator, and, on the other hand, any loss-of-function mutation or decrease in activation of an upstream repressor.

Upstream events involved in STAT3 activation

The first group involves mainly alterations in the EGFR signaling pathway and those in the IL-6 signaling axis. Both pathways are induced by receptor-associated tyrosine kinase activity and transduced through the JAK kinases. Gene amplification and/or the rearrangements that result in the EGFRvIII truncated variants, or the EGFR-SEPT 14 fusion mutant of EGFR, induce an aberrant, excessive signal leading to an hyperactivation of pSTAT3-Y705 (Frattini et al., 2013; Lo et al., 2008).

In addition to or independently of EGFR activation, IL-6 participates in complex genetic and epigenetic regulatory circuits that orchestrate STAT3 constitutive activation in glioma (Chiou et al., 2013). We have reported *IL-6* gene overexpression in glioblastoma patients and cell lines (Tchirkov et al., 2001, 2007). IL-6 induces STAT3 activation by a signal transduced through an hexameric transmembrane receptor complex that implicates the IL-6R α (gp80) and the gp130 subunit that is shared with receptor of other cytokines such as IL-11, LIF, CT-1, CTNF, OSM and CLC (Heinrich et al., 1998) that have not been shown to play as critical role in glioma as IL-6 except OSM (Chen and Benveniste, 2004; Grant and Begley, 1999). IL-6 induced STAT3 activation through JAK2 and is usually assessed by monitoring pSTAT3-Y705 (Wang et al., 2009). But Liu et al. reported a dose-dependent increasing accumulation of pSTAT3-S727 in T98G and U251 human GBM cell lines treated by various concentrations of IL-6 (Liu et al., 2010). In that assay, variation of pSTAT3-Y705 level has not been evidenced. Moreover, it has been shown that STAT3 activation induces accumulation of both VEGF mRNA and protein (Loeffler et al., 2005; Xu et al., 2005). Wang et al. have assessed STAT3 activation by its DNA-binding activity in mice melanoma as well as breast and colon tumor cells. STAT3 activation induced secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 itself and RANTES chemokine that contribute together to inactivate both dendritic cell maturation and adaptive immunity (Wang et al., 2004b). In addition to IL-6 and EGFR pathways, STAT3 activation can be induced through signal induced by many other cytokines or growth factor receptors such as PDGFR depending on cell type or experimental conditions (Ren, 2011).

Besides its induction by receptor-associated tyrosine kinase activity, activation of STAT3 in glioma can also be triggered by non-receptor tyrosine kinases. This implicates intracellular kinases such as Bone marrow X-linked (BMX) that is expressed by some glioblastoma stem-like cell subpopulation (Guryanova et al., 2011). Since knocking down BMX impairs pSTAT3-Y705 accumulation, it has been described as an upstream activator of STAT3 in glioblastoma stem cells.

Otherwise, intracellular serine/threonine kinases, mediate STAT3 activation by phosphorylating S727. Thus the protein kinase C epsilon (PKC ϵ) is overexpressed in human anaplastic astrocytoma, glioblastoma and gliosarcoma and is associated to a worse disease prognostic (Sharif and Sharif, 1999). This overexpression of PKC ϵ has been shown to take part in the constitutive activation of STAT3 through S727 phosphorylation in several human glioma cell lines (Aziz et al., 2010; Xu et al., 2014).

The NOTCH pathway has been implicated in STAT3 activation since it has been shown that NOTCH signaling stimulation by Delta-like 4 (Dll4) and Jagged 1 (Jag1) NOTCH ligands promotes human embryonic stem cell survival through pSTAT3-S727 (Androutsellis-Theotokis et al., 2006). This NOTCH-mediated effect on normal stem cell fate can be blocked by the NOTCH pathway inhibitor DAPT, a gamma-secretase inhibitor that impairs activating cleavage of NOTCH by Presenilin 1. Moreover, the preponderant role of NOTCH in activating pSTAT3-S727 in glioma became evident when Fan et al. demonstrated that blocking activated NOTCH pathway in GBM stem cell by gamma-secretase inhibitor 18 (GSI-18), reverses accumulation of pSTAT3-S727 and selectively impedes cell proliferation (Fan et al., 2010). Those findings suggest that there is a regulation loop between activated STAT3 and NOTCH signaling because NOTCH pathway regulates STAT3-S727 phosphorylation and Garner et al. reported that pSTAT3-Y705 participates with NF κ B in regulating activated NOTCH signaling in GBM stem cells (Garner et al., 2013). More studies should help decipher this regulatory loop in glioblastoma stem cells.

STAT3 pathway modulation

The constitutive activation of STAT3 in glioma could be due to alteration of STAT3 pathway activation negative control. This deregulating mechanism involves the Protein Inhibitor of Activated STAT3 (PIAS3), Suppressor Of Cytokine Signaling, (SOCS) and Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Delta (PTPRD).

The PIAS proteins are endogenous STAT inhibitors (Heinrich et al., 1998). Concordantly with S727 and Y705 phosphorylated STAT3 overexpression, the PIAS3 is less expressed in GBM in comparison with non-neoplastic brain tissue (Brantley et al., 2008). Furthermore, inhibition of PIAS3 in U87-MG human glioma cell line by RNA interference boosted cell proliferation despite no or little change in the level of phosphorylated STAT3. Conversely, overexpression of PIAS3 in U251-MG human glioma cell line dumped OSM-enhanced expression of the STAT3 targeted genes Survivin, Bcl-xL as well as SOCS3 and resulted in 80% slow-down of cell proliferation (Brantley et al., 2008). The SOCS protein family is a cytokine inducible signal transducers that encompasses several members involved in negatively regulation of cytokine and growth factor-induced signals (Yasukawa et al., 2000). Among them, SOCS3 is not only a STAT3 targeted gene but also an upstream

repressor of STAT3 via its inhibitory action on JAK kinases (Yoshimura et al., 2007). Thus, SOCS3 functions in a negative feedback loop to regulate STAT3 activity.

Like other cancers such as ovarian and breast cancers, GBM tumors and cell lines overexpress SOCS3 whereas they repress SOCS1 (Brantley et al., 2008; Sutherland et al., 2004; Zhou et al., 2007). Because SOCS3 is a STAT3 target-gene, this aberrant expression of SOCS3 that is accompanied by a constitutive activation of STAT3, suggests that SOCS3 might be induced by activated STAT3 (Zhou et al., 2007) and that SOCS3 might fail in inhibiting STAT3 in glioblastoma. Further study should help understand the link between the constitutive silencing of SOCS1 and activated STAT3.

PTPRD belongs to a family of protein-tyrosine phosphatases which are involved in the regulation of many normal and cancer cell processes such as adhesion, proliferation and migration, through the regulation of multiple cell-signaling pathways (Ostman et al., 2006). PTPRD function is frequently inactivated by genetic and epigenetic alterations in GBM as well as in other cancers, and is associated to a worse patient prognosis (Solomon et al., 2008; Veeriah et al., 2009). Functional analysis in mice, recently published by Ortiz et al. showed that loss of heterozygosity of PTPRD resulted in accumulation of pSTAT3-Y705 and cooperated with Cdkn2a/p16Ink4a to promote glioma tumorigenesis (Ortiz et al., 2014).

Constitutive activation of STAT3 in glioma is more likely induced by combined mechanisms rather than a single one. Apart from deregulation of upstream regulators, other factors might cooperate in inducing hyperactivity of STAT3 in glioma. Some of them have been identified but require more studies to well characterize the mechanism of their action. This involves for example the mutation of the GDNF Family Receptor Alpha 4 (GFRA4) that induces mislocated weakly-interacting GFRA4-persephin (PSPN) complexes. These complexes aberrantly dissociate from the RET proto-oncogene product (RET) at the plasma membrane and relocate to the endoplasmic reticulum (Lee et al., 2013). Moreover, GFRA4 silencing or artificial redirection of GFRA4 to the plasma membrane reduced pSTAT3-Y705 and resulted in slowed glioma cell proliferation.

STAT3 and glioma prognosis

Many studies have focused on the prognostic value of STAT3 expression and activation in glioma. Early study of the signaling pathways activated downstream EGFR, including MAPK, AKT/Akt and STAT3, established that pSTAT3-Y705 is correlated to the presence of the EGFRVIII mutated variant of EGFR in anaplastic astrocytoma and GBM (Mizoguchi et al., 2006). Among those downstream effectors of EGFR pathway, MAPK and Akt but not STAT3 have been correlated to the progression of grade III astrocytoma to grade IV glioblastoma. In accordance, activated Akt was predictive of a worse glioma prognosis. Unlike Akt, activated STAT3 was correlated with a slight improved prognosis when it is compared against co-activation of STAT3/MAPK/Akt.

In opposition to Mizoguchi et al. who evaluated STAT3 activity by quantifying pSTAT3-Y705 in tumours, Alvarez et al. assessed functional activation of STAT3 through expression of a subset of 12 genes admitted as defining the STAT3 signature (Alvarez et al., 2007). This study found a positive correlation linking high expression level of STAT3 target genes with a poorer prognosis in glioma. However, they did not correlate phosphorylated STAT3 with gene expression in tumour samples. Another study established that expression of pSTAT3-Y705 was a negative prognostic marker in anaplastic astrocytoma (Abou-Ghazal et al., 2008). Furthermore, some other studies reaffirmed the bad prognostic value of the constitutive activation of STAT3 alone or in association with others mesenchymal markers such as C/EBP- β and C/EBP- δ in GBM (Carro et al., 2010; Cooper et al., 2012).

The bad clinical signification of STAT3 activation has recently been attested by the studies carried out by Lin et al., which established that high number of pSTAT3-Y705 or pSTAT3-S727 positive cells in GBM specimens, impact independently and negatively the patients' progression-free survival and overall survival (Lin et al., 2014a, 2014b). Moreover an increased expression of the both makes worse the clinical outcome (Lin et al., 2014a).

Tallying data evidenced that STAT3 activation by Y705 or S727 phosphorylations in glioma influence negatively the patients' survival. Because association of the both worsens the patient prognosis suggests that they might act in more than one pathway in the tumorigenesis or the progression of the disease. Further studies are needed to better understand the mechanism regulated by pSTAT3-S727 and/or pSTAT3-Y705.

Role of STAT3 in glioma tumorigenesis and aggressiveness

STAT3 in glioma carcinogenesis

The first demonstrations of STAT3 involvement in cell transformation rose from the observation that it was activated (Y705 phosphorylated) in fibroblasts and epithelial cells, which have been stably transformed by the Src oncogene tyrosine kinase (Yu et al., 1995). Moreover, transgenic mice expressing *v-src* under control of GFAP gene regulatory elements develop transplantable astrocytoma that progress to GBM, thus providing evidence of involvement of *v-src* and probably the consecutive activated STAT3 in initiating and promoting glioma genesis in a multistep way (Smilowitz et al., 2007; Weissenberger et al., 1997). Consistently, the malignant transformation by *v-src* and maintenance of transformed phenotype require STAT3 that is however dispensable for normal cell growth (Schlessinger and Levy, 2005). The genuine oncogenic function of STAT3 by its own became clear with functional analysis using interfering negative or positive STAT3 dominant proteins. Negative dominant mutants rendered cells refractory to *v-src* transformation (Bromberg et al., 1998; Turkson et al., 1998) whereas positive dominants induced by themselves carcinogenesis (Bromberg et al., 1999; Dechow et al., 2004).

STAT3 function in cell survival and proliferation

STAT3 function activation is tightly associated to prosurvival gene expression induction such as *Survivin*, *Bcl-XL* (Konnikova et al., 2003), *Bcl-2*, *Mcl-1* (Rahaman et al., 2002) since inhibition of activated STAT3 by chemical compounds, neutralizing antibodies, decoy oligonucleotides, RNA-interference or dominant negative protein strategies resulted in a decreased accumulation of anti-apoptotic gene products. In addition, inhibiting activated STAT3 reduces expression of cell cycle regulators: *c-myc*, *cyclin D1* and *cyclin E* (Shen et al., 2009). Those experiments have been conducted *in vitro* (Rahaman et al., 2002) as well as *in vivo* models (Dasgupta et al., 2009; Shen et al., 2009). Through the control of cell cycle and apoptosis regulators, inhibiting STAT3 activity resulted in increased cell death and decreased cell or tumor growth. Since STAT3 activity has been modulated by targeting pSTAT3-Y705 (pharmacological inhibitors, blocking antibodies, and dominant negative proteins) or total STAT3 protein accumulation (RNAi and decoy oligonucleotides), the role of pSTAT3-S727 remained misunderstood in the cell fate control by STAT3.

GBM-derived stem cells displaying S727 and Y705 phosphorylated STAT3 showed a modified profile of STAT3 phosphorylation when grown in different conditions (Sherry et al., 2009). Interestingly, inhibiting STAT3 dimer formation and DNA-binding by the mean of STA-21 and S3I-201 STAT3 inhibitors which target the protein SH2 domain resulted in apoptosis or decreased cell proliferation (assessed by low BrdU incorporation), depending on the state of cell differentiation, cell culture conditions and the profile of STAT3 phosphorylation (on Y705 and S727 residues) (Sherry et al., 2009). Using Stattic, another STAT3 inhibitor that is structurally different from STA-21 and S3I-201 but acts like them by inhibiting SH2 domain, Villalva et al. showed that disruption of STAT3 function impaired neurosphere formation by slowing cell proliferation and inducing apoptosis of glioblastoma stem cell (Villalva et al., 2011).

Regulation of cell survival by STAT3 is tightly linked to blocking of both apoptosis and autophagy since inhibiting activated STAT3 (Y705 and S727) by several means induced autophagy and concomitantly sensitized glioma cells to induction of apoptosis (Yuan et al.; Zou et al., 2014). These findings suggested that autophagy contributes to glioma escape to anticancer therapy.

Considering together the published data, it becomes clear that STAT3 plays a critical role in the control of cell survival and proliferation. However the contribution of S727 and Y705 phosphorylation of STAT3 in cell survival and proliferation remains unclear because authors did not use methods that allow such distinguishing.

STAT3 activation role in glioma cell migration and invasion

Use of inhibitors of STAT3 (S727 and Y705) upstream regulators pointed that STAT3 might be involved in glioma cell migration and invasion (Jhanwar-Uniyal, 2009; Senft et al., 2011). This function of STAT3 has been linked to down-regulation of matrix metalloproteinase gene expression such as MMP2 (Li, 2010), MMP9 and epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulator genes like Snail and Twist (Priester et al., 2013). STAT3 has also been shown to cooperate with other transcription factors such as NF-κB (p65) (Kesanakurti et al., 2013) and Nuclear factor I-X3 (Singh et al., 2011) in up-regulating respectively ICAM-1 and YKL-40, resulting in promotion of glioma cell migration and invasiveness.

Role of STAT3 activation in local immune suppression

STAT3 activation has been shown in several models to promote cancer cell immune escape by disturbing the steps involved in normal functioning of both innate and adaptive immune system components. Through plasma membrane interactions (Xu et al., 2011) and released cytokines such as IL-6, IL-8, IL-10, IP-10 (CXCL10), RANTES, TNF α (See et al., 2012), TGF β , PGE-2 (Oosterhoff et al., 2012), STAT3 activation in glioma cells including cell lines, primary cultured cells and cancer stem cells has been shown to induce immune tolerance. STAT3 activation in glioma cells blocks differentiation, maturation and function of dendritic cells, inhibits T-cell proliferation (Wei et al., 2010), induces T-cell anergy, T-reg, and immunosuppressive microglia (Wu et al., 2010). Glioma-induced immunosuppression is potentiated by hypoxia (Wei et al., 2011). It can be hampered or reversed by STAT3 inhibition (Hussain et al., 2007; Wei et al., 2010), suggesting the relevance of using STAT3 inhibitors in glioma immunotherapy. However inhibition of STAT3 did not prevent IL-6 induced suppression of Langerhans cell differentiation (van Cruijsen et al., 2011), indicating that STAT3 activation is not the only one mechanism of glioma-induced immune tolerance.

Role of STAT3 activation in glioma resistance to standard treatment

Treatment of malignant glioma is based on surgery, radiotherapy, and concomitant and adjuvant chemotherapy with temozolomide (Stupp et al., 2005). This standard treatment has been reported to prolong patient survival and delay disease progression (Hart et al., 1996). Despite this gold treatment, recurrence is still unavoidable in GBM and recurrent GBM are chemoresistant due to a selection of resistant tumor clones and an inefficient drug delivery to the brain across altered blood-brain barrier (Kunwar et al., 2010; Yin et al., 2013).

The DNA-repair enzyme MGMT has been identified as conferring resistance to temozolomide. Repression of its coding gene mainly by promoter methylation in tumors is a predicting factor of GBM response to alkylators (Hegi et al., 2005; Weller et al., 2010). GBM harbor high level STAT3 activation assessed by the ratio of phosphorylated STAT3 / total STAT3 protein or immunohistochemical staining of phosphorylated STAT3. Furthermore, a study reported that recurrent astrocytic glioma displayed an increased STAT3 protein accumulation compared to primary astrocytic tumors (Zhang et al., 2011), suggesting that GBM recurrence is associated to STAT3 overexpression. This report was consistent with another that showed an increase in total STAT3 and pSTAT3-S727 accumulation and a concomitant decrease in pSTAT3-Y075 in temozolomide-resistant cells compared to parental

cells (LEE et al., 2011). But the ratio of phosphorylated STAT3/total STAT3 has not been calculated in this study. The role of STAT3 pathway activation in GBM resistance to standard treatment is established since knocking down STAT3 in temozolomide-resistant cells resulted in resistance reversal. Lee et al. showed that pSTAT3-S727 activation in temozolomide-resistant cells was independent on MGMT expression. By contrast Kohsaka et al. found that down-modulating STAT3 activity by shRNA or chemical inhibitor of pSTAT3-Y705 resulted in attenuated resistance to temozolomide and concomitant decrease in MGMT accumulation (Kohsaka et al., 2012). It has also been reported that impairment of temozolomide resistance by inhibition of pSTAT3-Y705 is mediated at least in part through modulation of pAkt and β -catenin (Kang, 2011). Thus increased STAT3 activity by protein accumulation and/or increased level of pSTAT3-S727 or pSTAT3-Y705 is involved in temozolomide-resistance through complex mechanisms including upregulation of MGMT, pAkt and β -catenin.

Besides temozolomide-resistance, STAT3 activation is involved in resistance to radiation since suppressing pSTAT3-Y705 activity by resveratrol weakened radioresistance and tumorigenic capacity of GBM cancer stem cells (Yang et al., 2012).

STAT3 activation in glioma and angiogenesis

STAT3 activation upregulates VEGF expression by glioma tumor cells *in vitro* and *in vivo* (Kang et al., 2010; Loeffler et al., 2005). The role of STAT3-induced VEGF expression in glioma angiogenesis and tumor growth is confirmed since U87 human GBM cells expressing dominant-negative STAT3 induced, slowly growing tumors with inhibited neoangiogenesis (Dasgupta et al., 2009). Ongoing clinical trials regarding anti-angiogenic therapy with Bevacizumab, a monoclonal anti-VEGF antibody approved by US Food and Drug Administration (FDA) in recurrent glioma patient treatment and chemical inhibitors of VEGFR such as Cediranib did not yet exhibit the expected benefit in terms of both safety and overall survival prolongation (Yin et al., 2013). Those unexpected results suggest that it might be relevant to integrate in anti-angiogenic therapy the modulation of STAT3 because of its function at least in part as upstream regulator of not only angiogenesis, but also autophagy and hypoxia-induced biological effects (Brantley and Benveniste, 2008; Yuan et al.).

Role of STAT3 in glioma cancer stem cell maintenance

Gliomas are one of human cancers in which the existence of cancer-initiating cells also called cancer stem (-like) cells, has been established (Galli et al., 2004; Singh et al., 2003). Cancer stem cells have self-renewal and tumorigenic capacities and reproduce some but not all stem cells behaviors (Lee et al., 2008). STAT3 pathway activation on S727 or Y705 has been reported to be essential in the maintenance of not only the capacity of these stem-like cells to initiate neurospheres (Villalva et al., 2011) but also their multipotency (Fan et al., 2010; Sherry et al., 2009) and their immunosuppressive ability (Wei et al., 2010). Those findings enhanced the keen interest of STAT3 inhibitors in glioma targeted therapy.

References

- Abou-Ghazal, M., Yang, D.S., Qiao, W., Reina-Ortiz, C., Wei, J., Kong, L.-Y., Fuller, G.N., Hiraoka, N., Priebe, W., Sawaya, R., et al. (2008). The Incidence, Correlation with Tumor-Infiltrating Inflammation, and Prognosis of Phosphorylated STAT3 Expression in Human Gliomas. *Clin. Cancer Res.* 14, 8228–8235.
- Alvarez, J.V., Mukherjee, N., Chakravarti, A., Robe, P., Zhai, G., Chakladar, A., Loeffler, J., Black, P., and Frank, D.A. (2007). A STAT3 Gene Expression Signature in Gliomas is Associated with a Poor Prognosis. *Transl. Oncogenomics* 2, 99–105.
- Androutsellis-Theotokis, A., Leker, R.R., Soldner, F., Hoeppner, D.J., Ravin, R., Poser, S.W., Rueger, M.A., Bae, S.-K., Kittappa, R., and McKay, R.D.G. (2006). Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 442, 823–826.
- Aoki, H., Iwado, E., Eller, M.S., Kondo, Y., Fujiwara, K., Li, G.-Z., Hess, K.R., Siwak, D.R., Sawaya, R., Mills, G.B., et al. (2007). Telomere 3' overhang-specific DNA oligonucleotides induce autophagy in malignant glioma cells. *FASEB J.* 21, 2918–2930.
- Aziz, M.H., Hafeez, B.B., Sand, J.M., Pierce, D.B., Aziz, S.W., Dreckschmidt, N.E., and Verma, A.K. (2010). Protein kinase C ϵ mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression and cell invasion in various human cancer cell lines via integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2). *Oncogene* 29, 3100–3109.
- Birner, P., Toumangelova-Uzeir, K., Natchev, S., and Guentchev, M. (2010). STAT3 tyrosine phosphorylation influences survival in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 100, 339–343.
- Brantley, E.C., and Benveniste, E.N. (2008). STAT-3: A Molecular Hub for Signaling Pathways in Gliomas. *Mol. Cancer Res.* MCR 6.
- Brantley, E.C., Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Choi, Y.-H., Palmer, C.A., Harrison, K., Roarty, K., and Benveniste, E.N. (2008). Loss of PIAS3 Expression in Glioblastoma Multiforme Tumors: Implications for STAT-3 Activation and Gene Expression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W., and Darnell, J.E. (1998). Stat3 Activation Is Required for Cellular Transformation by v-src. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2553–2558.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell Jr., J.E. (1999). Stat3 as an Oncogene. *Cell* 98, 295–303.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068.
- Carro, M.S., Lim, W.K., Alvarez, M.J., Bollo, R.J., Zhao, X., Snyder, E.Y., Sulman, E.P., Anne, S.L., Doetsch, F., Colman, H., et al. (2010). The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumors. *Nature* 463, 318–325.
- Chan, J.L., Lee, S.W., Fraass, B.A., Normolle, D.P., Greenberg, H.S., Junck, L.R., Gebarski, S.S., and Sandler, H.M. (2002). Survival and Failure Patterns of High-Grade Gliomas After Three-Dimensional Conformal Radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 1635–1642.
- Chen, S.-H., and Benveniste, E.N. (2004). Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 379–391.
- Chiou, G.-Y., Chien, C.-S., Wang, M.-L., Chen, M.-T., Yang, Y.-P., Yu, Y.-L., Chien, Y., Chang, Y.-C., Shen, C.-C., Chio, C.-C., et al. (2013). Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma. *Mol. Cell* 52, 693–706.
- Cooper, L.A.D., Gutman, D.A., Chisolm, C., Appin, C., Kong, J., Rong, Y., Kurc, T., Van Meir, E.G., Saltz, J.H., Moreno, C.S., et al. (2012). The Tumor Microenvironment Strongly Impacts Master Transcriptional Regulators and Gene Expression Class of Glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 180, 2108–2119.
- Van Cruijsen, H., Oosterhoff, D., Lindenberg, J.J., Lougheed, S.M., Fehres, C., Weijers, K., van Boerdonk, R., Giaccone, G., Scheper, R.J., Hoekman, K., et al. (2011). Glioblastoma-induced inhibition of Langerhans cell differentiation from CD34(+) precursors is mediated by IL-6 but unaffected by JAK2/STAT3 inhibition. *Immunotherapy* 3, 1051–1061.
- Darnell, J.E., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415–1421.

- Dasgupta, A., Raychaudhuri, B., Haqqi, T., Prayson, R., Van Meir, E.G., Vogelbaum, M., and Haque, S.J. (2009). Stat3 activation is required for the growth of U87 cell-derived tumours in mice. *Eur. J. Cancer* 45, 677–684.
- Dechow, T.N., Pedranzini, L., Leitch, A., Leslie, K., Gerald, W.L., Linkov, I., and Bromberg, J.F. (2004). Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10602–10607.
- Fan, X., Khaki, L., Zhu, T.S., Soules, M.E., Talsma, C.E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y.-M., Maciaczyk, J., et al. (2010). NOTCH Pathway Blockade Depletes CD133-Positive Glioblastoma Cells and Inhibits Growth of Tumor Neurospheres and Xenografts. *STEM CELLS* 28, 5–16.
- Frattini, V., Trifonov, V., Chan, J.M., Castano, A., Lia, M., Abate, F., Keir, S.T., Ji, A.X., Zoppoli, P., Niola, F., et al. (2013). The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nat. Genet.* 45, 1141–1149.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., Vitis, S.D., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res.* 64, 7011–7021.
- Garner, J.M., Fan, M., Yang, C.H., Du, Z., Sims, M., Davidoff, A.M., and Pfeffer, L.M. (2013). Constitutive Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Nuclear Factor κB Signaling in Glioblastoma Cancer Stem Cells Regulates the Notch Pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 26167–26176.
- Grant, S.L., and Begley, C.G. (1999). The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol. Med. Today* 5, 406–412.
- Guryanova, O.A., Wu, Q., Cheng, L., Lathia, J.D., Huang, Z., Yang, J., MacSwords, J., Eyler, C.E., McLendon, R.E., Heddleston, J.M., et al. (2011). Non-Receptor Tyrosine Kinase BMX Maintains Self-Renewal and Tumorigenic Potential of Glioblastoma Stem Cells by Activating STAT3. *Cancer Cell* 19, 498–511.
- Hart, M.G., Garside, R., Rogers, G., Stein, K., and Grant, R. (1996). Temozolomide for high grade glioma. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (John Wiley & Sons, Ltd),.
- Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 997–1003.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334, 297–314.
- Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J.L., Rouzaut, A., Sanmamed, M.F., Bon, A.L., and Melero, I. (2011). Direct Effects of Type I Interferons on Cells of the Immune System. *Clin. Cancer Res.* 17, 2619–2627.
- Holland, S.M., DeLeo, F.R., Elloumi, H.Z., Hsu, A.P., Uzel, G., Brodsky, N., Freeman, A.F., Demidowich, A., Davis, J., Turner, M.L., et al. (2007). STAT3 Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 357, 1608–1619.
- Hussain, S.F., Kong, L.-Y., Jordan, J., Conrad, C., Madden, T., Fokt, I., Priebe, W., and Heimberger, A.B. (2007). A Novel Small Molecule Inhibitor of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Reverses Immune Tolerance in Malignant Glioma Patients. *Cancer Res.* 67, 9630–9636.
- De la Iglesia, N., Konopka, G., Lim, K.L., Nutt, C.L., Bromberg, J.F., Frank, D.A., Mischel, P.S., Louis, D.N., and Bonni, A. (2008). Dereulation of a STAT3-IL8 Signaling Pathway Promotes Human Glioblastoma Cell Proliferation and Invasiveness. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5870–5878.
- Jerez, A., Clemente, M.J., Makishima, H., Koskela, H., LeBlanc, F., Ng, K.P., Olson, T., Przychodzen, B., Afable, M., Gomez-Segui, I., et al. (2012). STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 120, 3048–3057.
- Jhanwar-Uniyal (2009). Involvement of mTORC1 and mTORC2 in regulation of glioblastoma multiforme growth and motility. *Int. J. Oncol.* 35.
- Kang, C. (2011). Inhibition of STAT3 reverses alkylator resistance through modulation of the AKT and β-catenin signaling pathways. *Oncol. Rep.*
- Kang, S.-H., Yu, M.O., Park, K.-J., Chi, S.-G., Park, D.-H., and Chung, Y.-G. (2010). Activated STAT3 regulates hypoxia-induced angiogenesis and cell migration in human glioblastoma. *Neurosurgery* 67, 1386–1395; discussion 1395.

- Kesanakurti, D., Chetty, C., Maddirela, D.R., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2013). Essential Role of Cooperative NF-?B and Stat3 Recruitment to ICAM-1 Intronic Consensus Elements in the Regulation of Radiation-induced Invasion and Migration in Glioma. *Oncogene* 32.
- Kohsaka, S., Wang, L., Yachi, K., Mahabir, R., Narita, T., Itoh, T., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara, H., and Tanaka, S. (2012). STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1289–1299.
- Konnikova, L., Kotecki, M., Kruger, M.M., and Cochran, B.H. (2003). Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer* 3, 23.
- Koskela, H.L.M., Eldfors, S., Ellonen, P., van Adrichem, A.J., Kuusanmaki, H., Andersson, E.I., Lagstrom, S., Clemente, M.J., Olson, T., Jalkanen, S.E., et al. (2012). Somatic STAT3 Mutations in Large Granular Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 366, 1905–1913.
- Kunwar, S., Chang, S., Westphal, M., Vogelbaum, M., Sampson, J., Barnett, G., Shaffrey, M., Ram, Z., Piepmeier, J., Prados, M., et al. (2010). Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 12, 871–881.
- LEE, E.-S., KO, K.-K., JOE, Y.A., KANG, S.-G., and HONG, Y.-K. (2011). Inhibition of STAT3 reverses drug resistance acquired in temozolomide-resistant human glioma cells. *Oncol. Lett.* 2, 115–121.
- Lee, J., Son, M.J., Woolard, K., Donin, N.M., Li, A., Cheng, C.H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Walling, J., Ahn, S., et al. (2008). Epigenetic-Mediated Dysfunction of the Bone Morphogenetic Protein Developmental Pathway Inhibits Differentiation of Human Glioblastoma Tumor Initiating Cells. *Cancer Cell* 13, 69–80.
- Lee, K., Byun, K., Hong, W., Chuang, H.-Y., Pack, C.-G., Bayarsaikhan, E., Paek, S.H., Kim, H., Shin, H.Y., Ideker, T., et al. (2013). Proteome-wide discovery of mislocated proteins in cancer. *Genome Res.* 23, 1283–1294.
- Li (2010). IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncol. Rep.* 23.
- Lin, G.-S., Chen, Y.-P., Lin, Z.-X., Wang, X.-F., Zheng, Z.-Q., and Chen, L. (2014a). STAT3 serine 727 phosphorylation influences clinical outcome in glioblastoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 3141–3149.
- Lin, G.-S., Yang, L.-J., Wang, X.-F., Chen, Y.-P., Tang, W.-L., Chen, L., and Lin, Z.-X. (2014b). STAT3 Tyr705 phosphorylation affects clinical outcome in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma. *Med. Oncol.* 31, 1–7.
- Liu, Q., Li, G., Li, R., Shen, J., He, Q., Deng, L., Zhang, C., and Zhang, J. (2010). IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *J. Neurooncol.* 100, 165–176.
- Lo, H.-W., Cao, X., Zhu, H., and Ali-Osman, F. (2008). Constitutively Activated STAT3 Frequently Coexpresses with Epidermal Growth Factor Receptor in High-Grade Gliomas and Targeting STAT3 Sensitizes Them to Iressa and Alkylators. *Clin. Cancer Res.* 14, 6042–6054.
- Loeffler, S., Fayard, B., Weis, J., and Weissenberger, J. (2005). Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int. J. Cancer* 115, 202–213.
- Miklossy, G., Hilliard, T.S., and Turkson, J. (2013). Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 611–629.
- Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., Pasic, S., Stojkovic, O., et al. (2007). Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 448, 1058–1062.
- Mizoguchi, M., Betensky, R.A., Batchelor, T.T., Bernay, D.C., Louis, D.N., and Nutt, C.L. (2006). Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 1181–1188.
- Oosterhoff, D., Lougheed, S., van de Ven, R., Lindenberg, J., van Cruijsen, H., Hiddingh, L., Kroon, J., van den Eertwegh, A.J.M., Hangalapura, B., Scheper, R.J., et al. (2012). Tumor-mediated inhibition of human dendritic cell differentiation and function is consistently counteracted by combined p38 MAPK and STAT3 inhibition. *Oncoimmunology* 1, 649–658.

- Ortiz, B., Fabius, A.W.M., Wu, W.H., Pedraza, A., Brennan, C.W., Schultz, N., Pitter, K.L., Bromberg, J.F., Huse, J.T., Holland, E.C., et al. (2014). Loss of the tyrosine phosphatase PTPRD leads to aberrant STAT3 activation and promotes gliomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8149–8154.
- Ostman, A., Hellberg, C., and Böhmer, F.D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 307–320.
- Priester, M., Copanaki, E., Vafaizadeh, V., Hensel, S., Bernreuther, C., Glatzel, M., Seifert, V., Groner, B., Kögel, D., and Weissenberger, J. (2013). STAT3 silencing inhibits glioma single cell infiltration and tumor growth. *Neuro-Oncol.* 15, 840–852.
- Qin, H.R., Kim, H.-J., Kim, J.-Y., Hurt, E.M., Klarmann, G.J., Kawasaki, B.T., Serrat, M.A.D., and Farrar, W.L. (2008). Activation of Stat3 through a Phosphomimetic Serine727 Promotes Prostate Tumorigenesis Independent of Tyrosine705 phosphorylation. *Cancer Res.* 68, 7736–7741.
- Rahaman, S.O., Harbor, P.C., Chernova, O., Barnett, G.H., Vogelbaum, M.A., and Haque, S.J. (2002). Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 21, 8404–8413.
- Ren (2011). Selective inhibition of PDGFR by imatinib elicits the sustained activation of ERK and downstream receptor signaling in malignant glioma cells. *Int. J. Oncol.* 38.
- Schaefer, L.K., Ren, Z., Fuller, G.N., and Schaefer, T.S. (2002). Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene* 21, 2058–2065.
- Schlessinger, K., and Levy, D.E. (2005). Malignant transformation but not normal cell growth depend on STAT3. *Cancer Res.* 65, 5828–5834.
- See, A.P., Han, J.E., Phallen, J., Binder, Z., Gallia, G., Pan, F., Jinasena, D., Jackson, C., Belcaid, Z., Jeong, S.J., et al. (2012). The role of STAT3 activation in modulating the immune microenvironment of GBM. *J. Neurooncol.* 110, 359–368.
- Senft, C., Priester, M., Polacin, M., Schröder, K., Seifert, V., Kögel, D., and Weissenberger, J. (2011). Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* 101, 393–403.
- Sharif, T.R., and Sharif, M. (1999). Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int. J. Oncol.*
- Shen, J., Li, R., and Li, G. (2009). Inhibitory effects of decoy-ODN targeting activated STAT3 on human glioma growth in vivo. *Vivo Athens Greece* 23, 237–243.
- Sherry, M.M., Reeves, A., Wu, J.K., and Cochran, B.H. (2009). STAT3 Is Required for Proliferation and Maintenance of Multipotency in Glioblastoma Stem Cells. *STEM CELLS* 27, 2383–2392.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828.
- Singh, S.K., Bhardwaj, R., Wilczynska, K.M., Dumur, C.I., and Kordula, T. (2011). A Complex of Nuclear Factor I-X3 and STAT3 Regulates Astrocyte and Glioma Migration through the Secreted Glycoprotein YKL-40. *J. Biol. Chem.* 286, 39893–39903.
- Smilowitz, H.M., Weissenberger, J., Weis, J., Brown, J.D., O'Neill, R.J., and Laissue, J.A. (2007). Orthotopic transplantation of v-src-expressing glioma cell lines into immunocompetent mice: establishment of a new transplantable in vivo model for malignant glioma. *J. Neurosurg.* 106, 652–659.
- Solomon, D.A., Kim, J.-S., Cronin, J.C., Sibenaller, Z., Ryken, T., Rosenberg, S.A., Ressom, H., Jean, W., Bigner, D., Yan, H., et al. (2008). Mutational Inactivation of PTPRD in Glioblastoma Multiforme and Malignant Melanoma. *Cancer Res.* 68, 10300–10306.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
- Sutherland, K.D., Lindeman, G.J., Choong, D.Y.H., Wittlin, S., Brentzell, L., Phillips, W., Campbell, I.G., and Visvader, J.E. (2004). Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas. *Oncogene* 23, 7726–7733.

- Szelag, M., Czerwoniec, A., Wesoly, J., and Bluysen, H.A.R. (2014). Comparative screening and validation as a novel tool to identify STAT-specific inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 417–420.
- Tchirkov, A., Rolhion, C., Bertrand, S., Dore, J.-F., Dubost, J.-J., and Verrelle, P. (2001). IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *Br. J. Cancer* 85, 518–522.
- Tchirkov, A., Khalil, T., Chautard, E., Mokhtari, K., Veronese, L., Irthum, B., Vago, P., Kemeny, J.-L., and Verrelle, P. (2007). Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. *Br. J. Cancer* 96, 474–476.
- Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P., and Jove, R. (1998). Stat3 Activation by Src Induces Specific Gene Regulation and Is Required for Cell Transformation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2545–2552.
- Vallières, L., and Rivest, S. (2000). L'interleukine-6 dans le système nerveux central. *Médecine/sciences* 16, 936.
- Veeriah, S., Brennan, C., Meng, S., Singh, B., Fagin, J.A., Solit, D.B., Paty, P.B., Rohle, D., Vivanco, I., Chmielecki, J., et al. (2009). The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9435–9440.
- Villalva, C., Martin-Lannerée, S., Cortes, U., Dkhissi, F., Wager, M., Le Corf, A., Tourani, J.-M., Dusantefourt, I., Turhan, A.G., and Karayan-Tapon, L. (2011). STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas: A potential for targeted therapy? *Int. J. Cancer* 128, 826–838.
- Wang, H., Wang, H., Zhang, W., Huang, H.J., Liao, W.S.L., and Fuller, G.N. (2004a). Analysis of the activation status of Akt, NFkB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab. Invest.* 84, 941–951.
- Wang, H., Lathia, J.D., Wu, Q., Wang, J., Li, Z., Heddleston, J.M., Eyler, C.E., Elderbroom, J., Gallagher, J., Schuschu, J., et al. (2009). Targeting Interleukin 6 Signaling Suppresses Glioma Stem Cell Survival and Tumor Growth. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2393–2404.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., et al. (2004b). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat. Med.* 10, 48–54.
- Wei, J., Barr, J., Kong, L.-Y., Wang, Y., Wu, A., Sharma, A.K., Gumin, J., Henry, V., Colman, H., Priebe, W., et al. (2010). Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T cell proliferation and effector responses by the STAT3 pathway. *Mol. Cancer Ther.* 9, 67–78.
- Wei, J., Wu, A., Kong, L.-Y., Wang, Y., Fuller, G., Fokt, I., Melillo, G., Priebe, W., and Heimberger, A.B. (2011). Hypoxia Potentiates Glioma-Mediated Immunosuppression. *PLoS ONE* 6.
- Weissenberger, J., Steinbach, J.P., Malin, G., Spada, S., Rülicke, T., and Aguzzi, A. (1997). Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP-v-src transgenic mice. *Oncogene* 14, 2005–2013.
- Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A.A., van den Bent, M.J., Wick, W., and Hegi, M.E. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat. Rev. Neurol.* 6, 39–51.
- Wu, A., Wei, J., Kong, L.-Y., Wang, Y., Priebe, W., Qiao, W., Sawaya, R., and Heimberger, A.B. (2010). Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncol.* 12, 1113–1125.
- Xu, L., Xiao, H., Xu, M., Zhou, C., Yi, L., and Liang, H. (2011). Glioma-derived T Cell Immunoglobulin- and Mucin Domain-containing Molecule-4 (TIM4) Contributes to Tumor Tolerance. *J. Biol. Chem.* 286, 36694–36699.
- Xu, Q., Briggs, J., Park, S., Niu, G., Kortylewski, M., Zhang, S., Gritsko, T., Turkson, J., Kay, H., Semenza, G.L., et al. (2005). Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 24, 5552–5560.
- Xu, Y., Li, Z., Zhang, C., Zhang, S., Ji, Y., and Chen, F. (2014). Knockdown of PKC ϵ Expression Inhibits Growth, Induces Apoptosis and Decreases Invasiveness of Human Glioma Cells Partially Through Stat3. *J. Mol. Neurosci.* 1–11.
- Yang, Y.-P., Chang, Y.-L., Huang, P.-I., Chiou, G.-Y., Tseng, L.-M., Chiou, S.-H., Chen, M.-H., Chen, M.-T., Shih, Y.-H., Chang, C.-H., et al. (2012). Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *J. Cell. Physiol.* 227, 976–993.

- Yasukawa, H., Sasaki, A., and Yoshimura, A. (2000). Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 143–164.
- Yin, A., Cheng, J., Zhang, X., and Liu, B. (2013). The treatment of glioblastomas: A systematic update on clinical Phase III trials. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 87, 265–282.
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 454–465.
- Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J., and Jove, R. (1995). Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269, 81–83.
- Yuan, X., Du, J., Hua, S., Zhang, H., Gu, C., Wang, J., Yang, L., Huang, J., Yu, J., and Liu, F. Suppression of autophagy augments the radiosensitizing effects of STAT3 inhibition on human glioma cells. *Exp. Cell Res.*
- Zhang, K., Pang, B., Xin, T., Hou, X., Jia, J., Feng, B., Meng, L., Xu, S., and Pang, Q. (2011). Increased Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Decreased Cyclin D1 in Recurrent Astrocytic Tumours Compared with Paired Primary Astrocytic Tumours. *J. Int. Med. Res.* 39, 2103–2109.
- Zhou, H., Miki, R., Eeva, M., Fike, F.M., Seligson, D., Yang, L., Yoshimura, A., Teitel, M.A., Jamieson, C.A.M., and Cacalano, N.A. (2007). Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 2344–2353.
- Zou, M., Hu, C., You, Q., Zhang, A., Wang, X., and Guo, Q. (2014). Oroxylin A induces autophagy in human malignant glioma cells via the mTOR-STAT3-Notch signaling pathway. *Mol. Carcinog.* n/a – n/a.

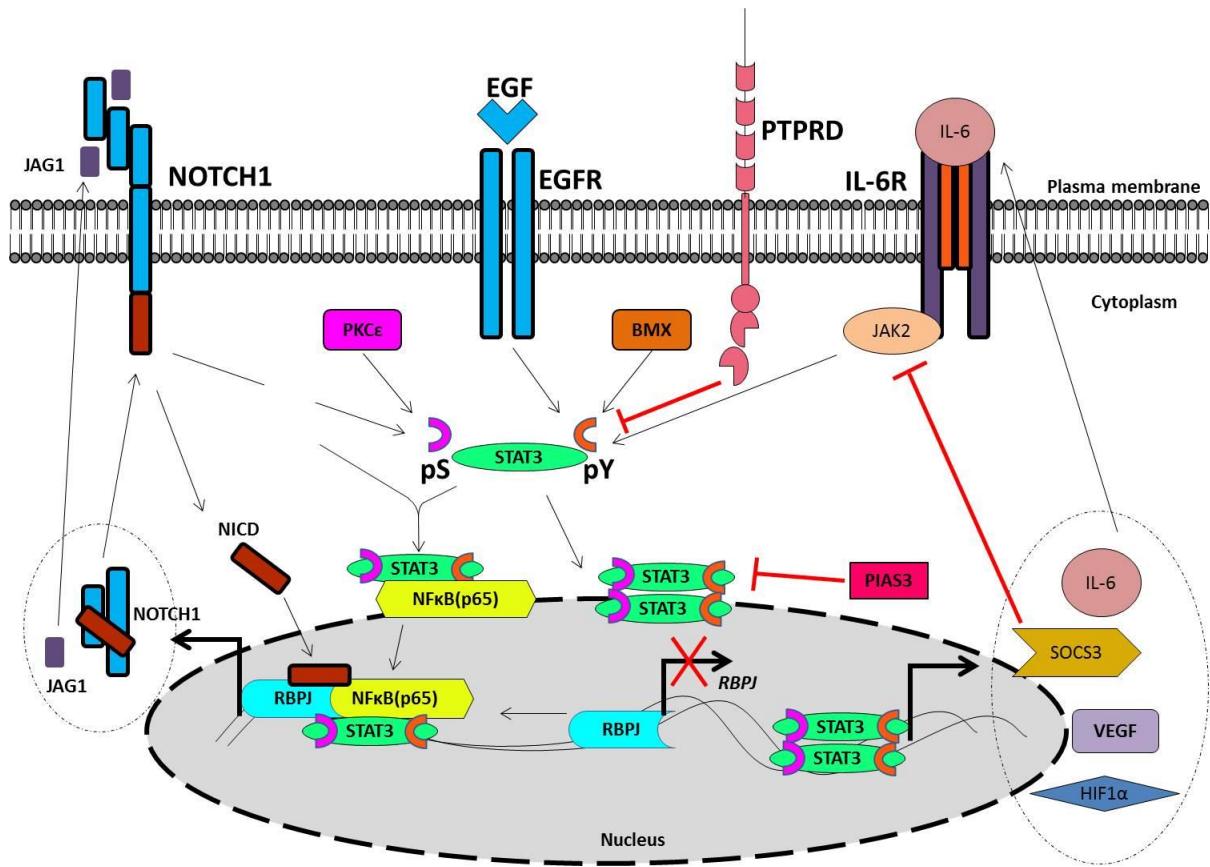


Figure 1. Stat3 pathway regulation in human glioblastoma

The latent cytoplasmic STAT3 is activated by phosphorylation on Y705 and S727 residues. The Y705 phosphorylation is mainly induced downstream IL-6 receptor signaling and activation of JAK2. In addition to this mechanism, EGFR or its mutated versions including EGFRvIII possesses a kinase activity that directly phosphorylates STAT3-Y705. S727 phosphorylation is directly mediated by PKC ϵ or through an unknown mechanism downstream the NOTCH1 pathway activation. Activated STAT3 homodimerise, translocate to the nucleus and interact with GAS for target gene regulation. They up-regulates expression of several genes, including HIF1 α , VEGF, SOC3, and IL-6. The released IL-6 contributes to auto-and paracrine activation of its pathway. In addition to homodimerisation, pSTAT3-Y705 heterodimerises with NF κ B (p65). Activated STAT3 and NF κ B (p65) bind to DNA and co-regulate several target genes, including that of NOTCH1 and its ligand Jagged 1. In absence of NICD (Notch Intracellular Domain), RBPJ is a gene repressor. It switches from a repressor to a co-activator of gene expression when the NICD bind to the complex. The STAT3 pathway is down-modulated by PTPRD that dephosphorylate activated STAT3, PIAS3 that directly inhibits activated STAT3 and SOCS3 which inhibits JAK2.

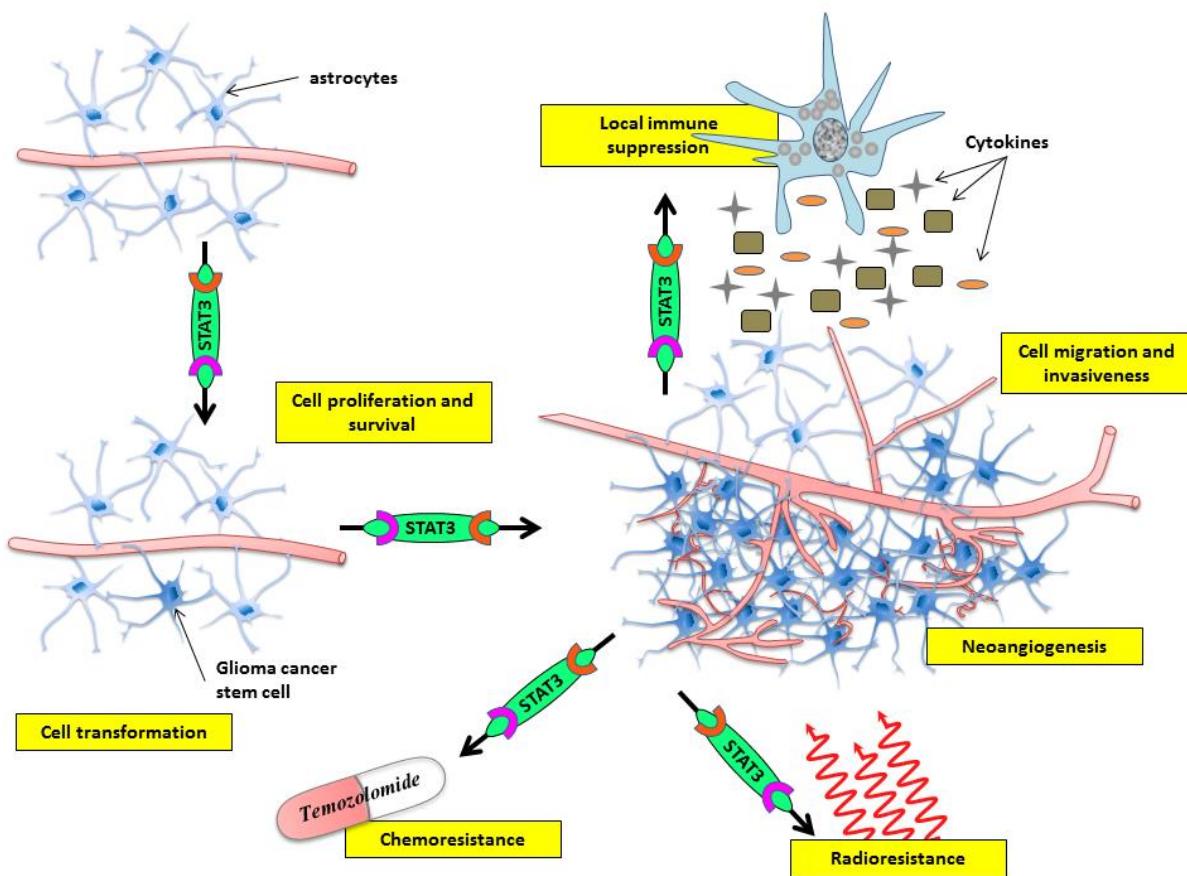


Figure 2. Role of STAT3 in glioblastoma tumorigenesis and tumor aggressiveness.

Activation of STAT3 in non-neoplastic cell contributes to their transformation. In GBM, STAT3 is involved in stem cell proliferation and survival. Activated STAT3 also participate in the maintenance of stemness in GBM stem cells. In glioma, activation of STAT3 pathway in tumor cell sustains cell proliferation and the resistance to death induction by hypoxia, chemotherapy or radiotherapy. To restrain the phenomenon of hypoxia, tumor cell up-regulate, through activated STAT3, an overexpression of the VEGF gene. The subsequent release of VEGF induces paracrine activation of endothelial cell proliferation and neoangiogenesis. Moreover, activation of STAT3 in tumor cell induces the release of several factors such as MMP that promotes cell migration and non-neoplastic brain tissue invasion. Invasion is also supported by STAT3-induced glioma cell expression of adhesion molecules such as ICAM-1. STAT3-induced release of chemokines and other cytokines like IL-6 contribute to block the maturation or to inactivate immune cell and induce immune tolerance of tumor cells.

*Travaux
Personnels*

Objectif général de la thèse

Les glioblastomes sont les plus fréquents et les plus agressifs des cancers du cerveau. Le témozolomide ajouté au traitement des patients de façon concomitante et adjuvante à la radiothérapie est devenu le standard du traitement des patients avec GBM. Le pronostic reste cependant mauvais, avec une survie médiane estimée à 15 mois. Cette agressivité de la maladie est due en grande partie à la radiorésistance intrinsèque des cellules de GBM, entraînant des récidives tumorales dans le volume irradié. Les acteurs moléculaires impliqués dans les mécanismes de radiorésistance sont des cibles thérapeutiques pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie. Leur identification est un prérequis à l'élaboration de stratégies ciblées de radiosensibilisation. Le radiosensibilisant idéal n'est que très peu cytotoxique lorsqu'il est utilisé seul, avec cependant un effet qui potentialise celui de l'irradiation de la tumeur. Depuis près d'une décennie, des études concordantes ont identifié la suractivation de STAT3 dans les gliomes comme une cible thérapeutique. Cependant aucune thérapie ciblant cette protéine n'a encore été validée. Afin de mieux affiner le ciblage de STAT3, il est utile de comprendre son rôle dans les mécanismes impliqués dans l'agressivité de la maladie et notamment la radiorésistance.

Article publié

STAT3 serine 727 phosphorylation: a relevant target to radiosensitize human glioblastoma

Zangbédé Guy Ouédraogo, Mélanie Müller-Barthélémy, Jean-Louis Kemeny, Véronique Dedieu, Julian Biau, Toufic Khalil, Lala Ines Raoelfils, Adeline Granzotto, Bruno Pereira, Claude Beaudoin, Innocent Pierre Guissou, Marc Berger, Laurent Morel, Emmanuel Chautard and Pierre Verrelle.

Objectifs de l'étude

Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que l'IL-6 est surexprimée dans les gliomes avec une valeur pronostique négative sur la survie des patients (Tchirkov et al., 2001, 2007). Le fait que l'IL-6 soit un activateur de la phosphorylation canonique de STAT3 sur le résidu tyrosine 705 suggère que l'activation de STAT3 pourrait participer à l'agressivité des gliomes. Des travaux ont donc été réalisés pour explorer un rôle de l'IL-6 dans la radiorésistance intrinsèque des GBM. Les cellules de GBM ont été traitées avec des anticorps neutralisant le récepteur à l'IL-6 sans aucun effet sur la radiorésistance intrinsèque des cellules malgré l'inhibition de pSTAT3-Y705. Il en a été de même avec un inhibiteur de la voie JAK/STAT, le JSI-124(Chautard et al., 2010).

Ces découvertes suggèrent que pSTAT3-Y705 pourrait contribuer à l'agressivité des GBM *in vivo* en ciblant les interactions avec le microenvironnement (immunosuppression, invasion et angiogenèse) plus que la radiorésistance tumorale intrinsèque. Des récentes études concordantes ont souligné la fréquence élevée et le rôle important de la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT3 (pSTAT3-S727) indépendamment de l'IL-6 et de pSTAT3-Y705 dans plusieurs types de cellules cancéreuses y compris des cellules souches de GBM (Miyakoshi et al., 2014; Qin et al., 2008; Villalva et al., 2011).

Les objectifs de cette étude ont été :

- (1) d'évaluer qualitativement et quantitativement la présence de pSTAT3-S727 et pSTAT3-Y705 dans un panel de lignées de GBM humain ;
- (2) de rechercher un lien entre ces activations et le degré de radiorésistance intrinsèque des lignées étudiées ;
- (3) d'étudier l'impact sur la radiosensibilité intrinsèque d'une inhibition la plus sélective possible de la phosphorylation du résidu sérine 727.
- (4) de rechercher la présence et la fréquence de pSTAT3-S727 et pSTAT3-Y705 sur une série d'échantillons cliniques de GBM en immunohistochimie semi-quantitative.

STAT3 serine 727 phosphorylation: a relevant target to radiosensitize human glioblastoma

Zangbéwendé Guy Ouédraogo^{1,2,11}, Mélanie Müller-Barthélémy^{1,2}, Jean-Louis Kemeny^{1,3}, Véronique Dedieu^{1,2}, Julian Biau^{1,2,4}, Toufic Khalil^{5,6}, Lala Ines Raoelfils⁷, Adeline Granzotto⁸, Bruno Pereira⁹, Claude Beaudoin¹⁰, Innocent Pierre Guissou¹¹, Marc Berger^{1,12}, Laurent Morel¹⁰, Emmanuel Chautard^{1,2} and Pierre Verrelle^{1,2}.

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 7283, CREaT, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

²Centre Jean Perrin, Service Radiothérapie, Laboratoire de Radio-Oncologie Expérimentale F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

³CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, F-63003 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

⁴Institut Curie, CNRS UMR3347, INSERM U2021, 91405 Orsay, FRANCE

⁵CHU Clermont-Ferrand, Service de Neurochirurgie, F-63003 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

⁶Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 7282, IGCNC, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

⁷Centre Jean Perrin, Service D'anatomopathologie, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

⁸INSERM, UMR1052, Radiobiology Group, Lyon, France

⁹CHU Clermont-Ferrand, Biostatistics unit, DRCI, F-63003 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

¹⁰Clermont Université, Université Blaise-Pascal, GReD, UMR CNRS 6293, INSERM U1103, 24 Avenue des Landais BP80026, 63171 Aubière 63177 AUBIERE, FRANCE

¹¹Laboratoire de Pharmacologie, de Toxicologie et de Chimie Thérapeutique, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 OUAGADOUGOU 03, BURKINA FASO

¹²CHU Clermont-Ferrand, Service d'Hématologie Biologique/Immunologie, F-63003 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

Running head: Targeting pSTAT-S727 to radiosensitize glioma

Address correspondence to : Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-Oncologie Expérimentale, EA7283 CREaT – Université d'Auvergne, 58 rue Montalembert, Clermont Ferrand, 63011, France. Tel : +33.4.73.27.81.42 ; Fax : +33.4.73.27.81.25; E-mail :

Emmanuel.chautard@cjp.fr ; oza_guy@yahoo.fr

Funding: This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy-De-Dôme), by the Institut National du Cancer and by the Region Auvergne. ZG.O. was the recipient of a fellowship from the Ministère des Enseignements Secondaire et Supérieur, Burkina Faso.

Conflict of interest: None.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/bpa.12254

Abstract

Radiotherapy is an essential component of glioma standard treatment. Glioblastomas (GBM) however display an important radioresistance leading to tumor recurrence. To improve patient prognosis, there is a need to radiosensitize GBM cells and to circumvent the mechanisms of resistance due to interactions between tumor cells and their microenvironment. STAT3 has been identified as a therapeutic target in glioma because of its involvement in mechanisms sustaining tumor escape to both standard treatment and immune control. Here, we studied the role of STAT3 activation on tyrosine 705 (Y705) and serine 727 (S727) in glioma radioresistance. This study explored STAT3 phosphorylation on Y705 (pSTAT3-Y705) and S727 (pSTAT3-S727) in glioma cell lines and in clinical samples. Radiosensitizing effect of STAT3 activation down-modulation by Gö6976 was explored. In a panel of 15 human glioma cell lines, we found that the level of pSTAT3-S727 was correlated to intrinsic radioresistance. Moreover, treating GBM cells with Gö6976 resulted in a highly significant radiosensitization associated to a concomitant pSTAT3-S727 down-modulation only in GBM cell lines that exhibited no or weak pSTAT3-Y705. We report the constitutive activation of STAT3-S727 in all GBM clinical samples. Targeting pSTAT3-S727 mainly in pSTAT3-Y705 negative GBM could be a relevant approach to improve radiation therapy.

Keywords: Glioma, STAT3, radiotherapy, resistance, Gö6976.

Introduction

Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system. Among them, the most frequent and malignant type is glioblastoma multiforme (GBM). GBM displays an outstanding resistance to anticancer therapies. Despite the gold standard treatment that encompasses surgery and radiotherapy with temozolomide-based concurrent and adjuvant chemotherapy, the median survival of selected GBM patients is almost 14.6 months (52). Since the tumor recurrence usually occurs within the treated volume (13, 35), radioresistance of glioma cells is involved in treatment failure. Tumor resistance to radiation involves radioresistance of tumor cells themselves i.e. intrinsic radioresistance, as well as interactions between tumor cells and their microenvironment (2, 4). Understanding the molecular mechanisms involved in GBM radioresistance might help improve GBM treatment effectiveness.

Concordant studies have reported Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) as a potential therapeutic target in glioma because of its functions at a focal point of multiple converging signaling pathways involved in cancer aggressiveness (6). There are several isoforms of STAT3 including alpha (α) and beta (β), which are generated by alternative mRNA splicing of a single gene transcript STAT3 (11, 12, 47) or by proteolytic cleavage (12). Some of them are c-terminal truncated proteins that act as dominant negatives of the corresponding full-length protein. Early studies revealed that activation of STAT3 functions requires phosphorylation of its tyrosine (pSTAT3-Y705) residue (46, 65). However it has been shown that besides Y705 and independently of gp130/JAK pathway, STAT3 can be phosphorylated also on serine 727 (pSTAT3-S727) residue (43). The canonical Y705 activation can be induced by the binding of the Interleukin 6-family cytokine receptors to the gp130 receptor and the consecutive Janus kinase 2 (JAK2) activation (25).

The pSTAT3-Y705 then form homodimers or heterodimers with partner proteins such as STAT1 and NF-κB (p65) (29). Those dimers translocate into the nucleus where they regulate expression of target-genes (5). pSTAT3-Y705 inhibits apoptosis through upregulation of *Survivin* (38), *Mcl-1* (28), *BCL-XL* (5, 9, 28) and promotes cell proliferation by upregulating *c-myc* (5, 9). Through increased *VEGF* expression, pSTAT3-Y705 stimulates angiogenesis (39). It also supports cell migration by augmenting *MMP9* (51) and *ICAM-1* (29) expression. It has been also shown that pSTAT3-Y705 activation in tumor cells participates in locally blocking immune cell maturation and activation by modifying tumor secretome (48). Moreover, pSTAT3-Y705 expression in glioma tumors has been positively correlated to tumor grade as well as to a worse patient prognosis (1, 37). Those findings suggested that STAT3 activation is involved in glioma tumorigenesis and tumor aggressiveness. Furthermore, *in vivo* study of glioma molecular response to ionizing radiation showed a time-dependent increase in pSTAT3-Y705 expressing tumor cells in a spontaneous GBM model generated in mice (23). Irradiation also induced a dose-dependent increase in pSTAT3-Y705 nuclear accumulation in glioma xenografts (29). The above published data suggest that STAT3 activation might participate in influencing glioma sensitivity to radiotherapy. However, using JSI-124, a JAK/STAT3 inhibitor or specific gp130 blocking antibodies, we showed that down-regulating pSTAT3-Y705 level in GBM cells did not impact cell intrinsic radioresistance (15).

In most studies, STAT3 pathway activation has been assessed through Y705 residue phosphorylation. In contrast to Y705 activation, upstream regulating events and downstream consequence of pSTAT3-S727 are not clearly understood. In T98G and MO59K human glioma cell lines, pSTAT3-S727 activation depends in part on PKCε (3). In GBM stem cells, pSTAT3-S727 is influenced by the NOTCH pathway since inhibiting NOTCH by GSI-18 impairs pSTAT3-S727 accumulation (20).

Some early studies reported that pSTAT3-S727 might have a critical biological role in GBM. It has been shown that pSTAT3-S727 was accumulated in GBM tumors (7) and was correlated with malignancy (49). Other studies reported that pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 are independent bad prognosis markers in GBM and their co-expression was associated to a worse patient clinical outcome (36, 37). These findings were consistent with others which reported that pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 were playing a critical role in GBM stem cells, since disrupting STAT3 both dimerization and binding to DNA resulted in apoptosis (55), decreased cell proliferation and reduced tumorigenic capacity (50, 55). Nevertheless, it remains a crucial need of a specific inhibitor of pSTAT3-S727 to help decipher the role of STAT3 in malignancy. In addition to Y705 and S727 phosphorylation, it has been reported that lysine acetylation (42, 44, 63) and methylation (61) are involved in STAT3 functional regulation. Furthermore, STAT proteins lacking phosphorylation on Y705 or mutated at this position, can still form dimers and induce transcription (8, 32-34, 60). To date, little is known about the relationship between the glioma response to radiation and the phosphorylation status of STAT3 on both S727 and Y705.

In this study, we evaluated by western blotting STAT3 pathway activation in a panel of 15 glioma cell lines. We found a correlation between pSTAT3-S727 accumulation and intrinsic radioresistance. Moreover Gö6976, a chemical multiple kinase inhibitor, reduced pSTAT3-S727 level in GBM cell lines that exhibited no or weak levels of pSTAT3-Y705. Interestingly, this decrease in pSTAT3-S727 was accompanied by a highly significant radiosensitization. Immunohistochemical analyses confirmed that pSTAT3-S727 is a common feature in GBM clinical samples, strengthening that it might be a relevant therapeutic target.

Materials and Methods

Cell culture – SF763, SF767, U87MG and U251MG human glioma cell lines were kindly provided by Dr C. Delmas (Centre Claudius Regaud, Toulouse, France). SW1783, SNB19, and U373MG human glioma cell lines were given by N. Auger (Institut Curie, Paris, France). T98G, U118MG and CB193 cell lines were given by G. Pennarun (CEA, Grenoble, France). M059K, MO59J, CCF, LN229 and U138MG cell lines were given by N. Foray (Centre Léon Bérard, Lyon, France). All culture reagents were purchased from GIBCO (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Gö6976 (No 365250), a cell-permeable, reversible, and ATP-competitive inhibitor of protein kinase C, was purchased from Merck Millipore (Nottingham, United Kingdom). Cells were grown in DMEM (with 4500mg/l glucose and L-glutamine) supplemented with Sodium Pyruvate 1%, Non-Essential Amino Acids 1%, Gentamicin 10µg/ml and 10% Fetal Calf Serum (20% for U138MG and CCF) in a humidified incubator containing 5% CO₂ at 37°C.

Antibodies – For Western blot, immunofluorescence and immunohistochemistry, anti-pSTAT3-Y705 monoclonal antibody (mAb, No 9145) was purchased from Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and anti-pSTAT3-S727 mAb (No 1121-1) from Euromedex (Souffelweyersheim, France). For Western blot, rabbit anti-STAT3 mAb (No 4904) was purchased from Ozyme and anti-β-actin polyclonal antibodies (pAbs, No A2066) from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Anti-phospho-JAK2-Y1007/1008 pAbs (No 3771) and anti-JAK2 mAb (No 3230) were purchased from Ozyme. Anti-EGFR pAbs (No RB-1417-P1) were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France) and anti-phospho-EGFR-Y1068 mAb (No 1138-S) from Euromedex. Anti-PKCα pAbs (No 06-870) and anti-phospho-PKCα-S657/Y658 pAbs (No 07-790) were purchased from Millipore (Molsheim, France). Anti-rabbit conjugated to horseradish peroxidase was from P.A.R.I.S. (Compiègne, France).

For immunofluorescence Cy3-conjugated goat anti-rabbit pAbs (No 111-165-144) were purchased from Interchim (Montluçon, France).

Western blotting – Cells in exponential phase of growth were harvested and whole cell extract prepared with Buffer C supplemented with NP-40, phosphatase inhibitors (NaF, Na₃VO₄) and cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France) and subjected to SDS-PAGE as previously reported (15). Protein accumulation was normalized to β-actin appropriate loading control. Phosphorylation of STAT3 was normalized to the corresponding total STAT3. Signal detection was performed using ECL Immobilon system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Three independent experiments were used for analysis with Quantity One .

Immunofluorescence – Glioblastoma cell lines were seeded in 9 cm² slide-flasks. 6h after plating, they were treated with Gö6976. Fixation was done with methanol after 24h or with PFA 4% after 72h, respectively for pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 detection. Fixed cells were then permeabilized with PBS-triton 0.5% and incubated with antibody in PBS-BSA 0.5% before image acquisition and analysis. All images were acquired by a Leica SPE microscope with a 40X/1.15 oil immersion objective. Signal analysis was performed by ImageJ software. Nuclei were selected in DAPI channel as region of interest (ROI). Threshold of fluorescence intensity was applied in Cy3 channel and fluorescence intensity of all ROI was measured by the plugin “Measure”. Results were corrected by a factor which integrated the background and the area of each ROI according to the formula: Corrected total cell fluorescence (CTCF) = Integrated Density – (Area of selected cell X Mean fluorescence of background). A mean of 100 cells in each condition was analyzed.

Cell growth assay – Global cell growth was assessed using the colorimetric MTT (3[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Cells were seeded in 96-well plates at a density adjusted to cell lines.

Gö6976 was added 6h after seeding and remained in culture medium until the experiment ended. At 24-hour incubation with Gö6976, irradiation was performed at room temperature as single exposure doses delivered by an Elekta SL18 linear accelerator with a nominal energy of 6 MV at a dose rate of about 400 cGy.min⁻¹. Doses ranging from 2 to 10 Gy were calculated using a dedicated treatment planning system to a depth of water of 1.5 cm. Intensity was collected at 490 nm using a Bio-Rad 11885 spectrophotometer. Cell growth was calculated as following: (ODtest sample–ODblank/ODcontrol–ODblank) ×100. Each experimental condition was analyzed at least in triplicate. Three independent experiments were used for analysis.

Clonogenic cell survival assay – Clonogenic cell survival assay was performed as previously reported (15). Briefly, cells were seeded at a density of 1 000 to 6 000 per 25-cm² flask. Gö6976 was added in growth medium 6h after seeding, for 72-hour incubation before irradiation. Irradiation was performed as described in the preceding chapter. Gö6976 containing medium was replaced by growth medium 24h after irradiation. The Plating Efficiency (PE) represents the percentage of seeded cells that grew into colonies. Colonies with more than 50 cells were counted by microscopic inspection, and PE as well as the radiation-surviving fraction (PE of experimental group/PE of control group) was determined. Each experimental condition was performed in triplicate. Survival curves were obtained with data from three independent experiments in accordance with linear-quadratic model.

Glioblastoma clinical samples – GBM samples (Biobank N° DC-2012-1584) were taken from the material of surgical resection during the course of standard diagnosis procedure. Thirty tumors, classified as GBM (grade IV, WHO, 2007), according to histological diagnosis and grading criteria were used in this study.

Patients were treated by surgery followed by radiotherapy and concomitant temozolomide followed by at least six monthly cycles of adjuvant temozolomide (52).

Immunohistochemistry – Immunostaining of pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 was performed with a Benchmark XT immunostainer (Ventana, Illkirch, France) on 5- μ m paraffin sections. After deparaffinization, antigen retrieval was carried out in CCI buffer. Antibodies were incubated at 37°C and the revelation was made with the Ultraview detection kit (Ventana). Sections were semiquantitatively scored by light microscopy by two pathologists. Cytoplasmic and nuclear staining, percentage of stained tumor cells and staining intensity (no, weak, moderate, strong) for each localization were specified.

Statistical analysis – Statistical analysis was performed using Stata 13 software (StataCorp LP, College Station, US). The tests were two-sided, with a Type I error set at $\alpha = 0.05$. Quantitative data were presented as mean \pm standard-error of mean. Comparisons between groups were realized using ANOVA or the Kruskal-Wallis test (assumption of normality assessed using the Shapiro–Wilk test and homoscedasticity verified by Bartlett test) followed, when appropriate, by Dunnett's test (multiple comparison procedure to compare each of a number of treatments with a single control). In case of non-multiple comparison and due to sample size, Mann-Whitney's test was proposed. The study of relation between quantitative parameters was explored by correlation coefficients (Pearson or Spearman according to statistical distribution, noted r). Finally, correlated repeated data were analyzed using random-effects models which allow taking into account between and within subject variability and to study fixed effects: groups, dose and their interaction. The normality of residuals was verified for each considered model. For each of pSTAT-Y705 and pSTAT3-S727 staining, the percentage of stained tumor cells was multiplied by the intensity (1, 2, or 3) and added to get a score between 0 and 300. Survival rates were estimated by the Kaplan Meier method.

The study of pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 (considered as quantitative parameters) staining impact on survival rate was considered, in first time, with Cox model. These parameters were then categorized according to the statistical distribution (rank indicators). Then, survival rates were compared by groups with log-rank test.

Results

Serine 727 phosphorylated STAT3 correlates with intrinsic radioresistance – By western blots, we assessed STAT3 phosphorylation status in 15 human glioma cell lines that were grown in basal conditions. Levels of protein activation were calculated by the phospho-protein/total protein expression ratio. All cell lines harbored variable level of pSTAT3-S727. By contrast, pSTAT-Y705 is not found in all cell lines because it was hardly or not detectable in SF767, U87MG, U118MG and U138MG (Figure 1, Table 1). There was no correlation between amounts of accumulated pSTAT3-S727, pSTAT3-Y705 and total STAT3. Previously described intrinsic radioresistance determination by standard clonogenic cell survival assay (15) was then extended to the selected glioma cell lines. Statistical analysis revealed that pSTAT3-S727 levels, but neither pSTAT3-Y705 nor total STAT3, were correlated (Spearman, $r=0.57$, $p<0.05$) with the surviving fractions at 2 Gy (SF2). We observed that in human glioma, STAT3 pathway was differently activated *in vitro* and that pSTAT3-S727 and intrinsic radioresistance positively correlated.

Gö6976 reduces *in vitro* growth of human glioblastoma – Since STAT3 is differently activated in glioma cell lines, we hypothesized that glioma might respond differently to STAT3 pathway inhibition. We tested Gö6976, a multiple kinase inhibitor that was previously reported to inhibit in diverse cell types upstream regulators of STAT3 activation such as PKCs and JAK (3, 17, 22).

We selected 3 GBM cell lines that displayed both pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 activation (SF763, U251MG and T98G) and 3 others that did not exhibit detectable pSTAT3-Y705 (SF767, U118MG and U87MG). 90-hour incubation with Gö6976 resulted in a dose-dependent growth inhibition, regardless of STAT3 activation status (Figure 2). However the cell lines displayed different sensitivity to Gö6976 as shown by estimated relative IC₅₀ ranging from 73 to 209 nM.

Gö6976 radiosensitizes pSTAT3-Y705 negative human glioblastoma cells –We further explored effect of Gö6976 on intrinsic radioresistance of GBM. MTT tests were done on cells treated with Gö6976, at 72h after 4-Gy irradiation. Data were normalized to controls (cells treated with Gö6976 without irradiation) to exclude the effect of Gö6976 alone on cell growth. Incubation with Gö6976 significantly enhanced growth inhibiting effect of irradiation only on the three pSTAT3-Y705 negative cell lines (Mann-Whitney test, p<0.05, Figure 3A-F). Thus, Gö6976 radiosensitized at 4 Gy GBM cells depending on the activation status of STAT3.

To confirm these results, we performed standard clonogenic cell survival assay on SF763, SF767 and U118MG cell lines. In order to reveal radiosensitizing effect of Gö6976, we used doses reducing only slightly cell plating efficiency (PE). We first tested Gö6976 effect on PE and observed less than 25% decrease of SF763 PE with 1000 nM whereas 200 nM induced 43% decrease on SF767 (Figure 3G and H). Because 150 nM of Gö6976 did not reduce the PE of U118MG cells, we increased the drug concentration to 1000 nM that reduced 32% of cell PE (Figure 3I). Treating SF767 cells with Gö6976 before irradiation at doses ranging from 2 to 10 Gy resulted in a highly significant radiosensitization even at lowest doses, in comparison to untreated irradiated controls (random-effects model, p<0.001, Figure 3K). For U118MG cell line, we had to increase cell density at plating in order to obtain enough colonies after treatment with Gö6976 combined to radiation.

As previously reported (10, 14), heightening cell density at plating increased resistance to irradiation alone (SF of 0.8 vs 0.4, Figure 3I and table 1). When U118MG cells were irradiated at doses higher than 6 Gy no colony was observed. Irradiation of Gö6976-pretreated U118MG cells resulted in a significant radiosensitization (random-effects model, p<0.001, Figure 3L). These results confirmed that Gö6976 radiosensitized SF767 and U118MG cell lines that are pSTAT3-Y705 negative. However, SF763 cells that were pSTAT3-Y705 positive were not radiosensitized by Gö6976 treatment (Figure 3J).

Gö6976 down-modulates pSTAT3-S727 only in pSTAT3-Y705 negative cells – To investigate the mechanisms involved in the effects of Gö6976, we explored STAT3 pathway activation in cells treated with Gö6976. As shown in Figure 4, treatment with Gö6976 resulted in a decrease of pSTAT3-Y705 in SF763, T98G and U251MG after 72-hour incubation and earlier (24h, data not shown). Both pSTAT3-S727 and total STAT3 levels were unaffected in those cells. By contrast, pSTAT3-Y705 negative cells showed decreased levels of pSTAT3-S727 with no change in total STAT3. To confirm western blot results and examine the subcellular distribution of pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 following Gö6976-treatment, we performed immunofluorescence assay. Analysis confirmed that, in untreated cells, pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 were distributed in cytoplasm and nuclei with a strong predominance in nuclei (Figure 5). The pSTAT3-S727 signal was observed in all cell lines but pSTAT3-Y705 was not detectable in SF767, U118MG and U87MG (data not shown). 72-hour incubation of cells with Gö6976 resulted in a decreased pSTAT3-S727 specific signal in the pSTAT3-Y705 negative cell lines (Figure 5A). Treatment with Gö6976 also reduced early (at 24h) STAT3-Y705 phosphorylation in SF763, T98G and U251MG (Figure 5B). Moreover, Gö6976 did not induce any change in subcellular location of neither pSTAT3-S727 nor pSTAT3-Y705. Nuclear pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 signal quantification confirmed these observations (Figure 5, histograms).

These results confirmed that Gö6976 down-modulated pSTAT3-Y705 in GBM cells and also reduced pSTAT3-S727 only in the pSTAT3-Y705 negative cell lines.

Gö6976-induced pSTAT3-S727 down-modulation remains 24h after irradiation –

Gö6976 effects on GBM cells have been investigated also in irradiated conditions (Figure 6). Cells were incubated in Gö6976 for 72h, then irradiated at 4 Gy and harvested 24h later. After irradiation, a decrease of total STAT3 is described in Gö6976-pretreated (compared to only irradiated) in SF767 and T98G cells but not in the other cell lines. We also observed a radio-induction of pSTAT3-Y705 in U118MG and U87MG cells without Gö6976 treatment but not in SF767 cells. We still detected pSTAT3-Y705 in U251, SF763 and T98G cells following irradiation. The Gö6976-induced pSTAT3-Y705 inhibition (in not irradiated cells, Figure 4) still remained in SF763 after irradiation (Figure 6). Moreover, Gö6976 impeded the radio-induced pSTAT3-Y705 phosphorylation in Gö6976-pretreated and irradiated U118MG and U87MG cells. However, Gö6976 failed to maintain pSTAT3-Y705 inhibition after irradiation in Gö6976-pretreated U251MG and T98G cells. For all cell lines, pSTAT3-S727 was still detected in cells untreated with Gö6976 and irradiated. But after irradiation, the Gö6976-induced down-modulation of pSTAT3-S727 remained 24h following 4-Gy irradiation. We concluded that 4-Gy irradiation did not affect the Gö6976-induced pSTAT3-S727 down-modulation in pSTAT3-Y705 negative GBM cells.

STAT3 pathway activation in glioblastoma clinical samples – To confirm clinical relevance of targeting the STAT3 pathway in glioma patients, we assessed the activation level of pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 in human GBM paraffin-embedded sections (Figure 7). The calculated staining score for pSTAT3-Y705 ranged from 0 to 150. In the positively stained GBM cells, pSTAT3-Y705 was located mainly in the nuclei (Figure 7B-D) whereas cytoplasm was no or weakly stained. The pSTAT3-Y705 positive staining was found in 24/30 patients (Table 2).

In these positive specimens, pSTAT3-Y705 was accumulated in 38% of total GBM cells. Staining intensity was variable; the majority (45%) of GBM cells showed a moderate staining. Interestingly, in pSTAT3-Y705 positive samples, we observed pSTAT3-Y705 staining of some blood vessel endothelial cells. Like in tumor cells, staining intensity was variable and mainly located in the nuclei (Figure 7C and D). We did not find any pSTAT3-Y705 stained stromal cell in the tumor sections that did not display pSTAT3-Y705 stained GBM cells (Figure 7A). In the vicinity of vessels, we found few lymphocytes and histiocytes that were negative for pSTAT3-Y705 staining. The pSTAT3-S727 staining was found in GBM cells of all specimens (Table 2) with a score ranging from 180-300. The majority of GBM cells displayed a moderate or a high intensity of positive pSTAT3-S727 staining (Table 2). The pSTAT3-S727 staining was located in cytoplasm and nuclei but, nuclei were more intensely stained than cytoplasm (Figure 7F-H). Moreover, all GBM cells of all tumor specimens were positively stained for pSTAT3-S727. However, Figure 7E shows one transitional zone with invasive stained malignant cells among non-stained non-neoplastic brain cells. Thus, unlike pSTAT3-Y705, pSTAT3-S727 is accumulated by all GBM cells in all GBM specimens of our cohort. Interestingly, blood vessel endothelial cells were highly positive for pSTAT3-S727 staining (Figure 7G). In case of capillary proliferation, endothelial cells also displayed intense pSTAT3-S727 staining (Figure 7H). Like for pSTAT3-Y705, the rare lymphocytes and histiocytes were negative for pSTAT3-S727 staining. We further explored the relationship between pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 expression and overall survival. Neither pSTAT3-Y705 ($p = 0.34$) nor pSTAT3-S727 staining ($p = 0.42$) were associated with patient overall survival.

Discussion

Radiotherapy is a main part of the gold standard treatment of GBM patients despite a demonstrated tumor radioresistance (52). GBM cells release, *in vitro* and *in vivo*, cytokines such as IL-6, which modulate their environment to support their growth. IL-6 and STAT3 are involved together in a same vicious regulatory loop in glioma since IL-6 initiates STAT3 activation via the complex gp130/IL-6R α (25) and activated STAT3 in turn induces IL-6 secretion (58). The role of IL-6 in mediating immune system inactivation through activation of STAT3 in GBM and glioma stromal cells is established (48, 59, 64) but it does not explain all the bad clinical outcome of neither IL-6 nor STAT3 activation in GBM cells. Inhibition of gp130/pSTAT3-Y705 signaling axis failed to radiosensitize glioma despite evidence that STAT3 pathway activation supports several hallmarks of glioma, including resistance to irradiation and to cell death induction (5, 23, 29, 31). Since STAT3 functions might be at least in part driven by pSTAT3-S727 as reported in other malignancies including prostate cancer (43), colorectal cancer (16), chronic lymphocytic leukemia (24) and mouse hepatocarcinoma (41), we postulated that pSTAT3-S727 might be involved in glioma intrinsic radioresistance.

In this study, we found that STAT3 pathway was differently activated in cell lines, since, on one hand, some clearly exhibited variable levels of pSTAT3-Y705 while the others did not (Figure 1 and Table 1). On the other hand, pSTAT3-S727 was expressed in a large-amplitude scale in all 15 glioma cell-lines. Interestingly, we reported for the first time that pSTAT3-S727 correlated with intrinsic radioresistance. Those analyses have been achieved before the American Type Culture Collection (ATCC) revealed that U251MG, U373MG and SNB19 originated from a same cell line. However, they are grown in different laboratories worldwide and they express phenotypic variations such as IL-6 secretion (data not shown). We further hypothesized that targeting pSTAT3-S727 would affect glioma radiosensitivity.

To our knowledge, to date, there is no reported specific inhibitor of pSTAT3-S727 capable of discriminating pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 (40, 53). Because pSTAT3-S727 regulation involved several pathways depending on cell types, broad-spectrum kinase inhibitors are useful in exploring STAT3 pathway activation. Western blots and immunofluorescence analyses showed that Gö6976 significantly decreased pSTAT3-Y705 level in cells. Interestingly, Gö6976 reduced pSTAT3-S727 level only in pSTAT3-Y705 negative cell lines. The subcellular location of both phosphorylated STAT3 was unaffected by Gö6976. The discrimination in pSTAT3-S727 inhibition depending on STAT3 status strengthened the relevance of testing Gö6976 on glioma cells. STAT3 pathway activation by Y705 and/or S727 phosphorylation has been reported to play a critical role on cell growth by stimulating proliferation, blocking cell death induction and supporting cell survival (5, 9, 27, 31, 43). We tested Gö6976 on GBM cell growth, choosing three cell lines that displayed pSTAT3-Y705 and three others that did not. Unlike a previous study that used lower doses of Gö6976 on U251MG (19), we report here that treating cells with Gö6976 resulted in a dose-dependent decrease of cell growth regardless of STAT3 activation status. Confirming growth inhibition, Gö6976 reduced SF763 and SF767 cell PE. Impact of Gö6976 on cell growth should not be attributed to inhibition of the one rather than the other of pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 because each of them has been reported to sustain cell growth (20, 28, 55). Since Gö6976 is an inhibitor of multiple kinases including Chk1 and the T790M mutant EGFR (17, 21, 54), Gö6976-induced cell growth decrease might also be due to another property. It remains unclear how Gö6976 did act in down-modulating pSTAT3-S727. Inhibition of pSTAT3-Y705 was clear as earlier as 6-hour incubation (data not shown), whereas the decrease in pSTAT3-S727 was not obvious before 72h. This latency regarding pSTAT3-S727 is compatible with an effect on any long-lasting activated pathway such as PKCs (17, 30).

However diverse mechanisms have been attributed to Gö6976 in different cancers. Gö6976 abrogated Chk1 activity and abolished DNA-damage induced intra-S and G2/M cell cycle checkpoints in nasopharyngeal carcinoma and breast cancer cells (21, 30). Checkpoint abolition by Gö6976 resulted in sensitizing *in vitro* and *in vivo* nasopharyngeal carcinoma to irradiation or cisplatin treatment (21). Gö6976 also inhibited the T790M mutant EGFR activation when reducing growth of xenografted non-small cell lung cancers (54). Thus, Gö6976 might interfere with several signaling pathways in radiosensitizing human glioma. Further investigation should help understand the mechanism of STAT3 pathway modulation in the GBM cell response to Gö6976.

Consistent with our hypothesis, a single dose of Gö6976 radiosensitized at a 4-Gy irradiation the three pSTAT3-Y705 negative cell lines concomitantly with pSTAT3-S727 down-regulation. This is strengthened by the persistence of Gö6976-induced pSTAT3-S727 down-modulation in the 24h following irradiation of Gö6976-pretreated pSTAT3-Y705-negative cells. Radiosensitization was confirmed on SF767 and U118MG by clonogenic cell survival assay. Radiosensitizing effect of Gö6976 was irradiation-dose-dependent. Gö6976 was a potent radiosensitizer even at the lowest irradiation dose. More interestingly, Gö6976 failed to radiosensitize pSTAT3-Y705 positive cell lines. This observation suggests that radiosensitization was a result of pSTAT3-S727 inhibition. Moreover, these results might be influenced by genetic background of GBM tumors. It has been shown that STAT3 may play in some tumors, a pro- or an anti-oncogenic role, depending on the mutational status of PTEN (18). We showed here that, STAT3 status in turn can influence tumor responsiveness to a chemical treatment (Gö6976) and to irradiation. STAT3 activation status is more likely independent on the mutational status of *PTEN*, *TP53*, *p16*, *p14^{ARF}* or *EGFR* according to genetic data compiled from different laboratories (26, 56, 62).

Moreover, we did not find any variation in PKC α , JAK2 and EGFR signaling, confirming that the down-modulation of both pSTAT3-S727 and cell radioresistance by Gö6976 may not be mediated through those pathways (supplementary Figure S1).

To confirm the relevance of targeting the STAT3 pathway in GBM, we assessed pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 accumulation in GBM clinical specimens collected in our tumor bank. All specimens exhibited variable level of pSTAT3-S727 in all neoplastic cells as well as in some stromal cells, while some samples were pSTAT3-Y705 negative. Our description of pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 in GBM is consistent with other previous reports (36). Some reported that stem-like cells in tumors can differentiate into endothelial cells, thereby generating the tumor vasculature (45, 57). Here, we found that endothelial cells in tumor specimens displayed the similar staining in pSTAT3-S727 and pSTAT3-Y705 as GBM cells. However we did not find any correlation between pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727. We did not also find any correlation linking neither pSTAT3-S727 nor pSTAT3-Y705 with patient overall survival as it has been recently reported (36, 37). The size of the cohort, the constitutive activation of S727 in all samples, the sensitivity of immunostaining and clinical data heterogeneity might explain such discrepancies. As far as pSTAT3-S727 is constitutively accumulated in all GBM cell lines and clinical samples, it might drive oncogenesis (41) and furthermore support constant radioresistance. However, targeting pSTAT3-Y705 in glioma also remains a pertinent strategy at least in part because of its critical role, in relation with IL-6, in modulating tumor microenvironment (48, 59, 64).

In conclusion, our description of STAT3 pathway activation in *vitro* was consistent with our findings in clinical samples. We identified that pSTAT3-S727 is involved in intrinsic radioresistance and unphosphorylated STAT3-Y705 is a predicting marker of glioma response to Gö6976 as a radiosensitizer.

Altogether, our results suggest that unphosphorylated STAT3-Y705 might be also *in vivo* a predictive biomarker of radiosensitization by Gö6976 or its related compounds. They also strengthen the need of a specific inhibitor to neutralize pSTAT3-S727 that could be a relevant target to overcome glioma resistance.

Acknowledgments

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy-De-Dôme), by the Institut National du Cancer and by the Region Auvergne. ZG.O. was the recipient of a fellowship from the Ministère des Enseignements Secondaire et Supérieur, Burkina Faso. We thank the imaging facility Imagerie Confocale de Clermont-Ferrand (ICCF) for provision of Leica SPE microscope. We are grateful to Dr Nicolas Foray for fruitful discussions, Angélique DeHaze, Annette Quinsat, and Jean-Paul Saru for technical assistance.

References

1. Abou-Ghazal M, Yang DS, Qiao W, Reina-Ortiz C, Wei J, Kong L-Y, Fuller GN, Hiraoka N, Priebe W, Sawaya R, Heimberger AB (2008) The Incidence, Correlation with Tumor-Infiltrating Inflammation, and Prognosis of Phosphorylated STAT3 Expression in Human Gliomas. *Clinical Cancer Research*.14:8228-35.
2. Amberger-Murphy V (2009) Hypoxia helps glioma to fight therapy. *Current Cancer Drug Targets*.9:381-90.
3. Aziz MH, Hafeez BB, Sand JM, Pierce DB, Aziz SW, Dreckschmidt NE, Verma AK (2010) Protein kinase C ϵ mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression and cell invasion in various human cancer cell lines via integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2). *Oncogene*.29:3100-9.
4. Barcellos-Hoff MH, Newcomb EW, Zagzag D, Narayana A (2009) Therapeutic Targets in Malignant Glioblastoma Microenvironment. *Seminars in radiation oncology*.19:163-70.
5. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene*.19:2474-88.
6. Brantley EC, Benveniste EN (2008) STAT-3: A Molecular Hub for Signaling Pathways in Gliomas. *Molecular cancer research : MCR*.6.
7. Brantley EC, Nabors LB, Gillespie GY, Choi Y-H, Palmer CA, Harrison K, Roarty K, Benveniste EN (2008) Loss of PIAS3 Expression in Glioblastoma Multiforme Tumors: Implications for STAT-3 Activation and Gene Expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.14.
8. Braunstein J, Brutsaert S, Olson R, Schindler C (2003) STATs Dimerize in the Absence of Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*.278:34133-40.
9. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell Jr. JE (1999) Stat3 as an Oncogene. *Cell*.98:295-303.
10. Buronfosse A, Thomas CP, Ginestet C, Doré JF (1994) Radiosensitivity in vitro of clonogenic and non-clonogenic glioblastoma cells obtained from a human brain tumour. *Comptes rendus de l'Académie des sciences Série III, Sciences de la vie*.317:1031-41.
11. Caldenhoven E, Dijk TBv, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JAM, Lammers J-WJ, Koenderman L, Groot RPd (1996) STAT3 β , a Splice Variant of Transcription Factor STAT3, Is a Dominant Negative Regulator of Transcription. *Journal of Biological Chemistry*.271:13221-7.
12. Chakraborty A, White SM, Schaefer TS, Ball ED, Dyer KF, Twardy DJ (1996) Granulocyte colony-stimulating factor activation of Stat3 alpha and Stat3 beta in immature normal and leukemic human myeloid cells. *Blood*.88:2442-9.
13. Chan JL, Lee SW, Fraass BA, Normolle DP, Greenberg HS, Junck LR, Gebarski SS, Sandler HM (2002) Survival and Failure Patterns of High-Grade Gliomas After Three-Dimensional Conformal Radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*.20:1635-42.

14. Chandna S, Dwarakanath BS, Khaitan D, Mathew TL, Jain V (2002) Low-dose radiation hypersensitivity in human tumor cell lines: effects of cell-cell contact and nutritional deprivation. *Radiation Research.*157:516-25.
15. Chautard E, Loubeau G, Tchirkov A, Chassagne J, Vermot-Desroches C, Morel L, Verrelle P (2010) Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. *Neuro-oncology.*12:434-43.
16. Courapied S, Sellier H, de Carne Trecesson S, Vigneron A, Bernard A-C, Gamelin E, Barre B, Coqueret O (2010) The cdk5 Kinase Regulates the STAT3 Transcription Factor to Prevent DNA Damage upon Topoisomerase I Inhibition. *The Journal of Biological Chemistry.*285:26765-78.
17. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal.*351:95-105.
18. de la Iglesia N, Konopka G, Lim KL, Nutt CL, Bromberg JF, Frank DA, Mischel PS, Louis DN, Bonni A (2008) Dereulation of a STAT3-IL8 Signaling Pathway Promotes Human Glioblastoma Cell Proliferation and Invasiveness. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.*28:5870-8.
19. Donson AM, Banerjee A, Gamboni-Robertson F, Fleitz JM, Foreman NK (2000) Protein kinase C zeta isoform is critical for proliferation in human glioblastoma cell lines. *Journal of Neuro-Oncology.*47:109-15.
20. 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 (2010) NOTCH Pathway Blockade Depletes CD133-Positive Glioblastoma Cells and Inhibits Growth of Tumor Neurospheres and Xenografts. *STEM CELLS.*28:5-16.
21. Feng Z, Xu S, Liu M, Zeng Y-X, Kang T (2010) Chk1 inhibitor Gö6976 enhances the sensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells to radiotherapy and chemotherapy in vitro and in vivo. *Cancer Letters.*297:190-7.
22. Grandage VL, Everington T, Linch DC, Khwaja A (2006) Gö6976 is a potent inhibitor of the JAK 2 and FLT3 tyrosine kinases with significant activity in primary acute myeloid leukaemia cells. *British Journal of Haematology.*135:303-16.
23. Halliday J, Helmy K, Pattwell SS, Pitter KL, LaPlant Q, Ozawa T, Holland EC (2014) In vivo radiation response of proneural glioma characterized by protective p53 transcriptional program and proneural-mesenchymal shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*111:5248-53.
24. Hazan-Halevy I, Harris D, Liu Z, Liu J, Li P, Chen X, Shanker S, Ferrajoli A, Keating MJ, Estrov Z (2010) STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood.*115:2852-63.
25. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal.*334:297-314.
26. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens A-C, Van Meir EG (1999) Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain Pathology.*9:469-79.

27. Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA, Gores GJ (2005) Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology*.42:1329-38.
28. Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, Aoki H, Yokoyama T, Fokt I, Hess K, Conrad C, Madden T, Sawaya R, Kondo S, Priebe W, Kondo Y (2007) A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene*.26:2435-44.
29. Kesanakurti D, Chetty C, Maddirela DR, Gujrati M, Rao JS (2013) Essential Role of Cooperative NF- κ B and Stat3 Recruitment to ICAM-1 Intronic Consensus Elements in the Regulation of Radiation-induced Invasion and Migration in Glioma. *Oncogene*.32.
30. Kohn EA, Yoo CJ, Eastman A (2003) The Protein Kinase C Inhibitor Gö6976 Is a Potent Inhibitor of DNA Damage-induced S and G2 Cell Cycle Checkpoints. *Cancer Research*.63:31-5.
31. Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM, Cochran BH (2003) Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer*.3:23.
32. Koo MY, Park J, Lim JM, Joo SY, Shin S-P, Shim HB, Chung J, Kang D, Woo HA, Rhee SG (2014) Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.111:6269-74.
33. Kretzschmar AK, Dinger MC, Henze C, Brocke-Heidrich K, Horn F (2004) Analysis of Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dimerization by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Biochemical Journal*.377:289-97.
34. Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR (1997) Defective TNF- α -Induced Apoptosis in STAT1-Null Cells Due to Low Constitutive Levels of Caspases. *Science*.278:1630-2.
35. Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, Herbst K, Gebarski SS, Martel MK, Radany EH, Lichten AS, Sandler HM (1999) Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*.43:79-88.
36. Lin G-S, Chen Y-P, Lin Z-X, Wang X-F, Zheng Z-Q, Chen L (2014) STAT3 serine 727 phosphorylation influences clinical outcome in glioblastoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*.7:3141-9.
37. Lin G-S, Yang L-J, Wang X-F, Chen Y-P, Tang W-L, Chen L, Lin Z-X (2014) STAT3 Tyr705 phosphorylation affects clinical outcome in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma. *Medical Oncology*.31:1-7.
38. Lin L, Hutzen B, Li PK, Ball S, Zuo M, DeAngelis S, Foust E, Sobo M, Friedman L, Bhasin D, Cen L, Li C, Lin J (2010) A novel small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and activities and exhibits potent growth-suppressive activity in human cancer cells. *Neoplasia*.12(1):39-50.

39. Loeffler S, Fayard B, Weis J, Weissenberger J (2005) Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. International Journal of Cancer.115:202-13.
40. Miklossy G, Hilliard TS, Turkson J (2013) Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. Nature reviews Drug discovery.12:611-29.
41. Miyakoshi M, Yamamoto M, Tanaka H, Ogawa K (2014) Serine 727 phosphorylation of STAT3: An early change in mouse hepatocarcinogenesis induced by neonatal treatment with diethylnitrosamine. Molecular Carcinogenesis.53:67-76.
42. O'Shea JJ, Kanno Y, Chen X, Levy DE (2005) Stat Acetylation--A Key Facet of Cytokine Signaling? Science.307:217-8.
43. Qin HR, Kim H-J, Kim J-Y, Hurt EM, Klarmann GJ, Kawasaki BT, Serrat MAD, Farrar WL (2008) Activation of Stat3 through a Phosphomimetic Serine727 Promotes Prostate Tumorigenesis Independent of Tyrosine705 phosphorylation. Cancer research.68:7736-41.
44. Ray S, Boldogh I, Brasier AR (2005) STAT3 NH2-terminal acetylation is activated by the hepatic acute-phase response and required for IL-6 induction of angiotensinogen. Gastroenterology.129:1616-32.
45. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. Nature.468:824-8.
46. Sasse J, Hemmann U, Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich PC, Horn F (1997) Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization. Molecular and Cellular Biology.17:4677-86.
47. Schaefer TS, Sanders LK, Nathans D (1995) Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.92:9097-101.
48. See AP, Han JE, Phallen J, Binder Z, Gallia G, Pan F, Jinasena D, Jackson C, Belcaid Z, Jeong SJ, Gottschalk C, Zeng J, Ruzevick J, Nicholas S, Kim Y, Albesiano E, Pardoll DM, Lim M (2012) The role of STAT3 activation in modulating the immune microenvironment of GBM. Journal of neuro-oncology.110:359-68.
49. Shen J, Li R, Li G (2009) Inhibitory effects of decoy-ODN targeting activated STAT3 on human glioma growth in vivo. In Vivo (Athens, Greece).23:237-43.
50. Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH (2009) STAT3 Is Required for Proliferation and Maintenance of Multipotency in Glioblastoma Stem Cells. STEM CELLS.27:2383-92.
51. Song Y, Qian L, Song S, Chen L, Zhang Y, Yuan G, Zhang H, Xia Q, Hu M, Yu M, Shi M, Jiang Z, Guo N (2008) Fra-1 and Stat3 synergistically regulate activation of human MMP-9 gene. Molecular Immunology.45:137-43.

52. 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 (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine.*352:987-96.
53. Szelag M, Czerwoniec A, Wesoly J, Bluysen HAR (2014) Comparative screening and validation as a novel tool to identify STAT-specific inhibitors. *European Journal of Pharmacology.*740:417-20.
54. Taube E, Jokinen E, Koivunen P, Koivunen JP (2012) A novel treatment strategy for EGFR mutant NSCLC with T790M-mediated acquired resistance. *International Journal of Cancer.*131:970-9.
55. Villalva C, Martin-Lannerée S, Cortes U, Dkhissi F, Wager M, Le Corf A, Tourani J-M, Dusanter-Fourt I, Turhan AG, Karayan-Tapon L (2011) STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas: A potential for targeted therapy? *International Journal of Cancer.*128:826-38.
56. Wang C-C, Liao Y-P, Mischel PS, Iwamoto KS, Cacalano NA, McBride WH (2006) HDJ-2 as a Target for Radiosensitization of Glioblastoma Multiforme Cells by the Farnesyltransferase Inhibitor R115777 and the Role of the p53/p21 Pathway. *Cancer Research.*66:6756-62.
57. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V (2010) Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature.*468:829-33.
58. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H (2004) Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature Medicine.*10:48-54.
59. Wei J, Barr J, Kong L-Y, Wang Y, Wu A, Sharma AK, Gumin J, Henry V, Colman H, Priebe W, Sawaya R, Lang FF, Heimberger AB (2010) Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T cell proliferation and effector responses by the STAT3 pathway. *Molecular cancer therapeutics.*9:67-78.
60. Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, Stark GR (2005) Novel Roles of Unphosphorylated STAT3 in Oncogenesis and Transcriptional Regulation. *Cancer Research.*65:939-47.
61. Yang J, Huang J, Dasgupta M, Sears N, Miyagi M, Wang B, Chance MR, Chen X, Du Y, Wang Y, An L, Wang Q, Lu T, Zhang X, Wang Z, Stark GR (2010) Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*107:21499-504.
62. Yang L, Clarke MJ, Carlson BL, Mladek AC, Schroeder MA, Decker P, Wu W, Kitange GJ, Grogan PT, Goble JM, Uhm J, Galanis E, Giannini C, Lane HA, James CD, Sarkaria JN (2008) PTEN Loss Does Not Predict for Response to RAD001 (Everolimus) in a Glioblastoma Orthotopic Xenograft Test Panel. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.*14:3993-4001.

63. Yuan Z-l, Guan Y-j, Chatterjee D, Chin YE (2005) Stat3 Dimerization Regulated by Reversible Acetylation of a Single Lysine Residue. *Science*.307:269-73.
64. Zhang J, Sarkar S, Cua R, Zhou Y, Hader W, Yong VW (2012) A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis*.33:312-9.
65. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* (New York, NY).264:95-8.

Figure captions

Figure 1: STAT3 serine 727 and tyrosine 705 phosphorylation in human malignant glioma cell lines – Cells were harvested during exponential growth phase. Thirty micrograms of total cell lysate were loaded per lane and electrophoresed by SDS-PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with anti-STAT3, anti-pSTAT3-Y705 and anti-pSTAT3-S727 specific antibodies. To ensure equal protein loading, β -actin was used as control. One representative immunoblot is shown. Three independent experiments were achieved for densitometric analyses.

Figure 2: Gö6976 reduces in vitro growth of human glioblastoma – Cells were seeded at 7500 per well of 96-well plates. Indicated quantity of Gö6976 has been added to growth medium 6h after seeding. Cells were then grown 90h before MTT assay. Results represent mean values \pm SEM of relative cell growth normalized to untreated cells from three independent experiments done in triplicate; relative IC₅₀ are specified; * significantly different from the control, Dunnett's test.

Figure 3: Gö6976 radiosensitizes pSTAT3-Y705 negative human glioblastoma cells – A-F: cells were seeded at a density of 5000 per well of 96-well plates. 6h later, Gö6976 was added to growth medium. Single 4-Gy dose irradiation was performed at 24-hour time course incubation with Gö6976. After 90h of cell growth in Gö6976, cell number was estimated by MTT assay. Results represent mean values \pm SEM of relative cell normalized to untreated cells (n=5, * p < 0.05, Mann-Whitney test). G, H and I: SF763, SF767 or U118MG cells were incubated 60h in different concentrations of Gö6976 and PE was determined 10 days after seeding. J, K and L: for clonogenic survival assay, SF763 and U118MG cells were treated with 1000 nM of Gö6976 and 200 nM for SF767. After 72h of incubation, cells were irradiated and the surviving fraction was compared with that of control. Data are fitted to linear-quadratic model.

They were represented by their mean \pm SEM of values of three independent experiments, each condition performed in triplicate (random-effects model). Y705⁻: pSTAT3-Y705 negative.

Figure 4: Gö6976 down-modulates pSTAT3-S727 only in pSTAT3-Y705 negative human glioblastoma cells – Cells were grown 72h in indicated concentration of Gö6976 or DMSO (control) before harvest. Thirty micrograms of total proteins were loaded per lane and electrophoresed by SDS-PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with anti-STAT3, anti-pSTAT3-Y705 and anti-pSTAT3-S727 specific antibodies. To ensure equal protein loading, β -actin was used as control.

Figure 5: Subcellular distribution of phosphorylated STAT3 in human glioblastoma cell lines treated by Gö6976 – Cells were treated with Gö6976 or DMSO (control) and fixed at 24- and 72-hour incubation with Gö6976 respectively for pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 detection. Anti-pSTAT3-Y705 and anti-pSTAT3-S727 antibodies were used. DAPI and Cy3-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody were used. Histograms represent the mean observed intensity of fluorescence in each condition. (Scale bars are equal to 20 μ m, 40X/1.15).

Figure 6: Gö6976 effects after irradiation – Cells were grown 72h in growth medium with indicated concentration of Gö6976 or DMSO (control) prior to 4-Gy irradiation. Cells were then harvested 24h later. Thirty micrograms of total proteins were loaded per lane and electrophoresed by SDS-PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with anti-STAT3, anti-pSTAT3-Y705 and anti-pSTAT3-S727 specific antibodies. To ensure equal protein loading, β -actin was used as control.

Figure 7: STAT3 activation in glioblastoma clinical samples – Immunostaining of pSTAT3-S727 was performed on paraffin-embedded sections. A: negative pSTAT3-Y705 stained section (x40). B and C: positive pSTAT3-Y705 staining of GBM and vascular endothelial cells (x20).

D: heterogeneous pSTAT3-Y705 staining of endothelial cells (x40). *E*: pSTAT3-S727 staining of a transitional zone in a tumor periphery, displaying positively stained GBM cells and unstained non-neoplastic glial cells (x 20). *F*: pSTAT3-S727 staining of GBM cells (x20). *G*: pSTAT3-S727 staining of vascular endothelial cells (x40). *H*: pSTAT3-S727 staining in case of capillary endothelial cell proliferation (x40).

Table 1: STAT3 pathway activation and intrinsic radioresistance of human malignant glioma cell lines – Densitometric analyses of the blots are presented as relative ratio of phosphoprotein/total protein. Data are presented as mean values ± standard error of triplicate determinations (arbitrary units). SF2: Surviving Fraction at 2Gy, N.D. : Not Determined , # Previously published (15).

Table 2: STAT3 activation in glioblastoma clinical samples – Percentage of stained tumor cells and staining intensity is presented for pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727. Negative: no staining; positive +: weak staining; positive ++: moderate staining; positive +++: strong staining.

Figure S1: Effect of Gö6976 on PCK α , JAK2 and EGFR pathways in human glioblastoma cell lines – Cells were grown 72h in indicated concentration of Gö6976 or DMSO (control) before harvest. Thirty micrograms of total proteins were loaded per lane and electrophoresed by SDS-PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with anti-PK α , anti-pPK α , anti-JAK2, anti-pJAK2, anti-EGFR or anti-pEGFR specific antibodies. To ensure equal protein loading, β -actin was used as control.

Table 1
STAT3 pathway activation and intrinsic radioresistance of human malignant glioma cell lines

Cell line	origin	Western Blot						SF2
		pSTAT3-Y705/STAT3		pSTAT3-S727/STAT3				
SF763	glioblastoma	8.46	±	4.83	1.55	±	0.96	0.84 #
SF767	glioblastoma	0			1.18	±	0.46	0.68 #
U87MG	glioblastoma	0			1.08	±	0.51	0.46
U118MG	glioblastoma	0			0.46	±	0.09	0.44
U251MG	glioblastoma	1.33	±	0.96	0.6	±	0.24	0.58 #
T98G	glioblastoma	1.8	±	0.86	0.79	±	0.23	0.64 #
SW1783	astrocytoma grade III	2.22	±	2.08	0.92	±	0.33	0.46 #
CB193	glioma grade III	1.25	±	1.13	1.68	±	0.8	0.52 #
SNB19	glioblastoma	0.95	±	0.64	1.05	±	0.48	0.5 #
U373MG	glioblastoma	1.65	±	0.98	1.11	±	0.67	0.58 #
U138MG	glioblastoma	0.08	±	0.08	0.26	±	0.08	0.39
LN229	glioblastoma	5.31	±	0.4	0.3	±	0.04	0.52
MO59K	glioblastoma	1.48	±	0.2	0.17	±	0.02	N.D.
MO59J	glioblastoma	0.58	±	0.14	0.27	±	0.06	0.02
CCF	glioblastoma	7.96	±	0.84	0.27	±	0.02	0.53

Table 2
STAT3 activation in glioblastoma clinical samples

	positive specimens	cell staining intensity in positive specimens	
pSTAT3-Y705	24/30	positive +++	11%
		positive ++	17%
		positive +	10%
		negative	62%
pSTAT3-S727	30/30	positive +++	55%
		positive ++	41%
		positive +	4%
		negative	0%

Figure 1

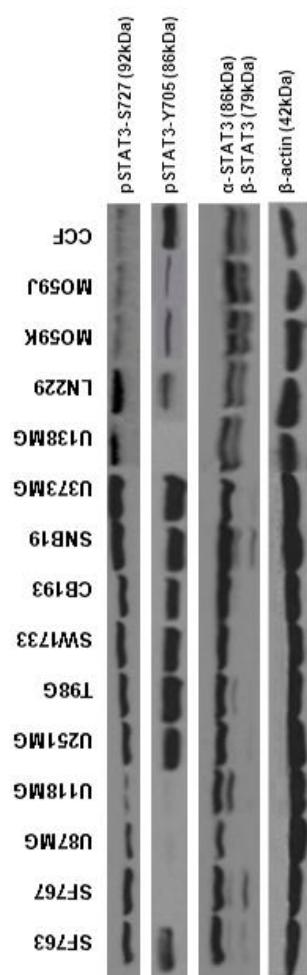
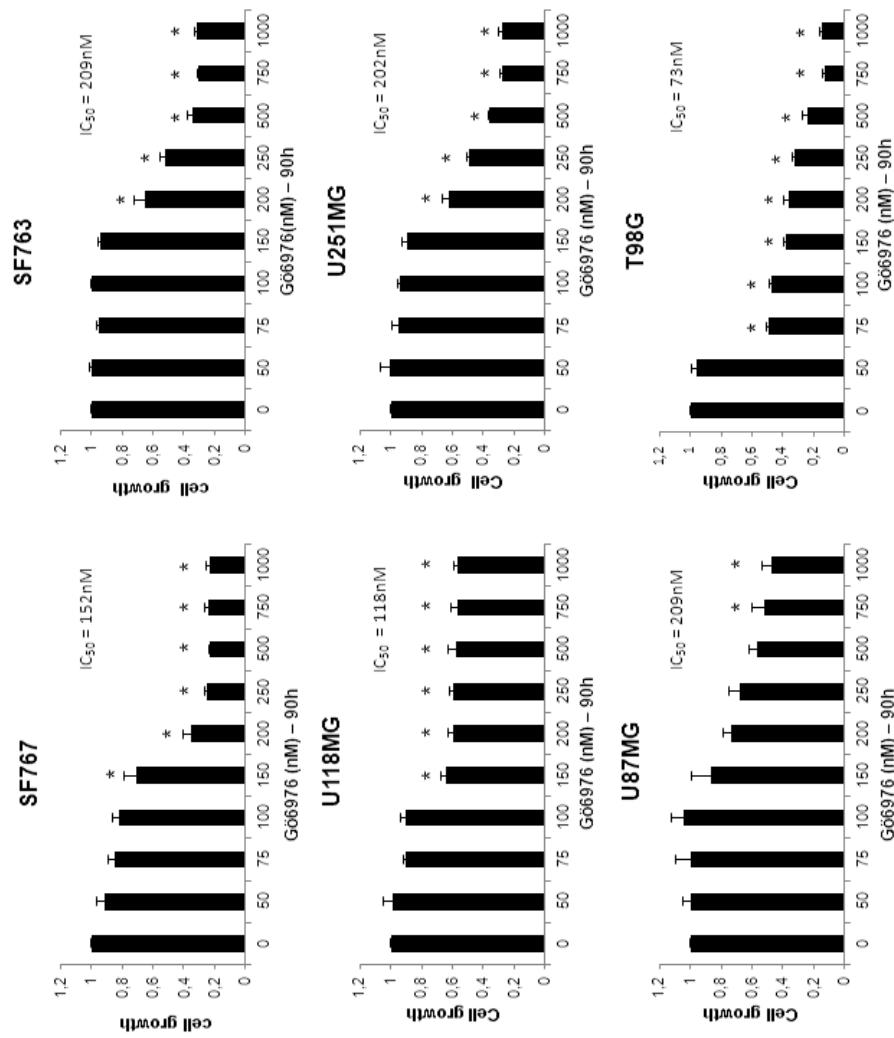


Figure 2



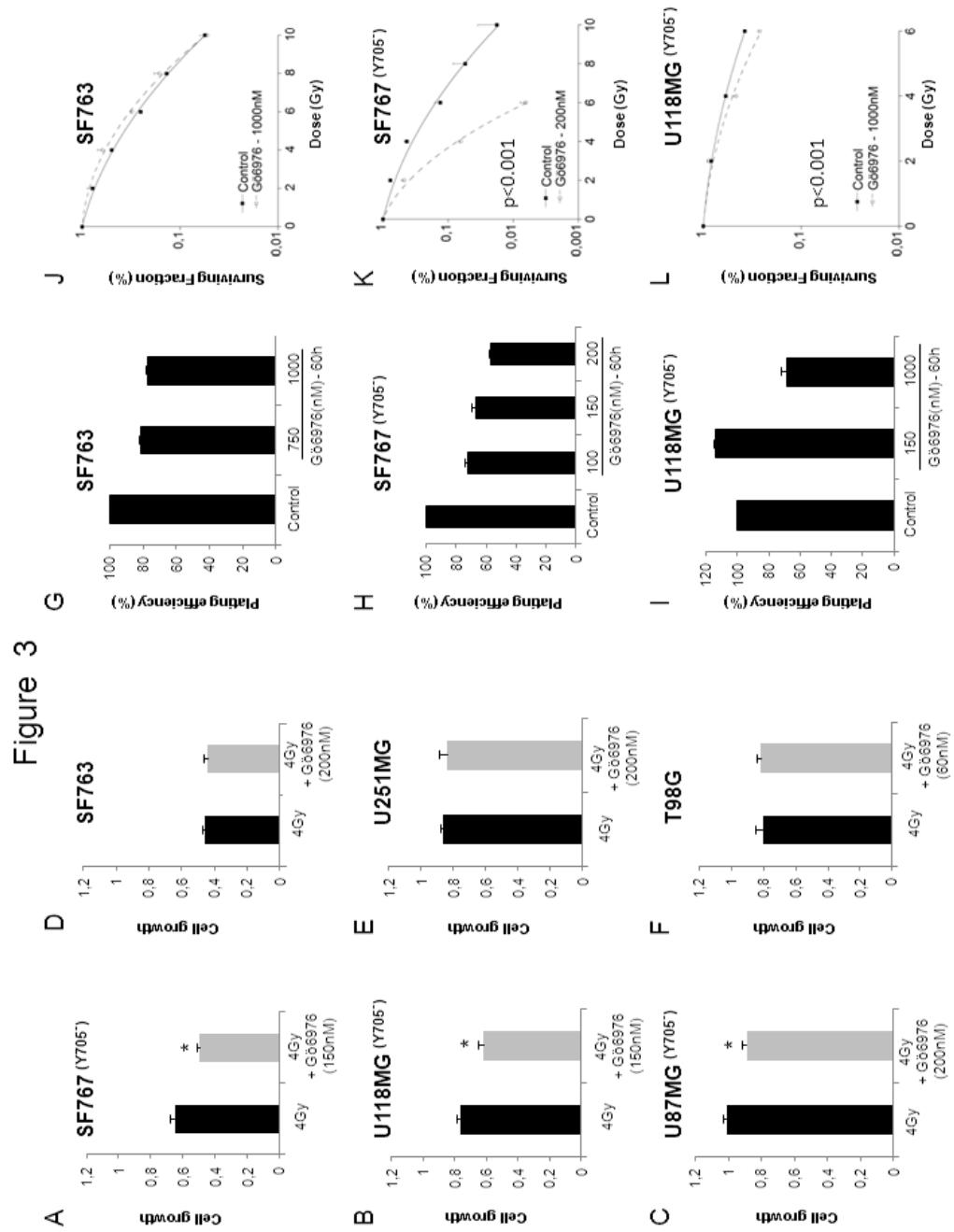


Figure 4

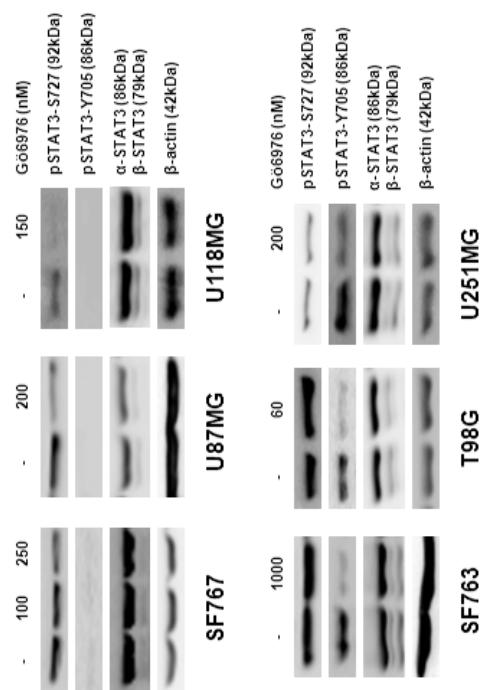


Figure 5

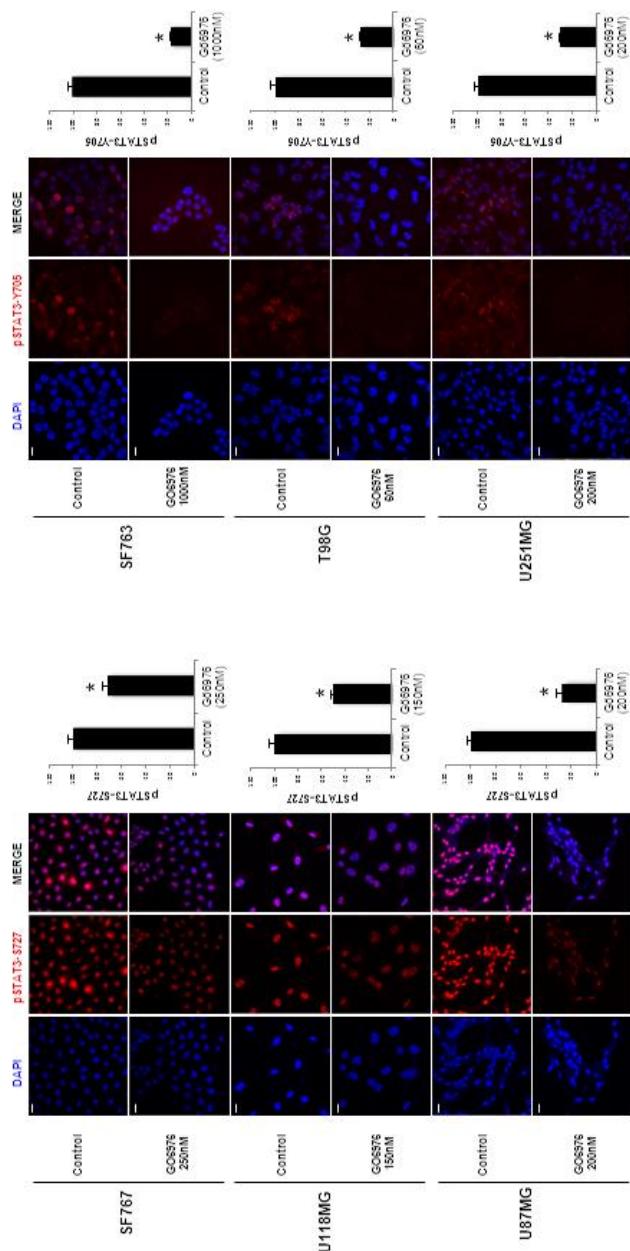
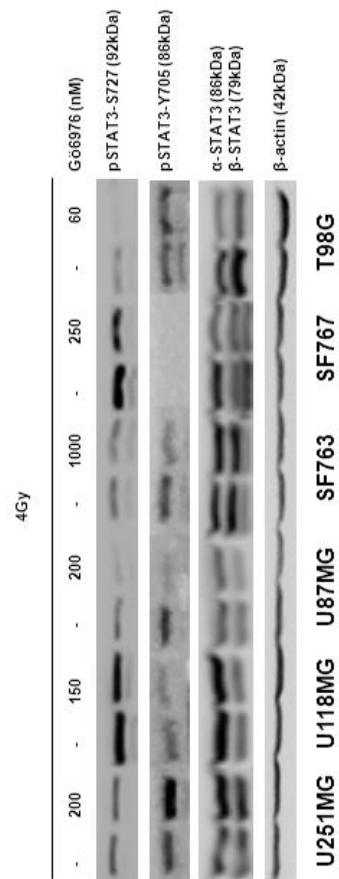


Figure 6



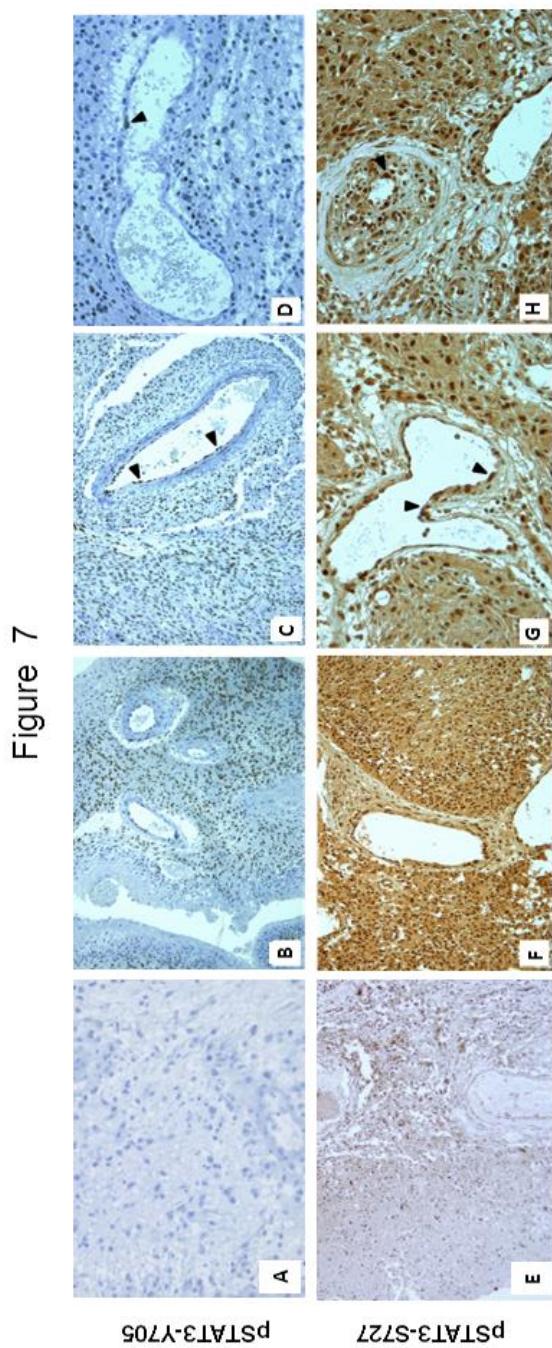
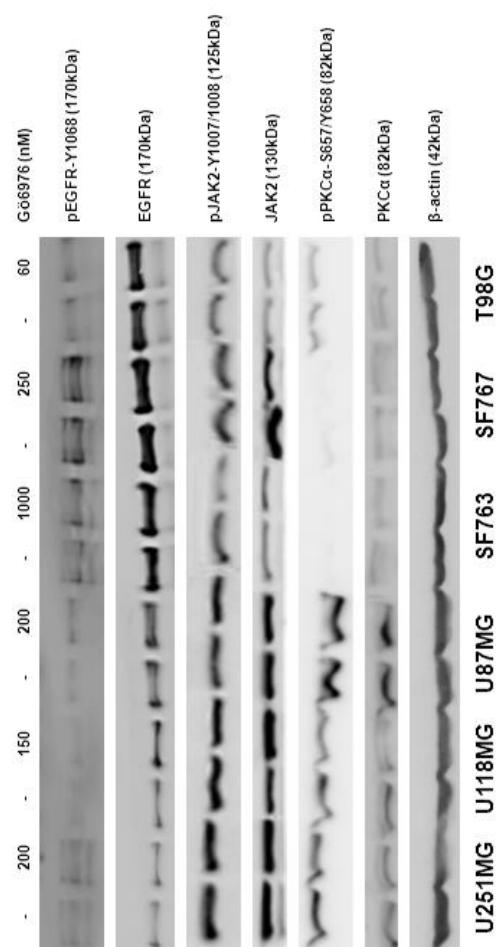


Figure S1



Résultats et discussion

Ce travail a d'abord complété la caractérisation des lignées cellulaires de GBM entretenues au laboratoire en apportant des informations sur l'état basal d'activation de STAT3 et le niveau de radiosensibilité. pSTAT3-Y705 a été retrouvée dans certaines lignées mais pas toutes. En revanche pSTAT3-S727 a été détectée dans toutes les lignées cellulaires testées. Le niveau d'activation de pSTAT3-S727 et pSTAT3-Y705 est variable d'une lignée à l'autre.

Nous avons établi pour la première fois **une corrélation positive entre l'activation de STAT3 par pSTAT3-S727 et la radiorésistance intrinsèque** des lignées cellulaires de GBM. Pour comprendre la nature de cette corrélation, nous souhaitions réaliser une inhibition pharmacologique sélective de chacune des 2 voies d'activation de STAT3. Des inhibiteurs spécifiques capables de discrimination entre pSTAT3-S727 et pSTAT3-Y705 auraient été très utiles. Dans la recherche de tels outils, nous avons identifié le Gö6967 comme un inhibiteur ciblant pSTAT3-Y705 mais aussi pSTAT3-S727 uniquement dans les lignées pSTAT3-Y705 négatives. Ces propriétés du Gö6976 ont permis de confirmer le **rôle important de pSTAT3-S727 dans la radiorésistance** puisque son inhibition est concomitante à la radiosensibilisation. Ces résultats ont aussi souligné l'importance de **pSTAT3-Y705** qui reste **un marqueur prédictif à la fois de l'inhibition de la phosphorylation S727 et de la radiosensibilisation induites par Gö6976.**

L'étude de l'expression de pSTAT3-S727 et pSTAT3-Y705 dans une série de 30 GBM avant radiochimiothérapie a montré une expression systématique à des degrés variables de pSTAT3-S727 et une expression inconstante à des degrés divers de pSTAT3-Y705. L'ensemble des résultats *in vitro* et *in vivo* suggère que **cibler pSTAT3-S727 dans le GBM pourrait augmenter l'efficacité de la radiothérapie particulièrement dans les tumeurs n'exprimant pas pSTAT3-Y705.**

Travaux complémentaires :
Étude *in vitro* des fonctions
biologiques de pSTAT3-S727 au
moyen de dominants positif et
négatif.

Objectifs de l'étude

Il s'agit de compléter les études sur le rôle des deux phosphorylations activatrices de STAT3 dans les cellules de glioblastome. En l'absence d'inhibiteurs pharmacologique réellement spécifique, la méthode choisie est une approche par des dominants négatif et positif de pSTAT3-S727 qui seront combinés aux inhibiteurs de pSTAT3-Y705. Dans cette étude les effets d'une modulation de l'activation de STAT3 seront étudiés sur le plan fonctionnel et moléculaire.

Ces travaux répondront aux questions suivantes :

- (1) Quelles sont les conséquences de l'expression des dominants de STAT3 sur la prolifération et la radiosensibilité ?
- (2) Quelles sont les mécanismes biologiques modulés par les dominants ?
- (3) Quels sont les gènes cibles de STAT3 en fonction du statut d'activation de STAT3 sur S727 et/ou Y705 ?

Matériels et méthodes

Les vecteurs d'expression des dominants de STAT3-S727

Les vecteurs plasmidiques pCI-Neo-STAT3-S727WT, pCI-Neo-STAT3-S727A et pCI-Neo-STAT3-S727D qui sont utilisés ont été gracieusement offerts par l'équipe du Pr. Ogawa Katsuhiro (Department of Pathology, Asahikawa Medical University, Japon) (Miyakoshi et al., 2014). Succinctement, ces vecteurs vont exprimer sous contrôle d'un promoteur CMV la forme sauvage du gène STAT3 (WT) ou le dominant négatif (S727A) ou encore le dominant positif (S727D). Il s'agit respectivement pour les dominants négatif et positif, d'une mutation ponctuelle de STAT3 par substitution de la S727 par lalanine (A) ou par l'aspartate (D). Chacune de ces protéines est exprimée avec un tag hémagglutinine A (HA) placée à l'extrémité N-terminale.

Les anticorps neutralisant l'activation de STAT3-Y705

Ce sont des anticorps neutralisant la sous-unité gp80 ou IL-6R α du récepteur à l'IL-6. De tels anticorps inhibent pSTAT3-Y705 aussi efficacement que l'inhibition de la gp130 (Chautard et al.) avec une plus grande spécificité pour le récepteur à l'IL-6. L'équipe a déjà démontré que l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre la sous unité gp130 du récepteur de l'IL-6

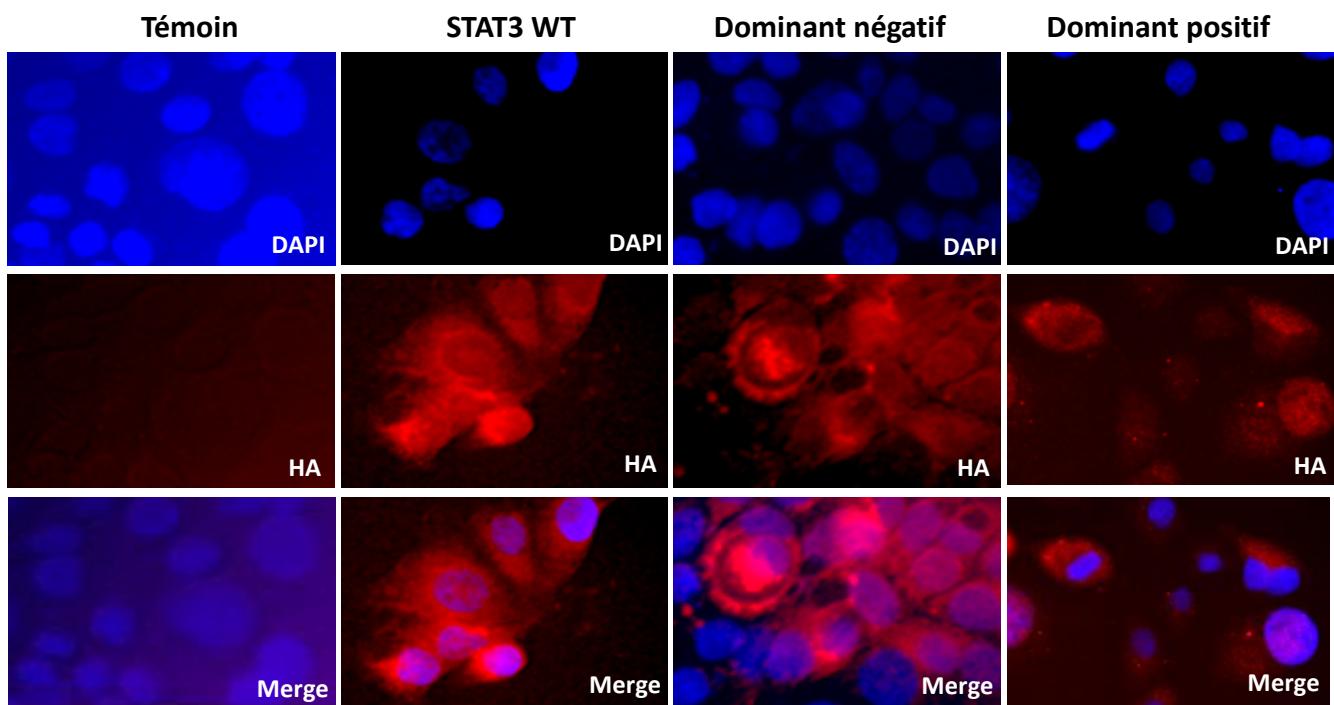


Figure 25. Contrôle d'expression des vecteurs plasmidiques par immunofluorescence.
Immunofluorescence indirecte sur cellules SF763 transfectées avec les vecteurs plasmidiques pCI-Neo-STAT3-S727WT (STAT3 WT), pCI-Neo-STAT3-S727A (Dominant négatif) et pCI-Neo-STAT3-S727D (Dominant positif) ; HA (Hémagglutinine A) (x40).

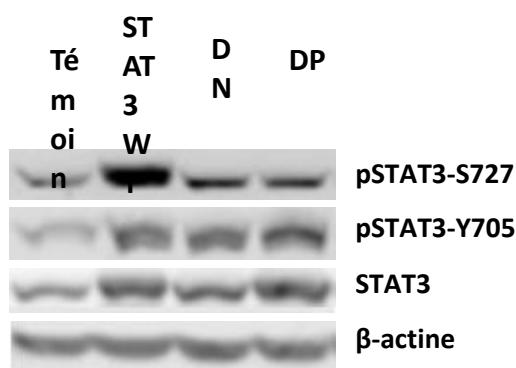


Figure 26. Contrôle d'expression des vecteurs plasmidiques par western blot.
Western blot montrant l'accumulation de STAT3 totale ou phosphorylée dans les cellules SF763 transfectée avec les vecteurs plasmidiques pCI-Neo-STAT3-S727WT (STAT3 WT), pCI-Neo-STAT3-S727A (DN) et pCI-Neo-STAT3-S727D (DP).

inhibe de manière complètement la phosphorylation de STAT3-Y705 dans les lignées de GBM (Chautard et al.)

Résultats préliminaires

Nous avons vérifié par immunofluorescence indirecte (Figure 25) et par western blot (Figure 26) l'accumulation des dominants positif et négatif ainsi que de la protéine STAT3 sauvage dans les cellules après transfection transitoire. Les outils biologiques semblent donc opérationnels pour la poursuite de ces travaux.

Conclusion Générale & Perspectives

Le glioblastome (GBM) est le cancer le plus fréquent et le plus agressif du SNC. La radiothérapie allonge la survie des patients mais le pronostic reste sombre du fait en partie de la radiorésistance de la tumeur. Dans un délai plus ou moins court après la radiothérapie, des récidives ont lieu en général dans le volume tumoral irradié et la médiane de survie de patients sélectionnés reste courte, environ 15 mois. Le fait que la radiothérapie allonge la survie des patients et que les récidives se produisent dans le volume irradié suggèrent que si l'on arrive à rendre cette tumeur plus sensible à l'irradiation, on pourrait diminuer les récidives et ainsi augmenter la survie des patients. C'est l'objectif poursuivi par l'Equipe CREaT ; pour l'atteindre, la stratégie adoptée est l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans la radiorésistance afin de les inhiber pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

La protéine STAT3 a suscité de l'intérêt dans la recherche de thérapie ciblée contre les gliomes parce qu'elle participe à des processus biologiques intracellulaires de survie et à la régulation des interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement. L'objectif de cette thèse a été d'étudier le rôle de l'activation de STAT3 dans l'agressivité du glioblastome, notamment dans la radiorésistance. La première étape a consisté à décrire l'état d'activation de STAT3 dans un large panel de lignées de glioblastome humain. Alors que la plupart des travaux publiés au sujet de STAT3 dans les gliomes avait considéré la phosphorylation du résidu Y705 comme marqueur d'activation de STAT3, nous avons inclus la phosphorylation de la S727 qui a suscité de l'intérêt dans certaines études récentes. D'autres modifications post-traductionnelles de STAT3 ont été décrites dans quelques rares publications et n'ont pas été incluses dans ce travail. Nous avons choisi la technique de *Western blot* pour évaluer l'activation de STAT3 du fait de sa simplicité et de la possibilité d'analyse semi-quantitative. Nous avons mis en évidence que l'activation de STAT3 est différente d'une lignée cellulaire à l'autre mais pSTAT3-S727 est présente dans toutes les lignées, à des degrés variables. La présence de pSTAT3-S727 est donc une caractéristique commune à ces lignées cellulaires. Nous avons ensuite évalué la radiorésistance des lignées cellulaires pour compléter les résultats antérieurs de l'équipe afin de comparer le niveau d'activation de STAT3 avec le niveau de radiorésistance intrinsèque. La méthode d'évaluation de la radiorésistance par la survie clonogénique est une technique de référence en radiobiologie cellulaire et en oncologie expérimentale. Son utilisation a fourni des résultats reproductibles qui ont été utilisés pour établir la corrélation positive retrouvée entre le niveau d'activation de pSTAT3-S727 et la fraction survivante à 2 Gy (SF2) mesurant la

radiorésistance. Cette corrélation semblait intéressante en raison des arguments associant STAT3 à des mécanismes de survie des cellules souches de GBM. L'inhibition sélective de la phosphorylation des résidus S727 et Y705 est une bonne approche pour ce faire. Nous avons utilisé le Gö6976 comme une alternative à un inhibiteur spécifique de pSTAT3-S727. Il a permis d'inhiber pSTAT3-S727 et de radiosensibiliser les lignées cellulaires pSTAT3-Y705 négatives. Ce résultat a confirmé le lien entre pSTAT3-S727 et la radiorésistance intrinsèque et en même temps souligné le rôle important de pSTAT3-Y705 dans la radiorésistance comme marqueur prédictif d'efficacité du Gö6976 à la fois comme inhibiteur de pSTAT3-S727 et radiosensibilisant. L'inefficacité du Gö6976 sur les lignées cellulaires pSTAT3-Y705 positives confirme d'ailleurs que son action n'est pas due à une toxicité globale.

Ce travail suggère de prendre en considération que le profil d'expression tumorale de pSTAT3-S727 et pSTAT3-Y705 pourrait avoir une valeur pronostique ou prédictive de la réponse des patients à des thérapies ciblées. Ces résultats suscitent cependant des interrogations :

- pourquoi l'inhibition de pSTAT3-S727 n'accompagne pas celle de pSTAT3-Y705 dans les lignées non radiosensibilisées par le Gö6976?
- pourquoi l'inhibition rapide par le Gö6976 de pSTAT3-Y705 n'est-elle pas suivie par une inhibition de pSTAT3-S727 ?

Des travaux sont en cours pour élucider les mécanismes d'action du Gö6976. La compréhension des mécanismes responsables de la phosphorylation de STAT3-S727 contribuera fortement au développement d'un inhibiteur plus spécifique de pSTAT3-S727 avec à terme des perspectives thérapeutiques intéressantes. Les résultats obtenus pourront être confirmés par des expérimentations *in vivo* sur des modèles de xénogreffe de GBM sur souris *nude* tout en reconnaissant les limites de ce modèle pour l'étude du microenvironnement.

L'analyse de l'activation de STAT3 dans les lignées a établi le lien entre STAT3 et la radiorésistance intrinsèque des GBM. Pour rechercher un intérêt clinique de ces travaux, nous avons analysé l'activation de STAT3 dans une série de 30 patients grâce à une méthode d'immunohistochimie semi-quantitative. Les résultats ont été en accord avec les analyses *in vitro*. pSTAT3-S727 est retrouvée dans tous les prélèvements. Elle est retrouvée dans toutes les cellules tumorales même si le niveau est variable d'un patient à l'autre et entre cellules tumorales du même patient. pSTAT3-Y705 n'est pas détectée dans tous les prélèvements et

reste restreinte à certaines cellules tumorales. Une activation de STAT3 sur les résidus Y705 et S727 a été retrouvée dans des cellules endothéliales vasculaires au contact de la tumeur. Cette observation, surtout pour S727, pourrait être en faveur d'une origine tumorale de certaines cellules endothéliales rapportée dans la littérature (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010).

Les résultats des analyses immunohistochimiques confirment l'intérêt d'un ciblage de pSTAT3-S727 dans la mesure où toutes les tumeurs sont positives. Au cas où la radiosensibilisation par inhibition de pSTAT3-S727 ne resterait valable que dans les tumeurs pSTAT3-Y705 négatives, elle pourrait quand même bénéficier à certains patients. La proportion de ces patients est difficile à prédire compte tenu de la faible taille de notre série clinique qui n'autorise pas d'inférence statistique. La population clinique étudiée n'a inclus que des GBM, elle pourrait être étendue aux gliomes de grades inférieurs afin de dégager un éventuel rôle de l'activation de pSTAT3-S727 dans la progression de la maladie.

Pour affiner le ciblage à but thérapeutique de STAT3, la description des mécanismes d'action de la protéine est importante. C'est pourquoi, nous avons mis en place l'exploration des fonctions de la protéine avec des dominants positifs et négatif. Ce travail en cours permettra de mieux comprendre le rôle de pSTAT3-S727 et pSTAT3-Y705 dans la régulation des gènes cibles. Cela permettra d'expliquer en partie les effets biologiques dus à l'inhibition ou l'activation de STAT3.

Il a été rapporté dans la leucémie lymphoïde chronique que pSTAT3-S727 joue un rôle dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Cela n'a pas encore été décrit dans les gliomes. C'est cependant une piste complémentaire pour comprendre la radiosensibilisation par inhibition de pSTAT3-S727. L'exploration de ce processus est envisageable avec les dominants de STAT3.

En accord avec les données de la littérature, cette thèse a confirmé le rôle majeur de l'activation de STAT3 par phosphorylation S727 dans l'agressivité des GBM en montrant son implication dans la radiorésistance. Le ciblage de cette phosphorylation S727 ou celle des voies d'activation en amont, encore peu connues, représente une stratégie prometteuse pour radiosensibiliser les gliomes.

Quant à la phosphorylation Y705, elle ne semble pas être impliquée directement dans la radiorésistance intrinsèque ce qui n'infirme pas son rôle dans les interactions entre la

Conclusion générale & perspectives

tumeur et son microenvironnement (angiogénèse, immunosuppression locale). Nous avons néanmoins validé que les voies de signalisation responsables de la phosphorylation de Y705 prennent indirectement part aux mécanismes impliqués dans la radiorésistance puisque l'absence de pSTAT3-Y705 est un marqueur prédictif de la réponse cellulaire au Gö6976.

Notre travail valide l'activation de pSTAT3-S727 dans le GBM comme une cible de thérapie radiosensibilisante et pSTAT-Y705 comme un biomarqueur prédictif de la réponse à ce ciblage.

Publication

Annexe

Role of Akt in human malignant glioma: from oncogenesis to tumor aggressiveness

Emmanuel Chautard · Zangbédé Guy Ouédraogo · Julian Biau · Pierre Verrelle

Received: 16 September 2013 / Accepted: 19 January 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Gathering evidence has revealed that Akt signaling pathway plays an important role in glioma progression and aggressiveness. Among Akt kinases the most studied, Akt1, has been involved in many cellular processes that are in favor of cell malignancy. More recently, the actions of the two other isoforms, Akt2 and Akt3 have emerged in glioma. After a description of Akt pathway activation, we will explore the role of each isoform in malignant glioma that strengthens the current preclinical and clinical studies evaluating the impact of Akt pathway targeting in glioblastomas.

Keywords Akt · Human malignant glioma · Resistance to treatment

Gliomas

Gliomas are the most common primary adult tumors of the central nervous system and include a variety of histologic types. Currently, the histologic identification of gliomas is based on the morphologic features that are common with non-neoplastic glial cells according to the World Health Organization (WHO) classification. Therefore, adults' gliomas are classified as astrocytic, oligodendroglial and mixed oligoastrocytic tumors. Pilocytic astrocytoma (WHO grade I), the most common pediatric gliomas, are relatively well demarcated from the surrounding tissues and most usually, surgery provides a cure. In adults, the most common types are highly infiltrative or diffuse gliomas and make resection almost always incomplete. Diffuse gliomas are categorized into low-grade gliomas (WHO grade II), which usually demonstrate relatively slow growth, and high-grade or anaplastic fast-growing gliomas (WHO grades III and IV). The most frequent and malignant type are glioblastomas (GBMs; WHO grade IV) [1, 2]. Primary GBMs arise de novo while secondary GBMs develop from preceding grade II and III glioma [3]. Histologically, primary and secondary GBMs are largely indistinguishable, but they differ in their genetic and epigenetic profiles. Isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation is a molecular marker of secondary GBMs [4]. GBMs are extremely resistant to current treatment that encompasses surgery, radiotherapy and chemotherapy. Patient median survival does not exceed 14 months [5, 6]. Besides intrinsic chemo and radioresistance of tumor cells themselves, interactions between tumor and its micro-environment are involved in tumor resistance through angiogenesis [7], hypoxia [8] and immunosuppression [9, 10]. After a description of Akt pathway activation, we will explore the role of each isoform in malignant glioma that strengthens

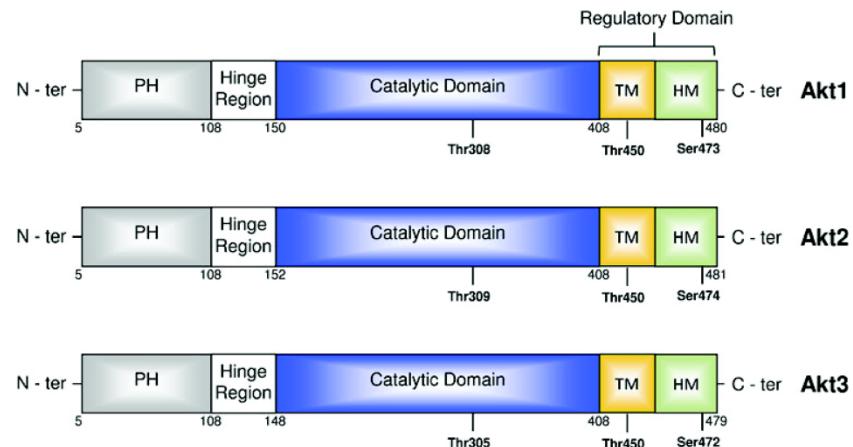
E. Chautard · Z. G. Ouédraogo · J. Biau · P. Verrelle
Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7283 CREaT,
28 Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

E. Chautard (✉) · Z. G. Ouédraogo · J. Biau · P. Verrelle
Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-Oncologie
Expérimentale, 58 Rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand,
France
e-mail: emmanuel.chautard@cjp.fr

Z. G. Ouédraogo
Laboratoire de Pharmacologie, de Toxicologie et de Chimie
Thérapeutique, Université de Ouagadougou,
BP 7021, Ouagadougou, Burkina Faso

J. Biau
Institut Curie, CNRS UMR3347, INSERM U2021, 91405 Orsay,
France

Fig. 1 Schematic representation of the 3 Akt isoforms, PH pleckstrin homology domain, TM turn motif, HM hydrophobic motif



the current preclinical and clinical studies evaluating the impact of Akt pathway targeting in GBM.

Akt kinases

Akt was initially identified by three independent groups, based on its homology with protein kinase A (PKA) [11] and C (PKC) [12] or as the cellular homolog to the retroviral oncogene viral akt (v-Akt) [13]. Akt is conserved from primitive metazoans to humans. It belongs to the AGC subfamily of the protein kinase superfamily, which consists of 518 members in humans [14]. The serine-threonine kinase Akt also called PKB for Protein Kinase B constitutes an intercept node of major interest in human physiology and diseases. Mammalian cells express three related isoforms named Akt1 or PKB α (62 kDa), Akt2 or PKB β (56 kDa) and Akt3 or PKB γ (62 kDa) synthesized by genes located on chromosomes 14, 19, and 1 respectively. All Akt isoforms share a common structure (Fig. 1), characterized by a N-terminal Pleckstrin Homology (PH) domain, a hinge region connecting the PH domain to a kinase domain, and a C-terminal regulatory tail including a turn motif (TM) and an hydrophobic motif (HM) [15].

Akt pathway activation

Among the three members, Akt1 is the most studied and will be named Akt thereafter. Unphosphorylated Akt is rapidly ubiquitinated before proteasome degradation. Upon synthesis Akt is phosphorylated by the mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) on Thr450 located in the TM to increase its stability [16]. Without TM site phosphorylation, Akt might also be protected by the Heat Shock Protein 90 (HSP90) from complete ubiquitination-mediated

proteasome degradation [17]. Rapid degradation of Akt occurs upon simultaneous inhibition of mTORC2 and Hsp90. Akt is activated through a series of phosphorylation events (Fig. 2) in cells exposed to diverse stimuli such as hormones, growth factors, and extracellular matrix components [15]. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) generates phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), a lipid second messenger, which is essential for the translocation of Akt to the plasma membrane through the PH domain. The Akt cascade is activated by tyrosine kinase receptors, integrins, B and T cell receptors, cytokine receptors, G-protein-coupled receptors and other stimuli that induce the production of PIP3 by PI3K. In cancer cells PI3K is often highly activated due to an autocrine and/or paracrine stimulation of tyrosine kinase receptors by cytokines and growth factors. After its recruitment to the plasma membrane, Akt conformation is modified to allow subsequent phosphorylation on Thr308 by the phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) [15]. If Thr308 phosphorylation activates partially Akt, Ser473 residue phosphorylation is necessary to obtain its full activation. Akt-Ser473 phosphorylation is mainly due to mTORC2 [18]. Other kinases such as DNA-protein kinase (DNA-PK), integrin-linked kinase (ILK) [17, 19, 20] have been involved in Ser473 phosphorylation. Besides this canonical activation mechanism, recent studies have highlighted that a diverse group of tyrosine kinases (Ack1/TNK2, Src, PTK6) and serine/threonine kinases (TBK1, IKBKE, DNAPKcs) could activate Akt directly to promote cell proliferation and survival in a PI3K-independent manner [21].

Akt pathway regulation

This signaling cascade is down-regulated by the activity of several phosphatases. Phosphatase and tensin homolog

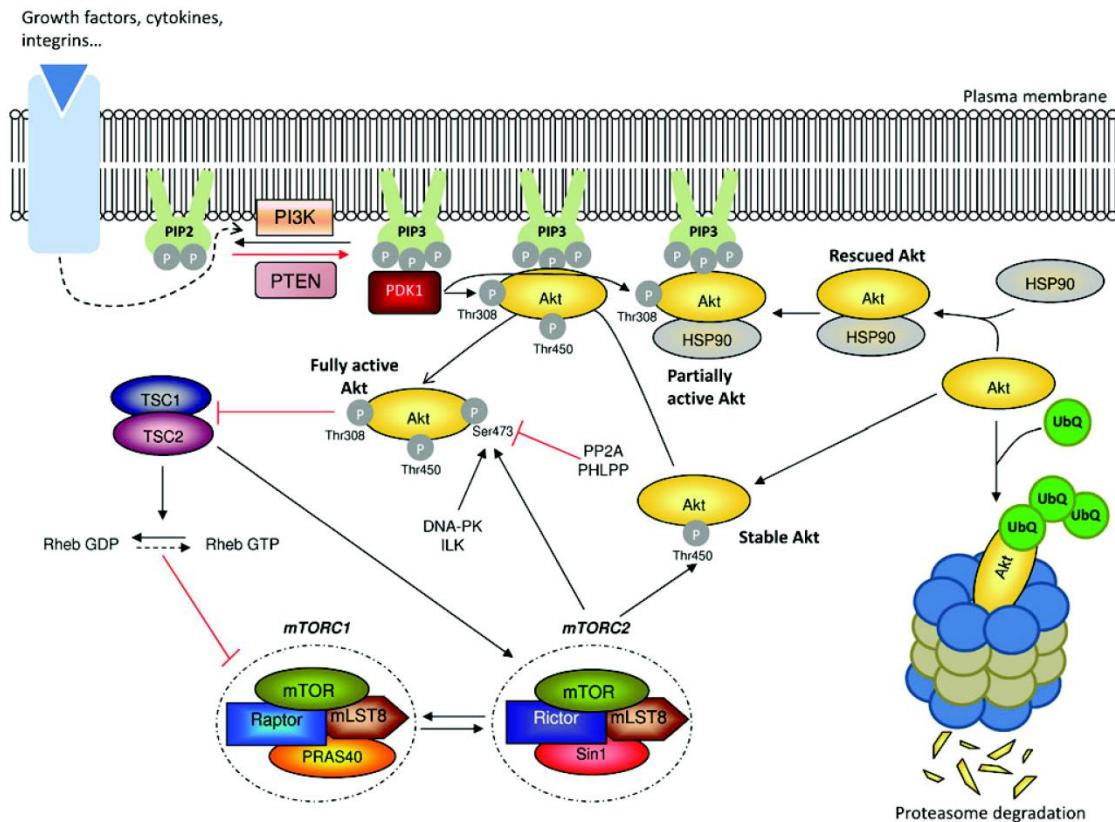


Fig. 2 Akt signaling pathway activation and regulation upon synthesis. Akt is protected from ubiquitination-mediated proteasome degradation by the molecular chaperone HSP90 or by its phosphorylation on Thr450 by mTORC2. PI3K generates PIP3 that allows the translocation of Akt to the plasma membrane. After its recruitment, Akt conformation is modified to allow subsequent phosphorylation on Thr308 by PDK1. Thr308 phosphorylation activates partially Akt, and full activation is obtained following Ser473 phosphorylation by

mTORC2. *PIP3* phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, *PIP2* phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, *PI3K* phosphoinositide 3-kinase, *PDK1* phosphoinositide-dependent kinase-1, *PTEN* phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, *HSP90* heat shock protein 90, *TSC* tuberous sclerosis complex, *DNA-PK* DNA-protein kinase, *ILK* integrin-linked kinase; *mTORC* mammalian target Of rapamycin complex, *UbQ* ubiquitin

deleted on chromosome 10 (PTEN) remains the main indirect negative regulator of Akt pathway by removing phosphate groups from the PIP3 to generate PIP2 [22]. Lowering of PIP3 level results in rapid down-regulation of Akt signaling primarily due to its inability to be recruited to the plasma membrane. In addition, spatial compartmentalization of plasma membrane is also involved in Akt pathway activity regulation. It has been described that PDK1 is activated in membrane lipid rafts in response to growth factors, whereas the negative regulator of the pathway, PTEN, is primarily localized in non-raft regions. Alteration of this compartmentalization, either by genetic targeting or ceramide-induced recruitment of PTEN to rafts, abolishes the activity of the whole pathway. These findings reveal critical steps in raft-mediated PI3K/Akt activation and demonstrate the essential role of membrane

microdomains in enabling PI3K/Akt signaling [23]. Protein phosphatase 2A (PP2A) and PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP) dephosphorylate Akt-Ser473 and act as direct negative regulators for the Akt pathway [24, 25]. PHLPP1 targets Akt2 and Akt3, while PHLPP2 dephosphorylates Akt1 and Akt3 [26]. The connection between Akt and mTOR is quite complex (Fig. 2) as mTOR can act upstream (mTORC2) or downstream of Akt (mTORC1). Indeed, Akt activates the mTOR-containing protein complex mTORC1 indirectly by phosphorylation and inactivation of Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2). The TSC1–TSC2 complex inhibits mTORC1 through its Rheb–GAP activity, while it activates mTORC2 through a mechanism independent of this activity. When the TSC1–TSC2 complex is active, the resulting decrease in Rheb–GTP levels inactivates mTORC1 [20]. Akt also directly

activates mTORC1 through phosphorylation of a component of mTORC1 complex named PRAS40.

Akt, Akt2 and Akt3 in cancer

The PI3K/Akt pathway is one of the most altered in cancer. The loss of PTEN activity or PI3K mutation associated with enhanced activity are able to constitutively activate Akt. An Akt somatic mutation has also been reported in human breast, colorectal and ovarian cancers. Such a mutation activates Akt by inducing its pathological localization to the plasma membrane, stimulates downstream signaling, transforms cells and gives rise to leukaemia in mice [27]. The first recurrent involvement of *Akt* in a human cancer, was reported in 1992 when Bellacosa et al. [28] revealed *Akt* amplification and *Akt2* overexpression in ovarian cell lines and tumors. Several studies have since documented *Akt2* amplification or overexpression in human ovarian, breast [29] and pancreatic cancers [30]. *Akt2* overexpression can transform NIH3T3 cells [31]. *Akt* amplification was described in a human gastric cancer [32]. To date, *Akt3* amplification has not been described. However, *Akt3* mRNA is up-regulated in estrogen receptor-negative breast tumors, and increased *Akt3* enzymatic activity was found in estrogen receptor-deficient breast cancer and androgen-insensitive prostate cancer cell lines [33], suggesting that *Akt3* may contribute to the aggressiveness of steroid hormone-insensitive cancers. Clearly, Akt signaling pathway plays an important role both in oncogenesis and progression in a wide variety of human cancers including malignant glioma.

Akt activation and activators in human glioma

The expression of Akt mRNA and protein was similar in glioma and normal control tissues contrarily to several other tumors [34]. Akt activity assessment is focused on the Ser473 phosphorylation that engages Akt in a fully active form (see above). In human glioma PI3K/Akt pathway activation is often associated with PTEN alterations such as mutation/loss of heterozygosity or with an increase of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and/or gene amplification [35, 36]. Moreover mutant receptors, especially EGFRvIII variant, which is constitutively activated in GBMs [37, 38] can give rise to constitutive activation of the Akt signal transduction pathway [39]. Mueller et al. [40] have recently found that activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway was associated with PTEN promoter methylation in a series of pediatric glioma. There was a trend toward inverse correlation of PTEN promoter methylation with PTEN protein expression. The role of a PTEN partner

was reported to affect PTEN function depending on its intracellular localization. The PTEN binding adapter protein NHERF1/EBP50 (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor/ezrin–radixin–moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50) overexpressed in GBMs is localized to the plasma membrane in normal astrocytes while it is present in the cytoplasm of GBMs tumor cells. Mechanistically, NHERF1 cytoplasmic redistribution in cancer cells impairs PTEN recruitment at the plasma membrane and results in Akt activation [41].

Akt pathway and prognosis in glioma

Activation of PI3K/Akt pathway has been correlated to the grade of malignancy according to WHO classification [42]. A link between Akt activation and prognosis of glioma has been explored by retrospective studies. A study in pediatric high grade glioma reported that pAkt was detected in 57 % of patients and that high levels of pAkt were associated with worse overall survival [43]. In a subset of anaplastic pilocytic astrocytoma pAkt increases concurrently to a decrease *PTEN* expression [44]. The prognostic value of pAkt expression was investigated in another series of 64 GBMs by using immunohistochemistry. The survival rate of the patients with pAkt positive tumors was significantly lower than that of the patients with pAkt negative tumors ($p = 0.004$). Multivariate analysis showed that extent of surgery was the strongest prognostic factor ($p = 0.01$) while the level of pAkt was the secondly one ($p = 0.06$). These results suggest that high pAkt expression is associated with a poor prognosis in GBMs patients [45].

Akt roles in glioma tumorigenesis and aggressiveness

Although neither Ras nor Akt activation are alone sufficient to induce GBMs formation in mice, the combined activation of both induces high-grade glioma with the histological features of human GBM [46]. Akt activation in an anaplastic astrocytoma model is sufficient to allow conversion of human anaplastic astrocytoma to human GBMs [47]. In a transgenic zebrafish model, a recent study reported that the overexpression of a dominant-active form of human Akt induced glioma [48]. Akt signaling pathway mediates phosphorylation of a large number of proteins leading to their activation or inhibition (arrows or blocking arrows, Fig. 3). Regulation of these substrates by Akt contributes to activation of various cellular processes.

Cell survival

Firstly, direct inhibition of Akt by siRNA leads to apoptosis of glioma cells [49]. Akt enhances the cell survival by

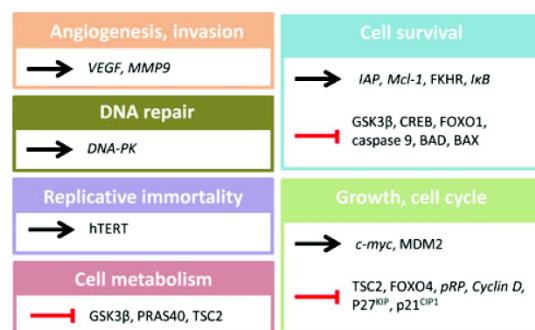


Fig. 3 Akt downstream targets Akt signaling pathway mediates activation or inhibition (arrows or blocking arrows) of a large number of targets either directly or indirectly (targets in *italics*). Akt, through its targets, is involved in several processes that are linked to tumor resistance to treatment. *MDM2* mouse double minute 2 homolog, *hTERT* human Telomerase reverse transcriptase, *DNA-PK* DNA-protein kinase, *VEGF* vascular endothelial growth factor, *MMP* matrix-degrading metalloproteinase, *IAP* inhibitors of apoptosis, *Mcl-1* myeloid cell leukemia-1; *BAX* Bcl-2-associated X protein, *BAD* Bcl-2-associated death protein, *GSK3β* glycogen synthase kinase-3 beta, *TSC* tuberous sclerosis complex, *Rb* retinoblastoma protein

blocking the function of pro-apoptotic proteins and processes or by regulating transcription of survival genes. Akt regulates the function or expression of several Bcl-2 homology domain 3 (BH-3)-only proteins. Pro-apoptotic Bcl-2 family members i.e. Bcl-2-Associated Death protein (BAD) and Bcl-2-associated X protein (BAX) are negatively regulated while prosurvival members such as myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) are positively regulated. Akt promotes cell survival by phosphorylating forkhead (FKHR) [50], FOXO [51], and cAMP response element-binding protein (CREB) [52] transcription factors. The Akt mediated phosphorylation of Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha (IKK α) leads to NF- κ B pathway activation which in turn increases inhibitors of apoptosis (IAPs) gene transcription [53]. The inhibition of ILK activity that down-modulates pAkt-S473 induces apoptosis, and decreases angiogenesis, invasiveness, and growth of mouse tumor models [54–56].

Sphingosine kinase-1 (SPHK1) exerts its anti-apoptotic activity in glioma cancer cells through an Akt/FOXO3a/Bim pathway [57]. Akt phosphorylates mouse double minute 2 homolog (MDM2) inducing its translocation into the nucleus where it inhibits P53 apoptosis functions [58]. Akt directly phosphorylates caspase-9 proapoptotic protein and decreases its protease activity [59]. Sorafenib, a kinase inhibitor, significantly induces apoptosis via down-regulation of the survival factor Mcl-1 depending on Akt and mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling inhibition [60].

Cell cycle

In addition to MDM2, Akt controls other proteins involved in cell cycle regulation. Akt phosphorylates p27^{KIP} and p21^{CIP1} and attenuates their cell-cycle inhibitory effects [51]. Akt increases *cyclin D* and *c-myc* expression through the glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β) pathway inhibition. PKB/Akt signaling is involved in the regulation of the retinoblastoma protein (pRB) phosphorylation most likely by controlling the expression or activity of cyclin D, p27^{KIP} and p21^{CIP1} [50].

DNA repair

Kao et al. [61], have demonstrated that targeting Akt results in an increase of residual unrepaired DNA double strand breaks (DSBs) following irradiation of U251 GBM cells. Importantly, the expression of constitutively active, myristylated Akt accelerates DNA repair, suggesting that the PI3K/Akt pathway is involved in radioresistance of GBM cells [62]. Ionizing radiation (IR) produces DSB and activates Akt, however a direct mechanism linking intra-nuclear DSBs and Akt signaling was lacking. Recently it was reported that the inhibition of an EGFR/Akt/DNA-PK axis was followed by an inhibition of DSBs repair [63]. Moreover, MRE11 promotes directly Akt phosphorylation in direct response to DSBs [64].

Glioma stem cells

Akt signaling was reported to be involved in glioma stem cell (GSC) response to hypoxia [65]. Local delivery of an Akt small-molecule inhibitor (A-443654) inhibits growth of GBM and GBM stem-like cells in experimental intracranial glioma models [66]. Platelet-derived growth factor pathway regulates glycolysis in GSC through Akt signaling [67]. The chemokine CXCL12 induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production by CD133(+) GSC via activation of the PI3K/Akt signaling pathway [68]. Finally, a very recent work reported that CD133 is a direct activator of Akt signaling via binding to the p85 regulatory subunit of PI3K [69]. Akt functions in GSC are relatively complex as attested by another recent work reporting that IGF1 signaling is activated after radiation and exerts a dual effect on Akt pathway activity. After fractionated radiation, Akt is down-regulated and enables the enhancement of stem cells characteristics by the activation of FoxO3a target genes. In contrast, after acute radiation IGF1 signaling activates Akt to protect GSC from radiation toxicity [70].

Other key roles

Akt pathway is also involved in nutrient uptake and metabolism after growth factor signals and notably glucose uptake. TSC2 and PRAS40 phosphorylation mediated by Akt increased glucose transporter Glut-1 expression [71]. Akt signaling also leads to an increase in VEGF expression directly [72] or through hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) transcriptional activity [73]. Reports have indicated that Akt and other kinases can regulate telomerase activity at the post-translational level through phosphorylating human telomerase reverse transcriptase (hTERT) [74]. The matrix-degrading metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-9 that promotes invasiveness, could be regulated through Akt pathway [75]. Runx2, a transcription factor involved in cell migration and invasion, was found to be expressed in human glioma [76]. Described initially in prostate cancer, PTEN-loss and/or Akt activation induces FOXO1 inhibition leading to an increase of Runx2 transcriptional activity [77].

Emerging role for Akt2 and Akt3 in glioma

All Akt isoforms are expressed and active in glioma cells [78] with significantly higher activation in PTEN-null cells [79]. Although *Akt2* was initially reported to be neither amplified nor overexpressed in GBMs [80], later studies have demonstrated that *Akt2* plays an important role in glioma cell line motility, invasion, survival and growth in vitro and in vivo [81–85]. In parallel, other studies reported that *Akt2* gene expression level increases with glioma grade and inversely correlates with patient survival [86, 87]. Although *Akt3* is highly expressed in the brain [78] its mRNA and protein level decreased as the malignancy grade increased [34]. However, some authors found an *Akt3* amplification in GBMs [88]. The down-regulation of *Akt2* or *Akt3* by RNA interference reduced the expression of the phosphorylated form of BAD, resulting in the induction of caspase-dependent apoptosis [34]. In addition, *Akt3* was required for anchorage-independent growth of transformed astrocytes and human glioma cells, and *Akt3* loss inhibited invasion of transformed astrocytes. These results indicate context-dependent roles for individual Akt isoforms and suggest that there may be heterogeneous tumor responses to isoform-specific inhibitors [79].

Targeting Akt to overcome glioma resistance to treatment

In a bioclinical study Chakravarti et al. [89] have reported that Akt-Ser473 is highly activated in GBMs and

associated with a poor prognosis in a subset of patients treated by radiation only. These results sustain that Akt activation could be involved in resistance to radiotherapy. The loss of PTEN, and the resulting high level of Akt activation, did not predict a shorter survival for patients treated by temozolamide [90]. Our results with others strongly suggest that Akt seems to be a valid target to overcome glioma resistance to treatment [91]. Many PI3K inhibitors have been developed in the last few decades to study PI3K/Akt signaling involvement in various biological processes in gliomas and other cancers. A part of them were used to explore their ability to overcome cancer cell resistance to radiotherapy and chemotherapy.

Preclinical studies

Akt activation was reported to suppress temozolamide-induced cell cycle arrest in G2 and to protect glioma cells from mitotic catastrophe and senescence [92]. Consequently, the association of temozolamide with an inhibition of Akt pathway enhanced temozolamide effects as reported for several inhibitors. Thus, temozolamide combined with, perifosine (dual Akt/Erk inhibitor), or LY294002 (PI3K inhibitor) or XL765 (dual PI3K/mTOR inhibitor) have been found to increase G2 arrest [93], drug cytotoxicity [27] and antitumor activity in glioma [94] respectively.

Chen et al. [95] have shown that PI-103 (PI3K inhibitor) could radiosensitize PTEN mutated cell lines whereas it could not radiosensitize PTEN wild type glioma cell lines. Re-establishment of PTEN was also a promising approach to radiosensitize glioma because PTEN is often altered in these tumors. In the same way, we demonstrated that targeting Akt itself (Akt inhibitor IV) is also a relevant approach to radiosensitize glioma cells [96]. By contrast perifosine combined with 10 Gy did not result in a significantly increased survival relative to 10 Gy alone in mice preclinical models [97].

Clinical studies and perspectives

Strengthened by promising results of preclinical studies investigating the impact of PI3K/Akt pathway targeting in GBMs, small molecules that target components of this pathway have emerged and are currently tested in clinical studies.

Inhibitors that act upstream or downstream of Akt are more advanced in their development than direct Akt inhibitors. Temsirolimus (mTOR inhibitor) was associated with significantly longer median time to progression for responders (36 % of treated patients) [98]. Another study reported that despite initial disease stabilization with temsirolimus in approximately 50 % of GBM patients, the durability of the response was short [99]. In phase I studies,

Table 1 Overview of clinical trials exploring Akt pathway targeting in glioma

Study title	Target	Recruitment	Conditions	Phases	NCT number
Study with nelfinavir and combined radiochemotherapy for glioblastoma	Akt	Suspended	Glioblastoma	Phase 1	NCT00694837
MK-2206 for recurrent malignant Glioma	Akt	Withdrawn	Malignant glioma	Phase 2	NCT01249105
Enzastaurin in treating young patients With refractory primary CNS tumors	PKC, Akt	Completed	Neuroblastoma	Phase 1	NCT00503724
Everolimus, temozolomide, and radiation therapy in treating patients With newly diagnosed glioblastoma	mTOR	Active, not recruiting	Brain and central nervous system tumors	Phase 1/2	NCT00553150
Everolimus in treating patients with recurrent or progressive low-grade glioma	mTOR	Recruiting	Brain and central nervous system tumors	Phase 2	NCT00831324
Everolimus and gefitinib in treating patients with progressive glioblastoma multiforme or progressive metastatic prostate cancer	mTOR	Completed	Brain and central nervous system tumors and prostate cancer	Phase 1/2	NCT00085566
Clinical and molecular-metabolic phase II Trial of perifosine for recurrent/progressive malignant gliomas	Akt	Active, not recruiting	Malignant gliomas	Phase 2	NCT00590954
Temozolomide and everolimus in treating patients with newly diagnosed, recurrent, or progressive malignant glioblastoma multiforme	mTOR	Completed	Brain and central nervous system tumors	Phase 1	NCT00387400

No results available for all presented studies

Enzastaurin (PI3K/PKC β inhibitor) and everolimus (mTOR inhibitor) administrated to newly diagnosed GBMs patients concomitantly with radiotherapy and temozolamide are well tolerated [100, 101]. Temsirolimus in combination with bevacizumab [102] and everolimus with temozolamide [103] could also be safely administered to glioma patients. In general, clinical trials with rapamycin (mTOR inhibitor) and its derivates (rapalogs) showed a limited efficacy, suggesting that mechanisms leading to resistance have emerged in response to such a treatment [104–106]. Indeed this could be explained by the fact that the rapalogs mediate only mTORC1 inhibition and did not affect Akt activation by mTORC2. Furthermore inhibiting only mTORC1 increased activation of Akt [105, 107]. The major drawback with using PI3K inhibitors is the lack of specificity because all PI3K protein family will be affected by such a treatment (DNA-PK, ATM, ATR...) leading to extensive side effects.

The abundance of pathways that lead to Akt activation along with the large number of downstream targets make it a real hub in glioma survival signaling. Therefore, targeting Akt itself could be more relevant than targeting one or more upstream activators (i.e. PI3K or PI3K independent activators) or downstream effectors. Two groups have started the evaluation of the HIV protease inhibitor nelfinavir (Akt inhibitor) combined with concomitant radiotherapy and temozolamide (NCT01020292 and NCT00694837). However, among all Akt inhibitors that have been already studied in GBMs clinical trials the most advanced is perifosine. While the outlined data from initial trials with perifosine were largely encouraging, several phase II studies have

produced sobering results in various malignancies [108]. Two unpublished clinical studies have been conducted using perifosine alone or combined with temsirolimus in GBMs (NCT00590954 and NCT01051557). Further studies are needed especially to assess perifosine concurrently to radiotherapy. Regarding the involvement of each Akt isoforms in glioma aggressiveness, drugs that affect all these isoforms directly such as MK2206 [109] (currently investigated, see Table 1) or GSK690693 [110] and GDC-0068 [111] could be of major interest.

Despite the potential clinical benefit following Akt inhibition, side effects including promotion of metastasis, infertility, diabetic phenotypes or various neurotoxicities could arise [112]. Indeed, Akt can block breast cancer cell motility and invasion by a surprising mechanism that depends at least in part, on nuclear factor of activated T-cells (NFAT), an invasion-promoting factor. Akt activated the E3 ubiquitin ligase HDM2, causing ubiquitination and degradation of NFAT [113]. In cancer patients Akt inhibitors are used alone or in combination with gold standard treatment. Akt inhibitors could be used at lower concentrations that are inefficient on tumor cells when used alone, but that could improve tumor response to radiation or drugs in a combinatorial approach. Combining Akt inhibitors with chemotherapy could improve tumor cell sensitivity to chemotherapy but this will also increase systemic side effects. Very interestingly, targeting Akt becomes promising when associated with a highly selective spatial targeting of tumor by radiation avoiding healthy surrounding tissues. This radiosensitizing effect might be obtained without increasing systemic side effects relative to Akt inhibition.

Conclusions

Akt signaling pathway understanding is of major interest because of Akt involvement in many cellular processes contributing to tumor progression, aggressiveness and resistance to treatment. Further studies are required to fully explore and develop new treatments based on Akt targeting. In this way, the combination of specific Akt targeting with the gold standard treatment is a promising strategy to improve glioma patient survival.

Acknowledgments The authors would like to sincerely thank Pr. Laurent Morel and Dr Cyrille Saintenac for their critical reading of this manuscript. CREaT (Cancer Resistance Exploring and Targeting) lab is supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy De Dôme), by the Institut National du Cancer and by the Région Auvergne. Z. G. O. was the recipient of a fellowship from the Ministère des Enseignements Secondaire et Supérieur, Burkina Faso.

Conflict of interest None.

References

1. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109:93–108
2. Legler JM, Ries LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, Linet MS (1999) Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 91:1382–1390
3. Nikiforova MN, Hamilton RL (2011) Molecular diagnostics of gliomas. *Arch Pathol Lab Med* 135:558–568
4. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19:764–772
5. DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG (1998) Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol* 44:691–695
6. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphorn MJ, 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 (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996
7. Shannon AM, Williams KJ (2008) Antiangiogenics and radiotherapy. *J Pharm Pharmacol* 60:1029–1036
8. Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ (2003) Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol* 67:3–15
9. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delalorge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13:1050–1059
10. De Ridder M, Verovski VN, Darville MI, Van Den Berghe DL, Monsaert C, Eizirik DL, Storme GA (2004) Macrophages enhance the radiosensitizing activity of lipid A: a novel role for immune cells in tumor cell radioresponse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60:598–606
11. Coffer PJ, Woodgett JR (1991) Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 201:475–481
12. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA (1991) Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4171–4175
13. Bellacosa A, Testa JR, Stalet SP, Tsichlis PN (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254:274–277
14. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912–1934
15. Franke TF (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27:6473–6488
16. Oh WJ, Wu CC, Kim SJ, Facchinetto V, Julien LA, Finlan M, Roux PP, Su B, Jacinto E (2010) mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J* 29:3939–3951
17. Facchinetto V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, Sessa WC, Qin J, Zhang P, Su B, Jacinto E (2008) The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J* 27:1932–1943
18. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098–1101
19. Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA (2004) Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 279:41189–41196
20. Memmott RM, Dennis PA (2009) Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* 21:656–664
21. Mahajan K, Mahajan NP (2012) PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol* 227:3178–3184
22. Cantley LC, Neel BG (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4240–4245
23. Gao X, Lowry PR, Zhou X, Depry C, Wei Z, Wong GW, Zhang J (2011) PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:14509–14514
24. Gao T, Furnari F, Newton AC (2005) PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18:13–24
25. Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK (2013) Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett* 335:9–18
26. Brognard J, Sierecki E, Gao T, Newton AC (2007) PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* 25:917–931
27. Chen L, Han L, Shi Z, Zhang K, Liu Y, Zheng Y, Jiang T, Pu P, Jiang C, Kang C (2012) LY294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI3K/Akt pathway. *Mol Med Rep* 5:575–579
28. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR (2005) Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 94:29–86
29. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G (1995) Benedetti Panici P, Mancuso S, Neri G, Testa

- JR: Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 64:280–285
30. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR (1996) Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3636–3641
31. Cheng JQ, Altomare DA, Klein MA, Lee WC, Kruh GD, Liss NA, Testa JR (1997) Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. *Oncogene* 14:2793–2801
32. Staal SP (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5034–5037
33. Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA (1999) Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 274:21528–21532
34. Mure H, Matsuzaki K, Kitazato KT, Mizobuchi Y, Kuwayama K, Kageji T, Nagahiro S (2010) Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas. *Neuro Oncol* 12:221–232
35. Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, Crosby K, Seligson D, Palotie A, Inge L, Smith BL, Sawyers CL, Mischel PS (2003) Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients *in vivo*. *Cancer Res* 63:2742–2746
36. Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D (1998) Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* 8:1195–1198
37. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990) Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8602–8606
38. Moscatello DK, Montgomery RB, Sundareshan P, McDanel H, Wong MY, Wong AJ (1996) Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene* 13:85–96
39. Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK, Furnari FB, White FM (2007) Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12867–12872
40. Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, Romero E, Zheng S, Wiencke JK, McBride SM, Cowdrey C, Prados MD, Weiss WA, Berger MS, Gupta N, Haas-Kogan DA (2012) PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro Oncol* 14:1146–1152
41. Molina JR, Morales FC, Hayashi Y, Aldape KD, Georgescu MM (2010) Loss of PTEN binding adapter protein NHERF1 from plasma membrane in glioblastoma contributes to PTEN inactivation. *Cancer Res* 70:6697–6703
42. Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WS, Fuller GN (2004) Analysis of the activation status of Akt, NFκB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest* 84:941–951
43. Antonelli M, Massimino M, Morra I, Garre ML, Gardiman MP, Buttarelli FR, Arcella A, Giangaspero F (2012) Expression of pERK and pAKT in pediatric high grade astrocytomas: correlation with YKL40 and prognostic significance. *Neuropathology* 32:133–138
44. Rodriguez EF, Scheithauer BW, Giannini C, Ryneanson A, Cen L, Hoesley B, Gilmer-Flynn H, Sarkaria JN, Jenkins S, Long J, Rodriguez FJ (2011) PI3K/AKT pathway alterations are associated with clinically aggressive and histologically anaplastic subsets of pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121:407–420
45. Suzuki Y, Shirai K, Oka K, Mobaraki A, Yoshida Y, Noda SE, Okamoto M, Itoh J, Itoh H, Ishiuchi S, Nakano T (2010) Higher pAkt expression predicts a significant worse prognosis in glioblastomas. *J Radiat Res* 51:343–348
46. Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN (2000) Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 25:55–57
47. Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO (2001) Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* 61:6674–6678
48. Jung IH, Leem GL, Jung DE, Kim MH, Kim EY, Kim SH, Park HC, Park SW (2013) Glioma is formed by active Akt1 alone and promoted by active Rac1 in transgenic zebrafish. *Neuro Oncol* 15:290–304
49. Koseoglu S, Lu Z, Kumar C, Kirschmeier P, Zou J (2007) AKT1, AKT2 and AKT3-dependent cell survival is cell line-specific and knockdown of all three isoforms selectively induces apoptosis in 20 human tumor cell lines. *Cancer Biol Ther* 6:755–762
50. Nicholson KM, Anderson NG (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14:381–395
51. Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274
52. Du K, Montminy M (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273:32377–32379
53. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB (1999) NF-κB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401:82–85
54. Koul D, Shen R, Bergh S, Lu Y, de Groot JF, Liu TJ, Mills GB, Yung WK (2005) Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 4:1681–1688
55. Edwards LA, Thiessen B, Dragowska WH, Daynard T, Bally MB, Dedhar S (2005) Inhibition of ILK in PTEN-mutant human glioblastomas inhibits PKB/Akt activation, induces apoptosis, and delays tumor growth. *Oncogene* 24:3596–3605
56. Edwards LA, Woo J, Huxham LA, Verreaux M, Dragowska WH, Chin G, Rajput A, Kyle AH, Kalra J, Yapp D, Yan H, Minchinton AI, Huntsman D, Daynard T, Waterhouse DN, Thiessen B, Dedhar S, Bally MB (2008) Suppression of VEGF secretion and changes in glioblastoma multiforme microenvironment by inhibition of integrin-linked kinase (ILK). *Mol Cancer Ther* 7:59–70
57. Guan H, Song L, Cai J, Huang Y, Wu J, Yuan J, Li J, Li M (2011) Sphingosine kinase 1 regulates the Akt/FOXO3a/Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in glioma cells. *PLoS One* 6:e19946
58. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC (2001) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3:973–982
59. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318–1321
60. Carra E, Barbieri F, Marubbi D, Pattarozzi A, Favoni RE, Florio T, Daga A (2013) Sorafenib selectively depletes human glioblastoma tumor-initiating cells from primary cultures. *Cell Cycle* 12:491–500
61. Kao GD, Jiang Z, Fernandes AM, Gupta AK, Maity A (2007) Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *J Biol Chem* 282:21206–21212
62. Mukherjee B, McEllin B, Camacho CV, Tomimatsu N, Sirasanagandla S, Nannepaga S, Hatanpaa KJ, Mickey B, Madden

- C. Maher E, Boothman DA, Furnari F, Cavenee WK, Bachoo RM, Burma S (2009) EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Res* 69:4252–4259
63. Kang KB, Zhu C, Wong YL, Gao Q, Ty A, Wong MC (2012) Gefitinib radiosensitizes stem-like glioma cells: inhibition of epidermal growth factor receptor-Akt-DNA-PK signaling, accompanied by inhibition of DNA double-strand break repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83:e43–e52
64. Fraser M, Harding SM, Zhao H, Coackley C, Durocher D, Bristow RG (2011) MRE11 promotes AKT phosphorylation in direct response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 10:2218–2232
65. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androulcellis-Theotokis A, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, Pollack IF, Park DM (2009) Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* 28:3949–3959
66. Gallia GL, Tyler BM, Hann CL, Siu IM, Giranda VL, Vescovi AL, Brem H, Riggins GJ (2009) Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Mol Cancer Ther* 8:386–393
67. Ran C, Liu H, Hitoshi Y, Israel MA (2013) Proliferation-independent control of tumor glycolysis by PDGFR-mediated AKT activation. *Cancer Res* 73:1831–1843
68. Ping YF, Yao XH, Jiang JY, Zhao LT, Yu SC, Jiang T, Lin MC, Chen JH, Wang B, Zhang R, Cui YH, Qian C, Wang J, Bian XW (2011) The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling. *J Pathol* 224:344–354
69. Wei Y, Jiang Y, Zou F, Liu Y, Wang S, Xu N, Xu W, Cui C, Xing Y, Cao B, Liu C, Wu G, Ao H, Zhang X, Jiang J (2013) Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6829–6834
70. Osuka S, Sampetrean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A, Saya H (2013) IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 31:627–640
71. Taha C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H, Sonenberg N, Klip A (1999) Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J Biol Chem* 274:33085–33091
72. Jiang BH, Liu LZ (2008) AKT signaling in regulating angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 8:19–26
73. Gordan JD, Simon MC (2007) Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17:71–77
74. Liu JP (1999) Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 13:2091–2104
75. Das G, Shiras A, Shanmuganandam K, Shastray P (2011) Rictor regulates MMP-9 activity and invasion through Raf-1-MEK-ERK signaling pathway in glioma cells. *Mol Carcinog* 50:412–423
76. Vladimirova V, Waha A, Luckeath K, Pesheva P, Probstmeier R (2008) Runx2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectin-3. *J Neurosci Res* 86:2450–2461
77. Zhang H, Pan Y, Zheng L, Choe C, Lindgren B, Jensen ED, Westendorf JJ, Cheng L, Huang H (2011) FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion. *Cancer Res* 71:3257–3267
78. Morimoto AM, Tomlinson MG, Nakatani K, Bolen JB, Roth RA, Herbst R (2000) The MMAC1 tumor suppressor phosphatase inhibits phospholipase C and integrin-linked kinase activity. *Oncogene* 19:200–209
79. Endersby R, Zhu X, Hay N, Ellison DW, Baker SJ (2011) Nonredundant functions for Akt isoforms in astrocyte growth and gliomagenesis in an orthotopic transplantation model. *Cancer Res* 71:4106–4116
80. Knobbe CB, Reifenberger G (2003) Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol 3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* 13:507–518
81. Pu P, Kang C, Li J, Jiang H (2004) Antisense and dominant-negative AKT2 cDNA inhibits glioma cell invasion. *Tumour Biol* 25:172–178
82. Pu P, Kang C, Li J, Jiang H, Cheng J (2006) The effects of antisense AKT2 RNA on the inhibition of malignant glioma cell growth in vitro and in vivo. *J Neurooncol* 76:1–11
83. Zhang J, Han L, Zhang A, Wang Y, Yue X, You Y, Pu P, Kang C (2010) AKT2 expression is associated with glioma malignant progression and required for cell survival and invasion. *Oncol Rep* 24:65–72
84. Zhang B, Gu F, She C, Guo H, Li W, Niu R, Fu L, Zhang N, Ma Y (2009) Reduction of Akt2 inhibits migration and invasion of glioma cells. *Int J Cancer* 125:585–595
85. Cui Y, Wang Q, Wang J, Dong Y, Luo C, Hu G, Lu Y (2012) Knockdown of AKT2 expression by RNA interference inhibits proliferation, enhances apoptosis, and increases chemosensitivity to the anticancer drug VM-26 in U87 glioma cells. *Brain Res* 1469:1–9
86. Fortin SP, Ennis MJ, Savitch BA, Carpenteri D, McDonough WS, Winkles JA, Loftus JC, Kingsley C, Hostetter G, Tran NL (2009) Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis stimulation of glioma cell survival is dependent on Akt2 function. *Mol Cancer Res* 7:1871–1881
87. Wang G, Kang C, Pu P (2010) Increased expression of Akt2 and activity of PI3K and cell proliferation with the ascending of tumor grade of human gliomas. *Clin Neurol Neurosurg* 112:324–327
88. Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061–1068
89. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, Loeffler JS (2004) The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol* 22:1926–1933
90. Carico C, Nuno M, Mukherjee D, Elramsiy A, Dantis J, Hu J, Rudnick J, Yu JS, Black KL, Bannykh SI, Patil CG (2012) Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolamide era. *PLoS One* 7:e33684
91. Narayan RS, Fedrigo CA, Stalpers LJ, Baumert BG, Sminia P (2013) Targeting the Akt-pathway to improve radiosensitivity in glioblastoma. *Curr Pharm Des* 19:951–957
92. Hirose Y, Katayama M, Mirzoeva OK, Berger MS, Pieper RO (2005) Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. *Cancer Res* 65:4861–4869
93. Momota H, Nerio E, Holland EC (2005) Perifosine inhibits multiple signalling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res* 65:7429–7435
94. Prasad G, Sottero T, Yang X, Mueller S, James CD, Weiss WA, Polley MY, Ozawa T, Berger MS, Aftab DT, Prados MD, Haas-Kogan DA (2011) Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide. *Neuro Oncol* 13:384–392

95. Chen JS, Zhou LJ, Entin-Meer M, Yang X, Donker M, Knight ZA, Weiss W, Shokat KM, Haas-Kogan D, Stokoe D (2008) Characterization of structurally distinct, isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors in combination with radiation in the treatment of glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 7:841–850
96. Chautard E, Loubeau G, Tchirkov A, Chassagne J, Vermot-Deroches C, Morel L, Verrelle P (2010) Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. *Neuro Oncol* 12:434–443
97. Becher OJ, Hambardzumyan D, Walker TR, Helmy K, Nazarian J, Albrecht S, Hiner RL, Gall S, Huse JT, Jabado N, MacDonald TJ, Holland EC (2010) Preclinical evaluation of radiation and perifosine in a genetically and histologically accurate model of brainstem glioma. *Cancer Res* 70:2548–2557
98. Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, Kreisberg JI, Ballman K, Boni J, Peralba JM, Jenkins RB, Dakhlil SR, Morton RF, Jaeckle KA, Scheithauer BW, Dancey J, Hidalgo M, Walsh DJ (2005) Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 23:5294–5304
99. Chang SM, Wen P, Cloughesy T, Greenberg H, Schiff D, Conrad C, Fink K, Robins HI, De Angelis L, Raizer J, Hess K, Aldape K, Lamborn KR, Kuhn J, Dancey J, Prados MD (2005) Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs* 23:357–361
100. Butowski N, Chang SM, Lamborn KR, Polley MY, Parvataneni R, Hristova-Kazmierski M, Musib L, Nicol SJ, Thornton DE, Prados MD (2010) Enzastaurin plus temozolamide with radiation therapy in glioblastoma multiforme: a phase I study. *Neuro Oncol* 12:608–613
101. Sarkaria JN, Galanis E, Wu W, Peller PJ, Giannini C, Brown PD, Uhm JH, McGraw S, Jaeckle KA, Buckner JC (2011) North Central Cancer Treatment Group Phase I trial N057K of everolimus (RAD001) and temozolamide in combination with radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81:468–475
102. Lassen U, Sorensen M, Gaziell TB, Hasselbalch B, Poulsen HS (2013) Phase II study of bevacizumab and temsirolimus combination therapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Anticancer Res* 33:1657–1660
103. Chinnaian P, Won M, Wen PY, Rojiani AM, Wendland M, Dipetrillo TA, Corn BW, Mehta MP (2013) RTOG 0913: a phase I study of daily everolimus (RAD001) in combination with radiation therapy and temozolamide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 86:880–884
104. Dowling RJ, Pollak M, Sonenberg N (2009) Current status and challenges associated with targeting mTOR for cancer therapy. *BioDrugs* 23:77–91
105. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N (2006) mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 66:1500–1508
106. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 284:8023–8032
107. O'Reilly T, McSheehy PM (2010) Biomarker development for the clinical activity of the mTOR inhibitor everolimus (RAD001): processes, limitations, and further proposals. *Transl Oncol* 3:65–79
108. Pal SK, Reckamp K, Yu H, Figlin RA (2010) Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Exp Opin Invest Drugs* 19:1355–1366
109. Cheng Y, Zhang Y, Zhang L, Ren X, Huber-Keener KJ, Liu X, Zhou L, Liao J, Keihack H, Yan L, Rubin E, Yang JM (2012) MK-2206, a novel allosteric inhibitor of Akt, synergizes with gefitinib against malignant glioma via modulating both autophagy and apoptosis. *Mol Cancer Ther* 11:154–164
110. Makarov PB, Golovine K, Kutikov A, Teper E, Canter DJ, Simhan J, Uzzo RG, Kolenko VM (2012) Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 11:1510–1517
111. Lin J, Sampath D, Nannini MA, Lee BB, Degtyarev M, Oeh J, Savage H, Guan Z, Hong R, Kassees R, Lee LB, Risom T, Gross S, Liederer BM, Koeppen H, Skelton NJ, Wallin JJ, Belvin M, Punnoose E, Friedman LS, Lin K (2013) Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res* 19:1760–1772
112. LoPiccolo J, Granville CA, Gills JJ, Dennis PA (2007) Targeting Akt in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 18:861–874
113. Wyszomierski SL, Yu D (2005) A knotty turnaround? Akt1 as a metastasis suppressor. *Cancer Cell* 8:437–439

Références

Bibliographiques

- A**ggarwal, B.B., Sethi, G., Ahn, K.S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Kunnumakkara, A.B., Sung, B., and Ichikawa, H. (2006). Targeting Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-3 for Prevention and Therapy of Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1091*, 151–169.
- Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P. (2006). XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining. *Cell* *124*, 301–313.
- Albanese, J., and Dainiak, N. (2003). Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation. *Exp. Hematol.* *31*, 455–464.
- Alentorn, A., Sanson, M., and Idbaih, A. (2012). Oligodendrogiomas: new insights from the genetics and perspectives. *Curr. Opin. Oncol.* *24*, 687–693.
- Amberger-Murphy, V. (2009). Hypoxia helps glioma to fight therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* *9*, 381–390.
- Andersson, U., Schwartzbaum, J., Wiklund, F., Sjöström, S., Liu, Y., Tsavachidis, S., Ahlbom, A., Auvinen, A., Collatz-Laier, H., Feychting, M., et al. (2010). A comprehensive study of the association between the EGFR and ERBB2 genes and glioma risk. *Acta Oncol.* *49*, 767–775.
- Andrade, P., Martin, M.J., Juarez, R., Lopez de Saro, F., and Blanco, L. (2009). Limited terminal transferase in human DNA polymerase ? defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16203–16208.
- Andrieu-Abadie, N., and Levade, T. (2002). Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1585*, 126–134.
- Arita, H., Narita, Y., Fukushima, S., Tateishi, K., Matsushita, Y., Yoshida, A., Miyakita, Y., Ohno, M., Collins, V.P., Kawahara, N., et al. (2013). Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *126*, 267–276.
- Aydin, D., Feychting, M., Schüz, J., Tynes, T., Andersen, T.V., Schmidt, L.S., Poulsen, A.H., Johansen, C., Prochazka, M., Lannering, B., et al. (2011). Mobile Phone Use and Brain Tumors in Children and Adolescents: A Multicenter Case–Control Study. *J. Natl. Cancer Inst.* *103*, 1264–1276.
- B**adaoui, N., Meyronet, D., Cartalat-Carel, S., Guyotat, J., Jouanneau, E., d' Hombres, A., Sunyach, M.P., Jouvet, A., Louis-Tisserand, G., Archinet, A., et al. (2014). Patterns of care and survival of glioblastoma patients: A comparative study between 2004 and 2008 in Lyon, France. *Rev. Neurol. (Paris)* *170*, 222–227.
- Badiali, M., Gleize, V., Paris, S., Moi, L., Elhouadani, S., Arcella, A., Morace, R., Antonelli, M., Buttarelli, F.R., Figarella- Branger, D., et al. (2012). KIAA1549-BRAF Fusions and IDH Mutations Can Coexist in Diffuse Gliomas of Adults. *Brain Pathol.* *22*, 841–847.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499–506.

- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2004). Initiating cellular stress responses. *Cell* *118*, 9–17.
- Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L., and Loiseau, H. (2010). Épidémiologie des glioblastomes. *Neurochirurgie* *56*, 433–440.
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., and von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *116*, 597–602.
- Bar, E.E. (2011). Glioblastoma, Cancer Stem Cells and Hypoxia. *Brain Pathol.* *21*, 119–129.
- Barcellos-Hoff, M.H., Newcomb, E.W., Zagzag, D., and Narayana, A. (2009). Therapeutic Targets in Malignant Glioblastoma Microenvironment. *Semin. Radiat. Oncol.* *19*, 163–170.
- Bartek, J., Ng, K., Bartek, J., Fischer, W., Carter, B., and Chen, C.C. (2012). Key concepts in glioblastoma therapy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *83*, 753–760.
- Bent, M.J. van den, Brandes, A.A., Taphoorn, M.J.B., Kros, J.M., Kouwenhoven, M.C.M., Delattre, J.-Y., Bernsen, H.J.J.A., Frenay, M., Tijssen, C.C., Grisold, W., et al. (2013). Adjuvant Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Chemotherapy in Newly Diagnosed Anaplastic Oligodendrogloma: Long-Term Follow-Up of EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J. Clin. Oncol.* *31*, 344–350.
- Bettegowda, C., Agrawal, N., Jiao, Y., Sausen, M., Wood, L.D., Hruban, R.H., Rodriguez, F.J., Cahill, D.P., McLendon, R., Riggins, G., et al. (2011). Mutations in CIC and FUBP1 Contribute to Human Oligodendrogloma. *Science* *333*, 1453–1455.
- Bian, S.X., McAleer, M.F., Vats, T.S., Mahajan, A., and Grosshans, D.R. (2013). Pilocytic astrocytoma with leptomeningeal dissemination. *Childs Nerv. Syst.* *29*, 441–450.
- Bonnefont-Rousselot, D., Khalil, A., Delattre, J., Jore, D., and Gardès-Albert, M. (1997). Oxidation of human high-density lipoproteins by .OH and .OH/O(.-)2 free radicals. *Radiat. Res.* *147*, 721–728.
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouysségur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *85*, 1301–1307.
- Brantley, E.C., and Benveniste, E.N. (2008). STAT-3: A Molecular Hub for Signaling Pathways in Gliomas. *Mol. Cancer Res. MCR* *6*.
- Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A., and Holland, E. (2009). Glioblastoma Subclasses Can Be Defined by Activity among Signal Transduction Pathways and Associated Genomic Alterations. *PLoS ONE* *4*.
- Brenner, A.V., Linet, M.S., Fine, H.A., Shapiro, W.R., Selker, R.G., Black, P.M., and Inskip, P.D. (2002). History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *99*, 252–259.
- Brenner, A.V., Linet, M.S., Shapiro, W.R., Selker, R.G., Fine, H.A., Black, P.M., and Inskip, P.D. (2004). Season of birth and risk of brain tumors in adults. *Neurology* *63*, 276–281.

Buckley, P.G., Alcock, L., Heffernan, J., Woods, J., Brett, F., Stallings, R.L., and Farrell, M.A. (2011). Loss of Chromosome 1p/19q in Oligodendroglial Tumors: Refinement of Chromosomal Critical Regions and Evaluation of Internexin Immunostaining as a Surrogate Marker. *J. Neuropathol.* *70*, 177–182.

Buckley, R.H., Wray, B.B., and Belmaker, E.Z. (1972). Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics* *49*, 59–70.

Buettner, R., Mora, L.B., and Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *8*, 945–954.

Burkart, W., Jung, T., and Frasch, G. (1999). Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* *322*, 89–101.

Cabaniols, C., Giorgi, R., Chinot, O., Ferahta, N., Spinelli, V., Alla, P., Barrie, M., and Lehucher-Michel, M.-P. (2011). Links between private habits, psychological stress and brain cancer: a case-control pilot study in France. *J. Neurooncol.* *103*, 307–316.

Cahan, W.G., Woodard, H.Q., Higinbotham, N.L., Stewart, F.W., and Coley, B.L. (1998). Sarcoma arising in irradiated bone: report of eleven cases. *Cancer* *82*, 8–34.

Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., Ino, Y., et al. (1998). Specific Genetic Predictors of Chemotherapeutic Response and Survival in Patients With Anaplastic Oligodendrogliomas. *J. Natl. Cancer Inst.* *90*, 1473–1479.

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., et al. (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* *11*, 69–82.

Caldenhoven, E., Dijk, T.B. van, Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J.A.M., Lammers, J.-W.J., Koenderman, L., and Groot, R.P. de (1996). STAT3 β , a Splice Variant of Transcription Factor STAT3, Is a Dominant Negative Regulator of Transcription. *J. Biol. Chem.* *271*, 13221–13227.

Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2999–3004.

Capp, J.-P., Boudsocq, F., Bertrand, P., Laroche-Clary, A., Pourquier, P., Lopez, B.S., Cazaux, C., Hoffmann, J.-S., and Canitrot, Y. (2006). The DNA polymerase δ is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* *34*, 2998–3007.

Capron, C., Jondeau, K., Casetti, L., Jalbert, V., Costa, C., Verhoyen, E., Massé, J.M., Coppo, P., Béné, M.C., Bourdoncle, P., et al. (2014). Viability and stress protection of chronic lymphoid leukemia cells involves overactivation of mitochondrial phosphoSTAT3Ser727. *Cell Death Dis.* *5*, e1451.

Cardis, E., Howe, G., Ron, E., Bebeshko, V., Bogdanova, T., Bouville, A., Carr, Z., Chumak, V., Davis, S., Demidchik, Y., et al. (2006). Cancer consequences of the Chernobyl accident: 20 years on. *J. Radiol. Prot.* *26*, 127.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J.L., Nuñez, G., et al. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* *10*, 105–115.

Chan, J.L., Lee, S.W., Fraass, B.A., Normolle, D.P., Greenberg, H.S., Junck, L.R., Gebarski, S.S., and Sandler, H.M. (2002). Survival and Failure Patterns of High-Grade Gliomas After Three-Dimensional Conformal Radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* *20*, 1635–1642.

Chauffert, B., Feuvret, L., Bonnetain, F., Taillandier, L., Frappaz, D., Taillia, H., Schott, R., Honnorat, J., Fabbro, M., Tennevèt, I., et al. (2014). Randomized phase II trial of irinotecan and bevacizumab as neo-adjuvant and adjuvant to temozolomide-based chemoradiation compared with temozolomide-chemoradiation for unresectable glioblastoma: final results of the TEMAVIR study from ANOCEF†. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *25*, 1442–1447.

Chautard, E., Loubeau, G., Tchirkov, A., Chassagne, J., Vermot-Desroches, C., Morel, L., and Verrelle, P. (2010). Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. *Neuro-Oncol.* *12*, 434–443.

Chautard, E., Ouédraogo, Z.G., Biau, J., and Verrelle, P. Role of Akt in human malignant glioma: from oncogenesis to tumor aggressiveness. *J. Neurooncol.* *1–11*.

Chen, R., Nishimura, M.C., Bumbaca, S.M., Kharbanda, S., Forrest, W.F., Kasman, I.M., Greve, J.M., Soriano, R.H., Gilmour, L.L., Rivers, C.S., et al. (2010). A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* *17*, 362–375.

Chinot, O.L., Wick, W., and Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *370*, 2049.

Chiou, G.-Y., Chien, C.-S., Wang, M.-L., Chen, M.-T., Yang, Y.-P., Yu, Y.-L., Chien, Y., Chang, Y.-C., Shen, C.-C., Chio, C.-C., et al. (2013). Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma. *Mol. Cell* *52*, 693–706.

Corle, C., Makale, M., and Kesari, S. (2012). Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. *J. Neurooncol.* *106*, 1–13.

Daley, J.M., and Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 1380–1388.

Darnell, J.E., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* *264*, 1415–1421.

Davis, F., Il'yasova, D., Rankin, K., McCarthy, B., and Bigner, D.D. (2011). Medical Diagnostic Radiation Exposures and Risk of Gliomas. *Radiat. Res.* *175*, 790–796.

Davis, S.D., Schaller, J., and Wedgwood, R.J. (1966). Job's Syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses. *Lancet* 1, 1013–1015.

D'Elia, A., Melone, G.A., Brogna, C., Formichella, A., Santoro, A., and Salvati, M. (2009). Radio-induced low-grade glioma: report of two cases and review of the literature. *Neurol. Sci.* 30, 137–141.

Denchi, E.L., and de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 448, 1068–1071.

Denton, D., Xu, T., and Kumar, S. (2014). Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol. Cell Biol.*

Dias-Santagata, D., Lam, Q., Vernovsky, K., Vena, N., Lennerz, J.K., Borger, D.R., Batchelor, T.T., Ligon, K.L., Iafrate, A.J., Ligon, A.H., et al. (2011). BRAF V600E Mutations Are Common in Pleomorphic Xanthoastrocytoma: Diagnostic and Therapeutic Implications. *PLoS ONE* 6.

Ducray, F., Idbaih, A., de Reynies, A., Bieche, I., Thillet, J., Mokhtari, K., Lair, S., Marie, Y., Paris, S., Vidaud, M., et al. (2008). Anaplastic oligodendroglomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol. Cancer* 7, 41.

Ducray, F., Mokhtari, K., Crinière, E., Idbaih, A., Marie, Y., Dehais, C., Paris, S., Carpentier, C., Dieme, M.-J., Adam, C., et al. (2011). Diagnostic and prognostic value of alpha internexin expression in a series of 409 gliomas. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 47, 802–808.

Eckerle Mize, D., Bishop, M., Resse, E., and Sluzevich, J. (2009). Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome. In *Cancer Syndromes*, D.L. Riegert-Johnson, L.A. Boardman, T. Hefferon, and M. Roberts, eds. (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)),.

Egan, K.M., Thompson, R.C., Nabors, L.B., Olson, J.J., Brat, D.J., LaRocca, R.V., Brem, S., Moots, P.L., Madden, M.H., Browning, J.E., et al. (2011). Cancer susceptibility variants and the risk of adult glioma in a US case-control study. *J. Neurooncol.* 104, 535–542.

Egan, K.M., Nabors, L.B., Olson, J.J., Monteiro, A.N., Browning, J.E., Madden, M.H., and Thompson, R.C. (2012). Rare TP53 genetic variant associated with glioma risk and outcome. *J. Med. Genet.* 49, 420–421.

Eng, C. (1993). PTEN Hamartoma Tumor Syndrome (PHTS). In *GeneReviews®*, R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.-T. Fong, R.J. Smith, and K. Stephens, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle),.

Eriksson, D., and Stigbrand, T. (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biol.* 31, 363–372.

Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427–5440.

Evans, S.M., Judy, K.D., Dunphy, I., Jenkins, W.T., Hwang, W.-T., Nelson, P.T., Lustig, R.A., Jenkins, K., Magarelli, D.P., Hahn, S.M., et al. (2004). Hypoxia Is Important in the Biology and Aggression of Human Glial Brain Tumors. *Clin. Cancer Res.* *10*, 8177–8184.

Favaudon, V. 2008. Effets cellulaires des rayonnements ionisants . radiosensibilité, cycle cellulaire et mort cellulaire. In *Radiobiologie* (ed. Hermann/Médecine), pp. 187-234. Tubiana, M., Paris.

Figarella-Branger, D., Bouvier, C., Moroch, J., Michalak, S., and F. Burel-Vandenbos (2010). Classification morphologique des glioblastomes. *Neurochirurgie* *56*, 459–463.

Figarella-Branger, D., Mokhtari, K., Dehais, C., Jouvet, A., Uro-Coste, E., Colin, C., Carpentier, C., Forest, F., Maurage, C.-A., Vignaud, J.-M., et al. (2014). Mitotic index, microvascular proliferation, and necrosis define 3 groups of 1p/19q codeleted anaplastic oligodendrogiomas associated with different genomic alterations. *Neuro-Oncol.* *16*, 1244–1254.

Filatova, A., Acker, T., and Garvalov, B.K. (2013). The cancer stem cell niche(s): The crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1830*, 2496–2508.

Frei, P., Mohler, E., Braun-Fahrlander, C., Fröhlich, J., Neubauer, G., Röösli, M., and QUALIFEX-team (2012). Cohort study on the effects of everyday life radio frequency electromagnetic field exposure on non-specific symptoms and tinnitus. *Environ. Int.* *38*, 29–36.

Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., et al. (2009). Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* *27*, 4733–4740.

Fukasawa, K. (2007). Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 911–924.

Fukasawa, K. (2008). p53, Cyclin-dependent Kinase and Abnormal Amplification of Centrosomes. *Biochim. Biophys. Acta* *1786*, 15–23.

Furqan, M., Mukhi, N., Lee, B., and Liu, D. (2013a). Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark. Res.* *1*, 5.

Furqan, M., Akinleye, A., Mukhi, N., Mittal, V., Chen, Y., and Liu, D. (2013b). STAT inhibitors for cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol* *6*, 90.

Getts, R.C., and Stamato, T.D. (1994). Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the xrs double-strand DNA repair-deficient mutant. *J. Biol. Chem.* *269*, 15981–15984.

Gillies, J.K., and Lorimer, I.A.J. (2007). Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in Glioblastoma. *Cell Cycle* *6*, 2005–2009.

Goodenberger, M.L., and Jenkins, R.B. (2012). Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* *205*, 613–621.

Goodhead, D.T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* *65*, 7–17.

Gramatzki, D., Herrmann, C., Happold, C., Becker, K.A., Gulbins, E., Weller, M., and Tabatabai, G. (2013). Glioma Cell Death Induced by Irradiation or Alkylating Agent Chemotherapy Is Independent of the Intrinsic Ceramide Pathway. *PLoS ONE* *8*.

Grassmé, H., Riethmüller, J., and Gulbins, E. (2007). Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog. Lipid Res.* *46*, 161–170.

Guan, B., Yue, P., Clayman, G.L., and Sun, S.Y. (2001). Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *J. Cell. Physiol.* *188*, 98–105.

Guichard, M., Dertinger, H., and Malaise, E.P. (1983). Radiosensitivity of four human tumor xenografts. Influence of hypoxia and cell-cell contact. *Radiat. Res.* *95*, 602–609.

Gulbins, E., and Grassmé, H. (2002). Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1585*, 139–145.

Gulbins, E., and Kolesnick, R. (2002). Acid sphingomyelinase-derived ceramide signaling in apoptosis. *Subcell. Biochem.* *36*, 229–244.

Haapaniemi, E.M., Kaustio, M., Rajala, H.L.M., Adrichem, A.J. van, Kainulainen, L., Glumoff, V., Doffinger, R., Kuusanmäki, H., Heiskanen-Kosma, T., Trotta, L., et al. (2014). Autoimmunity, hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation and mycobacterial disease in patients with dominant activating mutations in STAT3. *Blood* *blood – 2014–04 – 570101*.

Haber, J.E. (2000). Partners and pathways. *Trends Genet.* *16*, 259–264.

Hamilton, S.R., Liu, B., Parsons, R.E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S.M., Krush, A.J., Berk, T., Cohen, Z., Tetu, B., et al. (1995). The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *332*, 839–847.

Hanashiro, K., Kanai, M., Geng, Y., Sicinski, P., and Fukasawa, K. (2008). Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells. *Oncogene* *27*, 5288–5302.

Hardell, L., Mild, K.H., Carlberg, M., and Hallquist, A. (2004). Cellular and cordless telephone use and the association with brain tumors in different age groups. *Arch. Environ. Health* *59*, 132–137.

He, M., Ye, S., Ren, R., Dong, C., Xie, Y., Yuan, D., and Shao, C. (2012). Cytochrome-c mediated a bystander response dependent on inducible nitric oxide synthase in irradiated hepatoma cells. *Br. J. Cancer* *106*, 889–895.

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 997–1003.

Hendry, L., and John, S. (2004). Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *Eur. J. Biochem.* *271*, 4613–4620.

Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J.L., Rouzaut, A., Sanmamed, M.F., Bon, A.L., and Melero, I. (2011). Direct Effects of Type I Interferons on Cells of the Immune System. *Clin. Cancer Res.* *17*, 2619–2627.

Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., and Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* *44*, 113–139.

Hofer, S., and Lassman, A.B. (2010). Molecular markers in gliomas: impact for the clinician. *Target. Oncol.* *5*, 201–210.

Hofer, S., Rushing, E., Preusser, M., and Marosi, C. (2014). Molecular biology of high-grade gliomas: what should the clinician know? *Chin. J. Cancer* *33*, 4–7.

Holick, C.N., Giovannucci, E.L., Rosner, B., Stampfer, M.J., and Michaud, D.S. (2007). Prospective study of cigarette smoking and adult glioma: dosage, duration, and latency. *Neuro-Oncol.* *9*, 326–334.

Holland, S.M., DeLeo, F.R., Elloumi, H.Z., Hsu, A.P., Uzel, G., Brodsky, N., Freeman, A.F., Demidowich, A., Davis, J., Turner, M.L., et al. (2007). STAT3 Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1608–1619.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* *253*, 49–53.

Horbinski, C. (2013). To BRAF or Not to BRAF: Is That Even a Question Anymore? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *72*, 2–7.

Huse, J.T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., Sohn-Lee, C., le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T., et al. (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev.* *23*, 1327–1337.

Ianzini, F., Bertoldo, A., Kosmacek, E.A., Phillips, S.L., and Mackey, M.A. (2006). Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells. *Cancer Cell Int.* *6*, 11.

Idbaih, A., Marie, Y., Pierron, G., Brennetot, C., Hoang-Xuan, K., Kujas, M., Mokhtari, K., Sanson, M., Lejeune, J., Aurias, A., et al. (2005). Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. *Ann. Neurol.* *58*, 483–487.

Idbaih, A., Kouwenhoven, M., Jeuken, J., Carpentier, C., Gorlia, T., Kros, J.M., French, P., Teepe, J.L., Delattre, O., Delattre, J.-Y., et al. (2008). Chromosome 1p loss evaluation in anaplastic oligodendrogliomas. *Neuropathology* *28*, 440–443.

Iqbal, M.S., and Lewis, J. (2013). An Overview of the Management of Adult Ependymomas with Emphasis on Relapsed Disease. *Clin. Oncol.* *25*, 726–733.

Iyama, T., and Wilson, D.M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* *12*, 620–636.

Jasperson, K.W., and Burt, R.W. (1993). APC-Associated Polyposis Conditions. In GeneReviews®, R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.-T. Fong, R.J. Smith, and K. Stephens, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle),.

Jenkins, R.B., Blair, H., Ballman, K.V., Giannini, C., Arusell, R.M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P.D., et al. (2006). A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendrogloma. *Cancer Res.* *66*, 9852–9861.

Jenkins, R.B., Wrensch, M.R., Johnson, D., Fridley, B.L., Decker, P.A., Xiao, Y., Kollmeyer, T.M., Ryneanson, A.L., Fink, S., Rice, T., et al. (2011). Distinct germline polymorphisms underlie glioma morphologic heterogeneity. *Cancer Genet.* *204*, 13–18.

Jiao, Y., Killela, P.J., Reitman, Z.J., Rasheed, B.A., Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Rodriguez, F.J., Rosemberg, S., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K.N., et al. (2012). Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* *3*, 709–722.

Jones, D.T.W., Kocialkowski, S., Liu, L., Pearson, D.M., Backlund, L.M., Ichimura, K., and Collins, V.P. (2008). Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* *68*, 8673–8677.

Kakarougkas, A., and Jeggo, P.A. (2014). DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br. J. Radiol.* *87*, 20130685.

Kane, A., Deenick, E.K., Ma, C.S., Cook, M.C., Uzel, G., and Tangye, S.G. (2014). STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Curr. Opin. Immunol.* *28*, 49–57.

Kang, S.-H., Yu, M.O., Park, K.-J., Chi, S.-G., Park, D.-H., and Chung, Y.-G. (2010). Activated STAT3 regulates hypoxia-induced angiogenesis and cell migration in human glioblastoma. *Neurosurgery* *67*, 1386–1395; discussion 1395.

Kannan, K., Inagaki, A., Silber, J., Gorovets, D., Zhang, J., Kastenhuber, E.R., Heguy, A., Petrini, J.H., Chan, T.A., and Huse, J.T. (2012). Whole exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget* *3*, 1194–1203.

Kaza, N., Kohli, L., and Roth, K.A. (2012). Autophagy in Brain Tumors: A New Target for Therapeutic Intervention. *Brain Pathol.* *22*, 89–98.

Kesanakurti, D., Chetty, C., Maddirela, D.R., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2013). Essential Role of Cooperative NF-?B and Stat3 Recruitment to ICAM-1 Intronic Consensus Elements in the Regulation of Radiation-induced Invasion and Migration in Glioma. *Oncogene* *32*.

Killela, P.J., Reitman, Z.J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L.A., Friedman, A.H., Friedman, H., Gallia, G.L., Giovanella, B.C., et al. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 6021–6026.

Killela, P.J., Pirozzi, C.J., Healy, P., Reitman, Z.J., Lipp, E., Rasheed, B.A., Yang, R., Diplas, B.H., Wang, Z., Greer, P.K., et al. (2014). Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget* 5, 1515–1525.

Kim, H., Huang, W., Jiang, X., Pennicooke, B., Park, P.J., and Johnson, M.D. (2010). Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2183–2188.

Kim, J.E., Patel, M., Ruzevick, J., Jackson, C.M., and Lim, M. (2014). STAT3 Activation in Glioblastoma: Biochemical and Therapeutic Implications. *Cancers* 6, 376–395.

Kim, T.-M., Huang, W., Park, R., Park, P.J., and Johnson, M.D. (2011). A Developmental Taxonomy of Glioblastoma Defined and Maintained By MicroRNAs. *Cancer Res.* 71, 3387–3399.

Kim, T.-Y., Zhong, S., Fields, C.R., Kim, J.H., and Robertson, K.D. (2006). Epigenomic Profiling Reveals Novel and Frequent Targets of Aberrant DNA Methylation-Mediated Silencing in Malignant Glioma. *Cancer Res.* 66, 7490–7501.

Kirson, E.D., Schneiderman, R.S., Dbaly, V., Tovarys, F., Vymazal, J., Itzhaki, A., Mordechovich, D., Gurvich, Z., Shmueli, E., Goldsher, D., et al. (2009). Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjuvant alternating electric fields (TTFields). *BMC Med. Phys.* 9, 1.

Koivunen, P., Lee, S., Duncan, C.G., Lopez, G., Lu, G., Ramkissoon, S., Losman, J.A., Joensuu, P., Bergmann, U., Gross, S., et al. (2012). Transformation by the R Enantiomer of 2-Hydroxyglutarate Linked to EglN Activation. *Nature* 483, 484–488.

Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22, 5897–5906.

Labussière, M., Idbaih, A., Wang, X.-W., Marie, Y., Boisselier, B., Falet, C., Paris, S., Laffaire, J., Carpentier, C., Crinière, E., et al. (2010). All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology* 74, 1886–1890.

Lahiri, S., and Futerman, A.H. (2007). The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2270–2284.

Lavecchia, A., Di Giovanni, C., and Novellino, E. (2011). STAT-3 inhibitors: state of the art and new horizons for cancer treatment. *Curr. Med. Chem.* 18, 2359–2375.

Lee, S.W., Fraass, B.A., Marsh, L.H., Herbort, K., Gebarski, S.S., Martel, M.K., Radany, E.H., Lichter, A.S., and Sandler, H.M. (1999). Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *Int. J. Radiat. Oncol.* 43, 79–88.

Levine, B. (2007). Cell biology: Autophagy and cancer. *Nature* 446, 745–747.

- Lewandowska, M.A., Furtak, J., Szylberg, T., Roszkowski, K., Windorbska, W., Rytlewska, J., and Jozwicki, W. (2014). An Analysis of the Prognostic Value of IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase 1) Mutation in Polish Glioma Patients. *Mol. Diagn. Ther.* *18*, 45–53.
- Ligon, K.L., Alberta, J.A., Kho, A.T., Weiss, J., Kwaan, M.R., Nutt, C.L., Louis, D.N., Stiles, C.D., and Rowitch, D.H. (2004). The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *63*, 499–509.
- Linos, E., Raine, T., Alonso, A., and Michaud, D. (2007). Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* *99*, 1544–1550.
- Liu, X., Wu, G., Shan, Y., Hartmann, C., von Deimling, A., and Xing, M. (2013). Highly prevalent TERT promoter mutations in bladder cancer and glioblastoma. *Cell Cycle* *12*, 1637–1638.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *114*, 97–109.
- Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., et al. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* *483*, 474–478.
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M.F., Cerrato, C., Setién, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Gitt, A., et al. (2007). Genetic Unmasking of an Epigenetically Silenced microRNA in Human Cancer Cells. *Cancer Res.* *67*, 1424–1429.
- Lukiw, W.J., Cui, J.G., Li, Y.Y., and Culicchia, F. (2009). Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). *J. Neurooncol.* *91*, 27–32.
- M**aintz, D., Fiedler, K., Koopmann, J., Rollbrocker, B., Nechev, S., Lenartz, D., Stangl, A., Louis, D., Schramm, J., Wiestler, O., et al. (1997). Molecular Genetic Evidence for Subtypes of Oligoastrocytomas. *J. Neuropathol.* *56*, 1098–1104.
- Malmström, A., Grønberg, B.H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., Abacioglu, U., Tavelin, B., Lhermitte, B., Hegi, M.E., et al. (2012). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 916–926.
- Mandelzweig, L., Novikov, I., and Sadetzki, S. (2009). Smoking and risk of glioma: a meta-analysis. *Cancer Causes Control CCC* *20*, 1927–1938.
- Marková, E., Schultz, N., and Belyaev, I.Y. (2007). Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int. J. Radiat. Biol.* *83*, 319–329.
- Minder, C.E., and Pfluger, D.H. (2001). Leukemia, Brain Tumors, and Exposure to Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields in Swiss Railway Employees. *Am. J. Epidemiol.* *153*, 825–835.

Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., Pasic, S., Stojkovic, O., et al. (2007). Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* *448*, 1058–1062.

Miyakoshi, M., Yamamoto, M., Tanaka, H., and Ogawa, K. (2014). Serine 727 phosphorylation of STAT3: An early change in mouse hepatocarcinogenesis induced by neonatal treatment with diethylnitrosamine. *Mol. Carcinog.* *53*, 67–76.

Mokhtari, K., Ducray, F., Kros, J.M., Gorlia, T., Idbaih, A., Taphoorn, M., Wesseling, P., Hoang-Xuan, K., Van den Bent, M., and Sanson, M. (2011). Alpha-internexin expression predicts outcome in anaplastic oligodendroglial tumors and may positively impact the efficacy of chemotherapy. *Cancer* *117*, 3014–3026.

Morest, D.K., and Silver, J. (2003). Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: What are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* *43*, 6–18.

De Murcia, G., and Ménilssier de Murcia, J. (1994). Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.* *19*, 172–176.

Mustafa, D., Swagemakers, S., French, P., Luider, T.M., van der Spek, P., Kremer, A., and Kros, J.M. (2013). Structural and Expression Differences Between the Vasculature of Pilocytic Astrocytomas and Glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *72*, 1171–1181.

Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C → A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* *22*, 1715–1719.

Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* *15*, 6002–6007.

Northrup, H., Koenig, M.K., and Au, K.-S. (1993). Tuberous Sclerosis Complex. In GeneReviews®, R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.-T. Fong, R.J. Smith, and K. Stephens, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle),.

Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al. (2010). Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* *17*, 510–522.

Oh, J., Sahgal, A., Sanghera, P., Tsao, M., Davey, P., Lam, K., Symons, S., Aviv, R., and Perry, J. (2011). Glioblastoma: Patterns of Recurrence and Efficacy of Salvage Treatments. *Can. J. Neurol. Sci.* *38*, 621–625.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N.E., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2013). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro-Oncol.* *15*, ii1–ii56.

Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review.

Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A., and Kosik, K.S. (2008). MicroRNA-21 Targets a Network of Key Tumor-Suppressive Pathways in Glioblastoma Cells. *Cancer Res.* *68*, 8164–8172.

Patel, M., Vogelbaum, M.A., Barnett, G.H., Jalali, R., and Ahluwalia, M.S. (2012). Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. *Expert Opin. Investig. Drugs* *21*, 1247–1266.

Paz, M.F., Yaya-Tur, R., Rojas-Marcos, I., Reynes, G., Pollan, M., Aguirre-Cruz, L., García-Lopez, J.L., Piquer, J., Safont, M.-J., Balaña, C., et al. (2004). CpG Island Hypermethylation of the DNA Repair Enzyme Methyltransferase Predicts Response to Temozolomide in Primary Gliomas. *Clin. Cancer Res.* *10*, 4933–4938.

Pegg, A.E., and Byers, T.L. (1992). Repair of DNA containing O₆-alkylguanine. *FASEB J.* *6*, 2302–2310.

Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* *15*, 289–302.

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* *9*, 157–173.

Praveen, K., and Saxena, N. (2013). Crosstalk between Fas and JNK determines lymphocyte apoptosis after ionizing radiation. *Radiat. Res.* *179*, 725–736.

Preston, D.L., Ron, E., Yonehara, S., Kobuke, T., Fujii, H., Kishikawa, M., Tokunaga, M., Tokuoka, S., and Mabuchi, K. (2002). Tumors of the Nervous System and Pituitary Gland Associated With Atomic Bomb Radiation Exposure. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 1555–1563.

Provost, D., Cantagrel, A., Lebailly, P., Jaffré, A., Loyant, V., Loiseau, H., Vital, A., Brochard, P., and Baldi, I. (2007). Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occup. Environ. Med.* *64*, 509–514.

Qin, H.R., Kim, H.-J., Kim, J.-Y., Hurt, E.M., Klarmann, G.J., Kawasaki, B.T., Serrat, M.A.D., and Farrar, W.L. (2008). Activation of Stat3 through a Phosphomimetic Serine727 Promotes Prostate Tumorigenesis Independent of Tyrosine705 phosphorylation. *Cancer Res.* *68*, 7736–7741.

Rathi, K.R., Radotra, B.D., and Khosla, V.K. (2007). Proliferative index in astrocytic tumours. *Indian J. Pathol. Microbiol.* *50*, 754–758.

Rhayem, Y., Thérond, P., Camont, L., Couturier, M., Beaudeux, J.-L., Legrand, A., Jore, D., Gardés-Albert, M., and Bonnefont-Rousselot, D. (2008). Chain-breaking activity of resveratrol and piceatannol in a linoleate micellar model. *Chem. Phys. Lipids* *155*, 48–56.

Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., et al. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* *468*, 824–828.

Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 897–907.

Robertson, L.B., Armstrong, G.N., Olver, B.D., Lloyd, A.L., Shete, S., Lau, C., Claus, E.B., Barnholtz-Sloan, J., Lai, R., Il'yasova, D., et al. (2010). Survey of familial glioma and role of germline p16INK4A/p14ARF and p53 mutation. *Fam. Cancer* *9*, 413–421.

Rohle, D., Popovici-Muller, J., Palaskas, N., Turcan, S., Grommes, C., Campos, C., Tsoi, J., Clark, O., Oldrini, B., Komisopoulou, E., et al. (2013). An Inhibitor of Mutant IDH1 Delays Growth and Promotes Differentiation of Glioma Cells. *Science* *340*, 626–630.

Roth, P., Wischhusen, J., Happold, C., Chandran, P.A., Hofer, S., Eisele, G., Weller, M., and Keller, A. (2011). A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *J. Neurochem.* *118*, 449–457.

Rothenberg, E., Grimme, J.M., Spies, M., and Ha, T. (2008). Human Rad52-mediated homology search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping nucleoprotein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20274–20279.

Rousseau, A., Nutt, C.L., Betensky, R.A., Iafrate, A.J., Han, M., Ligon, K.L., Rowitch, D.H., and Louis, D.N. (2006). Expression of oligodendroglial and astrocytic lineage markers in diffuse gliomas: use of YKL-40, ApoE, ASCL1, and NKX2-2. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *65*, 1149–1156.

Ruvolo, P.P. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol. Res.* *47*, 383–392.

Sadighi, Z., and Slopis, J. (2013). Pilocytic astrocytoma: a disease with evolving molecular heterogeneity. *J. Child Neurol.* *28*, 625–632.

Sahm, F., Reuss, D., Koelsche, C., Capper, D., Schittenhelm, J., Heim, S., Jones, D.T.W., Pfister, S.M., Herold-Mende, C., Wick, W., et al. (2014). Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendrogloma or astrocytoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *128*, 551–559.

Salter, M.W., and Beggs, S. (2014). Sublime Microglia: Expanding Roles for the Guardians of the CNS. *Cell* *158*, 15–24.

Salvati, M., D'Elia, A., Melone, G.A., Brogna, C., Frati, A., Raco, A., and Delfini, R. (2008). Radio-induced gliomas: 20-year experience and critical review of the pathology. *J. Neurooncol.* *89*, 169–177.

Sampson, J.H., Archer, G.E., Mitchell, D.A., Heimberger, A.B., Herndon, J.E., Lally-Goss, D., McGehee-Norman, S., Paolino, A., Reardon, D.A., Friedman, A.H., et al. (2009). An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 2773–2779.

Sampson, J.H., Heimberger, A.B., Archer, G.E., Aldape, K.D., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Gilbert, M.R., Herndon, J.E., McLendon, R.E., Mitchell, D.A., et al. (2010). Immunologic Escape After Prolonged Progression-Free Survival With Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Peptide Vaccination in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* *28*, 4722–4729.

Sampson, J.H., Aldape, K.D., Archer, G.E., Coan, A., Desjardins, A., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Gilbert, M.R., Herndon, J.E., McLendon, R.E., et al. (2011). Greater chemotherapy-induced lymphopenia enhances tumor-specific immune responses that eliminate EGFRvIII-expressing tumor cells in patients with glioblastoma. *Neuro-Oncol.* *13*, 324–333.

Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., Hallani, S.E., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., et al. (2009). Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *J. Clin. Oncol.* *27*, 4150–4154.

Sanson, M., Hosking, F.J., Shete, S., Zelenika, D., Dobbins, S.E., Ma, Y., Enciso-Mora, V., Idbaih, A., Delattre, J.-Y., Hoang-Xuan, K., et al. (2011). Chromosome 7p11.2 (EGFR) variation influences glioma risk. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 2897–2904.

Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., and Tanaka, M. (2000). Radiation-Induced Centrosome Overduplication and Multiple Mitotic Spindles in Human Tumor Cells. *Exp. Cell Res.* *255*, 321–326.

Scheurer, M.E., El-Zein, R., Thompson, P.A., Aldape, K.D., Levin, V.A., Gilbert, M.R., Weinberg, J.S., and Bondy, M.L. (2008). Long-term anti-inflammatory and antihistamine medication use and adult glioma risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *17*, 1277–1281.

Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, C., Schmieder, K., Wesseling, P., Mawrin, C., Hasselblatt, M., et al. (2011). Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *121*, 397–405.

Schlehofer, B., Blettner, M., Becker, N., Martinsohn, C., and Wahrendorf, J. (1992). Medical risk factors and the development of brain tumors. *Cancer* *69*, 2541–2547.

Schmidt-Ullrich, R.K., Valerie, K., Fogelman, P.B., and Walters, J. (1996). Radiation-induced autophosphorylation of epidermal growth factor receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells. *Radiat. Res.* *145*, 81–85.

Schmitt, C.A. (2007). Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1775*, 5–20.

Schneider, K., Zelley, K., Nichols, K.E., and Garber, J. (1993). Li-Fraumeni Syndrome. In GeneReviews®, R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.-T. Fong, R.J. Smith, and K. Stephens, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle),.

- Schraufstatter, I.U., Hinshaw, D.B., Hyslop, P.A., Spragg, R.G., and Cochrane, C.G. (1986). Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.* *77*, 1312–1320.
- Schwartzbaum, J.A., Xiao, Y., Liu, Y., Tsavachidis, S., Berger, M.S., Bondy, M.L., Chang, J.S., Chang, S.M., Decker, P.A., Ding, B., et al. (2010). Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk. *Carcinogenesis* *31*, 1770–1777.
- Scully, R., and Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat. Res.* *750*.
- Shiloh, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 71–77.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 155–168.
- Simon, M., Hosking, F.J., Marie, Y., Gousias, K., Boisselier, B., Carpentier, C., Schramm, J., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., Idaih, A., et al. (2010). Genetic risk profiles identify different molecular etiologies for glioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 5252–5259.
- Singh, D., Chan, J.M., Zoppoli, P., Niola, F., Sullivan, R., Castano, A., Liu, E.M., Reichel, J., Porroati, P., Pellegatta, S., et al. (2012). Transforming Fusions of FGFR and TACC Genes in Human Glioblastoma. *Science* *337*, 1231–1235.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res.* *63*, 5821–5828.
- Soffietti, R., Trevisan, E., and Rudà, R. (2014). What have we learned from trials on antiangiogenic agents in glioblastoma? *Expert Rev. Neurother.* *14*, 1–3.
- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.-P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* *26*, 7780–7791.
- Soussi, T., and Béroud, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* *1*, 233–239.
- Srinivasan, S., Patric, I.R.P., and Somasundaram, K. (2011). A Ten-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Glioblastoma. *PLoS ONE* *6*.
- Stacey, S.N., Sulem, P., Jonasdottir, A., Masson, G., Gudmundsson, J., Gudbjartsson, D.F., Magnusson, O.T., Gudjonsson, S.A., Sigurgeirsson, B., Thorisdottir, K., et al. (2011). A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat. Genet.* *43*, 1098–1103.
- Steward-Tharp, S.M., Laurence, A., Kanno, Y., Kotlyar, A., Villarino, A.V., Sciume, G., Kuchen, S., Resch, W., Wohlfert, E.A., Jiang, K., et al. (2014). A mouse model of HIES reveals pro- and anti-inflammatory functions of STAT3. *Blood* *123*, 2978–2987.

Stracker, T.H., and Petrini, J.H.J. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 90–103.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.

Stupp, R., Wong, E.T., Kanner, A.A., Steinberg, D., Engelhard, H., Heidecke, V., Kirson, E.D., Taillibert, S., Liebermann, F., Dbalý, V., et al. (2012). NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur. J. Cancer* *48*, 2192–2202.

Suzuki, K., and Yamashita, S. (2014). Radiation-Induced Bystander Response: Mechanism and Clinical Implications. *Adv. Wound Care* *3*, 16–24.

Swerdlow, A.J., Feychtig, M., Green, A.C., Kheifets, L., and Savitz, D.A. (2011). Mobile Phones, Brain Tumors, and the Interphone Study: Where Are We Now? *Environ. Health Perspect.* *119*, 1534–1538.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3801–3804.

Takeuchi, S., and Nawashiro, H. (2011). NFKBIA deletion in glioblastomas. *N. Engl. J. Med.* *365*, 276–277; author reply 277–278.

Tangye, S.G. (2014). The right “Job” for STAT3 mutant mice! *Blood* *123*, 2907–2909.

Tchirkov, A., Rolhion, C., Bertrand, S., Dore, J.-F., Dubost, J.-J., and Verrelle, P. (2001). IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *Br. J. Cancer* *85*, 518–522.

Tchirkov, A., Khalil, T., Chautard, E., Mokhtari, K., Veronese, L., Irthum, B., Vago, P., Kemeny, J.-L., and Verrelle, P. (2007). Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. *Br. J. Cancer* *96*, 474–476.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 442–454.

Thomas, L., Di Stefano, A.L., and Ducray, F. (2013). Predictive biomarkers in adult gliomas: the present and the future. *Curr. Opin. Oncol.* *25*, 689–694.

Tubiana, M, 2008. *Radiobiologie* (ed. Hermann/Médecine), pp.1-502.

Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L.A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A.W.M., Lu, C., Ward, P.S., et al. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* *483*, 479–483.

Vallières, L., and Rivest, S. (2000). L'interleukine-6 dans le système nerveux central. *Médecine/sciences* *16*, 936.

Vasen, H. f. a., Gruis, N. a., Frants, R. r., van der Velden, P. a., Hille, E. t. m., and Bergman, W. (2000). Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int. J. Cancer* *87*, 809–811.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* *17*, 98–110.

Verrelle, P., and Bourhis, J. (1997). [Modulation of cellular response to ionizing radiation: towards new molecular targets?]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* *1*, 484–493.

Villalva, C., Martin-Lannerée, S., Cortes, U., Dkhissi, F., Wager, M., Le Corf, A., Tourani, J.-M., Dusanter-Fourt, I., Turhan, A.G., and Karayan-Tapon, L. (2011). STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas: A potential for targeted therapy? *Int. J. Cancer* *128*, 826–838.

Vit, J.-P., and Rosselli, F. (2003). Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* *22*, 8645–8652.

Vogazianou, A.P., Chan, R., Backlund, L.M., Pearson, D.M., Liu, L., Langford, C.F., Gregory, S.G., Collins, V.P., and Ichimura, K. (2010). Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. *Neuro-Oncol.* *12*, 664–678.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science* *339*, 1546–1558.

Vos, M.D., Hayward, B.E., Charlton, R., Taylor, G.R., Glaser, A.W., Picton, S., Cole, T.R., Maher, E.R., McKeown, C.M.E., Mann, J.R., et al. (2006). PMS2 Mutations in Childhood Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *98*, 358–361.

Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., Marcello, J., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., et al. (2007). Bevacizumab Plus Irinotecan in Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Clin. Oncol.* *25*, 4722–4729.

Walsh, L., Zhang, W., Shore, R.E., Auvinen, A., Laurier, D., Wakeford, R., Jacob, P., Gent, N., Anspaugh, L.R., Schüz, J., et al. (2014). A Framework for Estimating Radiation-Related Cancer Risks in Japan from the 2011 Fukushima Nuclear Accident. *Radiat. Res.*

Wang, H., and Diepgen, T.L. (2005). Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy* *60*, 1098–1111.

Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* *468*, 829–833.

Ward, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *35*, 95–125.

Ward, J.F. (1995). Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat. Res.* *142*, 362–368.

Watanabe, T., Katayama, Y., Komine, C., Yoshino, A., Ogino, A., Ohta, T., and Fukushima, T. (2005). O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. *Int. J. Cancer* *113*, 581–587.

Weaver, A.M., and Silva, C.M. (2007). Signal transducer and activator of transcription 5b: a new target of breast tumor kinase/protein tyrosine kinase 6. *Breast Cancer Res. BCR* *9*, R79.

Weller, M. (2011). Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma. *Swiss Med. Wkly.*

Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J.P., Sabel, M., et al. (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 707–715.

Van Wijngaarden, E., and Dosemeci, M. (2006). Brain cancer mortality and potential occupational exposure to lead: findings from the National Longitudinal Mortality Study, 1979–1989. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *119*, 1136–1144.

Wrensch, M., Weinberg, A., Wiencke, J., Miike, R., Sison, J., Wiemels, J., Barger, G., DeLorenze, G., Aldape, K., and Kelsey, K. (2005). History of chickenpox and shingles and prevalence of antibodies to varicella-zoster virus and three other herpesviruses among adults with glioma and controls. *Am. J. Epidemiol.* *161*, 929–938.

Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. (2009). IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* *360*, 765–773.

Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H.E., and Duerksen-Hughes, P.J. (2003). ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* *24*, 1571–1580.

Yang, J.-Y., Xia, W., and Hu, M.C.-T. (2006). Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis. *Int. J. Oncol.* *29*, 643–648.

Yin, A., Cheng, J., Zhang, X., and Liu, B. (2013). The treatment of glioblastomas: A systematic update on clinical Phase III trials. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *87*, 265–282.

Yip, S., Butterfield, Y.S., Morozova, O., Chittaranjan, S., Blough, M.D., An, J., Birol, I., Chesnelong, C., Chiu, R., Chuah, E., et al. (2012). Concurrent CIC mutations, IDH mutations and 1p/19q loss distinguish oligodendrogiomas from other cancers. *J. Pathol.* *226*, 7–16.

Yu, H., and Jove, R. (2004). The STATs of cancer — new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 97–105.

Yuan, X., Du, J., Hua, S., Zhang, H., Gu, C., Wang, J., Yang, L., Huang, J., Yu, J., and Liu, F. Suppression of autophagy augments the radiosensitizing effects of STAT3 inhibition on human glioma cells. *Exp. Cell Res.*

Zhang, Y., Zhang, N., Dai, B., Liu, M., Sawaya, R., Xie, K., and Huang, S. (2008). FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells. *Cancer Res.* *68*, 8733–8742.

Zhang, Y., Dutta, A., and Abounader, R. (2012). The role of microRNAs in glioma initiation and progression. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *17*, 700–712.

Zhou, X., Ren, Y., Moore, L., Mei, M., You, Y., Xu, P., Wang, B., Wang, G., Jia, Z., Pu, P., et al. (2010). Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab. Invest.* *90*, 144–155.

Zou, Y.-M., Hu, G.-Y., Zhao, X.-Q., Lu, T., Zhu, F., Yu, S.-Y., and Xiong, H. (2014). Hypoxia-induced autophagy contributes to radioresistance via c-Jun-mediated Beclin1 expression in lung cancer cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* *34*, 761–767.