



HAL
open science

Mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité neurovasculaire des cellules souches de glioblastome

Sophie Guelfi

► **To cite this version:**

Sophie Guelfi. Mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité neurovasculaire des cellules souches de glioblastome. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT078 . tel-01558240

HAL Id: tel-01558240

<https://theses.hal.science/tel-01558240>

Submitted on 7 Jul 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Biologiques et Chimiques pour la Santé (ED168)

Et de l'unité de recherche **INSERM U1051**

Spécialité : **Biologie Santé**

Présentée par **Sophie Guelfi**

**MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS
LA PLASTICITE NEUROVASCULAIRE DES
CELLULES SOUCHES DE GLIOBLASTOME**

Soutenue le 5 Décembre 2016 devant le jury composé de

Mme Danièle Mathieu, DR2, CNRS UMR5535, Montpellier	Présidente du Jury
Mme Dominique Figarella-Branger, PU-PH, INSERM U911, Marseille	Rapporteur
M. Thierry Virolle, DR2, INSERM U1091, Nice	Rapporteur
Mme Emmanuelle Huillard, CR1, CNRS UMR7225, Paris	Examineur
M. Bernard Rothhut, CR1, INSERM U1051, Montpellier	Co-directeur de Thèse
M. Jean-Philippe Hugnot, MCU, INSERM U1051, Montpellier	Directeur de Thèse



A Catherine, Pierre et Natalie,

Merci pour tout

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance envers les membres du jury : Mme Figarella-Branger, Mr Virolle, Mme Mathieu et Mme Huillard. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'avoir pris le temps d'analyser ce travail.

Je remercie chaleureusement Jean-Philippe Hugnot et Bernard Rothhut pour leur encadrement et leurs conseils durant ces quatre années de doctorat.

Je pense également à l'équipe de praticiens hospitaliers du CHU Gui de Chauliac : Dr. Duffau, Dr. Bauchet, et Dr. Rigau. Merci pour votre collaboration précieuse sans laquelle ce travail n'aurait pu être réalisé.

Aux associations qui financent la recherche, notamment la Ligue Contre le Cancer et l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales : Merci pour votre soutien financier au cours de ces travaux, et plus généralement pour votre contribution à faire avancer la recherche médicale.

Je tiens également à remercier les chercheurs qui ont suivi d'un œil extérieur et critique l'avancée de ces travaux, notamment les membres de mon comité de thèse, Julie Pannequin et Pierre Savagner.

J'ai aussi une pensée particulière pour mes encadrants de stage de Master, Philip Howe et Frédéric Hollande, qui m'ont donné l'envie de poursuivre une carrière dans la recherche, et tout particulièrement dans le domaine de l'oncologie.

Pour leur collaboration, leur expertise technique et leur disponibilité, un grand merci à Béatrice Orsetti, Virginie Deleuze, Frédéric Lionneton, Christophe Duperray et Emilie Lopez.

Je remercie également tous les chercheurs, ingénieurs, techniciens, thésards, stagiaires et administratifs de l'INM qui ont pu m'aider de près ou de loin dans l'avancement de ce projet et dans mon intégration au sein de l'unité U1051. Je pense notamment à Lucie, Alicia, Gautier, et Camille.

Merci à tous les membres passés et actuels de l'Equipe 4, le groupe des neurosphères. Je pense tout particulièrement à mes compagnons de paillasse, Ali, Safa, Soumaya, Hussein, Sarah, Emilie ; et aux bons moments passés ensemble en salle de culture ou autour d'un plateau savoureux du Resto U de Boutonnet.

Je remercie sincèrement Nicolas pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience et surtout son écoute. J'admire ton courage et ta volonté à toute épreuve et je te souhaite tout le meilleur pour le futur.

Un grand merci aux ingénieurs hors pair Philippe et Aurélie, qui ont été cruciaux à l'avancée des manip sur ce projet. Philippe, merci pour ta disponibilité et ton dévouement au cours de ces derniers mois.

Je tiens aussi à remercier de tout coeur Christine, Chantal, Zahra et Dasha pour leurs conseils précieux et leurs encouragements dans les moments difficiles. Zahra et Dasha, merci aussi pour les bons repas pris le midi au Fontenoy.

A Willy, mon voisin de bureau et collègue représentant des PostDocs, merci pour ta bonne humeur, ton franc parler, nos karaokés dans la grande salle de réunion, et nos bons moments partagés au Casino en faisant les courses pour les meetings PhD/PostDocs.

Je remercie sincèrement Pierre-Olivier, pour son travail qui a posé les bases du mien, pour sa disponibilité et son aide même à distance, et pour notre entraide mutuelle dans la concrétisation des projets liés à l'étude des glioblastomes.

Une pensée très particulière pour Marisa :

Pour ton soutien, tes encouragements, ta grande sagesse et ton humanité sans égal. J'ai adoré nos échanges scientifiques riches, nos moments passés en bas avec les souris : merci pour tout ce que tu m'as appris. Ta présence m'a beaucoup manqué pour finir ce travail.

A tous mes proches et amis :

Loic, Benoit, Romain, Olivier, Marion, Sophie, Lionel, Julien et Chloé ; mille mercis pour les bons moments passés avec vous.

Isabelle, je suis vraiment heureuse d'avoir pu faire ta connaissance à l'INM. De cette rencontre est née une belle amitié, et je te remercie pour ta bonne humeur, ton sourire et ton écoute, qui m'ont redonné le moral dans les moments difficiles. Nos délires complètement fous feront partie des meilleurs souvenirs associés à ces quatre ans de thèse. J'espère que l'on continuera encore longtemps à dire n'importe quoi, et surtout que l'on partagera d'autres moments forts ensemble.

Jennifer, mon acolyte de la fac durant tout mon cursus universitaire. J'ai adoré partager avec toi cette expérience de doctorat. Merci pour nos échanges scientifiques autour d'une bonne pinte au Black Sheep, tu m'as permis d'avancer dans mon travail et de me poser les bonnes questions. Mais je pense surtout à nos moments partagés en dehors, nos voyages, nos goûts communs, les barbecues chez tes parents, les sessions photos et d'autres moments inoubliables.

Laure, Marine, Elise et Violaine, mes amies de très longue date. Vous m'avez accompagnée durant ces quatre ans et je ne l'oublierai pas. Laure, merci pour ta positivité et ta présence durant la rédaction de ce mémoire. J'espère pouvoir t'apporter en retour le même soutien.

Enfin, un immense merci à toute ma famille :

Claude, Colette, Tom, Glen, Scott, Philippe, Christine, Carly, Noelle, Nick, Dylan, Ian, Julia, Maureen et Michael.

A mes grands-parents, j'espère que vous serez fiers.

Natalie, merci pour ta présence, et tes encouragements.

Je ne pourrai jamais assez remercier mes parents :

Pour leur soutien et encouragements dans mes différents projets, notamment l'entreprise de ce doctorat.

Pour leur présence et réconfort, surtout durant la rédaction de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

Liste des Abréviations	12
Liste des Figures.....	14
Liste des Tableaux.....	16
Avant-propos	17
Introduction	21
Chapitre I.....	23
Mise en place et homéostasie de l'unité neurovasculaire dans le système nerveux central	23
A. Composants cellulaires de l'unité neurovasculaire.....	23
1. Généralités	23
a. Le système nerveux central (SNC).....	23
b. Le système vasculaire.....	23
c. Vascolarisation du cerveau	24
2. Les cellules neurales	24
a. Les neurones.....	24
b. Les cellules gliales	24
3. Les cellules vasculaires et la BHE	26
a. Topographie de la barrière hémato-encéphalique	26
b. Les cellules endothéliales	28
c. Les cellules périvasculaires et les péricytes.....	28
d. Spécificités de la barrière hémato-encéphalique	29
B. Spécification des cellules neurales et vasculaires au cours de l'embryogénèse	30
1. Principes de la spécification des cellules souches	30
a. Propriétés des cellules souches.....	30
b. Le déterminisme cellulaire.....	30
c. Régulation transcriptionnelle de l'identité cellulaire	31
2. Spécification des cellules souches neurales embryonnaires.....	31
a. Spécification des cellules neuroépithéliales dans la zone ventriculaire	31
b. Les facteurs de transcription bHLH.....	32
c. Les gènes proneuraux.....	33
d. L'oligodendrogénèse.....	33
e. L'astrogénèse	35
f. Les multiples fonctions des bHLH.....	35
3. Spécification vasculaire dans le SNC et établissement de l'unité neurovasculaire ..	36
a. Vasculogénèse et spécification artério-veineuse	36
b. Angiogénèse du SNC embryonnaire.....	38
c. Origine et spécification des péricytes	39

4.	La niche neurovasculaire embryonnaire.....	41
C.	Homéostasie de la niche neurovasculaire adulte.....	42
1.	Les cellules souches neurales adultes.....	42
2.	La niche neurogénique de la zone sous-ventriculaire.....	44
D.	Intégrité de l'unité neurovasculaire et remodelage de la BHE.....	46
1.	Dialogue moléculaire entre cellules endothéliales et péricytes.....	46
2.	Remodelage des vaisseaux et cellules souches vasculaires.....	47
a.	Les progéniteurs endothéliaux adultes ou EPC.....	48
b.	La transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT).....	48
c.	Multipotence des cellules murales.....	48
E.	La plasticité neurovasculaire.....	49
1.	Plasticité des cellules neurales vers le lignage vasculaire.....	49
2.	Plasticité des cellules vasculaires vers le lignage neural.....	50
3.	Perspectives de ces études.....	51
	Chapitre II : Gliomes, Glioblastome Multiforme et Néovascularisation.....	53
A.	Les Gliomes.....	53
1.	Définitions et épidémiologie.....	53
2.	Classification histopathologique des gliomes.....	53
a.	Historique.....	53
b.	Classification de l'OMS, 4 ^{ème} édition de 2007.....	54
c.	Changements apportés par la mise à jour de 2016).....	55
d.	Limites de la classification de l'OMS.....	57
3.	Etiologie des gliomes.....	58
a.	Susceptibilité génétique.....	58
b.	Facteurs extrinsèques.....	58
4.	Prise en charge médicale des gliomes.....	59
a.	Diagnostic.....	59
b.	Stratégies thérapeutiques conventionnelles.....	60
c.	Médiane de survie.....	61
B.	Le Glioblastome Multiforme.....	61
1.	Caractéristiques anatomopathologiques.....	61
2.	Altérations moléculaires dans les glioblastomes.....	63
a.	Principales dérégulations génétiques des glioblastomes.....	63
b.	Les mutations IDH1 et IDH2.....	65
c.	Modifications épigénétiques.....	66
3.	Classifications moléculaires des glioblastomes.....	67
4.	Origine cellulaire des glioblastomes.....	70
5.	Les cellules souches de glioblastome.....	71
a.	Découverte et controverses.....	71
b.	Isolement et identification.....	72
c.	Régulations intrinsèques et extrinsèques des GSC.....	73
d.	Chimio/Radiorésistance.....	74

e. Hétérogénéité des GSC	74
C. Néovascularisation dans les Glioblastomes	75
1. Les niches tumorales et le maintien du réservoir de GSC.....	75
a. La niche périvasculaire	75
b. La niche hypoxique	76
c. La niche invasive.....	77
2. Mécanismes de néovascularisation dans les GBM.....	78
3. Transdifférenciation vasculaire des GSC.....	80
a. La transdifférenciation endothéliale des GSC.....	80
b. La transdifférenciation péricytaire des GSC.....	82
Chapitre III : Voie de Signalisation Notch dans les glioblastomes	85
A. Principes généraux de la signalisation Notch	85
1. Découverte et généralités.....	85
2. Acteurs moléculaires	85
a. Récepteurs Notch.....	85
b. Les ligands	86
c. Signalisation canonique.....	87
d. Gènes cibles	88
e. Signalisation non canonique	89
3. Stratégies expérimentales pour étudier la signalisation Notch	89
a. Modèles murins <i>in vivo</i>	89
b. Outils <i>in vitro</i>	90
4. Modulation de l'activation de Notch	90
a. Endocytose du ligand dans la « cellule signal »	90
b. Régulation en <i>cis/trans</i>	91
c. Interactions avec d'autres signalisations.....	91
d. Diversité complexe des fonctions de Notch	92
B. Signalisation Notch dans l'unité neurovasculaire.....	92
1. Notch et le lignage neural	92
a. Maintenance des NPC/RGC durant la neurogénèse	92
b. Rôle dans la gliogénèse.....	94
2. Notch et le lignage vasculaire	95
a. Spécification artério-veineuse	95
b. Régulation du bourgeonnement angiogénique	96
c. Différenciation des cellules musculaires lisses	97
3. Notch dans la niche neurogénique adulte	98
C. Signalisation Notch dans la gliomagénèse	98
1. Rôle général dans le cancer.....	99
2. Dérégulation des composants de la voie Notch dans les gliomes.....	99
3. Fonction de Notch dans les glioblastomes	100
a. Notch influe sur la prolifération et la tumorigénicité des cellules tumorales.....	100

b. Régulations moléculaires.....	101
c. Notch contrôle la différenciation de progéniteurs tumorigènes putatifs.....	103
d. Notch dans l'écosystème complexe des GBM	104
4. Thérapies anti-Notch et résistance des GSC.....	106
a. Inhibiteurs de γ -sécrétase.....	107
b. Anticorps bloquants.....	108
c. Peptides antagonistes solubles.....	108
d. Autres agents.....	109
Objectifs	111
Resultats.....	117
Partie I.....	119
Transdifférenciation des cellules souches de glioblastome en cellules «péricyte-like» par activation de la signalisation Notch1	119
Résumé de l'étude	121
Publication 1.....	123
Discussion et perspectives.....	153
Partie II.....	155
Contribution moléculaire des facteurs de transcription TAL1 et SLUG à la plasticité neurovasculaire des GSC	155
Contexte.....	157
A. Le facteur de transcription TAL1.....	157
B. Le facteur de transcription SLUG.....	163
Hypothèses et Stratégie	169
Méthodologie.....	171
Résultats	181
Légendes des figures.....	193
Figures 1 à 14	201
Discussion et perspectives.....	215
Partie III.....	227
Modulation de l'activité du protéasome dans les GSC par Notch1.....	227
Contexte.....	229
Hypothèses.....	229
Méthodologie.....	230
Résultats	232
Légende Figure 15	233
Figure 15.....	234
Discussion et perspectives.....	235

Conclusion générale	241
Bibliographie	247
Annexes	273
Publication 2.....	275
Publication 3.....	291
Communication scientifique sur le projet.....	312

LISTE DES ABREVIATIONS

αSMA Alpha smooth muscle actin	FGF Fibroblast growth factor
ADN Acide désoxyribonucléique	FISH Fluorescence in situ hybridization
ARN Acide ribonucléique	GBM Glioblastome multiforme
ARNg Acide ribonucléique guide	GFAP Glial fibrillary astrocytic protein
ARNm Acide ribonucléique messenger	GSC Glioblastoma stem-like cell
ASCL1 Achaete-scute homolog 1	GSI γ-secretase inhibitor
bFGF basic fibroblast growth factor	HIF Hypoxia inducible factor
BHE Barrière hémato-encéphalique	HSC Hematopoietic stem cell
bHLH Basic helix loop helix	HUVEC Human umbilical vein endothelial cell
BMP Bone morphogenic protein	IB Immunoblot
CAF Cancer associated fibroblasts	ICAM1 Intercellular adhesion molecule 1
Cas9 CRISPR associated protein 9	IDH1/2 Isocitrate deshydrogenase 1/2
CDK Cyclin dependent kinase	IF Immunofluorescence
CE Cellule endothéliale	IF-FISH Immunofluorescence combinée au FISH
CMV Cytomégalovirus	IGF Insulin growth factor
CRISPR Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	iHH Indian hedgehog
CSC Cellules souches cancéreuses	iPC ischemic pericyte
DAPI 4',6-diamino-2-phenylindole	iPS Induced pluripotent stem cell
DCX Doublecortin	KO Knock out
EGF Epidermal growth factor	LCR Liquide céphalo-rachidien
EGFR Epidermal growth factor receptor	LMO LIM-domain only
EHT Endothelial to hematopoietic transition	LOH Loss of heterozygotie
EMT Epithelial to mesenchymal transition	Map Microtubule-associated protein
EndMT Endothelial to mesenchymal transition	MDM Mouse double minute
EPC Endothelial progenitor cell	ME Moelle épinière
ES Embryonic stem cell	miARN micro ARN

MMP Matrix metalloproteinase	SV Système vasculaire
MODC Mouse ornithine decarboxylase	SVZ Sub-ventricular zone
MOI Multiplicity of infection	T-ALL T-cell acute lymphoblastic leukemia
MSC Mesenchymal stem cell	TGF Transforming growth factor
NECD Notch extracellular domain	TMZ Temozolomide
NG2 Neural/glial antigen 2	Tubb3 Tubulin beta 3
NHEJ Non homologous end joining	Ub Ubiquitine
NICD Notch IntraCellular Domain	UPS Ubiquitin-Proteasome system
NOS Not otherwise specified	VCAM1 Vascular cell adhesion protein 1
NPC Neural progenitor Cell	VEGF Vascular endothelial growth factor
NSC Neural stem cell	vSMC Vascular smooth muscle cell
NVU Neurovascular unit	vWF Von Willebrand factor
OLIG2 Oligodendrocyte transcription factor 2	VZ Ventricular zone
OMS Organisation mondiale de la santé	WB Western Blot
OPC Oligodendrocyte progenitor cell	YFP Yellow Fluorescent Protein
PAM Protospacer adjacent motif	
PDGF Platelet derived growth factor	
PDL Poly-D-Lysine	
PI3K Phosphatidyl-inositol-3 kinase	
PTEN Phosphatase and TENsin homolog	
RGC Radial glial cells	
RGS5 Regulator of G-protein signaling 5	
SCL Stem cell leukemia	
SGZ Sub-granular zone	
sHH Sonic hedgeHog	
siRNA Small interfering RNA	
SMC Smooth muscle cell	
SNC Système nerveux central	
SOX2 Sex determining region Y-box 2	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Topographie de l'unité neurovasculaire et maintien de la BHE	27
Figure 2 – Les cellules souches au cours du développement du SNC	32
Figure 3 – Fonction des bHLH dans la spécification neurale	33
Figure 4 – La spécification oligodendrocytaire.....	34
Figure 5 - Spécification des angioblastes et spécification artério-veineuse	37
Figure 6 - Angiogénèse cérébrale	39
Figure 7 - Origines embryonnaires des péricytes du SNC.....	40
Figure 8 - Composants moléculaires de la niche neurogénique embryonnaire de la VZ	42
Figure 9 - Localisation et lignage des zones neurogéniques de la SVZ et la SGZ.....	43
Figure 10 - Composants cellulaires de la niche neurogénique adulte de la SVZ.....	44
Figure 11 - Composants moléculaires de la niche neurogénique adulte de la SVZ.....	45
Figure 12 - Interactions moléculaires entre les cellules endothéliales et les péricytes	47
Figure 13 - Modèle de la plasticité neurovasculaire.....	51
Figure 14 - Algorithme pour le diagnostic des gliomes diffus d'après l'OMS (2016).	57
Figure 15 - Imagerie par résonance magnétique d'un glioblastome	60
Figure 16 - Caractéristiques histologiques d'un GBM	63
Figure 17 - Principales altérations moléculaires dans les GBM.....	65
Figure 18 - Les mutations IDH1 et IDH2 dans les gliomes.....	66
Figure 19 - La classification moléculaire de Phillips	67
Figure 20 - La classification moléculaire de Verhaak.....	68
Figure 21 - Hypothèses de l'origine cellulaire des glioblastomes	71
Figure 22 - Propriétés cardinales des GSC	72
Figure 23 - Isolement des GSC à partir de biopsies humaines de GBM	73
Figure 24 – Composants cellulaires de la niche périvasculaire des GBM	76
Figure 25 – Composants cellulaires de la niche hypoxique des GSC.....	77
Figure 26 – Composants cellulaires de la niche invasive des GSC	78
Figure 27 – Mécanismes de néovascularisation dans les GBM	80

Figure 28 – La transdifférenciation vasculaire des GSC au sein de la niche périvasculaire.....	84
Figure 29 – Structure de la famille de récepteurs Notch (1-4).....	86
Figure 30 – Structure des ligands DSL chez les vertébrés, <i>D. Melanogaster</i> et <i>C. Elegans</i>	87
Figure 31 – La voie Notch canonique.....	88
Figure 32 – Régulation en cis/trans de l'activation de NICD.....	91
Figure 33 – Régulation de la voie Notch.....	92
Figure 34 – Mécanisme d'inhibition latérale durant la neurogénèse.....	93
Figure 35 – Rôle de Notch dans l'astrogénèse.....	95
Figure 36 – Spécification artério-veineuse par l'axe VEGF/Dll4/Notch.....	96
Figure 37 – Régulation du bourgeonnement angiogénique par l'axe VEGF/Dll1/Jg1.....	97
Figure 38 – Régulations moléculaires de la signalisation Notch dans les glioblastomes.....	102
Figure 39 – Notch peut agir comme un suppresseur de tumeur dans les gliomes.....	104
Figure 40 – Mécanisme d'inhibition latérale par Notch dans les GSC.....	105
Figure 41 – Fonctions de Notch dans la niche périvasculaire.....	106
Figure 42 – Stratégies thérapeutiques anti-Notch.....	107
Figure 43 - Conséquences de l'activation de Notch1 dans les GSC.....	122
Figure 44 - Analyses complémentaires de l'activation de Notch1 dans les GSC.....	154
Figure 45 - Les différentes isoformes de TAL1.....	158
Figure 46 - Modèles de l'origine des cellules hématopoïétiques et endothéliales.....	159
Figure 47 – Implication de TAL1 (SCL) dans le lignage hématopoïétique.....	160
Figure 48 - TAL1 agit au sein d'un complexe transcriptionnel spécifique.....	161
Figure 49 - Structure de SLUG et Snail.....	164
Figure 50 – De multiples voies de signalisations convergent vers SLUG.....	165
Figure 51 – Comparaison entre l'EMT et l'EndMT.....	167
Figure 52 – Protocole d'Immuno-FISH séquentiel.....	172
Figure 53 - Le système CRISPR-Cas9.....	175
Figure 54 - Carte de restriction du plasmide Proteasome Sensor Vector.....	231

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Classification des gliomes selon l'OMS, 4 ^{ème} édition, 2007	55
Tableau 2 - Classification des gliomes selon l'OMS, mise à jour de 2016.....	56
Tableau 3 – Résultats II - Liste des anticorps utilisés en IF et western blot.....	179
Tableau 4 – Résultats II - Liste des amorçes utilisées en qPCR	180
Tableau 5 – Résultats II - Séquences des ARNg conçus	180
Tableau 6 – Résultats II - Liste des amorçes utilisées pour PCR et séquençage.....	180
Tableau 7 – Résultats II - Gènes candidats co-cultures GSC et HUVECS.....	197
Tableau 8 – Résultats III - Anticorps Utilisés.....	231

AVANT-PROPOS

Le cancer est un problème de santé publique à l'échelle mondiale et constitue la première cause de mortalité en France. Cette pathologie est avant tout une maladie génétique conduisant à la perte de contrôle de la prolifération cellulaire ; et menant à la croissance d'une masse tumorale qui envahit et détruit le tissu sain. Depuis le début du XX^e siècle, la théorie cellulaire du cancer définit les cellules cancéreuses comme intrinsèquement instables du fait d'altérations génétiques acquises en plusieurs étapes. Cette instabilité génomique se traduit principalement par l'activation anormale de réseaux de gènes oncogéniques ; et l'inhibition de programmes suppresseurs de tumeurs.

Dans la plupart des cas, ces réseaux de gènes réactivent des signalisations développementales majeures. Les études de biologie du développement ont d'ailleurs été cruciales à la compréhension d'importants mécanismes de l'oncogénèse. Grâce aux connaissances sur les cellules souches saines, la question de l'origine cellulaire des cancers a pu être posée par de nombreuses études et dans différents contextes tumoraux.

L'hypothèse des cellules souches cancéreuses (CSC) propose un modèle hiérarchique de la croissance tumorale: seule une sous-population tumorale particulière serait capable de proliférer de manière illimitée au sein des tumeurs, et donnerait naissance aux autres cellules de la masse tumorale. Les CSC partagent des propriétés communes aux cellules souches saines et sont définies par des critères stricts. Ces cellules maintiennent l'hétérogénéité intratumorale et assurent la résistance aux thérapies anti-cancéreuses. Le ciblage spécifique de cette sous-population fait donc l'objet de nombreux travaux. Néanmoins, l'isolement et l'identification des CSC posent problème et font l'objet de controverses. La terminologie employée pour désigner ces cellules est également critiquable et sujette à confusion.

La vision initialement centrée sur les cellules tumorales seules a désormais évolué, notamment grâce à la mise en évidence de l'impact du microenvironnement sur la progression tumorale. Il est désormais clairement reconnu que les cellules de l'hôte contribuent activement à la croissance et au développement de la tumeur. Parmi ces contributions, la néovascularisation et la prolifération vasculaire sont des mécanismes physiologiques majeurs détournés et suractivés par les cellules tumorales afin d'assurer leur croissance. Le ciblage spécifique de cette composante vasculaire présente un intérêt considérable en termes de thérapies anti-cancéreuses.

Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes et les plus dévastatrices. Elles sont associées à un pronostic vital extrêmement défavorable, du fait de l'échec des thérapies actuelles. Tout comme d'autres cancers, ces néoplasmes se caractérisent par une extrême instabilité génomique des cellules tumorales, conduisant à l'activation anormale de signalisations développementales. De plus, des populations

multipotentes aux caractéristiques comparables aux CSC ont été identifiées au sein des GBM, et ont été directement impliquées dans la radio/chimiorésistance. La compréhension fondamentale du fonctionnement de ces cellules souches de glioblastome (GSC) constitue l'objectif principal de notre équipe de recherche.

Les GBM comptent parmi les tumeurs solides les plus vascularisées. Plusieurs mécanismes moléculaires complexes assurent cette néovascularisation, et pourraient expliquer l'échec des stratégies anti-angiogéniques. Mes travaux se sont focalisés sur l'implication des GSC dans les mécanismes de néovascularisation, et particulièrement sur leur potentielle plasticité vers le lignage vasculaire.

Dans le cadre de cette introduction, mon propos sera divisé en trois chapitres :

Dans le premier chapitre, je montrerai le lien étroit entre la spécification du lignage neural et la spécification du lignage vasculaire au cours de l'embryogénèse du système nerveux central ; et comment ce lien maintient à la fois l'intégrité vasculaire et l'intégrité des niches neurogéniques chez l'adulte. Je présenterai également les différents travaux démontrant la plasticité neurovasculaire dans ce contexte physiologique.

Dans le deuxième chapitre, j'exposerai de manière synthétique les connaissances sur les gliomes et particulièrement les glioblastomes ; mon propos étant plus centré sur des aspects cellulaires et moléculaires. Je résumerai également les données démontrant l'implication des GSC dans les mécanismes de néovascularisation des GBM, et plus particulièrement leur plasticité vers le lignage vasculaire. Par ailleurs, cette question a fait l'objet d'un article de revue publié récemment (**Annexes, Publication 2**).

Mon étude sur la plasticité neurovasculaire découle directement d'une première étude focalisée sur la fonction de la signalisation Notch1 dans les GSC. Dans le troisième et dernier chapitre, je m'attacherai donc à décrire la fonction de cette signalisation dans le lignage neural, dans le lignage vasculaire, et dans le contexte pathologique des GBM.

INTRODUCTION

Chapitre I

Mise en place et homéostasie de l'unité neurovasculaire dans le système nerveux central

Au cours de l'embryogénèse, la coordination spatio-temporelle étroite entre le lignage neural et le lignage vasculaire permet l'établissement de l'unité neurovasculaire et de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Chez l'adulte, ce lien neurovasculaire maintient la spécificité de la BHE et favorise la neurogénèse au sein des niches neurovasculaires. Dans le contexte des tumeurs gliales, cette homéostasie est fortement perturbée et ce dérèglement favorise la progression tumorale.

A. Composants cellulaires de l'unité neurovasculaire

1. Généralités

a. Le système nerveux central (SNC)

Le système nerveux central (SNC) est un tissu dense ultraspécialisé qui intègre de nombreux stimuli et produit des réponses complexes afin d'assurer les fonctions vitales de l'organisme. Il regroupe l'encéphale (cerveau, tronc cérébral, cervelet) et la moelle épinière, tous deux protégés par des structures osseuses et enfermés dans les méninges. Le cerveau humain est subdivisé en structures fonctionnelles distinctes. Celles-ci sont définies par la régionalisation du tube neural au cours de l'embryogénèse.

b. Le système vasculaire

Le système vasculaire (SV) constitue un circuit fermé et alimenté par une pompe, le cœur. Par la circulation artérielle du sang, ce réseau approvisionne les tissus en oxygène, nutriments et hormones. Via le retour veineux, il assure la détoxification des tissus par acheminement des déchets métaboliques, du dioxyde de carbone et de l'urée. Le système lymphatique constitue une circulation spécifique qui permet le drainage de composés toxiques par la lymphe, et qui assure la surveillance immunitaire à partir des tissus lymphoïdes.

c. Vascularisation du cerveau

Le cerveau est l'organe le plus vascularisé, et consomme notamment 20% des ressources d'oxygène de l'organisme. Son réseau vasculaire spécifique implique plus de 100 milliards de capillaires de longueur totale avoisinant 600km, et d'une surface représentant environ 20m². Cette densité de capillaires est maximale dans le cortex. Pour pallier à cette demande considérable en oxygène et en nutriments, le système circulatoire assure un débit d'irrigation très important, avec environ 600ml de sang déversé par minute (Fagerholm 2007; Goodwin and Clark 2005).

2. Les cellules neurales

A l'échelle microscopique, le SNC est constitué d'un ensemble complexe et hétérogène de cellules formant le tissu neural. Les travaux pionniers de Ramon y Cajal à la fin du XIX^e siècle ont ouvert la voie à l'identification et à la caractérisation précise de ces différents types cellulaires.

a. Les neurones

Les neurones sont des cellules électriquement excitables qui constituent l'unité fonctionnelle de base du SNC. Ces cellules hautement spécialisées reçoivent, intègrent et transmettent l'influx nerveux sous forme de signal électrique (potentiel d'action). Leur morphologie caractéristique comporte un corps cellulaire, des prolongements dendritiques et un axone unique qui propage le potentiel d'action via la communication synaptique avec les dendrites de neurones adjacents. Le cerveau humain serait constitué d'environ 86 milliards de neurones (Williams and Herrup 1988).

b. Les cellules gliales

La glie constitue le tissu de soutien des neurones. Longtemps mise de côté au profit des neurones, elle est désormais reconnue comme essentielle à l'homéostasie neuronale, au maintien de la barrière hémato-encéphalique et à la surveillance immunitaire du SNC (Allen and Barres 2009). La glie est composée de cinq types de cellules gliales :

- Les astrocytes sont des cellules à la morphologie étoilée identifiées comme tel en 1893 par Mihály Lenhossék. Ils ne possèdent pas de signature moléculaire propre et leur identification réside principalement sur leur morphologie et leur interaction avec les neurones. Néanmoins, la détection de la protéine GFAP qui compose leurs filaments intermédiaires ou l'expression de récepteurs membranaires au glutamate permettent de

les discriminer des autres cellules neurales. Leur fonctions sont très diverses et encore très méconnues. Entre autre, ils sont capables de communiquer chimiquement via des vagues calciques ou par des gliotransmetteurs ; ils interviennent dans le remodelage synaptique; ils régulent l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE); et ils participent à la formation de la cicatrice gliale (astroglie).

- Les oligodendrocytes sont des petites cellules à multiples prolongements et ramifications. Dans la substance grise, ils sont retrouvés autour des neurones (satellitose), et assurent leur soutien par la sécrétion de facteurs neurotrophiques. Dans la substance blanche, leurs prolongements autour des axones permettent la formation de la gaine de myéline qui accélère la conduction de l'influx nerveux. Leur identification repose sur l'expression de marqueurs caractéristiques comme le facteur de transcription Olig2, le protéoglycan NG2 ou le récepteur PDGFR α . Dans le système nerveux périphérique, la myélinisation est assurée par les cellules de Schwann.
- les cellules NG2, polydendrocytes ou OPC, représentent une classe de précurseurs d'oligodendrocytes retrouvée de manière homogène dans le cortex. Ces cellules sont capables de proliférer et sont multipotentes. Elles assurent notamment la myélinisation adulte dans la substance blanche, et pourraient jouer un rôle important lors de situations pathologiques (Nishiyama, Suzuki, and Zhu 2014).
- les cellules microgliales représentent les macrophages résidants du SNC et assurent sa principale défense et surveillance immunitaire. Ces cellules mobiles de petite morphologie étoilée et ramifiée dérivent du lignage monocytaire, et sont capables de phagocytose des agents infectieux du cerveau. Elles constitueraient 10 à 15% des cellules du SNC (Lawson, Perry, and Gordon 1992) et présentent différentes morphologies et localisation selon leur état d'activation. Plusieurs études ont récemment démontré l'importance de la microglie dans la réponse immunitaire, la communication extracellulaire, la neuro-inflammation, le vieillissement et les maladies neurodégénératives (Ginhoux et al. 2013).
- Les épendymocytes sont considérés comme les cellules pseudo-épithéliales du SNC : elles recouvrent les cavités internes de l'encéphale, ont une morphologie cuboïde et sont polarisées. Ces cellules assurent un rôle de barrière perméable favorisant les échanges entre le parenchyme cérébral et le liquide céphalo-rachidien (LCR).

3. Les cellules vasculaires et la BHE

L'endothélium constitue la paroi des réseaux artériels et veineux. Il assure un rôle de barrière plus ou moins sélective à différents composés biochimiques, mais permet aussi l'extravasation de cellules hématopoiétiques comme les leucocytes. Il régule la coagulation sanguine (thrombose), la vasomotricité et la pression sanguine. Ce tissu est constamment renouvelé et remodelé, aussi bien durant l'embryogénèse que durant la vie post-natale.

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est l'endothélium hautement spécialisé du SNC. Elle est essentielle à la protection du cerveau des pathogènes, toxines et hormones circulantes. Cette structure fait intervenir des composants cellulaires et moléculaires spécifiques qui forment l'unité neurovasculaire (NVU). La stabilisation de la BHE implique notamment les cellules endothéliales, les cellules périvasculaires ou murales, les pieds astrocytaires, la microglie et les neurones. Ce filtre extrêmement sélectif complique le traitement médicamenteux d'un grand nombre de pathologies neurologiques, y compris le traitement des tumeurs cérébrales.

a. Topographie de la barrière hémato-encéphalique

Les principales artères et veines cérébrales sont contenues dans l'espace subarachnoïdien. L'arachnoïde enveloppe le SNC entre la dure-mère et la pie-mère pour globalement délimiter la membrane des méninges. A partir de cette circulation périphérique se développe un réseau dense de capillaires et microcapillaires qui pénètrent dans le parenchyme de manière tangentielle. La BHE est un endothélium continu non fenestré stabilisé par un système de jonctions intercellulaires serrées très résistantes. Les échanges entre le sang et le cerveau s'opèrent principalement par transcytose (Atkins, Jain, and Hamik 2011). La topographie de la barrière hémato-encéphalique délimite trois compartiments différents définis par des lames basales propres (pour revue, (Krueger and Bechmann 2010) **(Figure 1)** :

- La paroi vasculaire est formée de la *tunica intima* qui contient les cellules endothéliales, et la *tunica media* composée de péricytes et cellules musculaires lisses.
- Le second compartiment constitue l'espace périvasculaire (ou l'espace de Virchow-Robin) qui contient majoritairement des cellules présentatrices d'antigènes.
- Le parenchyme juxtavasculaire (ou neuropil) est formé de la glie (astrocytes) et microglie adjacente.

La composition cellulaire et l'organisation de ces compartiments varie grandement selon le type de vaisseaux. Les grandes artères/veines et les veinules post-capillaires possèdent ces trois compartiments, alors que les capillaires sont dénués d'espace perivasculaire et sont majoritairement stabilisés par des péricytes.

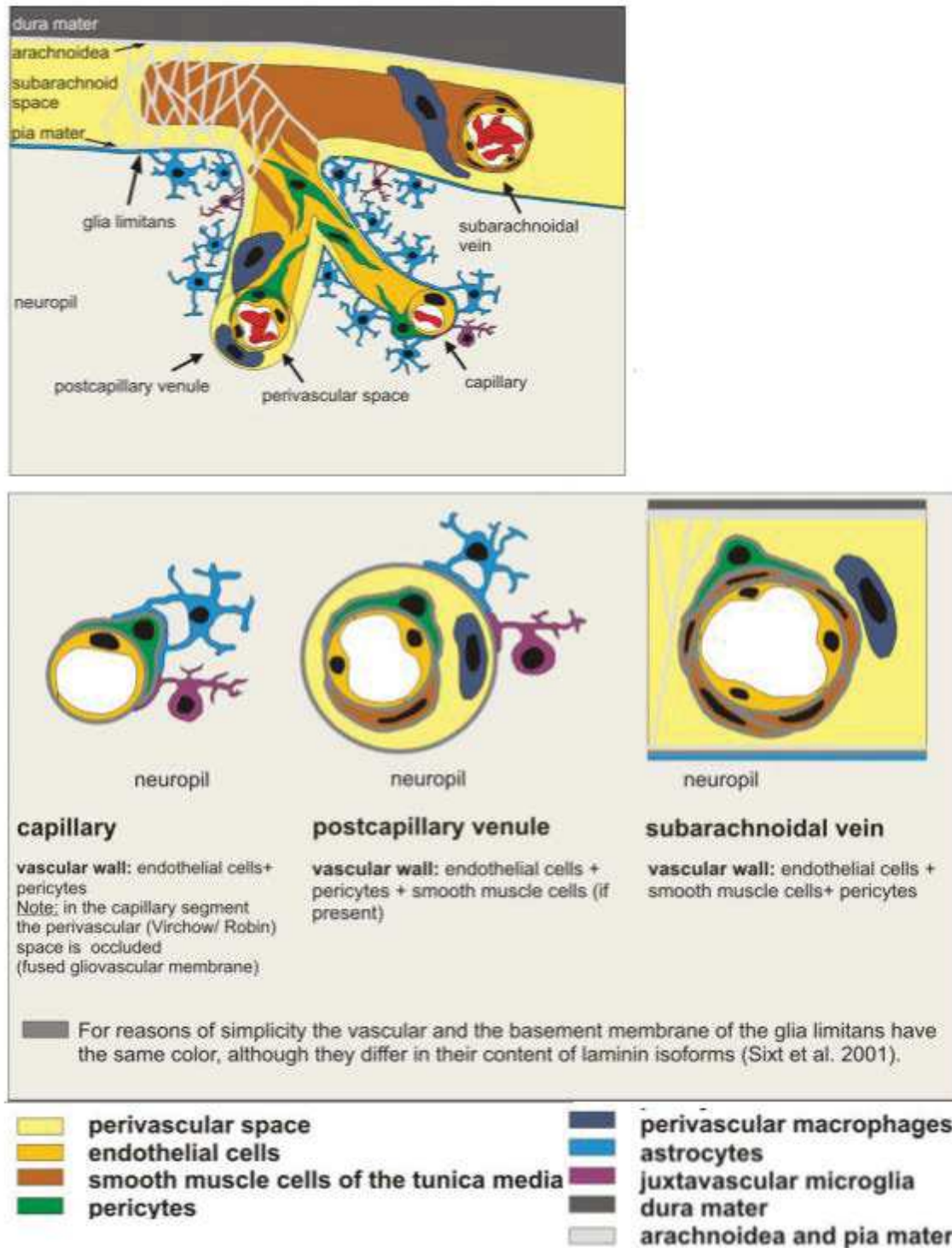


Figure 1 - Topographie de l'unité neurovasculaire et maintien de la BHE dans le SNC (d'après (Krueger and Bechmann 2010)).

b. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (CE) constituent la paroi monocouche de la barrière hémato-encéphalique, et sont en contact direct avec le sang et la lymphe. Elles s'organisent en « pseudo-épithélium » : leur pôle apical communique avec la lumière vasculaire (lumen), leur pôle basal contacte la lame basale faite majoritairement d'une matrice de collagène. Leur morphologie caractéristique plate et allongée varie selon le type de vaisseau où on les retrouve. L'élaboration d'un réseau tubulaire interconnecté implique plusieurs étapes coordonnées de migration, prolifération et morphogénèse des CE (Mathieu 2009). Elles subissent des contraintes mécaniques et biochimiques importantes. Leur cytoplasme contient les corpuscules de Weibel-Palade s'apparentant à des granules de stockage qui permettent notamment le relargage du facteur vWF impliqué dans la coagulation, et le relargage de l'Angiopoïétine 2 (Ang2) lors des mécanismes d'angiogénèse (Valentijn et al. 2011). De nombreux marqueurs sont utilisés pour les identifier, comme CD31 (ou PECAM-1) (Newman et al. 1990), la VE-Cadherine (Carmeliet et al. 1999), vWF et facteur VIII (Sadler 1998; Garlanda and Dejana 1997). Enfin, dans des conditions de culture particulières en matrigel ou en matrice de collagène, les CE ont la capacité de s'organiser en réseaux récapitulant *in vitro* les étapes primordiales de l'angiogénèse (Mathieu 2009).

c. Les cellules périvasculaires et les péricytes

Les cellules périvasculaires ou murales sont définies comme les cellules de soutien aux cellules endothéliales. Cette dénomination est directement liée au fait qu'elles partagent la même lame basale que les cellules endothéliales et sont en contact direct avec celles-ci. En réalité, ce groupe se compose de différents types cellulaires qu'il est très difficile de discerner, notamment les péricytes, les cellules vasculaires de muscle lisse, et les cellules mésenchymateuses vasculaires.

Le scientifique Charles Marie Benjamin Rouget fut le premier à identifier en 1873 des cellules contractiles (ou cellules de Rouget) en contact avec les vaisseaux (Rouget 1873, 1874, 1879). En 1923, KW Zimmermann les nomma péricytes, en raison de leur intime proximité avec les cellules endothéliales (Zimmermann 1923). L'identification en bonne et due forme de ces cellules s'avère compliquée. En effet, il n'existe aucun marqueur spécifique de ces cellules (Armulik, Genove, and Betsholtz 2011). Leur caractéristique principale est qu'ils partagent et synthétisent la lame basale avec les cellules endothéliales (Mandarino et al. 1993; Stratman et al. 2009); et qu'ils appartiennent à la paroi vasculaire (Sims 1986). Une identification selon les règles de l'art s'appuie à la fois sur des observations histologiques de l'ultrastructure des cellules (microscopie électronique); et sur des marquages des cellules endothéliales combinés à l'usage de deux marqueurs « acceptés » des péricytes. Les

protéines de surface et du cytosquelette comme PDGFR β , NG2, α SMA, Desmin, et RGS5 sont parmi les marqueurs les plus utilisés (Krueger and Bechmann 2010).

Le cerveau est l'organe le plus fourni en péricytes du fait du nombre important de réseaux microcapillaires (Armulik, Genove, and Betsholtz 2011). Ces cellules assurent des fonctions majeures dans le support de l'intégrité vasculaire, notamment via un dialogue direct avec les cellules endothéliales. En effet, ces deux types cellulaires communiquent via des points focaux d'adhésion, des sites de contact discrets (« peg-socket » points), des jonctions communicantes via la connexine 43 (Diaz-Flores et al. 2009), ou bien des plaques d'adhésion composées par la N-Cadherine (Gerhardt, Wolburg, and Redies 2000) (Armulik, Genove, and Betsholtz 2011). Dans le SNC, pour une cellule endothéliale, un à trois péricytes assurerai(en)t sa stabilisation (Mathiisen et al. 2010). Les péricytes expriment aussi des marqueurs du lignage monocytaire, sont capables de répondre à l'Interferon-gamma (IFN- γ); d'exercer des fonctions de phagocytose; et ils pourraient constituer un sous type spécialisé de macrophage (Zachariah and Cyster 2010; Balabanov et al. 1996). Enfin, ils possèdent des propriétés contractiles qui leur confèreraient une fonction dans la régulation du flux sanguin et dans la réponse à des molécules vasoactives et neurotransmetteurs (Peppiatt et al. 2006) (Winkler, Bell, and Zlokovic 2011).

d. Spécificités de la barrière hémato-encéphalique

L'extrême spécialisation de l'endothélium formant la BHE implique des caractéristiques propres à ses composants en comparaison des autres endothéliums. Par exemple, les CE expriment des transporteurs membranaires spécifiques, comme Glut-1 ou ABCB1 lors de la genèse de la barrière (Atkins, Jain, and Hamik 2011). La spécificité des CE du SNC a été aussi montrée par l'expression de facteurs transcriptionnels spécifiques, mais ces études n'ont pas encore élucidé les répercussions sur la fonctionnalité de la BHE (Vasudevan et al. 2008). Les péricytes jouent un rôle central à la maturation et au maintien de l'intégrité de la BHE, de manière spécifique à ce contexte (Armulik et al. 2010; Daneman, Zhou, Kebede, et al. 2010). Certaines protéines sont spécifiquement exprimées dans les péricytes du cerveau, comme le canal potassique Kir6.1 (Pombero, Garcia-Lopez, and Martinez 2016). Spécifiquement dans le SNC, la contribution active des cellules neurales à l'intégrité de la BHE suggère un lien neurovasculaire très fort. Précisément, des signaux attractifs ou répulsifs spécifiques du SNC, appelés « angioneurines » pourraient être à l'origine de la topographie spécialisée de l'endothélium de la BHE (Walchli et al. 2015; Quaegebeur, Lange, and Carmeliet 2011).

B. Spécification des cellules neurales et vasculaires au cours de l'embryogénèse

A l'issue de la gastrulation, les trois feuillets embryonnaires se coordonnent finement pour initier l'organogénèse. Le SNC et le SV sont les premières structures mises en place respectivement à partir de l'ectoderme et du mésoderme. Les spécifications du lignage neural et du lignage vasculaire dans le SNC sont fortement dépendantes l'une de l'autre, et emploient des mécanismes moléculaires communs.

1. Principes de la spécification des cellules souches

a. Propriétés des cellules souches

Par définition, une cellule souche est une cellule indifférenciée ayant 1- la capacité à s'auto-renouveler pour maintenir un réservoir ; 2- la capacité à proliférer de façon illimitée et 3- de s'engager dans un programme de différenciation spécifique (la potentialité). Plusieurs classes de cellules souches ont été définies :

- *Les cellules souches totipotentes* peuvent générer toutes les cellules d'un organisme, embryonnaires et extra-embryonnaires.
- *Les cellules souches pluripotentes* sont à l'origine des cellules constituant les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme).
- *Les cellules souches multipotentes* donnent naissance à des cellules formant un même groupe, ou tissu, comme les cellules souches neurales.
- *Les cellules souches progéniteurs* constituent les précurseurs d'un type cellulaire particulier, qui ne peuvent pas s'auto-renouveler mais prolifèrent et amorcent l'engagement vers la différenciation.

Hormis les cellules souches embryonnaires, il est désormais admis qu'un réservoir de cellules souches adultes persiste dans certains organes, en particulier dans le SNC.

b. Le déterminisme cellulaire : la balance entre prolifération, différenciation et quiescence

Les cellules souches se coordonnent entre elles de manière spatio-temporelle et reçoivent de multiples signaux extracellulaires qui vont activer des programmes intrinsèques leur permettant d'acquérir une identité propre et spécifique. Cette spécification cellulaire fait intervenir des processus régionalisés de restriction des potentialités au cours du développement, et à terme conduit à la différenciation, puis maturation terminale.

D'un point de vue moléculaire, cette prise de décision se traduit par la régulation de gènes spécifiques qui contrôlent de manière fine l'équilibre entre le fait de proliférer, se différencier, ou bien rester en « dormance » ou « quiescence ».

c. Régulation transcriptionnelle de l'identité cellulaire

Cette régulation de l'expression de gènes est coordonnée par les facteurs de transcription. Leur expression est très dynamique et régulée de manière spatio-temporelle au cours du développement. Ces facteurs de transcription sont classés en grande familles de protéines ; les principaux étant les bHLH, les doigts de zinc, les homéodomains, les leucine-zippers, les paired-box. Afin de simplifier mon propos concernant la spécification neurale et vasculaire, je ne me focaliserai que sur les régulations transcriptionnelles et les voies de signalisation associées, mais l'épigénétique module ces processus et est aussi à prendre en compte.

2. Spécification des cellules souches neurales embryonnaires

a. Spécification des cellules neuroépithéliales dans la zone ventriculaire (VZ) :

Au cours du développement, les cellules précurseurs neuroépithéliales du tube neural se divisent de manière symétrique pour amplifier le réservoir de progéniteurs multipotents, et ainsi former plusieurs couches autour de la lumière ventriculaire, ou zone ventriculaire (VZ) (Pour revue, (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009)). Dans un second temps, une partie de ces cellules acquiert un phénotype de cellules gliales radiales (RGC, ou NPC). Ces cellules s'étendent de la surface basale du néocortex jusqu'à la surface apicale de la zone ventriculaire et se divisent de manière symétrique et asymétrique. Ainsi, elles donnent naissance à des neuroblastes qui vont migrer le long de leurs prolongements vers la couche basale et mûrir en neurones spécifiques des différentes régions du cortex. Elles donnent aussi naissance à des progéniteurs intermédiaires neuronaux (nIPC). Les IPC s'accumulent au niveau de la zone sous-ventriculaire et génèrent progressivement d'autres neurones. Peu avant la naissance et lors du développement post-natal, les IPC et une proportion des RGC se spécifient en cellules gliales, via des progéniteurs intermédiaires oligodendrocytaires et astrocytaires (oIPC et aiPC) (Bjornsson et al. 2015). A la naissance, les RGC résiduelles adoptent un phénotype progéniteur de type B et persistent dans la zone sous-ventriculaire ainsi que dans le gyrus denté de l'hippocampe au sein des niches neurogéniques adultes (Pour revue, (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009)) (**Figure 2**).

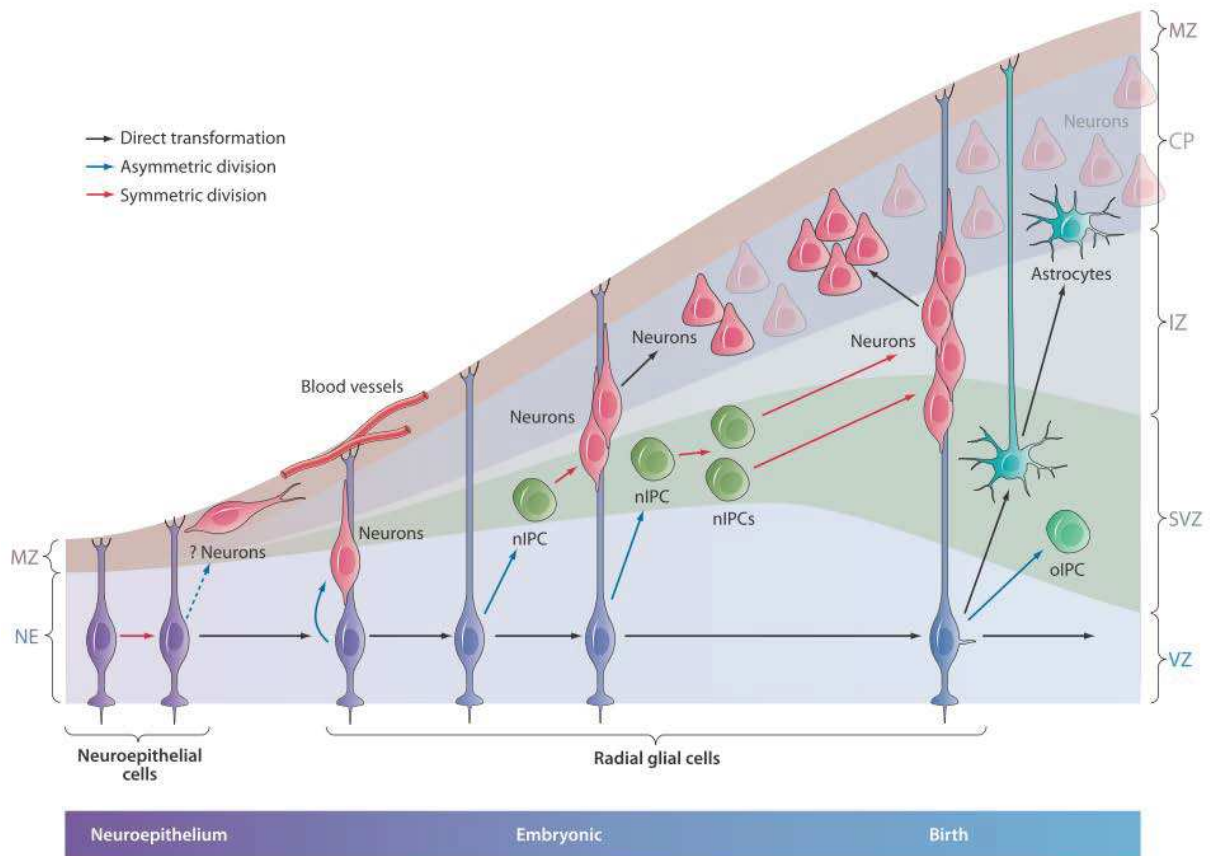


Figure 2 – Les cellules souches au cours du développement du SNC : nIPC : progéniteur intermédiaire neurogénique ; oiPC : progéniteur intermédiaire oligodendrocytaire ; MZ : zone marginale ; CP : plaque corticale ; IZ : zone intermédiaire ; SVZ : zone sous-ventriculaire ; VZ : zone ventriculaire (d'après (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009)).

b. Les facteurs de transcription bHLH

Lors de l'embryogénèse, le SNC est régionalisé par l'influence de gradients morphogènes tels que les FGFs, Wnts, SHH et BMPs qui dictent l'expression spécifique et spatio-temporelle des facteurs bHLH (Paridaen and Huttner 2014). La famille des facteurs de transcription bHLH a été mise en évidence par des travaux sur la drosophile dans les années 70 (Garcia-Bellido 1979). Ces protéines présentent un motif bHLH, correspondant à deux hélices alpha connectées par une boucle, qui leur permet de se dimériser. Leur domaine de fixation à l'ADN interagit avec une séquence consensus nommé la E-Box (Murre et al. 1989). Les dimères peuvent interagir de manière homodimérique ou hétérodimérique. Ce groupe de régulateurs transcriptionnels est essentiel durant le déterminisme neural (**Figure 3**). Ils peuvent notamment interagir avec différents partenaires autres que des bHLH. Leur expression est modulée par de nombreuses voies de signalisation ; par des facteurs épigénétiques, et le mode de division symétrique ou asymétrique des cellules.

c. Les gènes proneuraux

De nombreuses études ont démontré le rôle des bHLH proneuraux Neurogénine 1 et 2 (Neurog1/2) et Ascl1 dans la spécification de l'identité neuronale (Bertrand, Castro, and Guillemot 2002). Ils coopèrent de manière étroite avec la signalisation Notch, via uprégulation des ligands Dll1 et Jagged 1 et donc activation du récepteur Notch dans la cellule voisine, ce qui maintient une population de NPC (Castro et al. 2006). Ce processus d'inhibition latérale apparaît comme conservé dans toutes les régions du SNC en développement. L'expression des gènes proneuraux permet la différenciation neuronale par arrêt du cycle cellulaire, notamment par l'activation des inhibiteurs p16, p21 et p27 (Lange, Huttner, and Calegari 2009; Politis et al. 2007). Enfin, Ils régulent l'expression des gènes de maturation neuronale, tels que les gènes bHLH NeuroD et Math3/6 et les gènes à homéodomaines Dlx (Mattar et al. 2008; Fode et al. 1998; Cau, Casarosa, and Guillemot 2002; Ma et al. 1999; Bartolini, Ciceri, and Marin 2013).

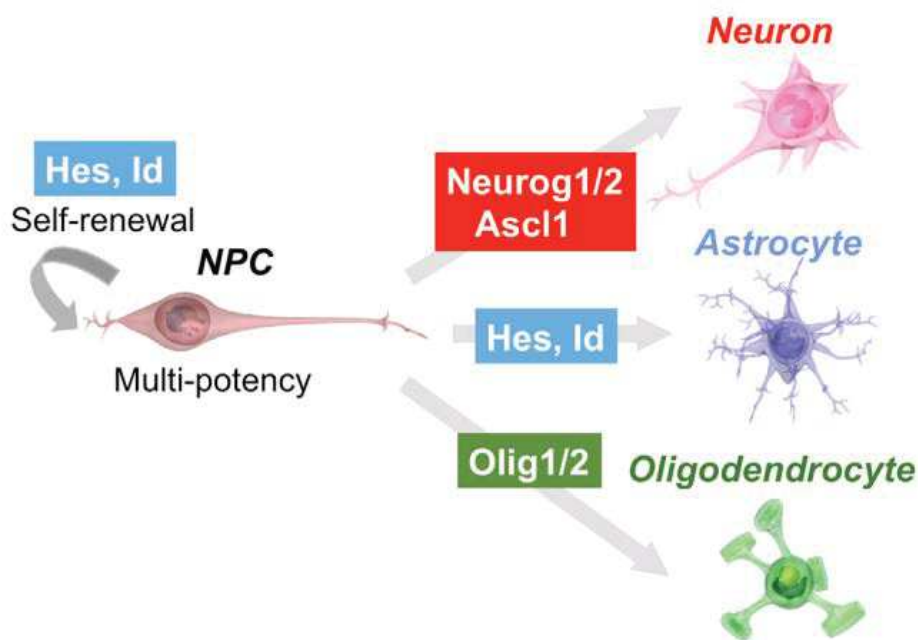


Figure 3 - Contrôle transcriptionnel de la spécification des cellules souches neurales par les facteurs de transcription bHLH (d'après (Imayoshi and Kageyama 2014)).

d. L'oligodendrogénèse

Les oligodendrocytes sont issus de la spécification des NPC en progéniteurs d'oligodendrocyte ou OPC, dans la zone ventriculaire. Par la suite, ces OPC vont proliférer et migrer et ne se différencient de manière terminale ; par acquisition de la gaine de myéline ; qu'une fois leur destination finale atteinte.

Plusieurs familles de facteurs de transcription sont impliquées dans leur spécification, notamment les bHLH (Olig1, Olig2, Ascl1), les homéodomaines (Nkx2.2, Nkx6.2), la famille Sox (Sox10) et les doigts de zinc (Zfp191, Zfp536, Myt1) (Nicolay, Doucette, and Nazarali 2007) (Figure 4).

Des études de perte et gain de fonction ont permis d'identifier les facteurs Olig1 et Olig2 comme centraux dans le déterminisme, la maturation et la myélinisation des oligodendrocytes (Lu et al. 2002; Zhou and Anderson 2002). En effet, Olig2 en coopération avec Nkx2.2 fonctionne en répresseur de Neurog1/2 (Zhou, Choi, and Anderson 2001) mais peut aussi induire l'expression de Sox10, gène nécessaire à la myélinisation et maturation des OPC (Kuspert et al. 2011). Olig1 agirait sur la maturation des OPC engagés (Arnett et al. 2004). A des stades plus tardifs, il a également été démontré que Ascl1 pouvait instruire une identité d'OPC (Parras et al. 2004) mais également une différenciation terminale en coopérant avec Olig2 et Nkx2.2 (Sugimori et al. 2008). La dynamique d'expression de ces facteurs de transcription est à nouveau modulée par la coordination des signalisations sHH, BMP, Wnt, et Notch.

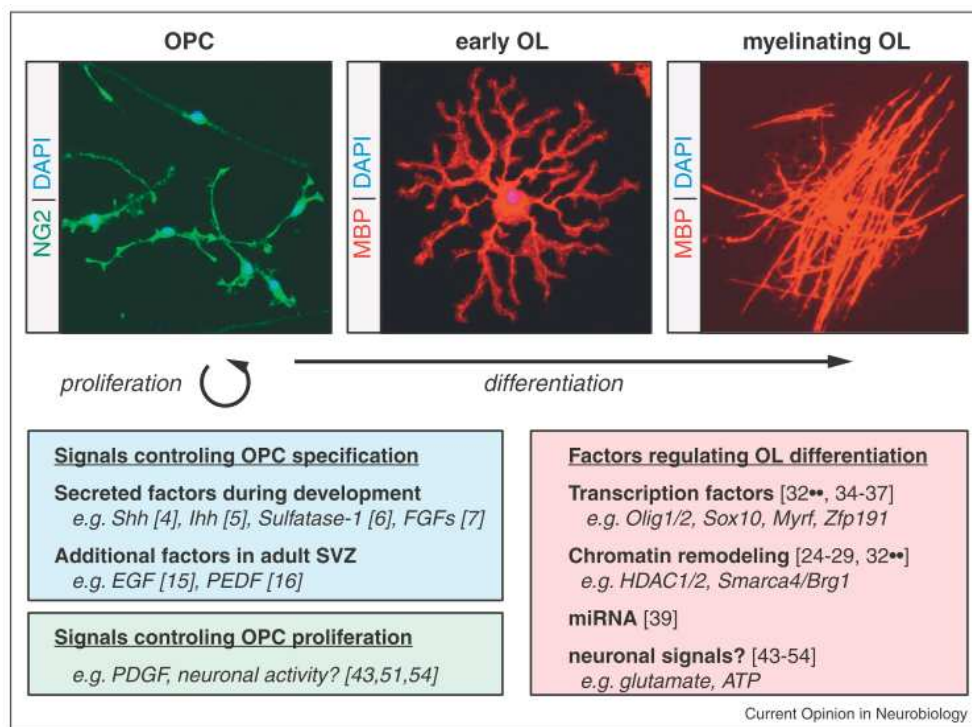


Figure 4 - Le lignage oligodendrocytaire et les signaux transcriptionnels et épigénétiques impliqués dans cette spécification (d'après (Zuchero and Barres 2013)).

e. L'astrogénèse

La neurogénèse a lieu avant la gliogénèse : l'astrogénèse est fortement inhibée à des stades précoces puis favorisée peu avant la naissance et lors du développement cérébral post-natal. Les astrocytes sont des cellules très dynamiques et plastiques, et les mécanismes à l'origine de ces propriétés sont encore largement méconnus. Dans le cerveau, les étapes moléculaires de la différenciation astrocytaire sont encore mal comprises ; mais il apparaît que ce processus serait un programme mis en place par défaut en l'absence de signaux stimulant et/ou en présence de signaux inhibant la neurogénèse ou l'oligodendrogénèse (Doetsch 2003). Le « switch » gliogénique embryonnaire a été le mieux caractérisé dans la moelle épinière (Gallo and Deneen 2014). Précisément, Sox9 et NFIA seraient impliqués dans le réseau transcriptionnel à l'origine de la spécificité gliale et astrogliale (Deneen et al. 2006; Stolt et al. 2003). L'étude approfondie de la régulation de l'expression de la GFAP a été majeure pour la caractérisation des signalisations de l'astrogénèse (Molofsky and Deneen 2015). A ce jour, aucun facteur de transcription n'a été démontré comme nécessaire et suffisant à la génération d'astrocytes. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle central de Notch et ses effecteurs Hes1 et protéines Id dans l'astrogénèse, possiblement par inhibition de l'engagement neuronal ou oligodendrocytaire mais aucun de ces facteurs n'est à lui seul nécessaire et suffisant (Imayoshi and Kageyama 2014). De nombreuses études pointent du doigt des facteurs épigénétiques, tels que les cytokines CNTF/LIF/CT-1 qui modulent l'activité de la signalisation JAK/STAT3, et induisent l'expression de la GFAP. Cet axe est aussi coordonné avec la voie des BMP; ainsi que la voie Notch (Nakashima et al. 1999; Gallo and Deneen 2014). Les jeunes neurones pourraient constituer la source de ces signaux extracellulaires. Par l'expression de CT-1/Jagged-Dll1, ils activent la différenciation astrocytaire par inhibition latérale (Barnabe-Heider et al. 2005; Namihira et al. 2009). La régulation temporelle de la spécification astrocytaire après la neurogénèse implique aussi des régulations épigénétiques qui graduellement inhibent les gènes proneuraux au profit d'une différenciation astrocytaire (Namihira et al. 2009; Hirabayashi et al. 2009)

f. Les multiples fonctions des bHLH

Les facteurs bHLH sont au cœur de la spécification des cellules neurales. En effet, il ressort de toutes ces études qu'ils assurent des fonctions diverses selon différents contextes. La composante épigénétique permet notamment d'influer sur leur expression spécifique à un moment, endroit et dans un type cellulaire donné. De plus, leur expression est régulée de façon très dynamique ; à la fois au niveau de la stabilité de leur ARN messager via une expression oscillatoire ; et au niveau de la protéine via phosphorylation et dégradation rapide pas le système ubiquitine-protéasome (UPS). Ascl1, Olig2 et Hes1 sont liés dans leur dynamique d'expression (Imayoshi et al. 2013). Ceci leur confère des rôles multiples durant la

spécification neurale, soit pour maintenir un état prolifératif, soit pour favoriser la différenciation. Leur expression oscillatoire favoriserait la prolifération alors que leur expression stable favoriserait la différenciation (Imayoshi and Kageyama 2014). Par exemple, *Ascl1* induit l'entrée en mitose par activation d'une transition G1/S au cours du cycle cellulaire (Castro et al. 2011), mais induit également l'expression des gènes de différenciation neuronale. Sa réactivation tardive induit aussi la maturation des oligodendrocytes. *Olig2* favorise également l'auto-renouvellement des NPC via sa phosphorylation qui lui confère un rôle pro-prolifératif dominant (Sun et al. 2011). Il détermine l'identité oligodendrocytaire, mais aussi motoneuronale dans la moelle épinière (Lu et al. 2002), et neuronale dans le cerveau (Furusho et al. 2006; Li, de Faria, et al. 2011).

3. Spécification vasculaire dans le SNC et établissement de l'unité neurovasculaire

La vascularisation embryonnaire du SNC implique deux grands mécanismes : la vasculogénèse des angioblastes, permettant la formation du plexus vasculaire primitif puis perineural ; et l'angiogénèse aboutissant au plexus vasculaire intraneural.

a. Vasculogénèse et spécification artério-veineuse

Les cellules souches à l'origine des vaisseaux sont des progéniteurs issus du mésoderme latéral qui prolifèrent pour former les îlots vasculo-sanguins dans le sac vitellin, et l'aorte dorsale dans l'embryon. Les cellules endothéliales primordiales ou angioblastes, vont tout d'abord former par vasculogénèse active le plexus vasculaire primitif, un réseau de tubules irrégulier et désorganisé. Ce réseau doit tout d'abord s'étendre et se remodeler dynamiquement pour aboutir à des structures vasculaires matures. Tout comme les cellules neuroépithéliales, les angioblastes sont soumis à des contraintes spatio-temporelles et des signaux moléculaires qui vont dicter l'acquisition d'un phénotype endothélial spécifique de l'organe vascularisé, et une identité artérielle, veineuse ou lymphatique (Corada, Morini, and Dejana 2014).

IHH, FGF2 et BMP4 sont des signaux moléculaires précoces sécrétés par l'endoderme viscéral qui assurent la spécification du mésoderme et l'engagement vers une identité endothéliale. Un autre facteur de croissance majeur sécrété par l'endoderme est le VEGF, précisément le VEGF-A dont le dosage précis est requis pour activer ses récepteurs respectifs VEGFR1 et VEGFR2, et réguler la survie et la prolifération des angioblastes

(Marcelo, Goldie, and Hirschi 2013). L'état prolifératif des angioblastes est aussi négativement régulé par la signalisation de l'acide rétinoïque RA et la voie du TGF β , cascades activées également par l'endoderme viscéral. L'identité artérielle ou veineuse des CE est par la suite définie par l'expression antagoniste et mutuellement exclusive des Ephrines (Eph) en aval de la signalisation Notch-Dll4-Hey1-Hey2. Précisément, EphB2 détermine une identité artérielle alors que EphB4 spécifie l'identité veineuse (Lawson et al. 2001). Les récepteurs Nrp interviennent aussi dans la spécification artério-veineuse (Nrp1 pour les artères, Nrp2 pour les veines) (Corada, Morini, and Dejana 2014).

Concernant le contrôle transcriptionnel de cette spécification, plusieurs facteurs ont été impliqués. Ils comprennent notamment les familles des bHLH, des E-twenty six (ETS), des GATA, des Kruppel-like factor (Klf), et des forkhead (FOX) (Corada, Morini, and Dejana 2014). Etv2, facteur de transcription de la famille ETS, est considéré comme un régulateur majeur de l'identité des angioblastes (Koyano-Nakagawa et al. 2012) et a récemment été montré comme suffisant à l'induction d'une transdifférenciation endothéliale de fibroblastes *in vitro* (Morita et al. 2015). En coopération avec FOXC, Etv2 active l'expression spécifique des gènes endothéliaux par fixation sur une séquence ci régulatrice spécifique (motif FOX:ETS). Le facteur de transcription COUP-TFII serait également déterminant de l'identité veineuse (Corada, Morini, and Dejana 2014) (Figure 5).

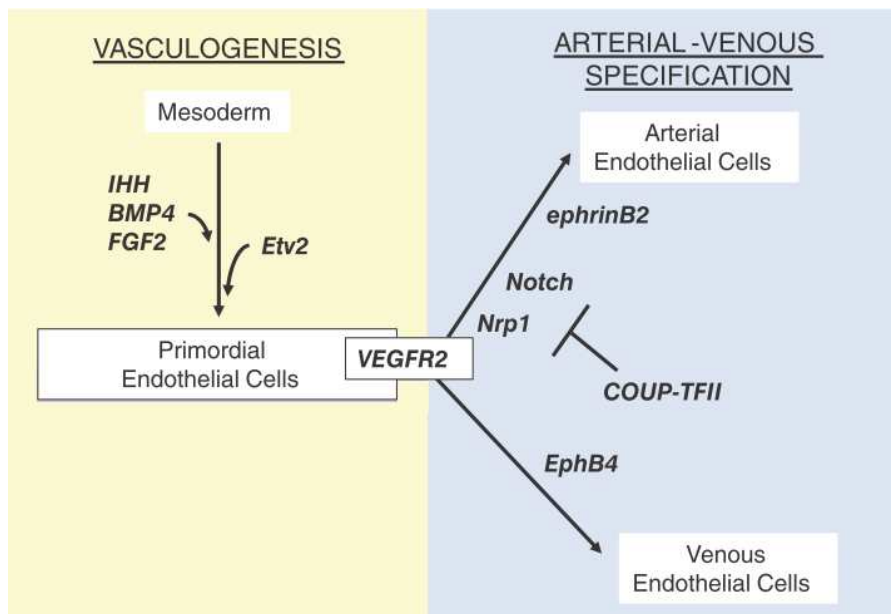


Figure 5 - Spécification des cellules endothéliales primordiales (ou angioblastes) et spécification artério-veineuse (d'après (Marcelo, Goldie, and Hirschi 2013)).

b. Angiogénèse du SNC embryonnaire

Spécifiquement dans le SNC, le plexus vasculaire primitif est remodelé pour former le plexus vasculaire périneural qui entoure le tube neural par colonisation des angioblastes. Cette vasculogénèse active permet la spécification des principales artères et veines cérébrales. Puis, les angioblastes vont pénétrer de manière tangentielle dans le parenchyme neural vers la zone sous-ventriculaire pour constituer le plexus vasculaire intraneural. Cette vascularisation intraneurale de régions précises du cerveau s'effectue principalement par bourgeonnement angiogénique, la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants (Walchli et al. 2015) (**Figure 6**). L'angiogénèse est un processus très dynamique qui implique différentes étapes, notamment :

- La rupture des jonctions serrées entre les cellules endothéliales du vaisseau existant.
- La dégradation de la membrane basale.
- La migration d'une cellule « tip » en association avec les cellules «stalk » qui prolifèrent.
- Le contact et l'anastomose entre les prolongements de deux cellules « tip ».
- La stabilisation de la structure vasculaire par les péricytes.
- Le recrutement des acteurs clé de la BHE.

Au niveau moléculaire, l'angiogénèse implique des signalisations moléculaires communes à celles de la vasculogénèse, à savoir les axes VEGF-Nrp1, Notch-Dll4, les Ephrines et TGF β (Marcelo, Goldie, and Hirschi 2013). La signalisation des Angiopoïétines (Ang1/2) et Récepteurs Tie est quant à elle spécifique de l'angiogénèse : elle implique la sécrétion des angiopoïétines, des cytokines qui se fixent sur les récepteurs Tie et déclenchent un programme pro- ou anti-angiogénique. Le récepteur Tie2 est exprimé majoritairement par les cellules endothéliales. L'Ang2 sécrétée par les cellules endothéliales a un effet déstabilisateur et pro-angiogénique; alors que l'Ang1 stabilise les CE et est sécrétée par les péricytes (Armulik, Genove, and Betsholtz 2011; Thurston et al. 1999). Les CE angiogéniques « tip » sécrètent également le PDGF-BB qui permet le recrutement et la prolifération des péricytes via activation du PDGFR β (Sweeney, Ayyadurai, and Zlokovic 2016). L'anastomose entre les branchements parallèles forme le plexus sous-ventriculaire, qui se situe proche de la zone ventriculaire VZ et des RGC en neurogénèse/gliogénèse active (Bjornsson et al. 2015). Les CE sont directement compétentes à assurer leur rôle de barrière par la formation des jonctions serrées, et les vaisseaux embryonnaires sont cohésifs de manière très précoce (Saunders, Liddelow, and Dziegielewska 2012). Le réseau vasculaire formé est par la suite stabilisé par les acteurs clé de la BHE, constituant donc l'unité

neurovasculaire spécialisée et hautement spécifique du SNC (Sweeney, Ayyadurai, and Zlokovic 2016).

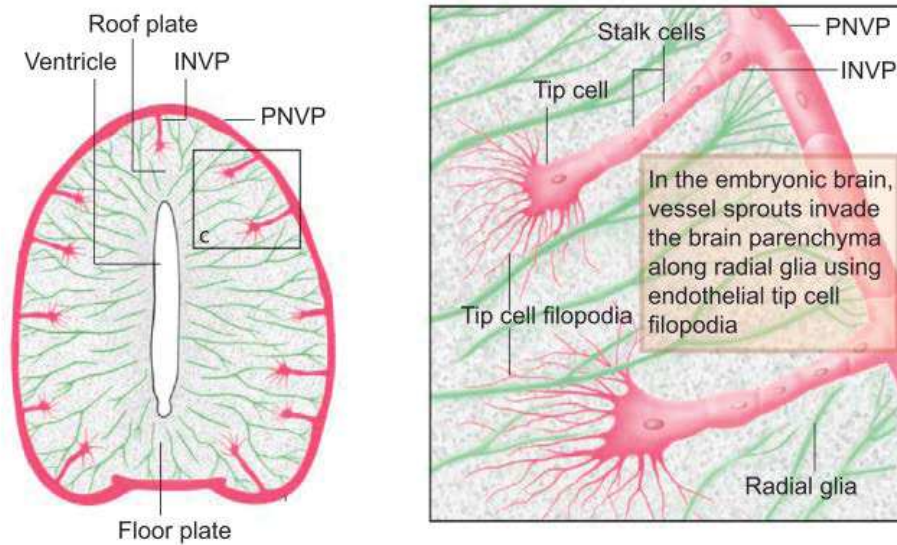


Figure 6 - Angiogénèse cérébrale et formation du plexus intraneural à partir du plexus perineural (d'après (Walchli et al. 2015)) : INVP : Intraneural vascular plexus ; PNVP : Perineural vascular plexus.

c. Origine et spécification des péricytes

L'ontologie des cellules murales au cours du développement demeure très obscure, en raison de spéculations sur l'existence d'un précurseur mésenchymateux commun que l'on ne peut identifier formellement (Drake, Hungerford, and Little 1998). Ces précurseurs seraient en fait multiples et spécifiquement déterminés de manière régionalisée au cours du développement (Majesky et al. 2011).

Néanmoins, il a été montré que les cellules murales des structures coelomiques sont dérivées du mésoderme (Armulik, Genove, and Betsholtz 2011). Dans le SNC, des expériences de chimérisation caille-poulet ont démontré que les péricytes du télencéphale dérivent du neurectoderme et des cellules de crête neurale ; alors que les péricytes du mésencéphale, tronc cérébral et moelle épinière proviennent majoritairement des cellules mésodermiques (Etchevers et al. 2001) (**Figure 7**).

Un processus commun de leur spécification implique une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) de leur précurseurs mésodermiques, suivie de leur délamination, migration et enfin colonisation des sites de vasculogénèse active (Armulik, Genove, and Betsholtz 2011). Ces progéniteurs mésenchymateux pourraient acquérir leur identité au contact des progéniteurs endothéliaux par les différents signaux régulant leurs interactions (Armulik, Genove, and Betsholtz 2011).

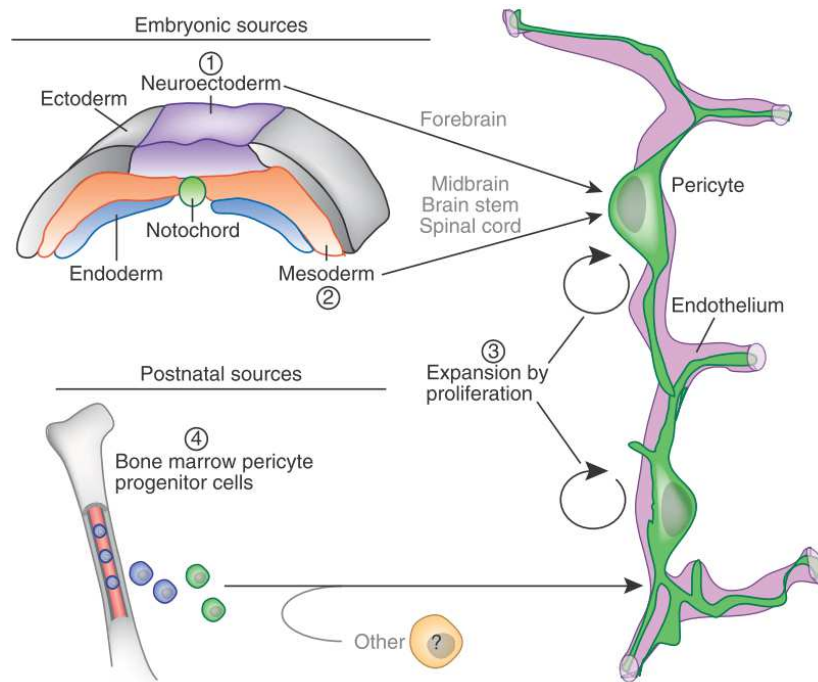


Figure 7 - Origines embryonnaires des péricytes du SNC (d'après (Winkler, Bell, and Zlokovic 2011)) : (1) les cellules de crête neurale dérivées du neuroectoderme sont à l'origine des péricytes du prosencéphale ; (2) les cellules souches mésenchymateuses (MSC) du mésoderme sont à l'origine des péricytes du mésencéphale, tronc cérébral et moelle épinière ; (3) génération de péricytes à partir du réservoir local pré-existant ; (4) les cellules mésenchymateuse de la moelle osseuse et autres sources inconnues de péricytes aux stades post-nataux.

Les régulations moléculaires de leur spécification au cours de la vasculogénèse embryonnaire demeurent encore imprécises. En effet, la plupart des études se placent dans un contexte pathologique qui ne reflète pas forcément la situation physiologique de leur croissance. Au cours de l'embryogénèse et le stade post-natal, la prolifération et l'expansion des péricytes du SNC s'effectuent via un recrutement longitudinal qui est intimement intriqué avec le réseau vasculaire en expansion. Notamment, la sécrétion de PDGF-BB par les CE semble majeure pour le recrutement des péricytes via la signalisation PDGFR β (Lindahl et al. 1997; Sweeney, Ayyadurai, and Zlokovic 2016).

La régulation transcriptionnelle de l'identité péricytaire demeure à ce jour largement méconnue, notamment car très peu de régulateurs spécifiques des péricytes ont été identifiés. Etant donné les ressemblances phénotypiques de ces cellules avec les cellules vasculaires lisses vSMCs, des facteurs communs sont exprimés dans les deux types cellulaires. La spécification des vSMCs est quant à elle bien caractérisée (Majesky et al. 2011). Des travaux récents ont démontré que le facteur de transcription Foxf2 est exprimé spécifiquement dans les péricytes du SNC. L'inactivation de ce gène par KO *in vivo* provoque des défauts sévères de la BHE, et la dérégulation des signalisations PDGFR β et TGF β (Reyahi et al. 2015).

L'expansion des péricytes est graduelle au cours du développement et durant la période post-natale, de manière concomitante à l'expansion des CE et des neurones.

4. La niche neurovasculaire embryonnaire

De manière très intéressante, la coordination temporelle de la vasculogénèse/angiogénèse est intimement corrélée au gradient de neurogénèse dans la zone ventriculaire VZ. Par exemple, l'hypoxie qui augmente graduellement dans la VZ favorise la production de VEGF par les CE via activation de HIF-1 α . Les RGC de la VZ stabilisent également les vaisseaux sanguins par modulation du ligand Wnt et par la production d'acide rétinoïque RA et de TGF- β (Bjornsson et al. 2015).

En retour, les CE régulent l'auto-renouvellement des NPC par sécrétion de VEGF, et l'expression de Notch et ses effecteurs. Elles expriment également des facteurs propres à leur identité du SNC. En effet, il a été montré que les CE du SNC ont un transcriptome spécifique comparé aux autres CE de l'organisme (Daneman, Zhou, Agalliu, et al. 2010). Plus spécifiquement, les CE du plexus vasculaire sous-ventriculaire exprimeraient des gènes différents des CE des vaisseaux de l'arachnoïde (Won et al. 2013). Les péricytes participent à la maturation de la BHE (Engelhardt and Liebner 2014), et pourraient réguler de façon indirecte la neurogénèse, en modulant l'accès à des signaux neurogéniques véhiculés par la circulation sanguine. Récemment, une étude a mis en évidence les gènes spécifiquement exprimés par les péricytes cérébraux, suggérant des facteurs spécifiques potentiellement impliqués dans ces régulations (Zhang et al. 2014).

L'homéostasie de la niche embryonnaire est également maintenue par d'autres acteurs majeurs de l'unité neurovasculaire, notamment les méninges, les plexus choroïdes, les cellules gliales et microgliales (Bjornsson et al. 2015) (**Figure 8**).

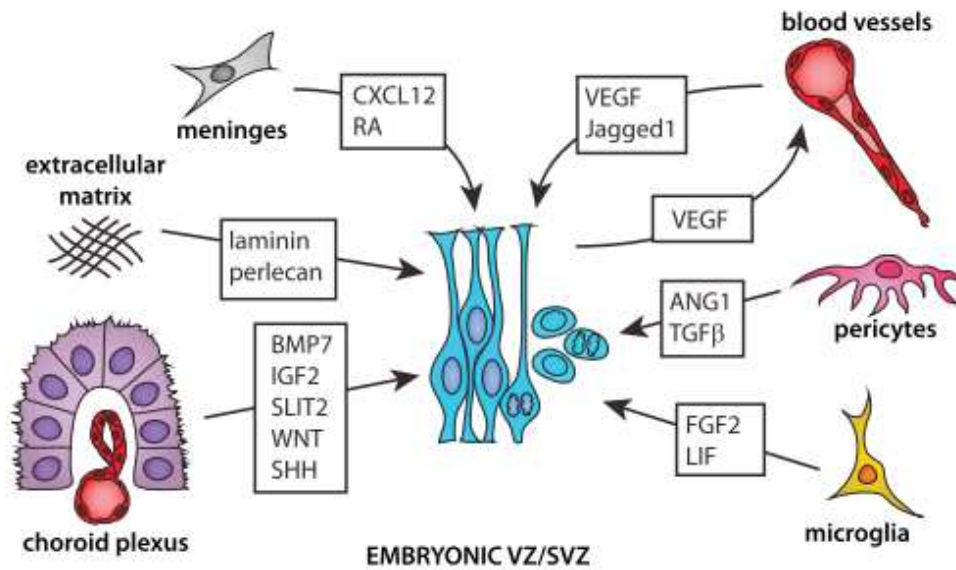


Figure 8 - Composants moléculaires de la niche neurogénique embryonnaire de la zone ventriculaire (VZ/SVZ) (d'après (Bjornsson et al. 2015)).

C. Homéostasie de la niche neurovasculaire adulte

1. Les cellules souches neurales adultes

Une des avancées les plus fascinantes de ces trente dernières années est représentée par la découverte de cellules immatures multipotentes dans le cerveau et la moelle épinière des mammifères. Le dogme fondé par les travaux de Ramon y Cajal laissait à penser que les cellules neuronales du cerveau adulte ne pouvaient pas se régénérer. Ces idées furent complètement remises en question au début du XX^e siècle. Les premières observations datant de 1901 par Alice Hamilton (Hamilton 1901), des travaux décisifs chez le rat et les oiseaux (Altman and Das 1965; Goldman and Nottebohm 1983) ont permis d'identifier et d'isoler les cellules souches neurales adultes (NSC) capables de produire des neurones et des cellules gliales *in vitro* et *in vivo* (Reynolds and Weiss 1992). *In vitro*, la culture de neurosphères a appuyé cette découverte et reste une méthode de référence car elle permet de démontrer au niveau clonal les propriétés cardinales des cellules souches, à savoir 1- l'auto-renouvellement, 2-la multipotentialité et 3-la capacité à proliférer (Deleyrolle and Reynolds 2009). *In vivo*, l'identification des NSC par des techniques de « lineage tracing » et de « fate-mapping » a également été décisive et a pu montrer que ces cellules multipotentes apparaissent quiescentes puis sont réactivées selon les besoins ou non d'une neurogénèse (Bonaguidi et al. 2011). Ainsi, deux classes de NSC ont été caractérisées.

Les NSC de la zone sous-ventriculaire (SVZ) et de la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (SGZ) sont les mieux caractérisées ((Doetsch 2003)). Dans la SVZ, les cellules de type B, fortement apparentées à des reliquats des RGC embryonnaires, donnent naissance aux progéniteurs de type C qui se divisent rapidement et se spécifient en neuroblastes (type A), et en cellules gliales. Les cellules de type A vont ensuite migrer en chaîne vers les bulbes olfactifs où elles vont maturer en différents sous types d'interneurones (Bjornsson et al. 2015). Les cellules de type B sont en majorité quiescentes *in vivo* puis réactivées selon les besoins (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Dans la SGZ, les cellules de type I, semblables aux cellules de type B, génèrent des progéniteurs intermédiaires aux capacités prolifératives limitées. Ceux-ci se spécifient ensuite en neuroblastes qui par migration tangentielle puis radiale, mûrent en neurones granulaires (Bond, Ming, and Song 2015) (Figure 9).

Les progéniteurs d'oligodendrocytes adultes ou OPC constituent la deuxième classe de NSC adultes. Ces progéniteurs du cortex présentent une restriction de leur potentialité ; ils prolifèrent et sont responsables de la myélinisation adulte (Nishiyama, Suzuki, and Zhu 2014).

La découverte des NSC constitue aujourd'hui une piste thérapeutique prometteuse dans le traitement des maladies neurodégénératives. La compréhension de leur origine et de leur lignage est également importante dans le contexte des gliomes, car elles seraient potentiellement à l'origine de l'initiation de ces tumeurs (Introduction, Chapitre II).

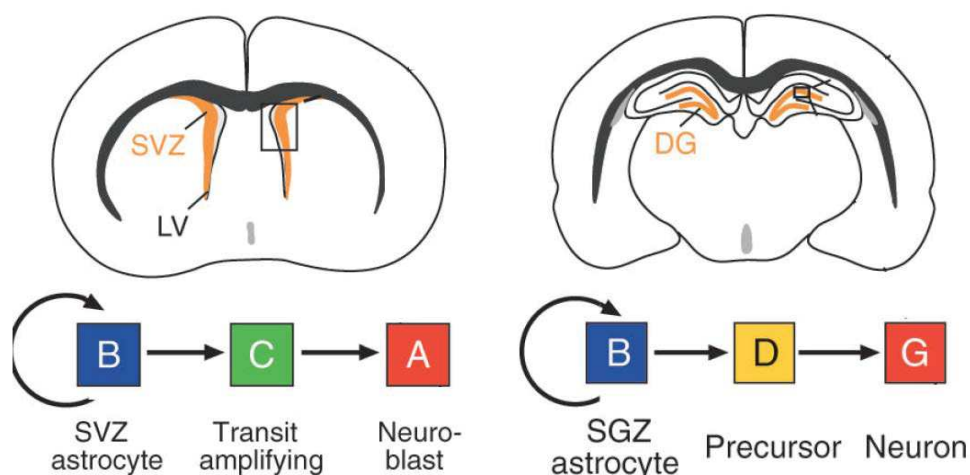


Figure 9 - Localisation et lignage des zones neurogéniques de la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (d'après (Doetsch 2003)) : SVZ : subventricular zone ; DG : dentate gyrus

2. La niche neurogénique de la zone sous-ventriculaire : une niche périvasculaire ?

Les niches neurogéniques des NSC adultes s'apparentent à des écosystèmes agissant comme des nids qui protègent, "nourrissent" et régulent le déterminisme des cellules souches. Généralement, ces niches fournissent aux cellules des signaux déterminants au maintien de leurs propriétés cardinales. Il est donc courant de retrouver des hauts niveaux d'activation des signalisations embryonnaires Wnt, BMP, sHH, et Notch dans ce contexte (Guelfi et al. 2016). L'homéostasie est également maintenue par l'interaction étroite des cellules souches avec les cellules et la matrice environnantes.

La niche neurogénique adulte de la SVZ peut être considérée comme un reliquat de la zone ventriculaire embryonnaire (VZ) (Doetsch 2003). Cependant, elle présente des attributs propres, associés à la perte ou au gain de certains composants. Par exemple, les épendymocytes matures sont peu présents dans la niche embryonnaire alors qu'ils sont très importants dans la neurogénèse adulte. La niche adulte est également innervée par des neurones matures qui modulent la prolifération des NSC, notamment par sécrétion d'oxyde nitrique, sérotonine et acétylcholine (Paez-Gonzalez et al. 2014; Romero-Grimaldi, Moreno-Lopez, and Estrada 2008; Tong et al. 2014). Les cellules microgliales, les plexus choroïdes et la composition de la matrice extracellulaire sont également cruciaux à l'homéostasie de cet écosystème (Bjornsson et al. 2015) (**Figure 10**).

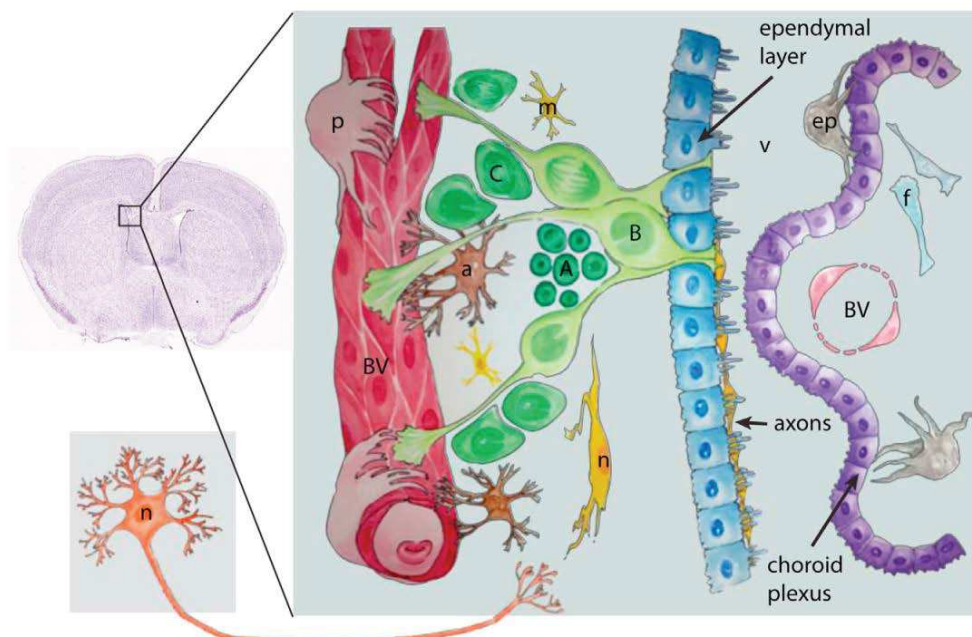


Figure 10 - Composants cellulaires de la niche neurogénique adulte de la SVZ (d'après (Bjornsson et al. 2015)) : B : cellules de type B ; C : cellules de type C ; A : cellules de type A ; m : microglie ; BV : vaisseau sanguin ; p : péricyte ; n : neurone ; ep : cellules de l'épiplexus ; a : astrocyte ; f : fibroblaste.

Par leur pôle basal, il a clairement été démontré que les cellules de type B sont en contact direct avec le réseau vasculaire du plexus sous-ventriculaire. Cette colocalisation topographique suggère donc que les cellules souches neurales résident dans une niche perivascularaire (Shen et al. 2008). Les vaisseaux sanguins de la SVZ servent de guides aux jeunes neuroblastes différenciés qui migrent en direction des bulbes olfactifs (Nam et al. 2007). Les CE exerceraient également un chimiotactisme sur les NSC au sein de la niche, par la sécrétion de cytokines parmi lesquelles SDF1 (Kokovay et al. 2010). Les cellules endothéliales influencent directement la prolifération/différenciation des NSC. En effet, certains travaux ont montré que les CE activent l'auto-renouvellement du réservoir des NSC de type C, via sécrétion de facteurs neurotrophiques (Shen et al. 2004; Bjornsson et al. 2015). D'autres études favorisent aussi l'idée que les CE maintiennent en quiescence les NSC de type B (Ottone et al. 2014). Cette régulation fine de l'équilibre entre quiescence et activation des NSC adultes par les cellules endothéliales fait notamment intervenir les grands axes de signalisation Jg1/Dll4/Notch1, VEGF/VEGFR, les Ephrines, signaux également impliqués dans la néovascularisation (Thomas et al. 2013).

Les péricytes sont présents au niveau de la SVZ mais en nombre réduit en comparaison d'autres régions cérébrales. Leur rôle est semblable à celui exercé lors de l'embryogénèse. Précisément, ils maintiennent l'intégrité de la BHE, régulent potentiellement le flux sanguin, et influent indirectement sur les NSC et leur accès aux nutriments du sang (Daneman, Zhou, Kebede, et al. 2010; Peppiatt et al. 2006). Ils continuent également de moduler la signalisation du TGF β et la production d'Ang1 pour stabiliser le réseau vasculaire (Bjornsson et al. 2015) (Figure 11).

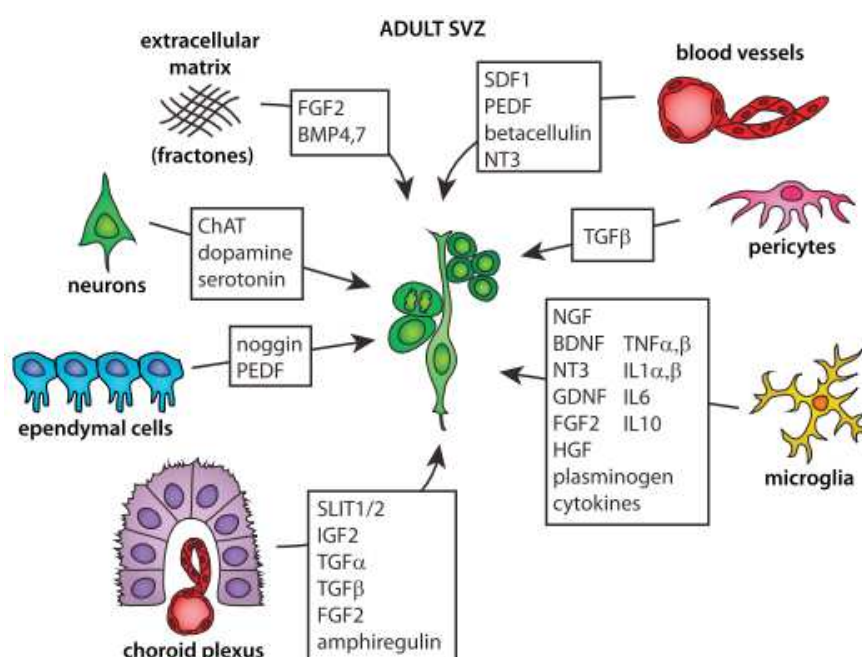


Figure 11 - Composants moléculaires de la niche neurogénique adulte de la SVZ (d'après (Bjornsson et al. 2015)).

D. Intégrité de l'unité neurovasculaire et remodelage de la BHE

1. Dialogue moléculaire entre cellules endothéliales et péricytes :

L'intégrité de la BHE est principalement régulée par l'interaction étroite entre les cellules endothéliales et les péricytes. Cette interaction est aussi dépendante des signaux neurovasculaires environnants qui impactent directement sur la cohésivité et la perméabilité sélective de la BHE. De façon intrigante, certaines régions du SNC comme la niche de la SVZ, ont une BHE plus perméable avec moins de péricytes et peu de contacts par les pieds astrocytaires (Tavazoie et al. 2008). Dans des situations pathologiques comme l'ischémie cérébrale, certaines maladies neurodégénératives ou encore les tumeurs cérébrales, l'équilibre de la BHE est perturbé par la modification de ces réseaux moléculaires.

Le contact étroit entre les péricytes et les CE fait intervenir des signalisations semblables à celles évoquées dans le contexte embryonnaire. En résumé, l'axe VEGF-A/VEGFR2 régule la survie endothéliale, la perméabilité vasculaire et l'angiogénèse. L'axe PDGF-BB/PDGFR β induit la prolifération et le recrutement des péricytes. La modulation par le TGF- β est plus complexe et peut avoir des effets opposés sur la prolifération et/ou la maturation vasculaire. Enfin, l'expression de Notch3 par les péricytes et la sécrétion de Jagged1 par les CE favorise la différenciation péricytaire. Ces axes convergent notamment pour réguler l'expression de la N-Cadhérine et la connexine 43, des molécules d'adhérence qui médient l'interaction entre CE et péricytes (Winkler, Bell, and Zlokovic 2011) (Sweeney, Ayyadurai, and Zlokovic 2016) (Figure 12).

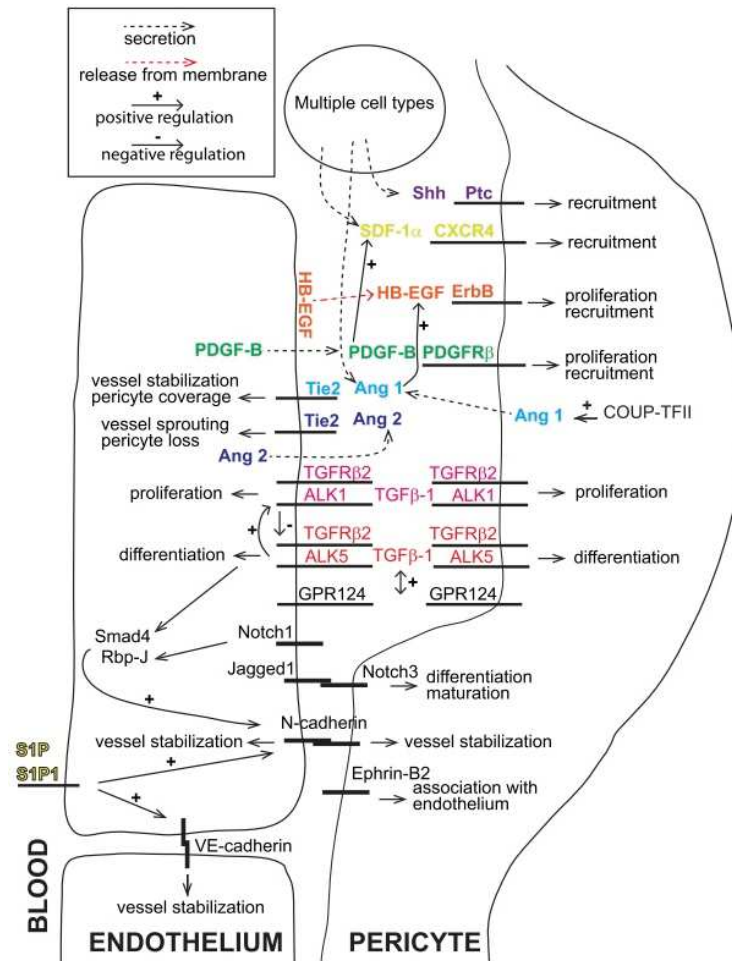


Figure 12 - Complexité des interactions moléculaires entre les cellules endothéliales et les péricytes (d'après (Armulik, Genove, and Betsholtz 2011)).

2. Remodelage des vaisseaux et cellules souches vasculaires :

Chez l'adulte, le remodelage vasculaire s'effectue principalement de manière locale par bourgeonnement angiogénique. Ceci se traduit par une réactivation des cascades moléculaires impliquées dans l'angiogénèse embryonnaire (Wälchli et al. 2013).

La possibilité d'une vasculogénèse adulte a aussi été proposée mais reste controversée car elle suggère l'existence de cellules souches/progéniteurs vasculaires dont l'identification et la localisation n'est pas encore clairement démontrée. De nombreux travaux argumentent le fait que les cellules endothéliales et périvasculaires locales maintiennent leur capacité à proliférer et se différencier, ce qui remet en question la nécessité d'un réservoir de cellules souches vasculaires.

a. Les progéniteurs endothéliaux adultes ou EPC

En 1997, T Asahara et collègues furent les premiers à prouver l'existence de progéniteurs putatifs endothéliaux ou EPC (Asahara et al. 1997). Les EPC seraient des cellules circulantes du sang qui résideraient dans la moelle osseuse, au sein de la niche hématopoïétique. Ils représenteraient une population d'angioblastes adultes (Ribatti 2007). En effet, les EPC auraient la capacité de migrer vers les sites de néovascularisation, proliférer et se spécifier vers le lignage endothélial, sans maturer complètement vers un phénotype endothélial différencié. La fonction putative de réservoir des EPC a surtout été analysée dans des conditions pathologiques comme l'ischémie ou les tumeurs, et reste fortement débattue (Bautch 2011).

b. La transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT)

Les cellules endothéliales de l'endothélium dormant peuvent subir une transition phénotypique mésenchymateuse et délaminent pour vasculariser une autre zone localement proche. Cette transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT) se produit notamment lors de l'embryogénèse cardiaque et lors de la fibrose (Medici and Kalluri 2012). Dans le SNC, l'EndMT a été récemment démontrée dans le contexte pathologique des malformations cavernueuses cérébrales (ou angiomes caverneux), qui se caractérisent par des malformations vasculaires causant des attaques et des hémorragies cérébrales. Dans ce contexte, l'EndMT impliquerait un intermédiaire vasculaire/mésenchymateux multipotent induit par les voies du TGF- β et BMP (Maddaluno et al. 2013).

c. Multipotence des cellules murales

Concernant les cellules murales, de nombreuses preuves *in vitro* pointent vers leurs propriétés multipotentes. En effet, les péricytes ont des propriétés communes aux cellules souches mésenchymateuses (MSC) et se différencient *in vitro* vers les lignages ostéogéniques, chondrogéniques et adipogéniques (Lin and Lue 2013). En coopération avec les EPC, ces cellules pourraient donc constituer un réservoir local de cellules souches vasculaires. Etant donné la difficulté à correctement les discerner des cellules vasculaires lisses ou des cellules mésenchymateuses périvasculaires, leur fonction de cellule souche putative demeure encore imprécise.

Néanmoins, des résultats récents dans le contexte spécifique du SNC désignent les péricytes comme cellules souches vasculaires putatives (Nakagomi, Nakano-Doi, et al. 2015; Pombero, Garcia-Lopez, and Martinez 2016). Les péricytes demeurent quiescents ou prolifèrent lentement durant la vie adulte ; mais ils peuvent être réactivés notamment lors d'ischémies cérébrales. Ces péricytes ischémiques (iPC) sont multipotents et expriment des marqueurs d'immaturation en plus de leurs marqueurs mésenchymateux caractéristiques

(Nakagomi, Kubo, et al. 2015). Ils auraient aussi des propriétés vasculogéniques : l'ischémie induirait notamment un phénotype « mésenchymangioblaste » possédant à la fois des propriétés de cellules murales et de cellules endothéliales. En effet, les iPC co-expriment α SMA et VE-Cadherine, et sont capables de former des tubules en matrigel (Nakagomi, Kubo, et al. 2015). Au cours du développement, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ont pour origine un progéniteur possédant cette bipotentialité (Slukvin and Vodyanik 2011; Vodyanik et al. 2010). Les péricytes réactiveraient donc ces propriétés chez l'adulte en conditions pathologiques.

E. La plasticité neurovasculaire

Nous avons vu que dans des contextes spécifiques, les cellules vasculaires peuvent devenir multipotentes. Dans le SNC, le lien neurovasculaire et l'effet double des signaux « angioneurines » laisse entrevoir qu'il existe une plasticité particulière entre les cellules vasculaires et les cellules neurales (Eichmann and Thomas 2013). Cette hypothèse d'une transdifférenciation neurovasculaire a été mise en évidence dans plusieurs études.

1. Plasticité des cellules neurales vers le lignage vasculaire

En 2004, Wurmser et collègues montrent que des NSC adultes de souris co-cultivées avec des CE humaines expriment CD146/MCAM, à l'époque un marqueur putatif du lignage endothélial. Cette population CD146⁺ exprime aussi des marqueurs de cellules endothéliales matures comme CD31 et VE-Cadhérine. Il était auparavant admis que les NSC en culture pouvaient exprimer des marqueurs « extra-neuraux » (Parati et al. 2002). Fonctionnellement, les cellules CD146⁺ forment des tubules en conditions bidimensionnelles dans une matrice de matrigel, possèdent des corpuscules de Weibel-Palade caractéristiques de cellules endothéliales matures, et se différencient également en cellules endothelial-like *in vivo* après transplantation chez l'embryon (Wurmser et al. 2004). Les auteurs ont également écarté la possibilité d'une fusion entre NSC et CE, phénomène qui avait déjà été observé dans d'autres types cellulaires.

D'autres travaux ont démontré que les NSC peuvent plutôt s'engager vers le lignage des cellules murales ; précisément par différenciation en cellules musculaires lisses qui 1- expriment les marqueurs caractéristiques α SMA, SM22, desmine et calponine, et 2- qui ont des propriétés contractiles (Oishi et al. 2002; Song et al. 2009; Tsai and McKay 2000). Les travaux de K Oishi et collègues ont par la suite suggéré la capacité des NSC à se différencier à la fois en cellules endothéliales et en cellules murales, renforçant donc l'idée d'une plasticité neurovasculaire au sens large (Oishi et al. 2004) (**Figure 13**).

2. Plasticité des cellules vasculaires vers le lignage neural

Plusieurs groupes de recherche ont récemment démontré la capacité des péricytes à se spécifier en cellules neurales, puis à maturer en neurones ou en cellules gliales. A partir de biopsies de cerveaux murins et humains, ils ont isolés des populations de cellules mésenchymateuses exprimant des marqueurs validés de péricytes, comme NG2, PDGFR β ou α SMA et ont montré 1-leur capacité d'auto-renouvellement via formation de sphères à l'échelle clonale ; 2-leur multipotence vers le lignage neuronal via expression des marqueurs Map2, Tuj1, Tubb3 et DCX ; et 3-leur multipotence vers le lignage glial via expression de GFAP, S100 β et O4 (Dore-Duffy et al. 2006; Paul et al. 2012).

En 2015, l'étude sur les péricytes ischémiques (iPC) montre également une transition neurale des iPC qui expriment les facteurs de transcription Sox2 et Olig2 (Nakagomi, Kubo, et al. 2015). Les iPCs acquièrent la compétence intrinsèque à s'engager dans le lignage neural. En effet, via la modulation de l'expression de Sox2, les auteurs ont observé l'induction de Map2, Neurog2 et Ascl1 dans les iPC en culture (Nakagomi, Kubo, et al. 2015).

Les travaux de M Karow et collègues ont aussi confirmé que la reprogrammation de péricytes isolés à partir de cerveaux humains et murins pouvait induire leur différenciation neuronale. Par transduction de lentivirus exprimant Sox2 et Ascl1, ils ont obtenus *in vitro* des neurones fonctionnellement matures, capables de potentiels d'action et de contacts synaptiques (Karow et al. 2012) (**Figure 13**).

Au contraire, d'autres publications ont réfuté l'hypothèse d'une transition péricyte-cellule neurale. Ces études démontrent que les cellules fibroblastiques ou mésenchymateuse isolées de zones périvasculaires du SNC, cellules que l'on peut alors définir comme des péricytes de manière vague, ne possèdent pas la capacité de se spécifier en cellules neurales. Les résultats observés dans les autres études résultent peut être d'une contamination de la soi-disante culture de péricytes d'origine, par des progéniteurs neuraux pouvant exprimer des marqueurs mésenchymateux selon leur stade de différenciation (Lojewski et al. 2015). La remarquable plasticité des péricytes/cellules murales est à relier avec leur origine embryonnaire. Dans le SNC adulte, les péricytes adultes pourraient conserver les propriétés multipotentes réminiscentes des cellules de crête neurale, que l'on sait neurogéniques, vasculogéniques, et mésodermiques (Lin and Lue 2013).

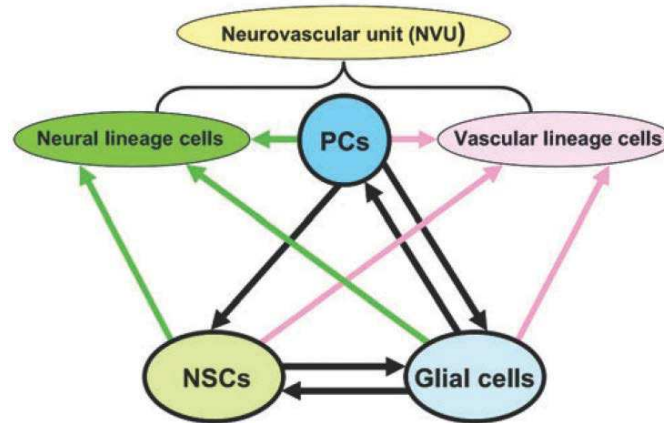


Figure 13 - Modèle de la plasticité neurovasculaire intégrant les données expérimentales de plusieurs études (d'après (Nakagomi, Nakano-Doi, et al. 2015) : PC : pericyte ; NSC : Neural stem cell ; NVU : neurovascular unit.

3. Perspectives de ces études

La plupart de ces travaux sur la plasticité neurovasculaire ont été effectués *in vitro*. Il ne faut donc pas écarter la possibilité d'un artefact lié aux conditions de culture cellulaire. Le choix des marqueurs utilisés pour déterminer l'identité endothéliale, péricytaire, et neurale est également critiquable. Les méthodes d'isolement des cellules à partir de cerveaux entiers laissent aussi entrevoir la possibilité d'une contamination dans les cultures, à l'origine d'observations partiellement erronées. Cette hétérogénéité dans les résultats résulte peut être d'un facteur spatio-temporel lors de l'isolement des NSC/ou péricytes. La régionalisation spécifique du SNC provoque des variations non négligeables du profil d'expression de certains types cellulaires à un instant donné. Des études à l'échelle unicellulaire couplées à la confirmation fonctionnelle *in vivo* de cette plasticité sont donc nécessaires dans de futurs projets (Guelfi et al. 2016). De façon remarquable, les cellules endothéliales n'ont pas encore été démontrées comme pouvant se spécifier vers le lignage neural, et cette possibilité n'est pas à écarter dans de futures études. Enfin, les mécanismes moléculaires de cette reprogrammation sont encore imprécis, que ce soit au niveau des voies de signalisations impliquées, ou au niveau du réseau transcriptionnel mis en jeu. Cette transition neurovasculaire a également été démontrée dans le contexte des tumeurs cérébrales. Ces données bibliographiques seront résumées dans le chapitre suivant.

Chapitre II : Gliomes, Glioblastome Multiforme et Néovascularisation

A. Les Gliomes

1. Définitions et épidémiologie

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes et sont issues du tissu de soutien neuronal ou glie. Ainsi, les cellules tumorales présentent des caractéristiques microscopiques similaires aux cellules gliales, et donc principalement aux astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes. D'un point de vue épidémiologique, les gliomes demeurent rares chez l'adulte (2 à 3% des cancers) alors qu'ils sont plus fréquents chez l'enfant (20 à 25% des cancers) et ainsi constituent le deuxième cancer le plus commun après les leucémies (Wiranowska 2013). Les gliomes forment un ensemble complexe de tumeurs très hétérogènes dont l'incidence est d'environ 5 cas pour 100 000 personnes dans le monde. Leur répartition varie notamment en fonction de l'âge et du sexe des sujets (Ostrom et al. 2015).

2. Classification histopathologique des gliomes

a. Historique

Etant donné l'hétérogénéité histologique des gliomes, il apparaît crucial de pouvoir les catégoriser de manière robuste et reproductible. Dès 1926, Bailey et Cushing proposent, par la théorie des restes embryonnaires, que les tumeurs primaires du SNC résultent de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades développementaux (Bailey and Cushing 1926). En 1949, Kernohan suggère que les gliomes se forment à partir de cellules gliales adultes capables de se différencier, et introduit la notion de « grading » qui classe les tumeurs en 4 groupes (I à IV) selon leur degré de malignité (Kernohan, Mabon, and et al. 1949).

La première classification de l'OMS fut établie en 1979, et fut par la suite révisée à plusieurs reprises. Elle résulte d'un consensus de spécialistes du domaine et est la seule classification officiellement reconnue au niveau international. Elle définit le type tumoral en fonction de la composante cellulaire majoritaire ; et le grade en fonction de différents signes de malignité strictement définis (densité cellulaire, atypies nucléaires, activité mitotique, prolifération microvasculaire et nécrose). Au fil des découvertes et de l'amélioration des

connaissances, elle a évolué en intégrant des données immunohistochimiques et plus récemment des données de biologie moléculaire.

A l'heure actuelle, elle est donc considérée comme la référence pour le typage histopathologique et le « grading » histo-pronostique des gliomes. L'application de ses règles est donc déterminante pour la pertinence du diagnostic médical et conditionne fortement la prise en charge thérapeutique des patients.

b. Classification de l'OMS, 4^{ème} édition de 2007 (Louis et al. 2007)

La classification en vigueur jusqu'à cette année distingue les gliomes en différents grands groupes: les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les gliomes mixtes (oligoastrocytomes). Le grade de malignité de I à IV est ensuite attribué pour chaque entité composant ces trois groupes (**Tableau 1**). Ainsi, les gliomes dits de "bas grade" comprennent les grades I et II alors que les gliomes dits de "haut grade" comprennent les grades III et IV.

Les glioblastomes appartiennent au groupe des astrocytomes et ont le grade de malignité le plus élevé (grade IV). Ils représentent 50% des gliomes et touchent des sujets âgés entre 45 et 70 ans. On distingue deux types de glioblastomes:

- Les glioblastomes primaires se développent *de novo* et sont les plus fréquents.
- Les glioblastomes secondaires se développent à partir d'un astrocytome de grade II ou III, sont plus minoritaires et affectent des patients plus jeunes.

Ces deux sous-types sont indiscernables d'un point de vue histologique mais ont été précisés grâce à la classification en vigueur de 2016. Plusieurs variantes histologiques du glioblastome sont aussi identifiées, notamment le glioblastome à cellules géantes, le glioblastome à petites cellules et le gliosarcome.

	WHO Grade			
	I	II	III	IV
<i>Astrocytic Tumors</i>				
Subependymal giant cell astrocytoma	▲			
Pilocytic astrocytoma	▲			
Pilomyxoid astrocytoma		▲		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		▲		
Diffuse astrocytoma		▲		
Anaplastic astrocytoma			▲	
Gliomatosis cerebri			▲	
Glioblastoma (including Gliosarcoma and Giant Cell GBM)				▲
<i>Oligodendroglial Tumors</i>				
Oligodendroglioma		▲		
Anaplastic oligodendroglioma			▲	
<i>Oligoastrocytic Tumors</i>				
Oligoastrocytoma		▲		
Anaplastic oligoastrocytoma			▲	
<i>Ependymal Tumors</i>				
Subependymoma	▲			
Myxopapillary ependymoma	▲			
Ependymoma		▲		
Anaplastic ependymoma			▲	

Tableau 1- Classification des gliomes selon l’OMS, 4^{ème} édition, 2007 (d’après (Louis et al. 2007)).

c. Changements apportés par la classification actuelle (mise à jour de la 4^{ème} édition, 2016) (Louis et al. 2016)

L’année 2016 marque un changement dans la définition des règles de la classification de l’OMS : celle-ci intègre désormais de manière officielle des paramètres génotypiques et moléculaires. En conséquence, elle subit des remaniements importants qui vont grandement impacter sur les méthodes diagnostiques :

- Elle ne se base plus uniquement sur le type cellulaire prédominant mais considère également le statut de certaines mutations. Ceci induit donc une restructuration qui distingue les gliomes diffus (astrocytomes et oligodendrogliomes) des autres (astrocytome pilocytique, gliome angiocentrique). De nouvelles entités apparaissent, comme le gliome diffus de la ligne médiane muté pour l’histone H3 (H3K27M, grade IV) (Tableau 2).
- Les gliomes diffus sont ensuite classés selon le statut de la mutation IDH1, et la co-délétion 1p19q.
- La notion de NOS (Not Otherwise Specified) est introduite : elle identifie les gliomes pour lesquels les informations moléculaires sont insuffisantes pour conclure d’un diagnostic précis.
- Le groupe des gliomes mixtes (oligoastrocytomes) tend à disparaître car désormais catégorisé soit en type astrocytaire, soit en type oligodendroglial de manière

dépendante au statut codéleté 1p19q. Si les données moléculaires sont insuffisantes, ces tumeurs seront classées en gliome mixte NOS (**Figure 14**).

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		Other astrocytic tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Pilocytic astrocytoma	9421/1
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Piloxyoid astrocytoma	9425/3
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	<i>9400/3</i>	Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	<i>9401/3</i>	Ependymal tumours	
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Subependymoma	9383/1
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3	Myxopapillary ependymoma	9394/1
Giant cell glioblastoma	9441/3	Ependymoma	9391/3
Gliosarcoma	9442/3	Papillary ependymoma	9393/3
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	<i>9440/3</i>	Clear cell ependymoma	9391/3
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*	Tanycytic ependymoma	9391/3
Glioblastoma, NOS	9440/3	Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	9396/3*
		Anaplastic ependymoma	9392/3
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*	Other gliomas	
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3	Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1
Oligodendroglioma, NOS	9450/3	Angiocentric glioma	9431/1
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3	Astroblastoma	9430/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	<i>9451/3</i>	Choroid plexus tumours	
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	<i>9382/3</i>	Choroid plexus papilloma	9390/0
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	<i>9382/3</i>	Atypical choroid plexus papilloma	9390/1
		Choroid plexus carcinoma	9390/3

Tableau 2 - Classification des gliomes selon l'OMS, mise à jour de 2016 : les astrocytomes et oligodendrogliomes sont désormais regroupés dans le même groupe des gliomes diffus (d'après (Louis et al. 2016)).

En ce qui concerne les glioblastomes, le statut IDH muté ou IDH « wildtype » est désormais à considérer ; et apporte notamment une indication quant au type de glioblastome rencontré (primaire ou secondaire) (Ohgaki and Kleihues 2013). La notion de glioblastome moléculaire correspond donc aux astrocytomes IDH non mutés présentant un gain du chromosome 7 ou une perte du chromosome 10. Si le statut IDH n'est pas disponible, les tumeurs sont catégorisées glioblastomes NOS (**Figure 14**). Enfin, de nouveaux variants ont été ajoutés à l'entité des glioblastomes, notamment le glioblastome épithélioïde et le glioblastome à composante neuronale primitive.

Le système de « grading » de cette mise à jour est toujours basé sur des critères histologiques et ne change donc pas par rapport à la 4^{ème} édition.

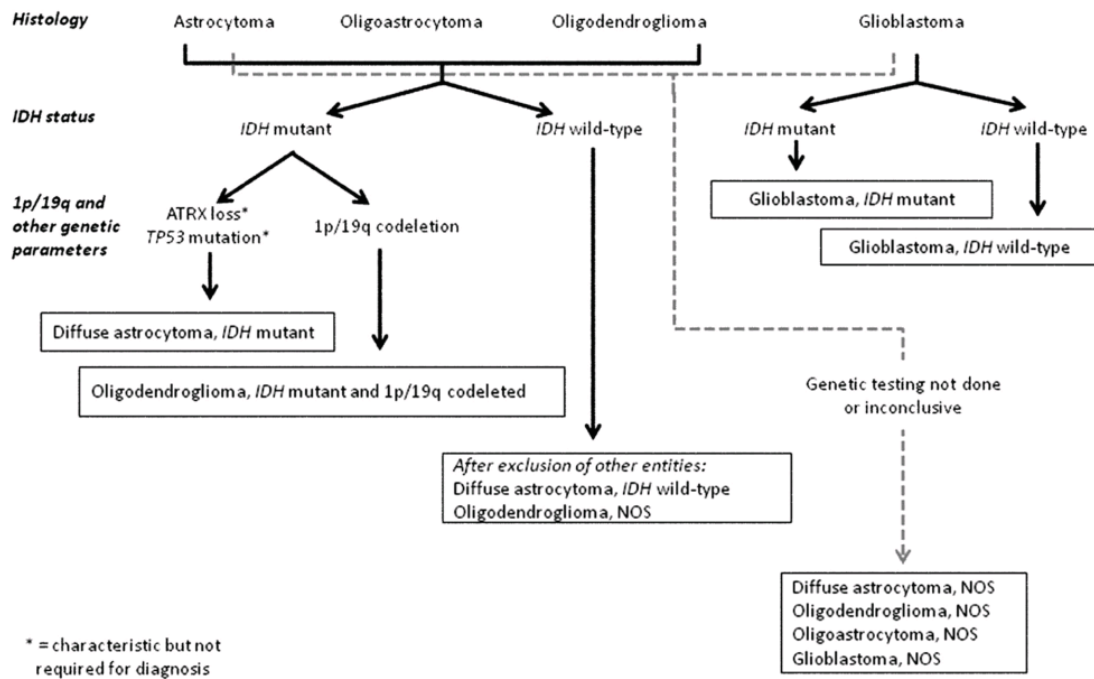


Figure 14 - Proposition « d'algorithme » pour le diagnostic des gliomes diffus basé à la fois sur des caractéristiques histologiques et génétiques, d'après la mise à jour de la classification de l'OMS en 2016 (d'après (Louis et al. 2016)).

d. Limites de la classification de l'OMS

Même si mondialement reconnue et acceptée, la classification de l'OMS présente certaines limites : elle souffre notamment d'une variabilité inter-observateur liée à l'hétérogénéité inter et intra-tumorale. En effet, elle est hautement dépendante de la localisation du prélèvement ; ne considère pas l'infiltration tumorale du parenchyme résiduel sain ; et ne prend pas en compte les données cliniques d'imagerie (Figarella-Branger and Bouvier 2005; Figarella-Branger, Labrousse, and Mohktari 2012). La mise à jour de 2016 de la classification de l'OMS apporte un niveau d'objectivité supplémentaire à l'examen anatomopathologique des gliomes.

La classification alternative histo-radiologique proposée en 1997 par le Pr. Daumas-Duport de l'hôpital Saint-Anne tente de pallier aux désavantages de la classification de l'OMS. Celle-ci considère les techniques d'imagerie et définit un système de « grading » basé sur la prise de contraste (ou non) associée à une prolifération microvasculaire (grade A ou B). Selon ces règles, deux structures sont observées dans les gliomes : la composante solide composée de cellules tumorales associées à une microvascularisation active ; et la composante infiltrante caractérisée par la dissémination des cellules tumorales dans le parenchyme sain. La classification de Saint Anne propose donc trois groupes de gliomes : les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A, les oligoastrocytomes de grade B et les glioblastomes (Daumas-Duport, Tucker, et al. 1997; Daumas-Duport, Varlet, et al. 1997).

Etant donné les améliorations apportées en 2016 par l'OMS, cette classification tend à être abandonnée en pratique.

3. Etiologie des gliomes

De nombreuses études associent certains facteurs de risques au développement des gliomes. Ces travaux considèrent d'une part des facteurs génétiques intrinsèques et d'autre part des facteurs environnementaux extrinsèques. Dans le contexte des gliomes, les divergences observées dans les études cliniques peuvent s'expliquer par la grande hétérogénéité phénotypique de ces tumeurs.

a. Susceptibilité génétique

Une petite proportion de gliome est retrouvée de manière héréditaire au sein de groupements familiaux (5 à 10% des cas) (Ostrom et al. 2015). Certaines maladies héréditaires monogéniques ont aussi été corrélées à l'apparition de gliomes, notamment la Neurofibromatose de type I et II, le Syndrome de Turcot, ou le Syndrome de Li-Fraumeni. Néanmoins, l'incidence de ces maladies combinées à la gliomagénèse demeure très rare (1% des cas) (Ohgaki and Kleihues 2005). La prédisposition génétique aux gliomes a également été étudiée et liée à plusieurs polymorphismes de gènes considérés oncogéniques ; à savoir des gènes régulant le cycle cellulaire et la prolifération comme CDKN2A/B, EGFR, TP53 ; des gènes régulant la sénescence cellulaire comme hTERT ; ou des gènes régulant le métabolisme carcinogène comme NAT2 et GST (Ostrom et al. 2015).

b. Facteurs extrinsèques

De nombreuses suspicions ont été faites concernant l'influence de l'exposition à des agents chimiques ou physiques environnementaux, la plupart basées sur des données expérimentales et pas forcément validées d'un point de vue clinique. Par exemple, l'impact potentiel des radiations non ionisantes, émises notamment par les téléphones portables, n'a clairement pas été démontré (Swerdlow et al. 2011). De même, l'effet protecteur éventuel de certaines allergies est controversé du fait de résultats contradictoires entre différentes études cliniques (Ostrom et al. 2015). De nombreux autres facteurs ; comme le tabagisme, l'alcoolisme, la consommation de dérivés nitrés, les taux d'hormones ; sont étudiés mais actuellement débattus car non démontrés comme significativement impliqués dans la susceptibilité aux gliomes (Baldi et al. 2010). Plusieurs travaux expérimentaux récents suggèrent une responsabilité des virus dans la gliomagénèse. Par exemple, le cytomégalovirus, un virus de la famille des Herpès, est retrouvé dans 80% des GBM et

module la gliomagénèse par le contrôle de certaines signalisations cellulaires oncogéniques (Cobbs et al. 2002; Cobbs et al. 2008; Soroceanu et al. 2015). A ce jour, le seul facteur physique clairement reconnu comme causal à la gliomagénèse est l'exposition aux radiations ionisantes. Celles-ci induisent des dommages irréversibles de l'ADN cellulaire et peuvent provoquer la survenue des tumeurs 7 à 9 ans après l'irradiation (Ostrom et al. 2015).

4. Prise en charge médicale des gliomes

a. Diagnostic

En France, le diagnostic des gliomes n'est pas intégré dans une procédure de dépistage nationalisée et encadrée par le système de santé, contrairement à d'autres cancers plus fréquents (sein, colon). Celui-ci dépend alors entièrement du patient et de la présence éventuelle de symptômes le poussant à effectuer un examen neurologique. Plusieurs symptômes peuvent alerter le médecin et conduire à des examens diagnostiques plus approfondis, bien que certains gliomes soient asymptomatiques. Les plus fréquents sont la survenue de crises d'épilepsie, de céphalées, de troubles de la mémoire et de la personnalité, et de déficits cognitifs. Ces signes sont entièrement dépendants de la localisation de la tumeur. La détection de signes cliniques par un neurologue conduit à un examen neuroradiologique faisant appel à l'imagerie médicale : le scanner à rayon X est réalisé en première intention et permet de révéler l'existence d'une tumeur. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est aujourd'hui l'examen de référence : elle permet d'orienter le diagnostic en précisant la taille, la localisation, l'évolution et l'aspect du gliome dans les trois plans de l'espace (**Figure 15**). En complément, le diagnostic de certitude requiert une preuve histologique issue d'une biopsie stéréotaxique ou d'une pièce d'excérèse. Le prélèvement est alors classé selon les règles anatomopathologiques définies par la classification de l'OMS (Louis et al. 2016).

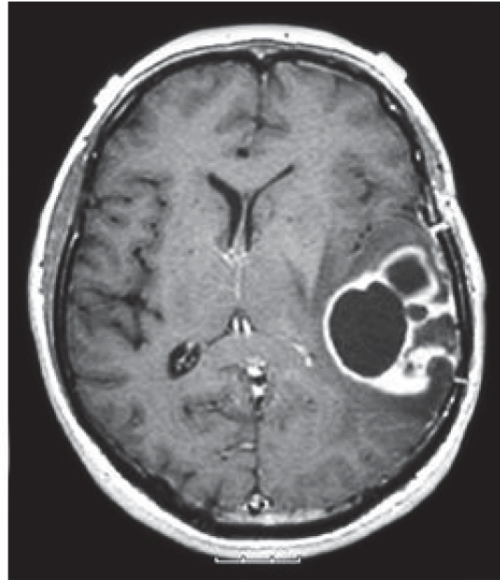


Figure 15 - Imagerie par résonance magnétique d'un glioblastome (d'après Mayfield Clinic).

b. Stratégies thérapeutiques conventionnelles

La résultante de ces examens conditionne entièrement la stratégie thérapeutique mise en place lors de la réunion de concertation pluridisciplinaire entre différents praticiens spécialistes. En fonction des données cliniques, l'âge et l'état physique du patient, il est décidé du plan de traitement.

Si cela est possible, la chirurgie est le traitement de première intention. En fonction du rapport bénéfices/risques pour le patient, celle-ci peut consister en une exérèse totale ou partielle de la tumeur. De nouvelles techniques chirurgicales de pointe utilisant la cartographie cérébrale fonctionnelle, permettent aujourd'hui de cibler au mieux les zones tumorales tout en limitant les séquelles neurocognitives post-opératoires. Néanmoins, dans le cas des gliomes de haut grade et des glioblastomes, la récurrence est souvent inévitable et la chirurgie doit être complétée par des thérapies post-opératoires adjuvantes.

La radiothérapie est envisagée dans la plupart des cas : elle consiste en un traitement qui détruit par irradiations les cellules tumorales et réduit le volume de la tumeur. Néanmoins, elle implique des effets indésirables comme l'apparition d'œdèmes cérébraux ou de symptômes de déficits neurocognitifs (Taillibert, Pedretti, and Sanson 2004).

La chimiothérapie consiste à administrer en local ou en systémique un agent cytostatique ou cytotoxique. Plusieurs molécules sont disponibles pour le traitement des gliomes. La plus utilisée est le témozolomide (TMZ), un agent alkylant qui entraîne l'apoptose des cellules tumorales (Benouaich-Amiel, Simon, and Delattre 2005). D'autres composés peuvent combiner plusieurs molécules aux actions différentes pour maximiser les

effets sur la tumeur, tout en minimisant les effets secondaires. C'est notamment le cas du protocole PCV (Procarbazine, CCNU, et Vincristine). La capacité à traverser la BHE est une limite majeure aux chimiothérapies dans les gliomes.

Il a été montré dans une étude internationale de phase III que la combinaison entre radiothérapie et chimiothérapie augmente significativement la médiane de survie des patients. Cette amélioration pronostique pourrait s'expliquer par une potentialisation des effets. Pour les gliomes de haut grade, l'association concomitante radiothérapie/chimiothérapie et TMZ constitue donc le nouveau standard thérapeutique de prise en charge des patients (Protocole Stupp) (Stupp et al. 2005).

Malheureusement, dans le cas des GBM, la résistance des cellules tumorales induit dans la grande majorité des cas la récurrence de la tumeur.

c. Médiane de survie

Le recoupement entre les données histologiques et cliniques permet d'associer aux différents grades de gliomes un indice de prédiction de la survie des patients appelé médiane de survie. Cette donnée statistique est d'une extrême importance dans l'annonce de la maladie et la prise en charge du patient (Louis et al. 2007):

- Pour les gliomes de grade II, elle est supérieure à 5 ans.
- Pour les gliomes de grade III, elle est comprise entre 2 et 3 ans.
- Pour les GBM, elle est comprise entre 12 et 15 mois après prise en charge thérapeutique et est de 31 mois dans les GBM secondaires.

B. Le Glioblastome Multiforme

1. Caractéristiques anatomopathologiques

Le glioblastome (ou glioblastome multiforme, GBM) est la tumeur primaire cérébrale la plus commune et la plus agressive chez l'adulte. Les critères de classification selon l'OMS s'appuient sur des caractéristiques histologiques, et désormais moléculaires, strictement définies pour les identifier.

A l'échelle macroscopique, ces tumeurs se développent très rapidement au niveau des hémisphères cérébraux dans les régions fronto-temporales et pariétales. Elles présentent un aspect irrégulier (d'où le terme « multiforme pour les décrire) sans réelle démarcation avec le

parenchyme environnant. La masse tumorale peut être très étendue, pouvant également disséminer dans la région contro-latérale via le corps calleux.

A l'échelle microscopique, les GBM apparaissent comme des néoplasmes extrêmement hétérogènes, ce qui explique l'existence de plusieurs variants histologiques et moléculaires. Cette hétérogénéité est également observée au sein d'une même tumeur : la densité, viabilité et morphologie des cellules anaplasiques peuvent varier entre la périphérie et la zone nécrotique centrale de la tumeur. Ces facteurs sont donc à prendre en compte dans l'analyse anatomopathologique. Des critères histologiques nécessaires au diagnostic d'un GBM ont été décrits (Louis et al. 2007) :

- **Une densité cellulaire élevée (Figure 16A)**

- **Une activité mitotique élevée**

Celle-ci est généralement mesurée par quantification du nombre de mitoses observées par champs. La positivité immuno-histochimique du marqueur Ki67 permet aussi la quantification des cellules en prolifération. En moyenne, l'indice de prolifération Ki67 est de 12,4% dans les GBMs (Burger, Shibata, and Kleihues 1986).

- **Une prolifération microvasculaire importante:**

Celle-ci est définie par une hyperplasie des cellules vasculaires, à savoir une activité mitotique élevée des cellules endothéliales et murales. Ces vaisseaux anormaux souvent thrombotiques s'organisent en structures caractéristiques sphéroïdes ou glomérulaires (d'aspect similaire au glomérule rénal) (Wiranowska 2013) **(Figure 16B)**.

- **Une nécrose caractéristique :**

Celle-ci est très importante dans la distinction des GBM par rapport à d'autres gliomes. Les cellules tumorales nécrotiques s'associent en couches et sont entourées de cellules tumorales fusiformes migratoires, formant une structure en « pseudo-palissades ». Ces structures sont souvent associées à l'hypoxie et au caractère invasif et migratoire des cellules tumorales (Wiranowska 2013) **(Figure 16C)**.

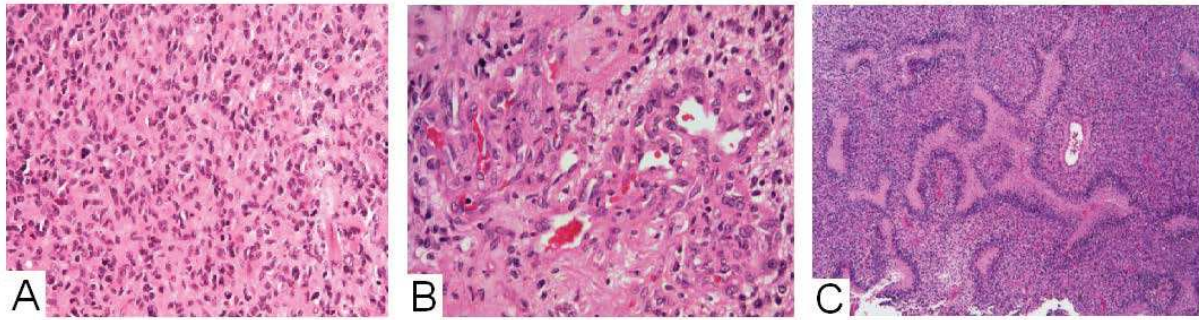


Figure 16 - Caractéristiques histologiques d'un GBM (d'après (Wiranowska 2013)) : A. Haute densité cellulaire B. Prolifération microvasculaire glomérulaire C. Structure nécrotique en pseudo-palissade.

2. Altérations moléculaires dans les glioblastomes

De manière comparable à d'autres cancers, la gliomagénèse implique des événements mutationnels intrinsèques caractéristiques. Ceux-ci induisent l'oncogénèse des cellules en activant leur prolifération et en favorisant leur survie par inhibition de l'apoptose. Ces altérations réduisent la dépendance aux facteurs de croissance des cellules ; rendent constitutivement actives des signalisations oncogéniques et enfin inhibent des programmes suppresseurs de tumeurs.

L'hétérogénéité morphologique des GBM est également retrouvée au niveau moléculaire et pourrait expliquer l'échec des thérapies actuelles. Au cours de cette dernière décennie, l'analyse génomique à haut débit de réseaux oncogéniques a permis de clarifier la complexité moléculaire des GBM. De ces travaux ont émergé des processus moléculaires récurrents, mais également des signatures moléculaires spécifiques.

a. Principales dérégulations génétiques des glioblastomes

Deux études cruciales ont ainsi permis de mieux comprendre le paysage génomique complexe des GBM et ont révélé trois signalisations majoritairement activées dans ce contexte (**Figure 17**) (TCGA 2008; Parsons et al. 2008) :

- **La signalisation RTK/RAS/PI3K/AKT**

Elle est altérée dans 88% des cas et favorise la prolifération, la survie et l'invasion des cellules tumorales. Cet axe implique l'activation constitutive d'un récepteur tyrosine kinase membranaire, le plus fréquent étant le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ; la transduction du signal par des effecteurs protéiques intracellulaires comme RAS, PI3K et AKT ; et enfin la régulation transcriptionnelle des gènes cibles (Van Meir et al. 2010).

- **La signalisation p53**

Elle est affectée dans 87% des cas et conduit principalement à l'inhibition du programme apoptotique dans les cellules tumorales. En effet, la protéine p53 est un effecteur majeur du contrôle du cycle cellulaire qui permet la réparation de l'ADN ou l'amorçage de l'apoptose en cas de situation irréversible. Cette protéine est donc inhibée dans les GBM, notamment par la surexpression des protéines MDM2 et MDM4 (Van Meir et al. 2010).

- **La signalisation pRB**

Elle est affectée dans 77% des cas et induit la perte du contrôle du cycle cellulaire dans les cellules tumorales. En effet, la phosphorylation de la protéine Rb est cruciale au contrôle des « checkpoints » du cycle cellulaire : celle-ci est donc hyperactivée dans les GBM, notamment par la suractivation de kinases comme CDK4 et CDK6 (Van Meir et al. 2010).

Les analyses cytogénétiques complémentaires confirment les mutations de ces réseaux de gènes par l'identification de remaniements chromosomiques importants. Des délétions de locus de gènes suppresseurs de tumeurs sont fréquemment observées. La perte d'hétérozygotie (LOH) la plus fréquente est celle du chromosome 10 : elle peut concerner le chromosome entier, son bras long ou bien uniquement le locus contenant le gène PTEN, un inhibiteur de l'axe RTK/AKT. D'autres délétions ont été mises en évidence, comme celles des gènes P53, CDKN2A/B, RB1 et NF1 (Chen, McKay, and Parada 2012). Au contraire, l'amplification chromosomique de locus de gènes oncogéniques est aussi fréquente : la plus commune est l'amplification du chromosome 7 qui contient le locus EGFR. Les locus des gènes PI3K, PDGFRA, CDK4, MDM2 sont aussi sujets à amplification chromosomique (Beroukhi et al. 2007) (**Figure 17**).

Plus récemment, il a été montré que la délétion hétérozygote du gène NFKBIA, un inhibiteur de la signalisation NFκB, est retrouvée dans environ 25% des GBMs. NFKBIA code pour la protéine IκBα qui en conditions basales séquestre le facteur de transcription NFκB (p50/p65) dans le cytoplasme et inhibe donc l'expression de gènes contrôlant la croissance et l'infiltration tumorale. Une déficience en IκBα (NFKBIA) active constitutivement l'axe NFκB et serait également dépendante de l'amplification du récepteur EGFR (Bredel et al. 2011) (**Figure 17**).

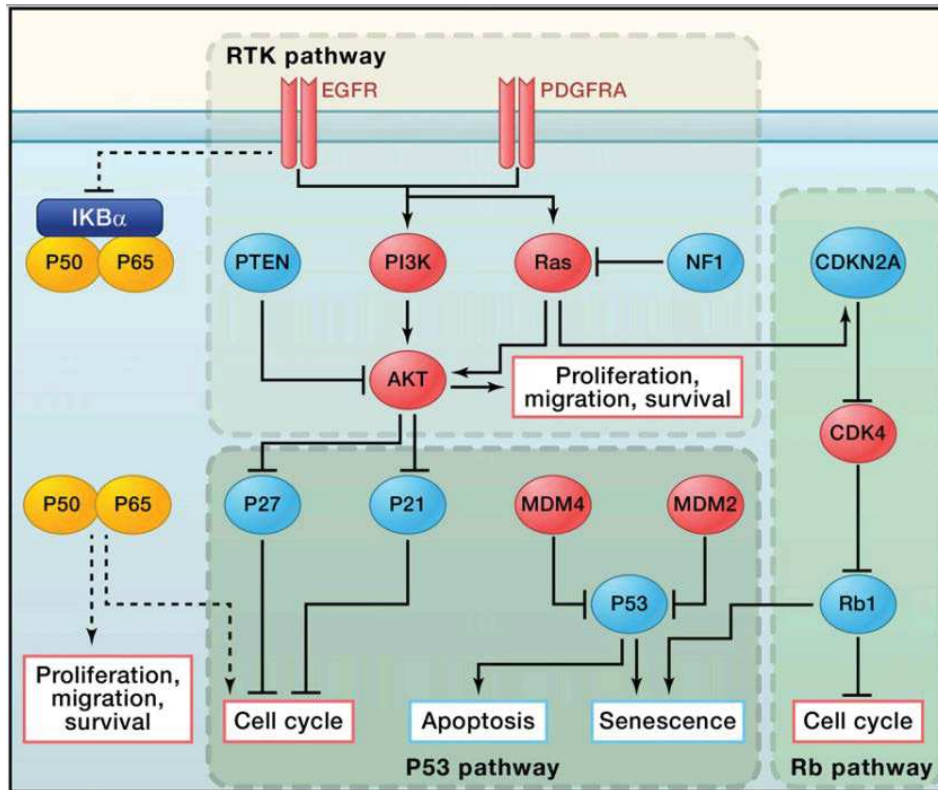


Figure 17 - Principales altérations moléculaires dans les GBM (d'après (Chen, McKay, and Parada 2012)) : les oncogènes activés sont représentés en rouge, les suppresseurs de tumeur inhibés sont représentés en bleu.

b. Les mutations IDH1 et IDH2

L'implication des mutations IDH1 et IDH2 dans la gliomagénèse constitue une avancée majeure de ces dernières années, et a provoqué la surprise de la communauté scientifique (Parsons et al. 2008). Les gènes IDH1 et IDH2 codent pour les isocitrate déshydrogénases, des enzymes métaboliques du cycle de Krebs qui convertissent l'isocitrate en α -cétoglutarate (α -KG). Les mutations très spécifiques R132 pour IDH1 et R172 pour IDH2 confèrent aux enzymes une activité « néomorphique » oncogénique : celles-ci catalysent la production du 2-hydroxyglutarate (2-HG) au dépend de l' α -cétoglutarate (Dang et al. 2010; Reitman, Parsons, and Yan 2010). Le 2-HG se comporterait comme un oncométabolite. Il pourrait notamment favoriser la croissance et l'angiogénèse tumorale en inhibant la dégradation du facteur HIF-1 α (Zhao et al. 2009). La prédominance du 2-HG par rapport au α -KG pourrait également altérer le profil de méthylation de l'ADN et de certaines histones, ce qui influencerait sur l'expression de gènes cruciaux de l'oncogénèse (Noushmehr et al. 2010; Xu et al. 2011). Etant donné les substrats multiples des enzymes du métabolisme, les mutations IDH1/2 pourraient affecter d'autres processus cellulaires contribuant à la gliomagénèse (Figure 18).

La mutation IDH1 est retrouvée dans 70 à 90% des gliomes de grades II/III alors qu'elle concerne 12% des GBM, majoritairement les GBM secondaires (Parsons et al. 2008; Yan et al. 2009). La mutation IDH2 est également détectée mais moins fréquemment, et elle est absente dans les GBM primaires (Yan et al. 2009). La détection génétique du statut IDH1 muté est cruciale au diagnostic et à la classification des gliomes selon les règles dictées par l'OMS. La mutation est aussi un marqueur pronostic favorable lié à une meilleure survie des patients (Sanson et al. 2009).

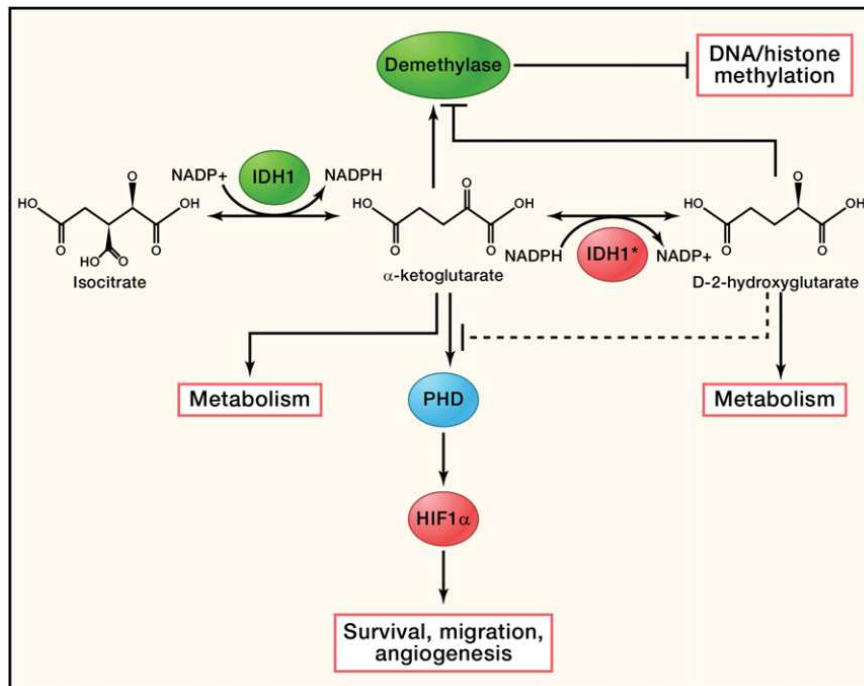


Figure 18 - Les mutations IDH1 et IDH2 et leur conséquences dans la progression des gliomes (d'après (Chen, McKay, and Parada 2012)).

c. Modifications épigénétiques

La plus importante dans les GBM affecte l'expression du gène MGMT qui code pour une enzyme de réparation de l'ADN. Le promoteur de ce gène est fréquemment hyperméthylé, ce qui inhibe son expression et donc son rôle protecteur des dommages à l'ADN (Esteller et al. 2000). Dans les GBM, cette méthylation est corrélée à un meilleur pronostic et à une meilleure réponse thérapeutique au TMZ (Hegi et al. 2005). Dans 70% des GBM, l'hyperméthylation du gène SFRP, codant pour un ligand antagoniste de Wnt, est également observée. Sa répression transcriptionnelle favorise indirectement la prolifération cellulaire en permettant l'activation de la voie Wnt (Gotze et al. 2010).

3. Classifications moléculaires des glioblastomes

L'analyse de profils d'expression génique dans différents échantillons de GBM a aussi permis de mettre en évidence des signatures spécifiques communément retrouvées et indétectables par les méthodes morphologiques standard. Cette catégorisation en différents sous-types moléculaires marque une étape cruciale dans la compréhension de l'hétérogénéité des GBM (Brennan et al. 2013).

Au sein de l'entité des GBM, des études comparatives ont tout d'abord montré que certains gènes étaient différentiellement exprimés entre les GBM primaires et GBM secondaires. Les gènes spécifiques des GBM secondaires touchent le contrôle du cycle cellulaire alors que ceux spécifiques des GBM primaires contrôlent la signalisation extracellulaire et la réponse à l'activation du stroma (Tso, Freije, et al. 2006). Ces différences sont intéressantes, notamment en rapport à l'origine différente entre les GBM primaires, qui se développent *de novo*, et les GBM secondaires qui dérivent majoritairement de gliomes de grades inférieurs (Ohgaki and Kleihues 2013). Deux publications majeures ont par la suite classé les GBM en différents sous-types moléculaires :

En 2006, les travaux de Phillips et collègues divisent les GBM en 3 sous-groupes : les proneuraux, les prolifératifs et les mésenchymateux. Les auteurs ont aussi associé à leurs données génomiques le profil cytogénétique des échantillons, ainsi que les données histologiques et cliniques disponibles (**Figure 19**) (Phillips et al. 2006).

	Proneural	Proliferative	Mesenchymal
Histological grade	WHO grade III or WHO grade IV with or without necrosis	WHO grade IV with necrosis	WHO grade IV with necrosis
Cellular morphology	Astrocytic or Oligodendroglial	Astrocytic	Astrocytic
Evolution of signature	Arises in 1° tumor, may persist or convert to Mes	Arises in 1° tumor, may persist or convert to Mes	Arises in 1° tumor or by conversion from other subtype
Patient age	Younger (~40 yrs.)	Older (~50 yrs.)	Older (~50 yrs.)
Prognosis	Longer survival	Short survival	Short survival
Histological Markers	Olig2, DLL3, BCAN	PCNA, TOP2A	CHI3L1/YKL40, CD44, VEGF
Tissue similarities	Adult and Fetal Brain	HSC, lymphoblast	Bone, cartilage, smooth musc, endothelium, dendritic cells
Biological process	Neurogenesis	Proliferation	Angiogenesis
Analogous forebrain cell	Neuroblast	Neural Stem Cell and/or Transit Amplifying Cell	Neural Stem Cell
Chromosome gain/loss	None	Gain of 7 & Loss of 10 or 10q	Gain of 7 & Loss of 10
PTEN locus	PTEN intact	PTEN loss	PTEN loss
EGFR locus	EGFR normal	EGFR amplified or normal	EGFR amplified or normal
Signaling	Notch activation	Akt activation	Akt activation

Figure 19 - La classification moléculaire de Phillips, basée sur l'expression de 35 gènes dans 76 échantillons de GBM (d'après (Phillips et al. 2006).

En 2010, l'analyse de R G Verhaak en association avec le "cancer genome atlas" apporte des précisions moléculaires à la classification de Phillips et propose de diviser les GBM primaires en 4 sous-types: les proneuraux (PN), les neuraux (NL), les classiques (CL) et les mésenchymateux (MES). Les signatures proneurales et mésenchymateuses corrélient fortement avec les résultats précédents de Phillips. Les GBM secondaires appartiennent à la catégorie proneurale. Cette classification précise également les aberrations géniques spécifiques associées à chaque sous-types : à savoir les mutations PDGFRA/IDH1 pour les proneuraux ; NF1 pour les mésenchymateux et EGFR pour les classiques et neuraux (Verhaak et al. 2010) (**Figure 20**). Dans le cas des GBM proneuraux, la subdivision G-CIMP-positif/G-CIMP-négatif (CpG island methylator phenotype) a été proposée et prend en compte le profil de méthylation de l'ADN correspondant au statut IDH1 (Noushmehr et al. 2010).

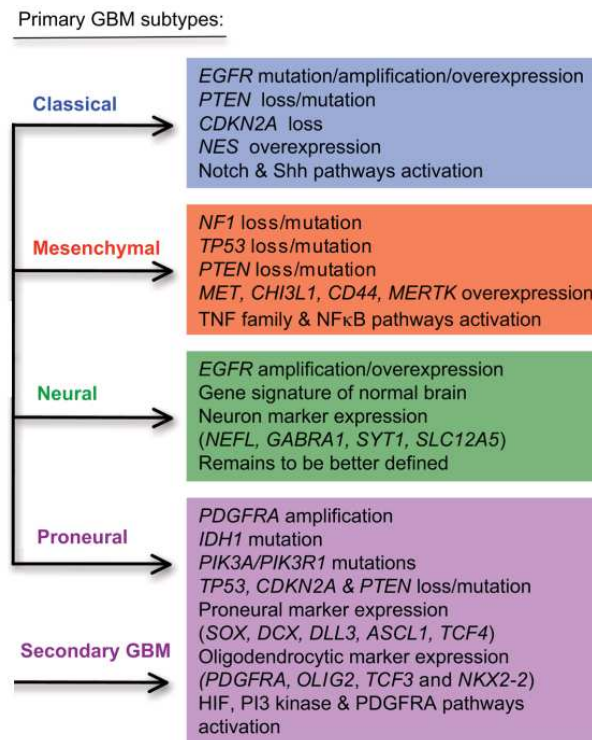


Figure 20 - La classification moléculaire de Verhaak, basée sur l'expression de 840 gènes dans 500 échantillons de GBM (adapté de (Van Meir et al. 2010)).

En complément de ces données, des études parallèles ont également regroupé les GBM en catégories moléculaires, mais de manière intégrée aux gliomes de haut grades (grade III et IV). En 2004, une première étude sur 44 gènes à partir de 85 échantillons a classé les gliomes de hauts grades en 4 groupes (1A, 1B, 2A et 2B) (Freije et al. 2004). En 2009, deux études ont également proposé différents profils moléculaires. La première définit 24 « clusters » différents et répartit les GBM dans 7 groupes, 1 groupe définissant les GBM secondaires (Gravendeel et al. 2009). La seconde définit deux entités différentes à savoir les

« oligodendroglioma-rich »(O) et les « glioblastoma-rich » (G) pouvant être subdivisées en 6 sous-types (Li, Walling, et al. 2009).

Des divergences ressortent de ces multiples études, notamment le nombre et la nomenclature des différents sous-types. De plus, ces analyses génomiques sont hautement dépendantes de paramètres prédéfinis. En effet, le choix des grades à considérer, le nombre d'échantillons de la cohorte, et les algorithmes utilisés pour l'analyse conditionnent fortement les résultats rapportés. Néanmoins, les données se recoupent entre les publications : les signatures proneurales et mésenchymateuses sont retrouvées très fréquemment, et elles définissent deux entités différentes d'un point de vue génomique, clinique et fonctionnel (Vitucci, Hayes, and Miller 2011).

La prédiction diagnostique de ces multiples profils moléculaires varie elle aussi selon les études et n'est pas encore totalement clarifiée. Cependant, il ressortirait que les GBM exprimant des gènes associés à la neurogénèse (proneuraux) corrèlent à une amélioration de la médiane de survie. Au contraire, les GBM exprimant des gènes impliqués dans la profération, l'invasion et l'angiogénèse (prolifératifs et mésenchymateux) ont un mauvais pronostic mais répondent mieux aux traitements radio-chimiothérapeutiques combinés. Cette sensibilisation augmenterait significativement la probabilité de survie des patients (Chen, McKay, and Parada 2012).

Ces classifications génomiques corrèlent des profils d'expression génique avec l'histopathologie, l'évolution clinique et les probabilités de réponses thérapeutiques des patients. Elles amènent aussi à de nouvelles questions de recherche fondamentale, notamment mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de ces signatures sur l'oncogénèse des cellules tumorales. Ainsi, la prévalence de certains sous-types pourrait refléter une diversité des cellules à l'origine des GBM. Par exemple, les mécanismes moléculaires de la transformation mésenchymateuse des cellules de GBM est au centre de nombreux travaux récents. Ces méthodes globales peuvent également présenter certaines limites fonctionnelles car elles considèrent la tumeur dans son ensemble et ne discriminent pas les cellules tumorales des cellules parenchymales environnantes.

L'ensemble de ces études génomiques constitue un outil prédictif robuste qui dans un avenir proche pourrait permettre d'envisager des thérapies « à la carte » et donc adaptées à la spécificité de chaque patient. Les changements apportés par la nouvelle classification de l'OMS sont également à considérer et pourront aussi modifier la vision moléculaire des différentes entités des GBM et moduler la stratégie thérapeutique en conséquence.

4. Origine cellulaire des glioblastomes

Par définition, la cellule d'origine d'un cancer est une cellule normale qui acquiert et accumule en premier des mutations oncogéniques amorçant la malignité. Dans le cas des GBM, l'identité de cette cellule reste encore un mystère. L'hétérogénéité des sous-types moléculaires de GBM pourrait refléter différentes cellules à l'origine de ces tumeurs (**Figure 21**).

Plusieurs hypothèses ont été formulées sur cette question, notamment via l'utilisation de modèles murins induisant la gliomagénèse. Ces modèles se basent principalement sur la surexpression d'oncogènes et/ou l'inhibition d'anti-oncogènes sous le contrôle de promoteurs spécifiques de cellules candidates putatives (Furnari et al. 2007). L'amélioration technique de ces modèles a permis d'apporter des informations de premier plan sur la génèse des gliomes.

Avant la découverte majeure de l'existence de NSC néonatales et adultes (**Introduction, Chapitre I**), les cellules pressenties à l'origine des GBM étaient les astrocytes. Ainsi, la transformation maligne d'astrocytes matures a été observée dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. Précisément, les astrocytes corticaux sont capables de réverter vers un phénotype progéniteur neural/glial après déletion des suppresseurs de tumeur INK4A/ARF (Uhrbom et al. 2005); surexpression de PDGF-B (Dai et al. 2001); ou activation de KRAS et AKT (Uhrbom et al. 2002). La combinaison fine de ces mutations par manipulation génétique des souris favorise la formation de gliomes ayant des morphologies hétérogènes et des pénétrances plus ou moins importantes. La théorie des astrocytes comme cellules d'origine aux GBM implique donc leur dédifférenciation vers un état progéniteur immature.

Cette hypothèse est désormais malmenée par l'identification de progéniteurs adultes déjà présents et compétents à la transformation maligne (Chen, McKay, and Parada 2012). En effet, d'autres travaux ont démontré le rôle potentiel des précurseurs d'oligodendrocytes (ou OPC) dans la génèse des GBM. En 2011, Liu et collègues ont notamment observé *in vivo* par une analyse de lignage en mosaïque (MADM), que les OPC sont responsables à la fois de l'initiation et de la propagation de gliomes (Liu et al. 2011). D'autres études ont impliqué les NSC et les progéniteurs neuraux NPC de la SVZ. Après déletion selective et inductible de P53, NF1 et PTEN, ces cellules sont aussi capables de former des astrocytomes (Jacques et al. 2010; Alcantara Llaguno et al. 2009). Plus récemment, il a été proposé que les sous-types moléculaires de GBM dérivent de progéniteurs NPC distincts (Alcantara Llaguno et al. 2015). La question de la cellule d'origine des GBM est aussi liée à l'identification ces dernières années de cellules tumorales multipotentes au sein des tumeurs.

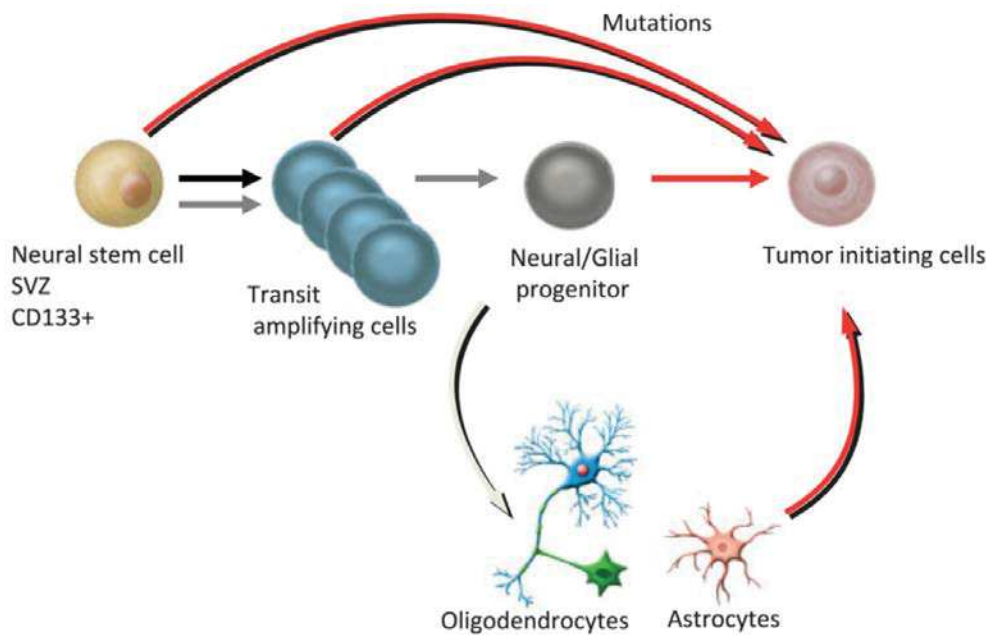


Figure 21 - Hypothèses de l'origine cellulaire des glioblastomes (adapté de (Van Meir et al. 2010)).

5. Les cellules souches de glioblastome (GSC)

a. Découverte et controverses

Le concept de cellules souches cancéreuses (CSC) a été introduit pour la première fois dans le contexte des tumeurs hématopoïétiques (Bonnet and Dick 1997). Ce modèle propose qu'au sein d'une tumeur, seule une sous-population de cellules serait capable de donner naissance aux autres cellules tumorales. Ces cellules alors dénommées cellules souches cancéreuses (CSC) ; partagent des propriétés communes aux cellules souches saines et sont définies par des critères stricts (**Figure 22**) ; à savoir 1-leur auto-renouvellement ; 2-leur capacité quasi-illimitée à proliférer ; 3-leur multipotence et 4-leur potentiel tumorigène *in vivo* après transplantations (Reya et al. 2001). Les CSC seraient donc à l'origine de l'hétérogénéité tumorale selon un modèle hiérarchique ; et présentent un intérêt considérable du fait de leur résistance aux thérapies anti-cancéreuses. De nombreuses terminologies sont employées pour désigner ces cellules, certaines pouvant prêter à confusion par rapport aux critères définissant les CSC. Par exemple, le terme « cellule initiateur de tumeur » renvoie directement à l'idée de la cellule à l'origine de la tumeur. Hors les CSC ne doivent pas être confondues avec la cellule d'origine d'une tumeur ; et sont plutôt définies comme les cellules qui maintiennent et propagent une tumeur déjà formée (Chen, McKay, and Parada 2012). Le modèle des CSC a par la suite été étendu aux tumeurs solides, notamment dans le cancer du sein (Al-Hajj et al. 2003) et dans les GBM

(Ignatova et al. 2002; Galli et al. 2004; Singh et al. 2004). Pour désigner les CSC isolées à partir des GBM, nous emploierons la terminologie GSC, pour *glioblastoma stem-like cell*.

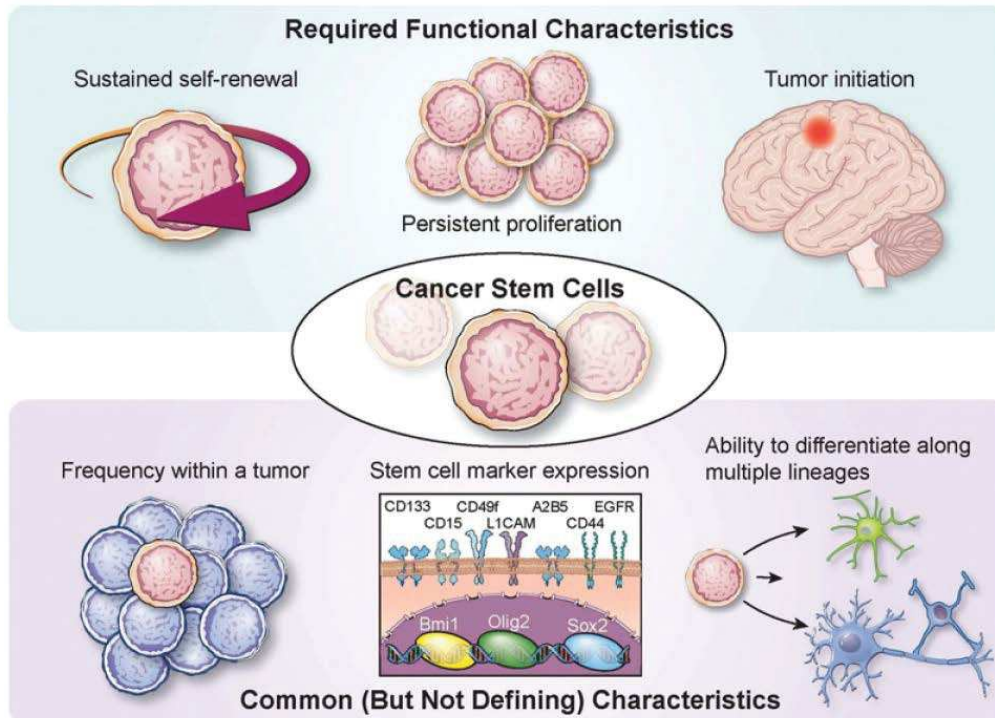


Figure 22 - Propriétés cardinales des GSC (d'après (Lathia et al. 2015)) : Les GSC sont définies par des critères fonctionnels stricts qui incluent l'auto-renouvellement, le maintien de la prolifération, et les capacités tumorigènes après transplantation, qui correspond au test fonctionnel définitif. Les GSC partagent aussi des caractéristiques communes aux cellules souches somatiques: la fréquence dans la tumeur, l'expression de marqueurs spécifiques, et la capacité de multipotence.

b. Isolement et identification

Depuis plusieurs années, la culture des GSC est réalisée selon le modèle des neurosphères. A l'origine, cette technique a été utilisée pour isoler les cellules souches de cerveaux murins. Ces cultures en suspension et en milieu riche en facteurs de croissance (EGF, bFGF) se rapprocheraient davantage des conditions réelles *in vivo* de maintien des cellules souches. Ce système permet notamment d'apprécier *in vitro* leurs propriétés de prolifération et auto-renouvellement, ainsi que leur multipotence après retrait des facteurs de croissance et ajout de sérum (Reynolds and Weiss 1992). Cette méthode a ensuite été transposée au contexte tumoral, et a permis d'isoler les GSC directement à partir de biopsies de patients (Vescovi, Galli, and Reynolds 2006) (**Figure 23**). Le modèle des neurosphères est néanmoins critiqué et d'autres méthodes en monocouches ont aussi été proposées pour entretenir *in vitro* les GSC (Pollard et al. 2009).

De nombreux marqueurs sont aussi utilisés pour les identifier ; la plupart étant également exprimé dans les cellules souches neurales saines et caractéristiques de l'état indifférencié des cellules. L'usage d'un marqueur unique de GSC fait actuellement débat. En effet, des travaux récents tendent à prouver que les GSC constituent une population de cellules hétérogène (Rennert et al. 2016); ce qui remet en question l'isolement de ces cellules à partir d'un marqueur unique. Parmi ces marqueurs, on retient les protéines de surface telles que CD133, A2B5, CD15 et CD44 ; les protéines intracellulaires comme la nestine ; ou encore les facteurs de transcription SOX2, OLIG2, BMI1 et ASCL1 (Lathia et al. 2015) (Figure 22).

Enfin, une analyse fonctionnelle *in vivo* après transplantation est nécessaire pour valider leurs capacités tumorigènes. Ceci constitue le critère définitif à leur identification en « bonne et due » forme (Figure 22).

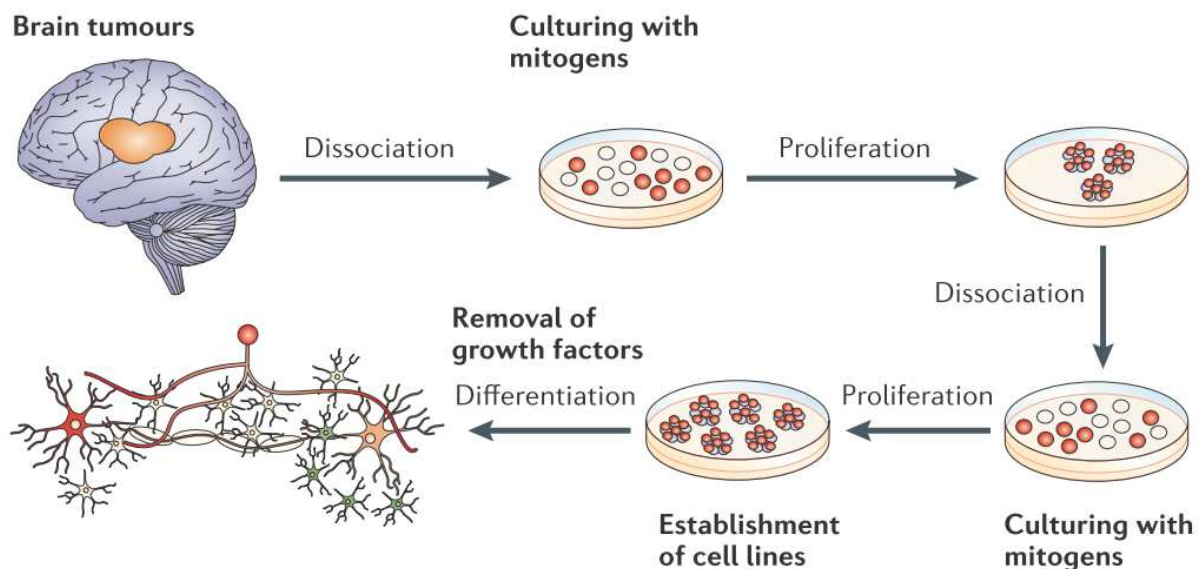


Figure 23 - Isolement des GSC à partir de biopsies humaines de GBM (d'après (Vescovi, Galli, and Reynolds 2006)).

c. Régulations intrinsèques et extrinsèques des GSC

Les GSC subissent des régulations à la fois intrinsèques de par leur nature cancéreuse, mais également extrinsèques de par l'environnement qui les entoure. Les facteurs intrinsèques incluent notamment l'instabilité génomique ainsi que des régulations épigénétiques et métaboliques spécifiques. Les facteurs extrinsèques incluent les signaux fournis par les niches tumorales, le microenvironnement cellulaire et le système immunitaire de l'hôte. La coordination fine de ces régulations permet le maintien et la résistance de la population de GSC ; tout en favorisant leurs propriétés tumorigènes (Lathia et al. 2015).

d. Chimio/Radiorésistance

Les GSC seraient déterminantes dans les récurrences et dans l'échec des thérapies actuelles. En effet, leur résistance aux chimiothérapies et radiothérapies a été démontrée dans plusieurs études (Bao, Wu, McLendon, et al. 2006). Les GSC présenteraient une activation exacerbée des points de contrôle des dommages à l'ADN via les protéines Chk1 et Chk2 (checkpoint kinases 1 et 2); ainsi qu'une augmentation de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN (Rich 2007). Elles surexpriment également des gènes de la famille des transporteurs ABC (ATP binding cassette) qui permettent l'efflux des agents de chimiothérapies (Liu et al. 2006).

e. Hétérogénéité des GSC

Les différentes techniques d'isolement des GSC entre différents groupes de recherche révèlent que ces cultures sont très hétérogènes. Cette hétérogénéité est hautement dépendante des paramètres expérimentaux pris en compte lors de l'identification des GSC. Néanmoins, elle peut aussi être considérée comme un reflet de l'hétérogénéité moléculaire des GBM. En effet, plusieurs publications ont montré des différences phénotypiques *in vitro* rappelant les différences moléculaires *in vivo* de la tumeur dans son ensemble; notamment des cultures au phénotype plus proneural, ou des cultures au phénotype plus mésenchymateux (Chandran et al. 2015). Ces différences favoriseraient différentes fonctions des GSC, notamment des capacités invasives ou angiogéniques différentes. Plus récemment, il a également été démontré par des techniques génomiques à l'échelle d'une cellule ; que plusieurs sous-types de GSC pouvaient co-exister au sein d'une même tumeur, suggérant aussi une hétérogénéité intratumorale des GSC (Rennert et al. 2016). L'hétérogénéité des GSC pourrait aussi refléter différentes cellules d'origine putatives des GBM (Siebzehnrubl et al. 2011). Ceci complique grandement le ciblage spécifique des GSC, qui peuvent alors être considérées comme des « cibles mouvantes » aux identités multiples (Nakano 2015).

C. Néovascularisation dans les Glioblastomes

1. Les niches tumorales et le maintien du réservoir de GSC

La découverte des GSC et leurs implications dans la résistance thérapeutique compliquent la compréhension des mécanismes liés à la gliomagenèse. Tout comme les cellules souches saines, il a été proposé que les GSC résident dans des écosystèmes spécifiques qui fournissent des signaux indispensables à leur maintien et à leur tumorigénicité. La mise en évidence de ces microenvironnements particuliers rajoute un niveau de complexité à l'étude des GSC. En effet, les GSC doivent désormais être considérées comme intégrées dans ces compartiments. Trois niches spécialisées ont été décrites dans les GBM. La composante vasculaire est majeure dans les trois systèmes, mais d'autres composants cellulaires interviennent, comme les cellules immunitaires, microgliales, neuronales, gliales et tumorales (Hambardzumyan and Bergers 2015). De plus, l'hypoxie et la nécrose sont déterminantes au maintien de l'intégrité de ces niches.

a. La niche périvasculaire

Le concept de niche périvasculaire des GSC a été défini suite aux travaux qui ont démontré une forte association *in vivo* et *in vitro* entre les GSC et les CE. En effet, à partir d'échantillons de GBM et autres tumeurs cérébrales, C Calabrese et collègues ont observé, de manière statistique, que des cellules exprimant CD133 et nestine sont fréquemment retrouvées à proximité de cellules exprimant CD34. Cette forte association est également confirmée *in vitro* en culture bidimensionnelle sur matrice de matrigel. Après xénogreffes orthotopiques, les auteurs observent aussi que l'intégrité du réseau vasculaire module la croissance des tumeurs, et impacte sur les capacités tumorigènes des GSC (Calabrese et al. 2007). Ceci suggère que les CE sont capables de sécréter des facteurs nécessaires à l'auto-renouvellement des GSC. Depuis ces travaux, de nombreuses autres études se sont focalisées sur l'interaction étroite entre GSC et CE. Plusieurs effecteurs moléculaires modulant ce dialogue ont ainsi été identifiés ; notamment la voie Notch, sHH et l'oxyde nitrique (eNOS) qui favorisent l'auto-renouvellement des GSC et sont contrôlés par les CE (Guelfi et al. 2016). Plus récemment, l'expression endothéliale des Ephrines (EphB2) a été montrée comme un régulateur de la prolifération des GSC *in vivo* (Krusche et al. 2016). Les cytokines, comme l'IL8 (Infanger et al. 2013) ; et les molécules d'adhérence comme les intégrines (Burgett et al. 2016) et les JAM (junctional adhesion molecule) (Turpin et al. 2015) constituent également des facteurs importants dans le maintien des niches périvasculaires. Les niches périvasculaires sont aussi composées de cellules stromales qui modulent

fortement cette interaction (Hambardzumyan and Bergers 2015) (**Figure 24**). Outre le maintien du réservoir de GSC par cet écosystème, les GSC favorisent en retour les mécanismes de néovascularisation.

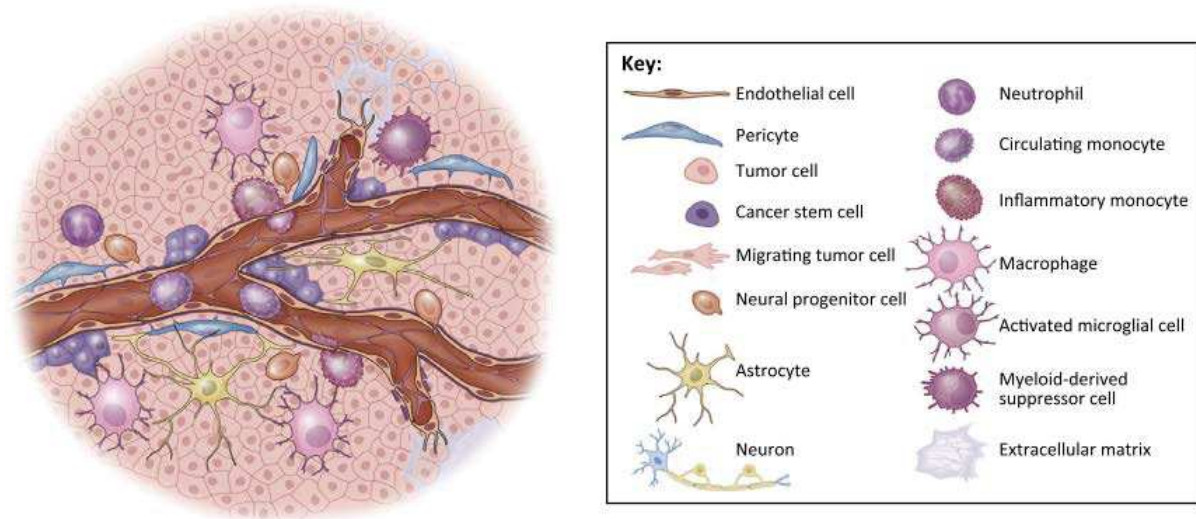


Figure 24 – Composants cellulaires de la niche périvasculaire des GBM (adapté de (Hambardzumyan and Bergers 2015)).

b. La niche hypoxique

Les GBM sont des tumeurs faiblement oxygénées : l'hypoxie y est donc prédominante et maintiendrait les GSC indifférenciées. Ce mécanisme est principalement contrôlé par le facteur de transcription HIF-1 α ; qui est activé en réponse à des faibles concentrations en oxygène environnant. Par la suite, ce facteur active l'expression de gènes nécessaires à l'auto-renouvellement des GSC (Filatova, Acker, and Garvalov 2013). Les niches hypoxiques des GBM présentent une cytoarchitecture spécifique : le cœur nécrotique est la région la plus pauvre en oxygène et il est entouré par des structures cellulaires dites en pseudo-palissades. Cette topographie spécifique constitue un critère important d'identification histopathologique des GBM (Hambardzumyan and Bergers 2015) (**Figure 25**).

L'activation des réponses à l'hypoxie est intimement liée à l'intégrité du réseau vasculaire environnant, qui est fortement altéré dans le contexte des tumeurs. De fait, il apparaît désormais que les niches périvasculaires et hypoxiques constituent une seule et même niche pour les GSC (Turpin et al. 2015).

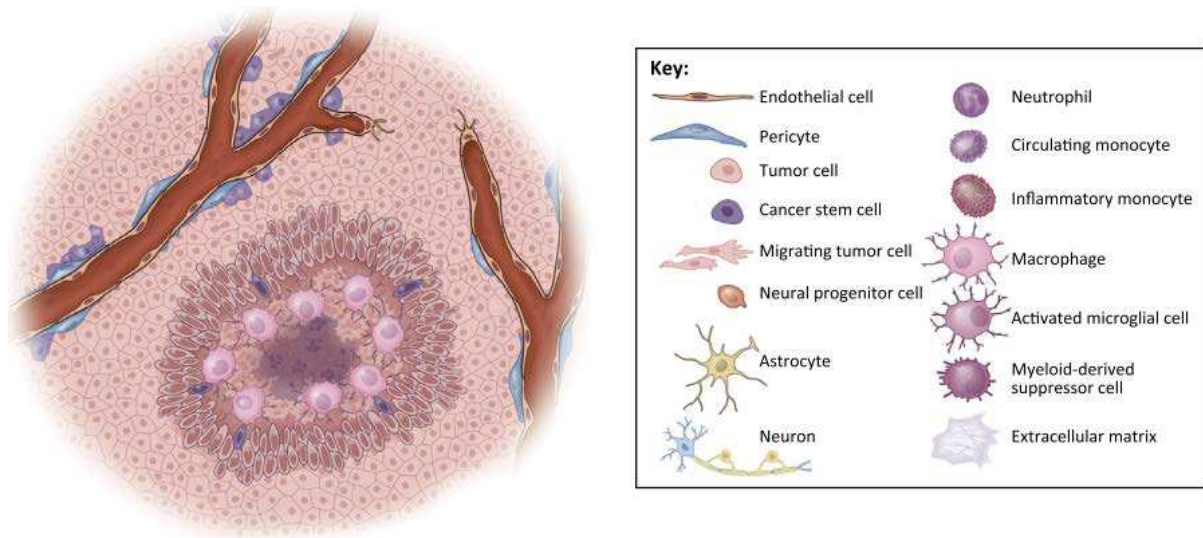


Figure 25 – Composants cellulaires de la niche hypoxique des GSC : le cœur nécrotique tumoral est entouré par une structure en pseudo-palissade composée de cellules tumorales au phénotype migratoire (adapté de (Hambardzumyan and Bergers 2015)).

c. La niche invasive

L'hypoxie au niveau des zones nécrotiques pseudo-palissadiques induit la migration des cellules tumorales. Celles-ci vont envahir le parenchyme environnant grâce au réseau vasculaire pré-existant (**Figure 26**). Cette invasion périvasculaire implique notamment les MMP (MMP2 et MMP9), et suggère une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules tumorales. Cette migration via les vaisseaux promeut également un phénotype CSC des cellules tumorales, qui seraient alors plus tumorigènes dans ces conditions (Hambardzumyan and Bergers 2015). Ces observations ont donc suggéré l'existence d'une niche invasive qui favorise l'agressivité et la dissémination des GSC. Cet écosystème est également lié aux niches hypoxiques et périvasculaires. On pourrait alors formuler l'hypothèse d'une seule et même niche qui assurerait différentes fonctions selon les besoins.

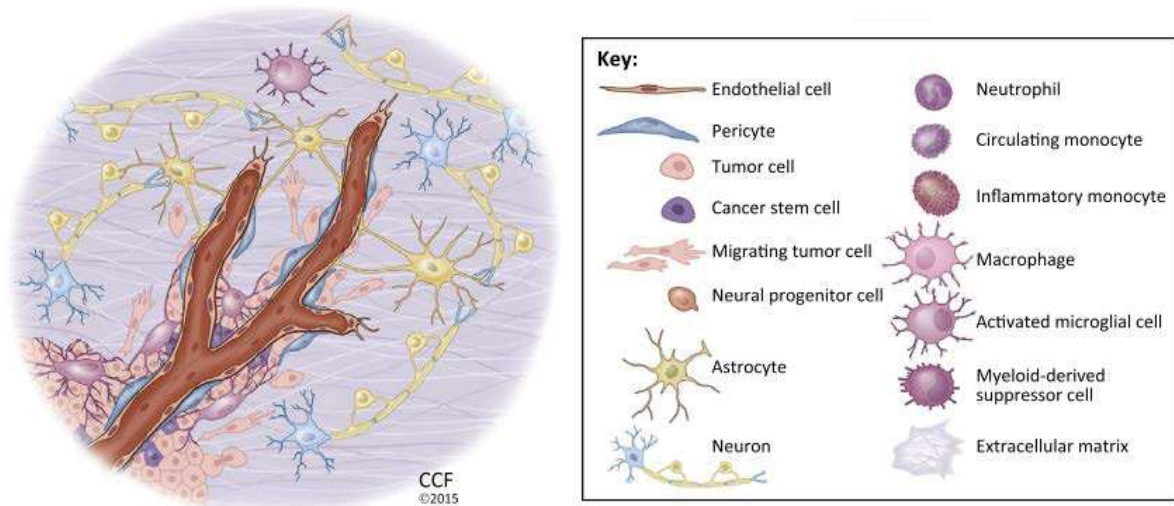


Figure 26 – Composants cellulaires de la niche invasive des GSC (adapté de (Hambardzumyan and Bergers 2015)).

2. Mécanismes de néovascularisation dans les GBM

Le lien étroit entre les GSC et les cellules vasculaires au sein des niches périvasculaires suggère également que les GSC contrôlent activement les processus de néovascularisation ; et cette hypothèse a été démontrée dans de nombreuses études. La prolifération microvasculaire et l'hyperplasie endothélio-capillaire constituent des critères indispensables au diagnostic des GBM selon la classification de l'OMS 2016 (Louis et al. 2016). En effet, les GBM font partie des tumeurs solides les plus vascularisées (Brem, Cotran, and Folkman 1972). Le ciblage spécifique de cette composante vasculaire présente un intérêt considérable en termes de thérapies. Cette stratégie est déjà employée en clinique, notamment grâce au bevacizumab (Avastin) qui cible le VEGF ; mais elle s'avère peu efficace sur la survie des patients.

La vascularisation des GBM implique majoritairement l'angiogénèse stimulée par les cellules tumorales. D'autres mécanismes alternatifs ont été décrits et nécessitent une validation plus formelle, car ils pourraient constituer une stratégie d'échappement thérapeutique expliquant la récurrence (Hardee et Zagzag 2012). Les différents mécanismes identifiés dans les GBM emploient des voies communes, et sont liés entre eux de manière complexe (Figure 27).

L'étape préliminaire à la vascularisation correspond à la « co-option » des cellules tumorales autour du réseau vasculaire pré-existant (Zagzag et al. 2000; Holash et al. 1999). Le contact avec les vaisseaux favorise la croissance tumorale, la nécrose et l'hypoxie, qui à

terme déclenchent l'angiogénèse et le bourgeonnement angiogénique des cellules endothéliales (Brem 1976). Au niveau moléculaire, la vascularisation par « co-option » et l'angiogénèse emploient des effecteurs moléculaires communs, réminescents du contexte physiologique. L'axe central implique la signalisation du VEGF (Plate et al. 1992) qui active la prolifération des cellules endothéliales ; et induit la déstabilisation du réseau vasculaire, notamment via l'angiopoiétine 2 (Ang2) (Reiss, Machein, and Plate 2005) et l'activation des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire MMP (MMP2 et MMP9) (Lakka, Gondi, and Rao 2005). Les signalisations Dll4-Notch1 (Schmidt, Brixius, and Bloch 2007) et les Ephrines (Sawamiphak et al. 2010) sont impliquées dans le bourgeonnement des cellules endothéliales « tip » ; et les effecteurs SDF1-CXCR4 (Zagzag et al. 2006) et PDGF-B/PDGFR β permettent le recrutement des péricytes et la stabilisation du réseau vasculaire nouvellement formé. L'angiogénèse dans les gliomes est fortement dépendante des conditions hypoxiques et est notamment régulée par la signalisation HIF-1 α qui active la sécrétion de VEGF dans l'environnement tumoral (Hardee et Zagzag 2012). Les GSC ont été directement impliqués dans ces processus, notamment par la sécrétion de SDF1 et VEGF en réponse aux conditions hypoxiques (Folkins et al. 2009; Bao, Wu, Sathornsumetee, et al. 2006). L'angiogénèse peut également être indépendante de l'hypoxie dans les GBM (Parliament et al. 2000).

La vasculogénèse représente un autre mécanisme de néovascularisation dans les GBM qui récapitulerait les étapes de vascularisation embryonnaire : elle impliquerait le recrutement et la différenciation de progéniteurs putatifs de type EPC issus de la moelle osseuse (Machein et al. 2003; Lyden et al. 2001). La vasculogénèse est actuellement débattue, notamment à cause des difficultés à identifier formellement les EPC. Elle emploierait des effecteurs moléculaires communs à l'angiogénèse; et les GSC pourraient contrôler certains de ces signaux moléculaires (Hardee et Zagzag 2012).

Un autre mécanisme alternatif à l'angiogénèse est le « vascular mimicry », qui implique la formation d'un réseau vasculaire « de fortune » par les cellules tumorales au dépend des cellules endothéliales. Les modalités moléculaires du « vascular mimicry » sont encore imprécises ; néanmoins les GSC pourraient y contribuer activement (Hardee et Zagzag 2012).

L'ensemble de ces processus conduit à des structures vasculaires anormales, désorganisées et la plupart du temps non fonctionnelles (De Bock et al. 2009). Dans ce contexte, les cellules endothéliales sont peu cohésives et très peu stabilisées par les péricytes : l'intégrité de la BHE n'est donc pas maintenue (Jain 2005).

Enfin, il a également été montré que les GSC peuvent se transdifférencier en cellules endothéliales ou en péricytes, ce qui ajoute un niveau de complexité supplémentaire à l'étude de la vascularisation dans les GBM.

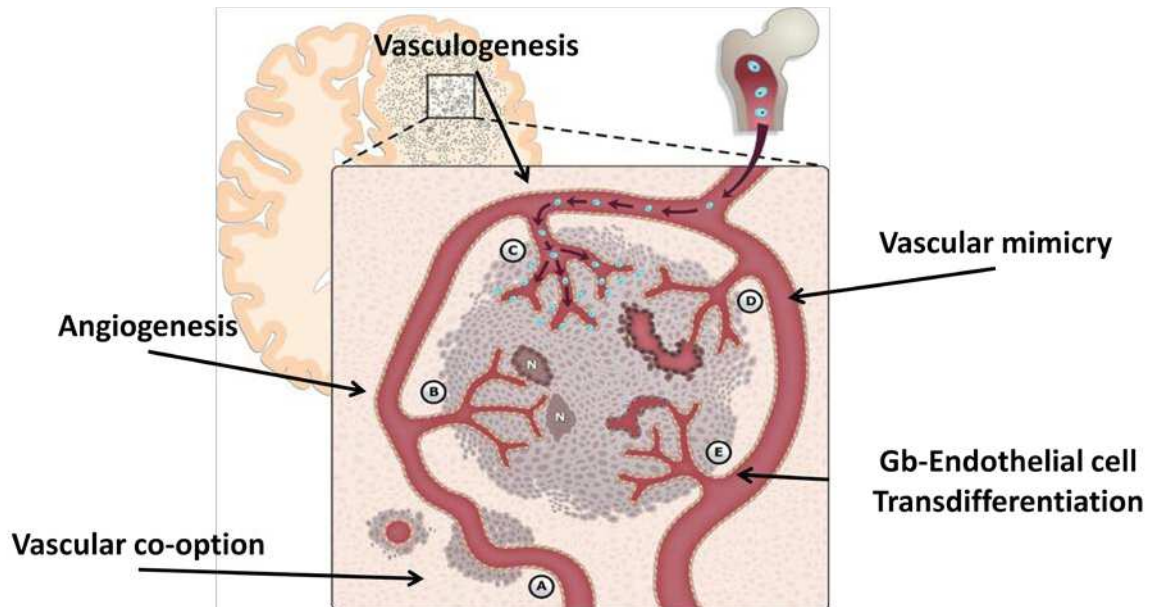


Figure 27 – Mécanismes de néovascularisation dans les GBM (d'après (Hardee et Zagzag 2012)).

3. Transdifférenciation vasculaire des GSC

Des travaux récents ont ainsi démontré la capacité des GSC à se transdifférencier en cellules vasculaires : deux idées s'opposent. Certaines publications favorisent la transdifférenciation endothéliale, alors que d'autres infirment ces observations et favorisent l'idée d'une transdifférenciation péricytaire (Figure 28).

a. La transdifférenciation endothéliale des GSC

Les premières preuves expérimentales de la transdifférenciation endothéliale des cellules tumorales découlent d'études basées sur l'analyse d'échantillons de patients dans le contexte des mélanomes et neuroblastomes (Pezzolo et al. 2007; Pisacane, Picciotto, and Risio 2007).

Dans les neuroblastomes (NB), Pezzolo et collègues ont combiné l'immunofluorescence des marqueurs endothéliaux CD31 et CD105 avec l'hybridation *in situ* par fluorescence (IF-FISH) du locus MYCN, gène communément amplifié dans les NB. Ils ont tout d'abord observé des CE amplifiées pour MYCN sur des coupes de patients ; dans des proportions corrélant au grade des tumeurs, et ont notamment écarté la possibilité d'une

transdifférenciation péricytaire. Après xénogreffes sous-cutanées de lignées cellulaires de NB, ils ont également observé que le réseau vasculaire pouvait être formé de cellules tumorales (Pezzolo et al. 2007). La contribution spécifique du phénotype CSC fut par la suite proposée dans le cancer du sein (Bussolati et al. 2009), et dans le cancer de l'ovaire selon un mécanisme indépendant du VEGF (Alvero et al. 2009).

Dans les GBM, deux publications concomitantes ont démontré la capacité des GSC à se transdifférencier en « véritables » CE (Ricci-Vitiani et al. 2010; Wang et al. 2010). Les deux études ont utilisé la technique d'IF-FISH et ont observé directement sur des coupes la présence de CE aux aberrations génétiques, notamment une amplification du locus EGFR. Ces travaux ont également démontré cette plasticité *in vitro* après dissociation de biopsies de GBM, et suggèrent que les vaisseaux ont une origine majoritairement tumorale après xénogreffes de GSC. *In vivo*, Ricci-Vitiani et collègues ont utilisé un système élégant de ciblage sélectif des CE dérivées des GSC (système Tie2-tk) ; et observent en conséquence une réduction et dégénération des tumeurs après xénogreffes. Ces données suggèrent une contribution majeure de la transdifférenciation endothéliale à la progression tumorale (Ricci-Vitiani et al. 2010). D'autres études antérieures ont également analysé ces phénomènes *in vitro* : les GSC sont capables de former des structures tubulaires en matrice de matrigel, notamment dans un milieu de culture endothélial, et sous l'influence de l'hypoxie (Zhao et al. 2010). La transdifférenciation endothéliale pourrait impliquer des progéniteurs multipotents transitoires comparables à des EPC ; néanmoins ces hypothèses n'ont pas été formellement validées (Zhao et al. 2010; Dong et al. 2011; Zheng et al. 2013). La plasticité endothéliale des GSC a été directement corrélée à la chimiorésistance, et impliquerait des mécanismes moléculaires indépendants du VEGF (Soda et al. 2011). Le lien entre transdifférenciation endothéliale et chimiorésistance a également été démontré dans le contexte des carcinomes hépatocellulaires (Marfels et al. 2013).

Au contraire, d'autres publications ont réfuté l'hypothèse d'une transdifférenciation endothéliale par les GSC. En effet, par l'utilisation de marqueurs fluorescents distinguant les CE des GSC, il a été montré que ces deux types cellulaires sont capables de fusionner, suggérant des artéfacts potentiels dans les études précédentes (El Hallani et al. 2014). La transdifférenciation endothéliale a aussi été réfutée dans les carcinomes hépatocellulaires (Ghanekar et al. 2013).

Au niveau moléculaire, cette reprogrammation des GSC demeure encore imprécise, notamment en ce qui concerne les facteurs de transcription impliqués. Très récemment, le facteur LMO2 ; qui est central durant la spécification hématopoïétique et endothéliale ; a été démontré comme potentiel inducteur du phénotype vasculaire endothélial des GSC via régulation directe de l'expression de la VE-Cadhérine. De plus, LMO2 est exprimé chez les

patients atteints de GBM, mais les auteurs n'ont pas examiné l'origine tumorale ou non de ces cellules (Kim et al. 2015). Dans d'autres contextes, des effecteurs transcriptionnels précis de cette plasticité ont été identifiés, notamment l'axe Twist1-Jagged1/KLF4 dans des lignées HNC (head and neck cancer cell lines) (Chen et al. 2014), et le complexe SOX9-ER81 dans les tumeurs mammaires (Endo et al. 2008).

L'hypothèse d'une transdifférenciation endothéliale des GSC n'est pas encore formellement admise, et nécessite des travaux pour approfondir les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette plasticité. Ces observations dans le contexte tumoral font également miroir à la plasticité des NSC envers les lignages vasculaires (**Introduction, Chapitre I**). De futures études dans le contexte des GBM devront notamment examiner l'implication d'effecteurs moléculaires physiologiques intervenant au cours de la spécification vasculaire embryonnaire.

b. La transdifférenciation péricytaire des GSC

D'autres travaux favorisent plutôt l'hypothèse d'une transdifférenciation péricytaire des GSC. Des études préliminaires ont notamment montré la capacité de lignées cellulaires de glioblastome à se différencier en cellules mésenchymateuses (Tso, Shintaku, et al. 2006) ; et qu'une sous-population de GSC est capable de se différencier vers les lignages chondro-ostéogéniques (Ricci-Vitiani et al. 2008). Etant donné les similitudes entre péricytes et cellules mésenchymateuses (**Introduction, Chapitre I**), la question d'une plasticité péricytaire a été posée et démontrée dans plusieurs publications (**Figure 28**).

En 2010, El Hallani et collègues observent qu'une fraction de GSC CD133⁺ est capable de se transdifférencier en cellules de muscle lisse *in vitro* pour former des tubules s'apparentant à du « vascular mimicry » (VM) (El Hallani et al. 2010). En 2012, une autre publication a notamment montré que la transdifférenciation des GSC en cellules murales est majoritaire en comparaison de la transdifférenciation endothéliale, et que ce processus implique l'expression et l'activité du récepteur VEGFR2 (Scully et al. 2012).

En 2013, le groupe de J Rich a formellement validé l'hypothèse d'une transdifférenciation des GSC en « véritables » péricytes. Par une étude *in vivo* utilisant des rapporteurs fluorescents de l'activité du promoteur de gènes péricyitaires (α SMA et desmine), ils ont prouvé qu'une fraction de GSC se différencie en péricytes et interagit très fortement avec les vaisseaux de l'hôte. De plus, ils ont réfuté l'hypothèse d'une transdifférenciation endothéliale, en utilisant des rapporteurs spécifiques du lignage endothélial. Leurs observations ont été confirmées directement chez les patients, notamment par la détection en IF-FISH de cellules EGFR amplifiées/PTEN délétées

exprimant le marqueur α SMA. Au niveau moléculaire, l'axe TGF β permettrait le recrutement vasculaire des GSC transdifférenciées, par l'intermédiaire du chimiotactisme SDF1/CXCR4. Enfin, par ciblage sélectif de ces GSC transdifférenciées (ou G-péricytes), ils ont observé une réduction significative de la croissance des tumeurs en greffes orthotopiques. Les G-péricytes seraient donc cruciaux à la progression tumorale, notamment par leur stabilisation du réseau vasculaire endothélial (Cheng et al. 2013).

Les modalités moléculaires de cette plasticité sont encore obscures. Une étude récente a analysé les conséquences du traitement des GSC par le BMP4 : selon les doses, celui-ci induirait différents effets sur la différenciation des GSC. Ainsi, des doses faibles favoriseraient un phénotype neuronal ou astrocytaire ; alors que des doses fortes favoriseraient un phénotype musculaire lisse (Videla Richardson et al. 2015).

A l'opposé de ces travaux, certains groupes ont réfuté la transdifférenciation péricytaire et ont notamment montré après xénogreffes que la majorité des péricytes tumoraux étaient dérivés de l'hôte (Svensson et al. 2015). La formation de cellules hybrides résultant de la fusion entre GSC et péricytes endogènes a également été démontrée, et suggère aussi de potentiels artéfacts expérimentaux (Caspani et al. 2014).

La transdifférenciation péricytaire des GSC apparait centrale dans la vascularisation et la croissance des GBM, au même titre que la transdifférenciation endothéliale. Ces deux processus pourraient notamment expliquer la résistance des GSC, et de futures études sont nécessaires pour élucider les mécanismes complexes de cette plasticité neurovasculaire.

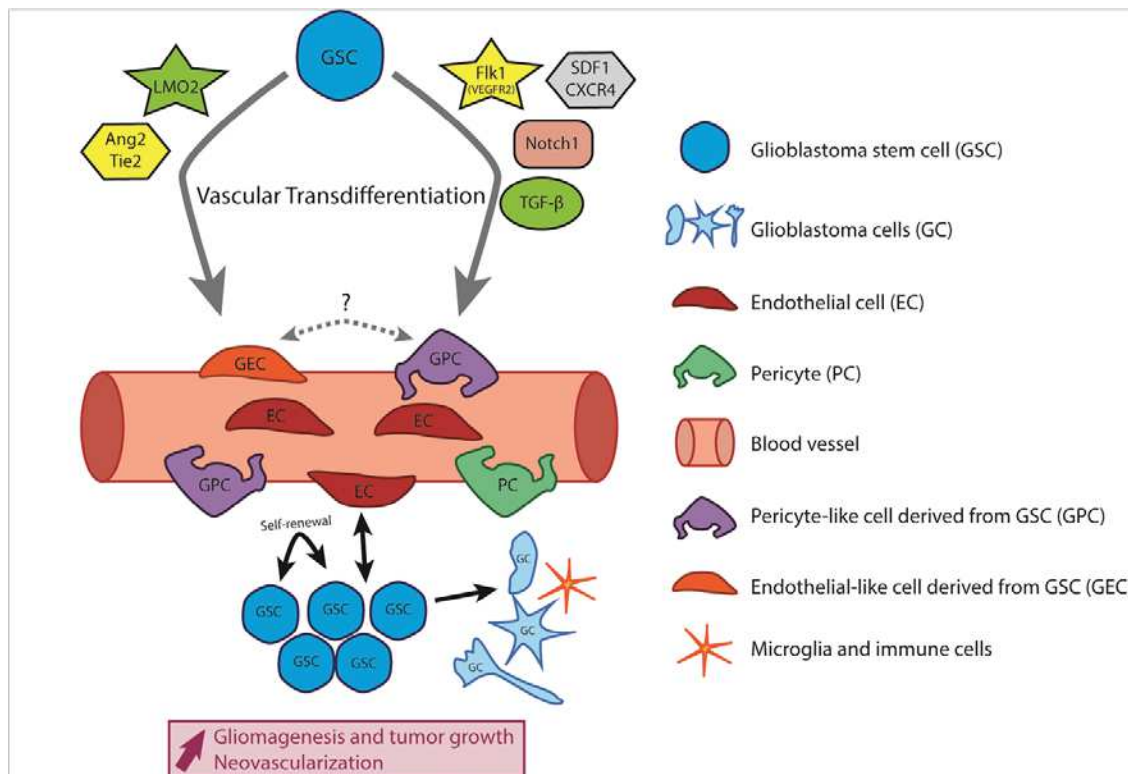


Figure 28 – La transdifférenciation vasculaire des GSC au sein de la niche périvasculaire : opposition entre la transdifférenciation endothéliale et la transdifférenciation péricytaire et effecteurs moléculaires impliqués (d'après (Guelfi et al. 2016)).

Chapitre III : Voie de Signalisation Notch dans les glioblastomes

A. Principes généraux de la signalisation Notch

1. Découverte et généralités

Le gène *Notch* a été découvert au début du XX^e siècle dans le laboratoire de Thomas Hunt Morgan. Précisément, John S Dexter observe chez un mutant de *D. Melanogaster* une encoche dans l'extrémité distale de l'aile qu'il nomme alors *Notch* (Dexter 1914). D'autres caractéristiques chez ces mutants sont alors observées, notamment des veines supplémentaires sur l'aile, ce qui suggérait déjà un rôle pléiotropique de cet allèle. Il faut attendre les travaux de D Poulson dans les années 1930 pour entrevoir une fonction de Notch au cours de l'embryogénèse et dans l'induction du phénotype neurogénique (Poulson 1937). Ainsi, les études chez la drosophile ont été pionnières pour élucider Notch comme au centre d'une voie de communication cellule-cellule qui régule la transcription de gènes spécifiques (Artavanis-Tsakonas, Matsuno, and Fortini 1995; Schroeter, Kisslinger, and Kopan 1998). Ses orthologues furent découverts chez le nématode, le xénope, et enfin chez l'Homme par des travaux sur les leucémies (Ellisen et al. 1991). Cette signalisation est conservée chez tous les êtres multicellulaires à travers l'évolution et régule des fonctions cellulaires majeures et très diverses au cours de l'embryogénèse et la vie adulte. L'implication moléculaire de Notch a également été associée à des pathologies humaines, notamment les cancers. La dynamique complexe de cette cascade fait l'objet d'importantes études qui visent à mieux la caractériser et la cibler pharmacologiquement dans le contexte pathologique (Yamamoto, Schulze, and Bellen 2014). Les travaux de recherche sur ce sujet sont donc très nombreux et interdisciplinaires.

2. Acteurs moléculaires

a. Récepteurs Notch

La famille Notch est composée de quatre récepteurs chez les mammifères (Notch1-4) qui sont des protéines transmembranaires à domaine unique de type I. Plusieurs domaines de ces récepteurs ont été décrits (Yamamoto, Schulze, and Bellen 2014) (**Figure 29**) :

- Le domaine intracellulaire ou NICD constitue la partie du récepteur qui agit comme co-activateur transcriptionnel. Il se caractérise par différentes régions protéiques, notamment un domaine d'adressage au noyau, un domaine de transactivation, et un domaine d'association à ses partenaires transcriptionnels. Il peut également subir différentes modifications post-traductionnelles.
- Le domaine extracellulaire ou NECD est composé de multiples motifs EGF-like répétés en tandem (29 à 36), qui permettent son interaction avec des ligands spécifiques exprimés à la membrane de cellules voisines.

Après traduction de la chaîne protéique, le récepteur mature dans l'appareil de Golgi et subit un premier clivage S1 séparant NICD de NECD : les deux domaines interagissent donc par des liaisons non covalentes.

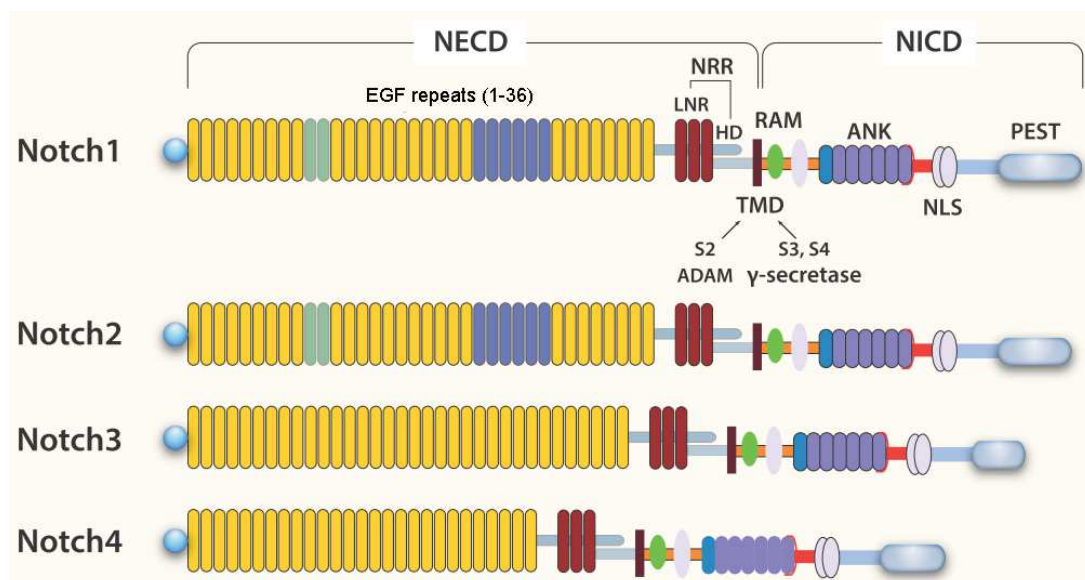


Figure 29 – Structure de la famille de récepteurs Notch (1-4) : Les récepteurs diffèrent par leurs domaines NECD (nombre de motifs EGF-like répétés) et par leurs domaines de transactivation PEST. LNR : Lin repeats ; NRR : negative regulatory region ; TMD : transmembrane domain ; NLS : nuclear localization sequences ; ANK : ankyrin repeats ; HD : heterodimerization domain ; PEST : transactivation domain (d'après (Yavropoulou, Maladaki, and Yovos 2015)).

b. Les ligands

Les ligands interagissant avec les récepteurs Notch sont également des protéines à domaine transmembranaire unique de type I. Les domaines extracellulaires possèdent aussi des motifs EGF-like répétés en tandem. Ils sont regroupés en deux grandes familles mais forment globalement la famille de ligands DSL (D'Souza, Meloty-Kapella, and Weinmaster 2010) (Kopan and Ilagan 2009) (Figure 30) :

- La famille Delta est composée des ligands Delta-Like **Dll1**, **Dll3** et **Dll4**.
- La famille Serrate est composée des ligands Jagged, **Jagged1** et **Jagged2**.

Ils sont également sujets à des modifications post-traductionnelles et subissent un trafic vésiculaire très dynamique qui régule finement le niveau d'activation de la signalisation (D'Souza, Meloty-Kapella, and Weinmaster 2010). Récepteurs et ligands sont exprimés dans de multiples types cellulaires et peuvent tous interagir entre eux. Les différentes combinaisons permettent de moduler finement l'activation de la signalisation et les effets sur la prise de décision cellulaire.

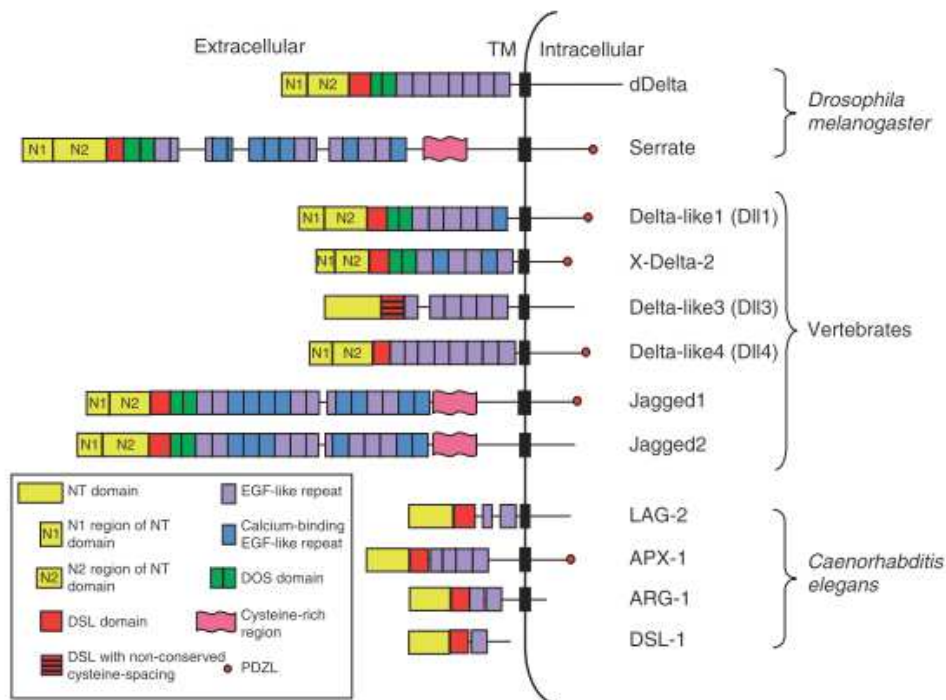


Figure 30 – Structure des ligands DSL chez les vertébrés, *D. Melanogaster* et *C. Elegans* : Ils varient par le nombre et l'espacement des motifs EGF-like répétés ; et également par la présence de motifs d'ubiquitinylation intracellulaire (d'après (D'Souza, Meloty-Kapella, and Weinmaster 2010)).

c. Signalisation canonique

La signalisation Notch est singulière car c'est une voie juxtacrine qui nécessite l'interaction physique entre deux cellules, contrairement aux voies paracrines où le signal est sécrété et diffusible dans la matrice extracellulaire. On désigne alors la cellule exprimant le ligand comme la « cellule signal », et la cellule exprimant le récepteur comme la « cellule récepteur » (Bray 2016).

L'interaction Récepteur-Ligand par les domaines EGF-Like provoque un changement conformationnel du récepteur qui subit alors un second clivage S2 par la protéase ADAM. La forme clivée demeure toujours à la membrane de la « cellule récepteur » et le dernier clivage

S3 est assuré par la γ -sécrétase qui libère le domaine intracellulaire NICD dans le cytoplasme.

Ensuite, NICD est transloqué dans le noyau et interagit avec le facteur CSL (ou RBP- κ chez les mammifères), le co-activateur Mastermind (ou MAML1/2/3 chez les mammifères) et d'autres co-activateurs pour transcrire les gènes cibles. En l'absence de NICD, le facteur RBP- κ est lié à un complexe co-répresseur et induit la compaction de la chromatine via des histones dé-acétylases HDAC, pour maintenir inhibés les gènes cibles. Après activation transcriptionnelle, NICD est rapidement phosphorylé, poly-ubiquitinylé et dégradé par la machinerie du protéasome. Ceci permet une activation dynamique de la signalisation (Kopan 1999) (Figure 31).

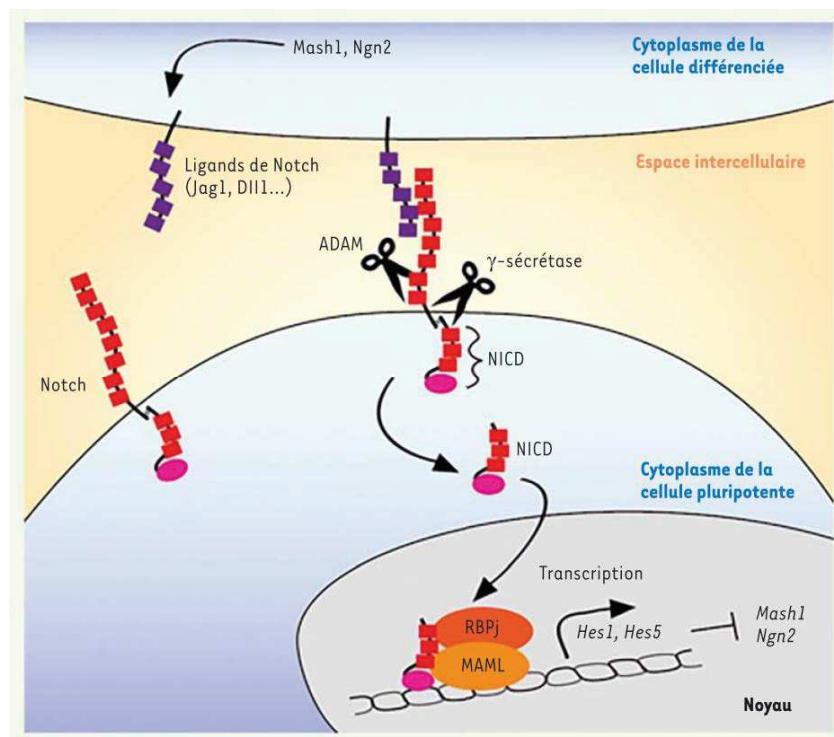


Figure 31 – La voie Notch canonique (d'après (Traiffort and Ferent 2015)).

d. Gènes cibles

Les gènes cibles directs les mieux caractérisés font partie de la famille des facteurs de transcription bHLH et fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels. Ils ont été mis en évidence chez la drosophile de manière directe par la modulation de leur expression suite à l'activation ou inhibition du récepteur Notch.

- Les gènes Hes pour « Hairy and enhancer of split » : **Hes1** à **Hes7**.
- Les genes Hey pour "Hairy and enhancer of split-related" : **Hey1**, **Hey2**.

Dans la plupart des cas, ces gènes répriment le programme de différenciation des cellules. De nombreux travaux ont montré que Notch régule d'autres gènes majeurs de l'équilibre prolifération/différenciation, comme *myc*, *cycline D1*, *p21* ou *GFAP*. En effet, ces gènes possèdent dans leurs promoteurs des sites de fixation pour le complexe RBP-jκ (Pierfelice, Alberi, and Gaiano 2011).

e. Signalisation non canonique

Des ligands non canoniques n'appartenant pas au groupe des DSL ont aussi été identifiés chez les vertébrés. En effet, on peut citer des ligands membranaires tels que *Dlk-1* et des ligands sécrétés comme *CCN3*, *thrombospondin2* *TSP2*, *YB1*. Ces ligands n'ont pas de domaine consensus pour interagir avec le récepteur Notch mais ils activent le clivage de celui-ci par la γ -sécrétase et déclenchent l'activation transcriptionnelle via RBP-jκ (D'Souza, Meloty-Kapella, and Weinmaster 2010). Plusieurs études ont également montré que le récepteur Notch peut être activé indépendamment de son interaction avec le ligand de la cellule-signal, notamment via le calcium extracellulaire, un clivage ectopique vésiculaire dans le cytoplasme, ou une mutation constitutive du domaine NECD (Yamamoto, Schulze, and Bellen 2014). D'autres voies non canoniques induisent la transcription des gènes cibles indépendamment de l'activité transcriptionnelle du complexe RBP-jκ, ce qui suggère l'interaction de NICD avec d'autres effecteurs transcriptionnels. Enfin, les gènes *Hes/Hey* peuvent être activés autrement que par l'activité transcriptionnelle de NICD (Sanalkumar, Dhanesh, and James 2010).

3. Stratégies expérimentales pour étudier la signalisation

Notch

a. Modèles murins *in vivo*

Afin d'étudier la voie Notch *in vivo*, on peut envisager des approches en gain ou perte de fonction constitutives *in vivo* via l'utilisation de modèles murins bien caractérisés. Néanmoins, un désavantage de cette stratégie est la létalité embryonnaire rencontrée pour la plupart des allèles mutés de la signalisation Notch. Le développement de modèles murins conditionnels et/ou inductibles a permis de contourner ce problème. L'utilisation de systèmes recombinases *Cre-Lox* inductibles au tamoxifène est donc courante pour manipuler Notch ou ses composants dans des types cellulaires spécifiques (Gu et al. 1994). Il est également possible d'étudier *in vivo* les conséquences de l'inhibition de Notch via l'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques de la γ -sécrétase comme le DAPT ou le DBZ, mais

ceux-ci s'avèrent toxiques pour les animaux du fait de leurs effets non spécifiques sur d'autres protéines. Une approche par l'utilisation d'anticorps neutralisants ou bien des ligands solubles est également envisageable mais moins courante (Ables et al. 2011). L'usage de souris « rapporteurs » est également une bonne alternative pour étudier la dynamique d'expression des gènes cibles de Notch. Cette approche couplée au système Cre-Lox peut permettre de visualiser par fluorescence ou luminescence des types cellulaires spécifiquement actifs pour les gènes étudiés (Bellen and Yamamoto 2014).

b. Outils *in vitro*

Il est plus abordable d'étudier la signalisation *in vitro* par des approches constitutives ou inductibles en utilisant différents vecteurs comme des lentivirus, des transposons ou des plasmides introduits de manière stable dans des cellules en culture. Les inhibiteurs pharmacologiques de la γ -sécrétase sont à nouveau utiles mais présentent une spécificité qui est controversée dans le domaine. En effet, il a été montré que la γ -sécrétase peut agir collatéralement sur 60 autres protéines cellulaires (De Strooper and Annaert 2010). Le désavantage de ces techniques réside dans le fait qu'on ne contrôle pas le niveau d'inhibition ou activation de la cascade. L'étude dynamique de l'expression dynamique des cibles de Notch via des gènes rapporteurs fluorescents ou luminescents a également permis de montrer leur expression oscillatoire dans des contextes spécifiques (Bellen and Yamamoto 2014; Imayoshi et al. 2013).

4. Modulation de l'activation de Notch

La signalisation Notch déclenche des événements moléculaires qui paraissent simples de prime abord : l'activation du récepteur entraîne sa translocation directe dans le noyau sans amplification du signal ni messenger secondaire (Yamamoto, Schulze, and Bellen 2014). Cependant, elle est extrêmement sensible à la dose de ligand et récepteur interagissant ensemble ; ses acteurs moléculaires subissent des modifications post-traductionnelles ; et ses gènes cibles ont une expression dynamique et instable qui est hautement dépendante d'autres voies de signalisation (Imayoshi and Kageyama 2011).

a. Endocytose du ligand dans la « cellule signal »

Lors de l'interaction Récepteur-Ligand, l'ubiquitinylation intracellulaire du ligand par l'enzyme Mindbomb1 (Mib1) provoque une force de traction du complexe vers la « cellule signal » qui favorise le changement de conformation du domaine NECD et induit le clivage

S2. La variabilité des motifs d'ubiquitinylation ou leur absence module donc l'activation de la cascade moléculaire (D'Souza, Meloty-Kapella, and Weinmaster 2010).

b. Régulation en *cis/trans*

La « cellule récepteur » peut aussi exprimer les ligands qui entrent en compétition avec le ligand de la « cellule signal ». Ces ligands en *cis* ne provoquent pas le changement conformationnel nécessaire au clivage S2 et inhibent donc l'activation de Notch dans la « cellule récepteur » (Figure 32).

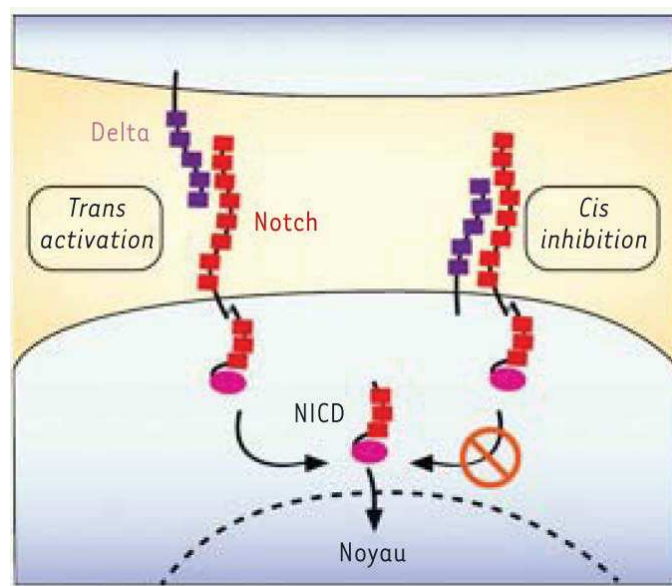


Figure 32 – Régulation en cis/trans de l'activation de NICD (d'après (Traiffort and Ferent 2015)).

c. Interactions avec d'autres signalisations

Il est désormais admis que la voie Notch coopère avec d'autres signalisations également cruciales au cours du développement. Les interactions les plus importantes concernent les signaux sHH, TGF β , BMP, Wnt, et aussi l'hypoxie via HIF- α . Ces interactions peuvent agir directement via le domaine NICD, ou indirectement par modulation de l'expression du récepteur Notch, de ses ligands spécifiques, ou de ses gènes cibles (Borggreffe et al. 2016) (Figure 33).

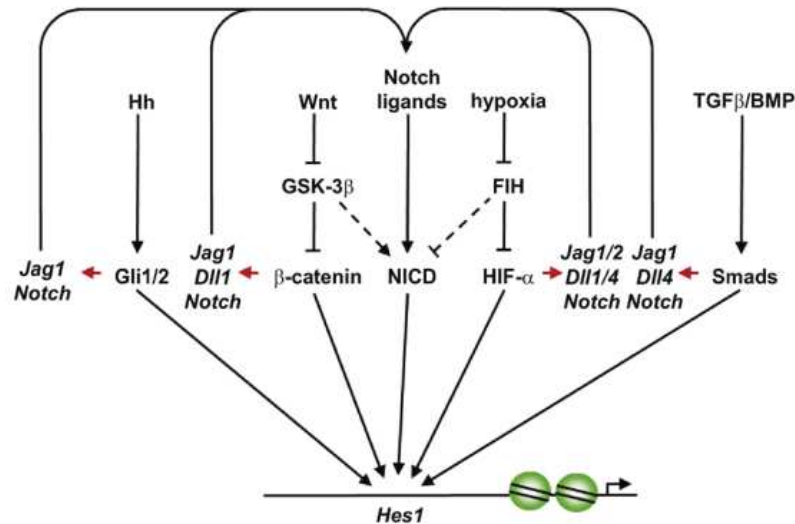


Figure 33 – Régulation de la voie Notch par d’autres effecteurs, et modulation de l’expression de Hes1 en aval (d’après (Borggrefe et al. 2016)).

d. Diversité complexe des fonctions de Notch

L’expression pléiotropique de Notch et ses composants assure des fonctions très diverses au cours du développement et chez l’adulte. La majorité des études désignent Notch comme régulateur de la balance entre prolifération/différenciation dans le déterminisme cellulaire. Néanmoins, cette voie pourrait avoir d’autres fonctions biologiques encore inconnues étant donné la complexité de son mode d’action et ses interactions multiples avec d’autres effecteurs.

B. Signalisation Notch dans l’unité neurovasculaire

Au cours du chapitre I, la signalisation Notch est apparue comme essentielle au développement et à l’homéostasie de l’unité neurovasculaire du SNC. Il convient donc ici de détailler son mode d’action dans ce contexte particulier.

1. Notch et le lignage neural

a. Maintenance des NPC/RGC durant la neurogénèse

Durant l’embryogénèse, Notch joue un rôle clé dans la spécification des cellules neurales à partir du neurectoderme, en inhibant la différenciation neuronale pour maintenir le réservoir de RGC indifférenciées. Les gènes Hes1 et Hes5 sont centraux dans l’inhibition du programme neuronal, notamment par la répression transcriptionnelle des gènes proneuraux Ascl1 et Neurog1/2 (Huang, Chan, and Schuurmans 2014; Dhanesh, Subashini,

and James 2016). Les progéniteurs neuronaux expriment quant à eux le ligand Dll1 qui par inhibition latérale renforcent le phénotype RGC dans la cellule voisine par l'activation via NICD de Hes1 et Hes5. Ce processus spécifie donc une sous-population à devenir neuronale et instruit aux cellules alentours de maintenir un état indifférencié et prolifératif pour assurer les différentes vagues de la neurogénèse au cours du développement (Traiffort and Ferent 2015; Bertrand, Castro, and Guillemot 2002) (Figure 34).

La modulation de l'activité de Notch dans ce contexte est intimement corrélée aux divisions asymétriques des RGC qui repartissent différemment certains composants moléculaires favorisant ou inhibant la signalisation Notch (Pierfelice, Alberi, and Gaiano 2011). Les travaux du groupe de R Kageyama ont également montré que l'expression des gènes *Hes* est régulée par une demi-vie très courte provoquant une expression oscillatoire et dynamique (Imayoshi et al. 2013). Ils sont également soumis à des instructions provenant d'autres signalisations ou régulations épigénétiques qui se coordonnent précisément de manière spatio-temporelle (Borggreffe et al. 2016).

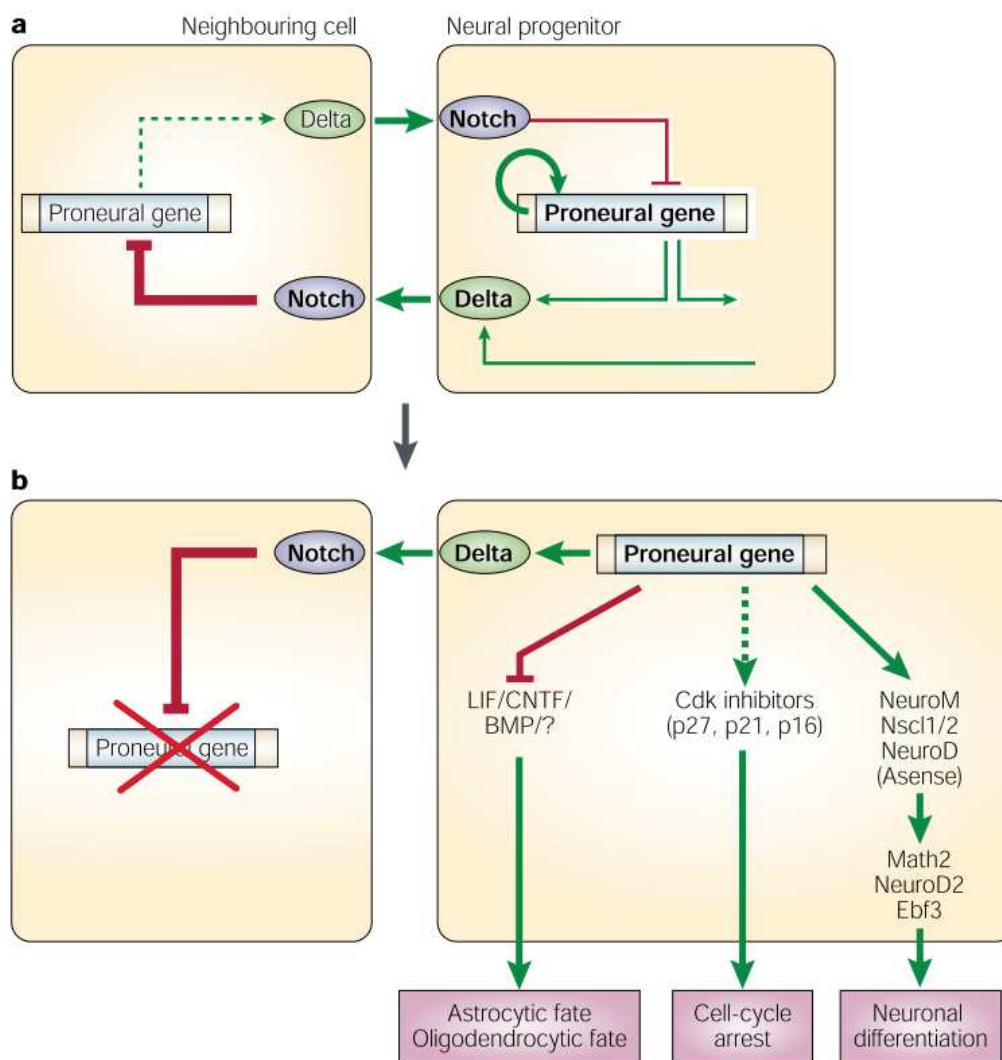


Figure 34 – Mécanisme d'inhibition latérale durant la neurogénèse (adapté de (Bertrand, Castro, and Guillemot 2002)).

b. Rôle dans la gliogénèse

La signalisation Notch intervient aussi dans la spécification gliale. Le fait que les RGC puissent constituer un état précurseur de cellule gliale, ainsi que la persistance d'un reliquat de ce phénotype chez l'adulte renforce l'argument que les cellules gliales, particulièrement les astrocytes, sont dérivés des RGC. Notch ayant un rôle central dans la maintenance de ces cellules, cette voie favorise indirectement la spécification plus tardive du phénotype glial. Par ailleurs, Notch peut être acteur de la différenciation astrocytaire non pas par l'induction du phénotype neuronal, mais par un rôle instructif et l'activation de gènes spécifiques de l'astrogénèse de manière spatio-temporelle (Pierfelice, Alberi, and Gaiano 2011). Plusieurs travaux sur la rétine, la moelle épinière et le SNP ont ainsi démontré que l'activation de Notch favorise l'expression de marqueurs astrogliaux, comme la GFAP (Ge et al. 2002). Dans l'hippocampe, Notch1 et Notch3 dirigent le programme astroglial (Tanigaki et al. 2001). Dans la moelle épinière, le facteur de transcription NFIA régule l'expression de Hes1 et Hes5 qui initient la transition gliogénique par interaction avec les effecteurs JAK/STAT3 (Deneen et al. 2006) (Kamakura et al. 2004). Les jeunes neurones activent également Notch dans les RGC résiduelles voisines via l'expression des ligands Dll1 et Jagged1, induisant un remodelage chromatinien des promoteurs des gènes astrocytaires, ce qui favorise l'action du facteur de transcription NFIA (Namihira et al. 2009). Enfin, Notch permet aussi de promouvoir un phénotype précurseur d'oligodendrocyte OPC par son interaction avec d'autres effecteurs moléculaires comme Olig2, mais inhibe la maturation des OPC (Park and Appel 2003). Notch ne semble pas avoir de rôle instructif dans le lignage oligodendrocytaire, mais plutôt une fonction de maintien du phénotype RGC puis plus tard une permissivité à d'autres effecteurs de la gliogénèse (**Figure 35**).

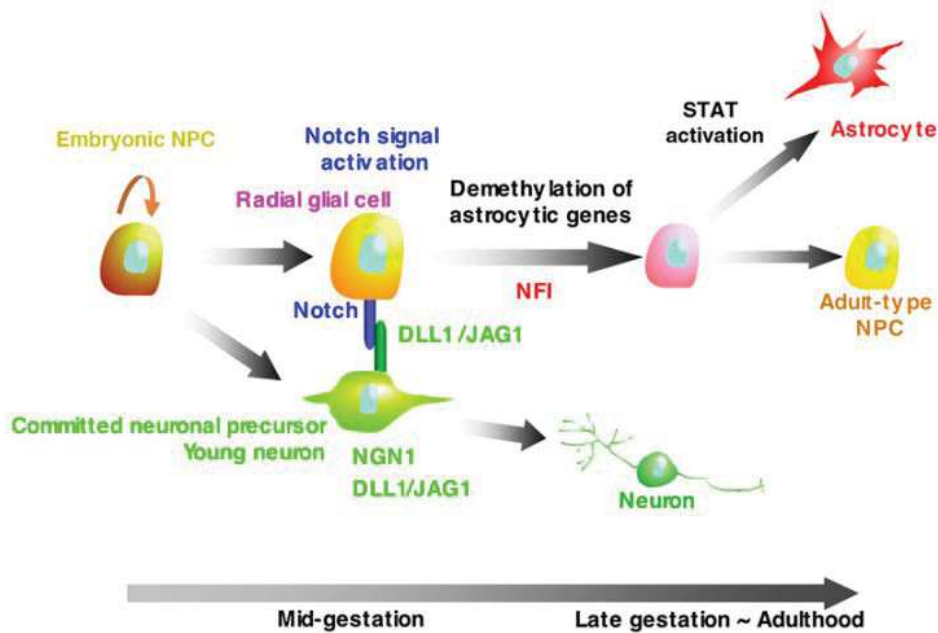


Figure 35 – Rôle de Notch dans l’astrogénèse : aux stades tardifs, Notch active les gènes nécessaires à la transition gliogénique, notamment en favorisant l’action transcriptionnelle de NF1A (d’après (Namihira et al. 2009)).

2. Notch et le lignage vasculaire

Chez les mammifères, les récepteurs Notch1, Notch4 et les ligands Jagged1, Jagged2, Dll1 et Dll4 sont impliqués dans l’intégrité du réseau vasculaire. Notch4 est uniquement exprimé dans les cellules endothéliales. Dans les cellules périvasculaires, Notch3 et Jagged1 sont détectés. Chacun assure des fonctions précises dans les processus de vascularisation embryonnaire et post-nataux (Gridley 2010).

a. Spécification artério-veineuse

Au cours du développement, l’activation de Notch dans les angioblastes est nécessaire à la spécification du déterminisme artério-veineux. Précisément, la notochorde sécrète le facteur sHH qui déclenche la production du facteur de croissance VEGF-A dans l’environnement cellulaire local sous forme de gradient morphogène (Corada, Morini, and Dejana 2014). Les angioblastes en contact avec un niveau élevé de VEGF-A initient un programme de spécification artérielle alors qu’un niveau faible dicte une identité veineuse. De nombreuses études en perte de fonction ont ainsi démontré que la signalisation Notch est en aval de la signalisation VEGF-A/VEGFR2, précisément via l’expression du ligand Dll4. Des travaux récents ont aussi montré que Dll4 est induit par les facteurs de transcription FoxC1/FoxC2, facteurs connus comme centraux dans la spécification endothéliale (Introduction, Chapitre I) (Fish and Wythe 2015). L’expression combinée de Dll4 et

Notch1/4 dans les angioblastes induit en aval la transcription de Hey1/2 et EphB2, qui spécifient l'identité artérielle. Le contact avec des doses faibles de VEGF-A n'induit pas cet axe dans les cellules veineuses. Le facteur de transcription COUP-TFII réprime Dll4/Notch1/4 et par défaut active EphB4 qui spécifie un destin veineux. Le ligand Dll1 est exprimé à des stades plus tardifs spécifiquement dans des cellules artérielles et est détecté en post-natal : il est requis pour la maintenance de cet état, notamment en favorisant l'expression de EphB2 et en inhibant l'expression de COUP-TFII. Dll1 active aussi l'expression des récepteurs VEGFR2 et Nrp1 dans les angioblastes artériels, ce qui accentue la boucle d'autorégulation et maintient l'axe VEGF-A/Nrp1/Dll4/Notch actif. Dans ces processus, Notch ne fonctionne pas via l'inhibition latérale de la cellule voisine. C'est en effet le gradient de VEGF qui initie la cascade moléculaire, la voie Notch instruit à la cellule une identité d'artère et maintient cette identité dans la cellule voisine. L'expression des composants de Notch dicte ici un choix binaire à la population d'angioblastes (Kume 2012) (Figure 36).

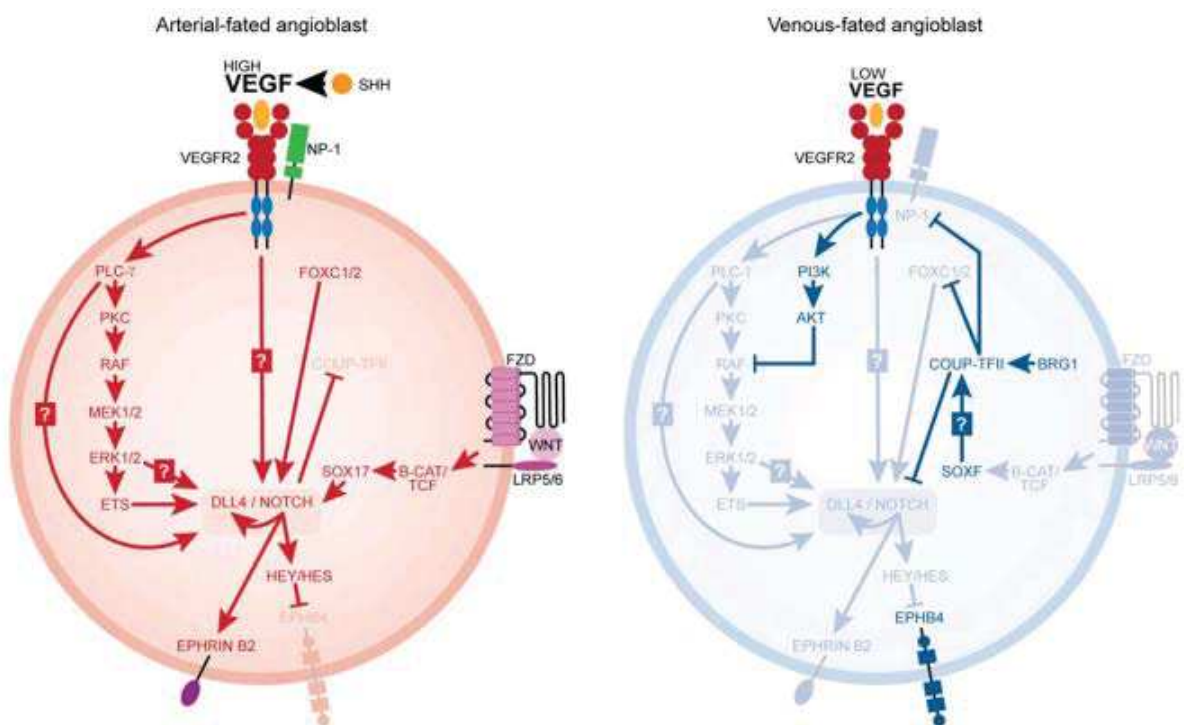


Figure 36 – Spécification artério-veineuse par l'axe VEGF/Dll4/Notch (d'après (Fish and Wythe 2015)).

b. Régulation du bourgeonnement angiogénique

Le bourgeonnement angiogénique des cellules endothéliales est à nouveau dirigé par un gradient morphogène de VEGF qui active via VEGFR2 le ligand Dll4 et spécifie l'identité de cellule « tip ». Cette cellule étend des prolongements et initie le bourgeonnement pour contacter une cellule « tip » voisine. L'expression de Dll4 provoque par interaction avec le

récepteur Notch1/4 de la cellule voisine, l'inhibition du récepteur VEGFR2 ce qui diminue la sensibilité au gradient de VEGF et réprime le phénotype « tip » pour spécifier un phénotype de cellule « stalk » proliférative (Hellstrom et al. 2007; Phng and Gerhardt 2009). Les cellules stalk expriment des niveaux élevés de Jagged1 qui antagonise l'effet de Dll4 et promeut le phénotype stalk et la prolifération de ces cellules (Benedito et al. 2009). L'axe Dll4/Notch régule donc le phénotype de la cellule « tip » via inhibition latérale de la cellule « stalk » (Figure 37).

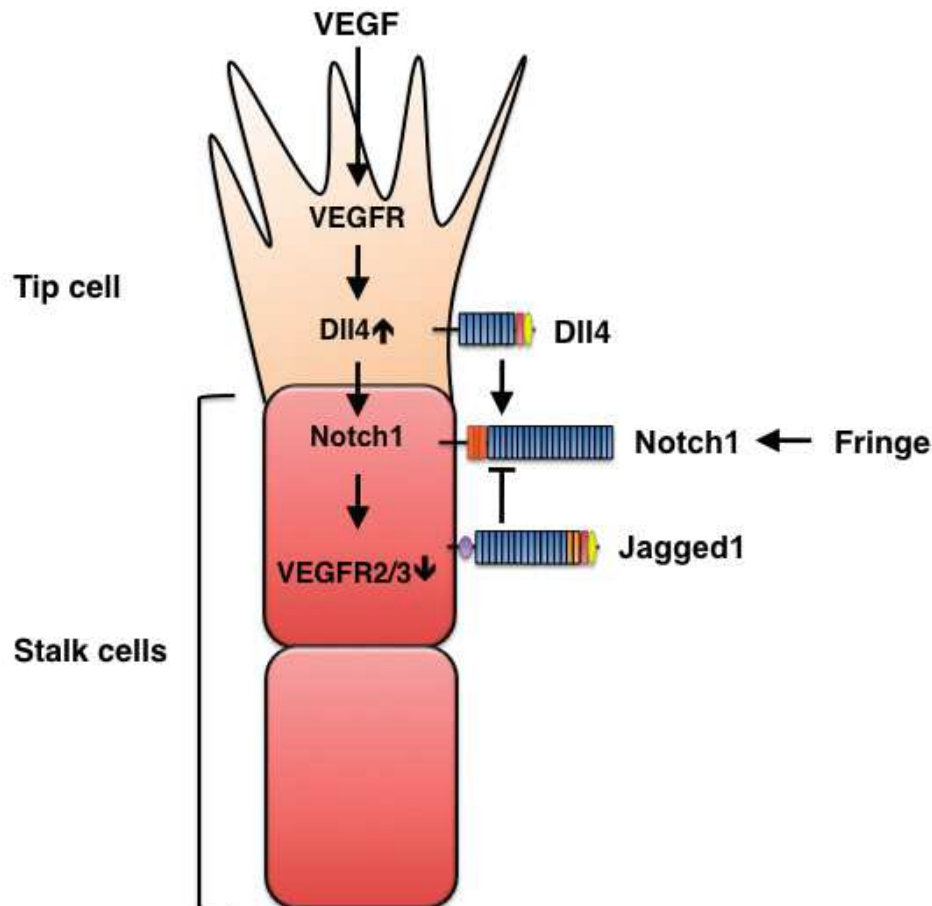


Figure 37 – Régulation du bourgeonnement angiogénique par l'axe VEGF/Dll4/Jg1 (d'après (Kume 2012)).

c. Différenciation des cellules musculaires lisses

Notch contrôle également la prolifération/différenciation des cellules murales, mais les mécanismes moléculaires sont encore imprécis. Les péricytes expriment spécifiquement le récepteur Notch3 qui interagit avec Jagged1 présenté par les cellules endothéliales. L'interaction active l'expression de gènes de différenciation des péricytes, comme α SMA (Kofler et al. 2015), mais induit également Notch3 et Jagged1 dans la « cellule récepteur »/le péricyte. Cette boucle d'autorégulation permet de maintenir un état différencié dans les

péricytes adjacents (Liu, Kennard, and Lilly 2009). Très récemment, une étude a montré que l'expression spécifique de Jagged1 dans les CE peut être modulée par la voie Akt et influe sur l'intégrité des cellules musculaires lisses (Kerr et al. 2016). Au contraire, d'autres travaux ont démontré que l'activation de Notch3/Jagged1 active la prolifération des péricytes (Wang, Pan, et al. 2014) via l'expression de Hey1/Hey2, qui régulent en aval des acteurs du cycle cellulaires p21, p27 (Havrda et al. 2006) et qui répriment l'induction de α SMA (Tang, Urs, and Liaw 2008).

3. Notch dans la niche neurogénique adulte

Dans les niches neurogéniques adultes, Notch conserve des fonctions cruciales au maintien du réservoir de cellules souches neurales en régulant leur quiescence ou leur activation (Giachino and Taylor 2014). Notch emploie les mêmes effecteurs embryonnaires pour répondre à la demande neurogénique. Selon le contexte, la région, la signalisation Notch favorise ainsi l'hétérogénéité du lignage des NSC et des sous-types de progéniteurs requis dans les différentes niches. L'environnement cellulaire et moléculaire des niches est également important, notamment le dialogue entre les cellules vasculaires et les cellules neurales ; et l'hypoxie, qui active ou réprime Notch à de multiples niveaux. Par ailleurs, on retrouve exprimé des composants de cette cascade en dehors des niches où Notch pourrait être impliqué dans l'apprentissage, la mémoire, l'exercice et la plasticité synaptique (Ables et al. 2011). De plus, en situation de neurotrauma, Notch est réactivé pour, entre autres exemples, favoriser la cicatrice gliale ou la revascularisation en cas d'ischémie (Traiffort and Ferent 2015).

C. Signalisation Notch dans la gliomagénèse

Notch assure un rôle pléiotropique à la fois dans le lignage neural et le lignage vasculaire physiologiques. Dans le contexte pathologique des gliomes, de nombreux travaux démontrent que cette signalisation développementale est réactivée dans les cellules tumorales. Néanmoins, des publications très récentes suggèrent aussi une fonction plus complexe de cette signalisation durant la gliomagénèse.

1. Rôle général dans le cancer

Les premiers travaux impliquant Notch dans la tumorigénèse se situent dans le contexte des leucémies chroniques lymphoblastiques T (T-ALL). Par des remaniements chromosomiques du gène Notch1, le récepteur se retrouve constitutivement actif et agit comme un oncogène qui promeut la prolifération des cellules tumorales et la tumorigénèse (Ellisen et al. 1991). Dans d'autres tumeurs, Notch peut au contraire favoriser la différenciation cellulaire et agit comme un suppresseur de tumeur, notamment dans le cancer du poumon ou de la peau (Lino, Merlo, and Boulay 2010). Cette fonction dépendante du contexte cellulaire dans les tumeurs est à relier au rôle physiologique de Notch dans le tissu d'origine. De plus, les différents récepteurs et ligands modulent les conséquences de l'activation de la signalisation, ce qui peut expliquer différentes fonctions dans différentes situations. Néanmoins, il apparaît clair pour de multiples tumeurs que la dérégulation des composants de Notch affecte la progression tumorale.

2. Dérégulation des composants de la voie Notch dans les gliomes

Au sein des gliomes, le profil d'expression des différents récepteurs Notch n'est pas clair et ne corrèle pas forcément avec l'intensité du grade de la tumeur. Pour exemple, le récepteur Notch1 est augmenté par rapport à un tissu non tumoral dans tous les grades de gliomes, sauf un sous-type de tumeurs de grade IV. De plus, l'expression nucléaire de NICD est plus élevée dans les oligodendrogliomes et les astrocytomes de grades II et III que dans les GBM. Une observation similaire a été faite pour les ligands : Dll1 est plus exprimé dans les oligodendrogliomes, alors que Jagged1 est plutôt retrouvé dans les astrocytomes de grade II et III. Dans les GBM, le ligand Jagged1 n'est pas significativement plus exprimé que dans le cerveau normal, néanmoins un groupe de tumeurs présente une forte présence de Jagged1 (Purow et al. 2005).

D'autres études montrent qu'au contraire l'expression de Notch1 augmente graduellement avec le grade et que 100% des échantillons de GBM expriment de forts niveaux de Notch1. C'est aussi le cas pour les récepteurs Notch3 et Notch4, dont la détection corrèle avec le grade. Au contraire, l'expression de Notch2 demeure rare dans les gliomes et est préférentiellement détectée dans des échantillons de médulloblastomes (Xu

et al. 2009). Le taux élevé de Notch1 est inversement lié à la survie des patients, ce qui implique Notch1 comme marqueur diagnostique et pronostique majeur (Li, Cui, et al. 2011).

Sur la base de la classification moléculaire de Philips, les gliomes proneuraux contenant des grades III et les GBM secondaires contiennent les marqueurs « neuronaux » Dll1 et Hash-1, un régulateur transcriptionnel de Dll1 (Phillips et al. 2006). En ce qui concerne l'expression des gènes cibles connus de Notch, Hes1 a été montré comme augmenté dans les GBM primaires (Somasundaram et al. 2005). De manière similaire, Hey1 est présent dans les GBM et constitue donc un marqueur diagnostique préférentiel associé à une survie plus courte des patients (Hulleman et al. 2009; Gaetani et al. 2010).

Malgré des observations contradictoires concernant les récepteurs (Dell'albani et al. 2014), il est plutôt accepté que Notch et ses effecteurs canoniques soient plus représentés dans les GBM, reflétant un état activé de la signalisation. Cette activation serait donc associée à une malignité et une agressivité ascendante. Néanmoins, des études récentes réfutent cette idée et confèrent un rôle plus complexe à Notch dans la gliomagenèse.

3. Fonction de Notch dans les glioblastomes : un oncogène ou un suppresseur de tumeurs ?

Deux hypothèses contradictoires à la fonction de Notch dans les gliomes sont proposées ; soit un rôle suppresseur de tumeur associé à un état différencié des cellules, soit un rôle d'oncogène associé à l'état indifférencié des cellules.

a. Notch influe sur la prolifération et la tumorigénicité des cellules tumorales

Des études en perte et gain de fonction ont ainsi permis de positionner Notch au centre de la croissance des cellules tumorales. En effet, en utilisant des lignées immortalisées de gliomes, Purow et collègues ont montré *in vitro* et *in vivo* après xénogreffes, que l'inhibition de Notch1 et Dll1 via siRNA induit une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose associée à l'arrêt du cycle cellulaire (Purow et al. 2005). D'autres travaux complémentaires ont également montré que cette inhibition induit un phénotype différencié des cellules, par une morphologie « pseudoneuronale », ou l'expression de la GFAP. Au contraire, l'activation de Notch1 via NICD augmente la prolifération des cellules (Zhang et al. 2008). De plus, Notch2 semble avoir une fonction opposée à celle de Notch1, et sa surexpression diminue l'agressivité des cellules (Xu et al. 2013).

Plus spécifiquement, la cascade Notch serait associée au phénotype GSC et donc aux propriétés tumorigènes d'une sous-population de cellules au sein des GBM. En effet, des cellules de gliome purifiées de biopsies cultivées en conditions « neurosphères » expriment les composants Notch1, Notch4, Dll1 et Dll3 (Lee et al. 2006). D'autres travaux similaires ont montré l'expression spécifique de Notch1, Dll3 et Hes1 dans le groupe le plus tumorigénique de cellules primaires cultivées dans les mêmes conditions (Gunther et al. 2008). De plus, la surexpression de NICD dans une lignée immortalisée de gliome augmente la capacité à former des sphères et la multipotentialité, conférant donc un caractère GSC aux cellules (Zhang et al. 2008). A partir de GSC isolées de patients, plusieurs publications ont aussi montré que l'inhibition de Notch par traitement aux inhibiteurs de γ -sécrétase (GSI) influe spécifiquement sur les GSC en diminuant leur prolifération, leur auto-renouvellement *in vitro* ; et leur propriétés tumorigéniques *in vivo* (Fan et al. 2010; Gilbert et al. 2010). Ces résultats suggèrent donc que la voie Notch est importante au maintien des propriétés souches et au potentiel tumorigène des GSC. Cette hypothèse laisse donc entrevoir Notch comme une cible spécifique et pertinente des GSC radiorésistantes.

b. Régulations moléculaires

Le mode d'action moléculaire précis de Notch sur la croissance tumorale est quant à lui plus complexe à élucider et de nombreuses études relient cette signalisation à d'autres effecteurs majeurs de la gliomagénèse.

La surexpression et l'activité augmentée du récepteur EGFR est caractéristique des GBM, que ce soit via amplification génique ou réarrangement chromosomique conduisant au variant constitutivement actif EGFRvIII. La signalisation associée à ce récepteur tyrosine kinase est donc majeure dans la prolifération, invasion et résistance à l'apoptose des GBM ; et elle implique l'axe MAPK kinase et l'axe PI3K-AKT-mTOR (Teodorczyk and Schmidt 2014).

De manière similaire au contexte physiologique des NSC (Aguirre, Rubio, and Gallo 2010), il a été montré que Notch et EGFR agissent en synergie dans les cellules de gliome, notamment via régulation transcriptionnelle de EGFR par Notch1 et l'expression intermédiaire de p53. Cette corrélation est également confirmée par l'analyse d'échantillons humains de GBM (Purow et al. 2008). Dans un modèle murin de gliome, Ras et Akt, deux effecteurs majeurs en aval de EGFR, induisent l'expression de Notch1 (Rajasekhar et al. 2003). Il y aurait donc une boucle d'auto-régulation positive entre Notch et EGFR, ainsi responsable de la forte croissance des cellules tumorales. Néanmoins, la hiérarchie du contrôle de la tumorigénèse reste encore confuse entre ces deux acteurs moléculaires et semble varier selon les sous-types de GBM (Teodorczyk and Schmidt 2014). Spécifiquement

dans les GSC, l'inhibition de Notch2 par traitement au GSI bloque la phosphorylation de Akt et STAT3 et augmente l'apoptose des cellules (Fan et al. 2010). Ceci renforce à nouveau l'idée de la coopération entre les signalisations Notch et EGFR, mais montre également l'implication d'autres effecteurs connus dans la prolifération des NSC comme l'axe JAK/STAT (Cheng et al. 2016). D'autres modulateurs coordonnent aussi finement l'activation de Notch dans les GSC, comme des protéines médiatrices de la dégradation lysosomale CRMP5 (Moutal et al. 2015), ou bien les mi-ARNs comme miR-33a (Wang, Sun, et al. 2014), miR-34a (Li, Guessous, et al. 2009) ou miR-18a (Turchi et al. 2013).

Concernant les cibles canoniques de Notch et leurs fonctions, des études impliquent Hes1 au centre de la régulation de la prolifération des cellules tumorales (Schreck et al. 2010; Yin et al. 2014). Une autre étude récente montre aussi que l'axe Notch-Hey1 réprime la stabilisation de suppresseurs de tumeur, favorisant ainsi la malignité et la tumorigénicité de cellules de gliome *in vitro* et *in vivo* (Wu et al. 2014). De plus, Notch2 activerait directement via RBPJ- κ la Tenascin-C, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire dont l'expression est élevée dans les GBM et corrèle à un mauvais pronostic pour les patients. L'expression de la Tenascin-C favorise l'invasion des cellules de GBM (Sivasankaran et al. 2009) (**Figure 38**).

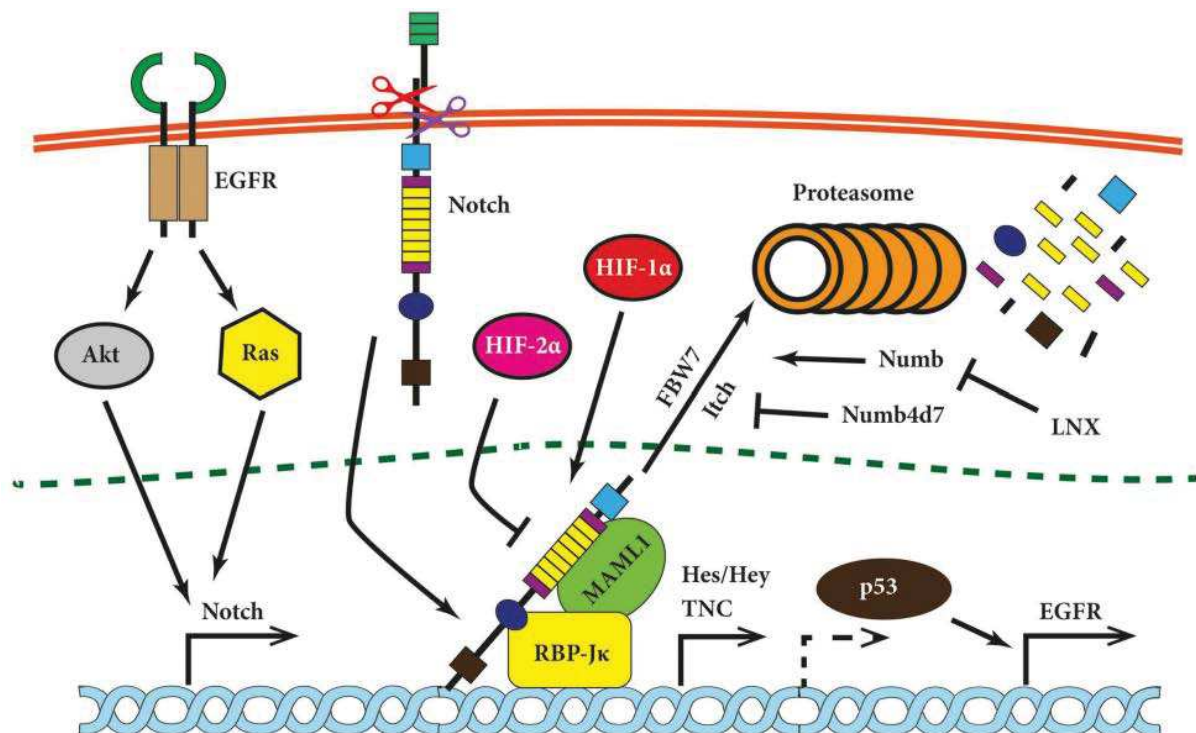


Figure 38 – Régulations moléculaires de la signalisation Notch dans les glioblastomes (d'après (Teodorczyk and Schmidt 2014)).

c. Notch contrôle la différenciation de progéniteurs tumorigènes putatifs

La grande majorité des études mécanistiques sur la fonction de Notch dans les GBM suggère qu'il agirait comme oncogène majeur de la gliomagénèse. Des publications récentes tendent à modérer cette idée et à analyser plus en détail les composants de cette cascade. De plus, Notch est une signalisation juxtacrine, ce qui sous-entend un rôle important des cellules environnantes, qu'elles soient tumorales ou non.

En 2015, C Giachino et collègues ont étudié les conséquences de l'inactivation de Notch1, Notch2 et RBP-J κ *in vivo* dans des progéniteurs neuraux par l'utilisation de modèles murins inductibles et en suivant le devenir des cellules par fluorescence. Ils observent d'abord que dans des souris PDGF⁺/Trp53^{-/-} développant des gliomes aux caractéristiques de certains GBM humains, il existe une sous-population de cellules Hes5⁺ dont certaines positionnées proche des vaisseaux, et certaines demeurant quiescentes. Après transformation oncogénique spécifique, ces cellules Hes5⁺ sont compétentes à former des gliomes, mais ne constituent pas la majorité de la tumeur car minoritaires comparées aux progéniteurs Hes5⁻ prolifératifs. Ensuite, suite à l'inhibition génétique de soit RBP-J κ , soit Notch1 et Notch2, la croissance des gliomes est accélérée, le nombre de cellules Hes5⁺ diminue et l'expression de Olig2 et Ascl1 augmente. Les tumeurs présentent un phénotype typique de GBM. Tout ceci suggère que Notch aurait une fonction de suppresseur de tumeurs dans la gliomagénèse. Ces observations sont confirmées par l'analyse bioinformatique des bases de données REMBRANDT et TCGA : Hes5 est en effet plus exprimé dans les astrocytomes de grades II et III et sa faible expression est associée à un meilleur pronostic de survie chez les patients. Au sein des GBM, Hes5 est quand à lui peu exprimé mais spécifiquement dans les GBMs proneuraux, sa faible expression corrèle aussi à un bon pronostic de survie des patients. Cette étude montre Notch comme inhibiteur de la gliomagénèse des tumeurs de grade II, III et des GBM proneuraux. La fonction de Notch serait ici de contrôler à des stades précoces la transition des progéniteurs quiescents en progéniteurs tumorigènes. Ces données renforcent également l'idée que les progéniteurs neuraux prolifératifs parmi lesquels les OPC puissent être à l'origine des gliomes ; et Notch est central à la génération de ces cellules (Giachino et al. 2015) **(Figure 39)**.

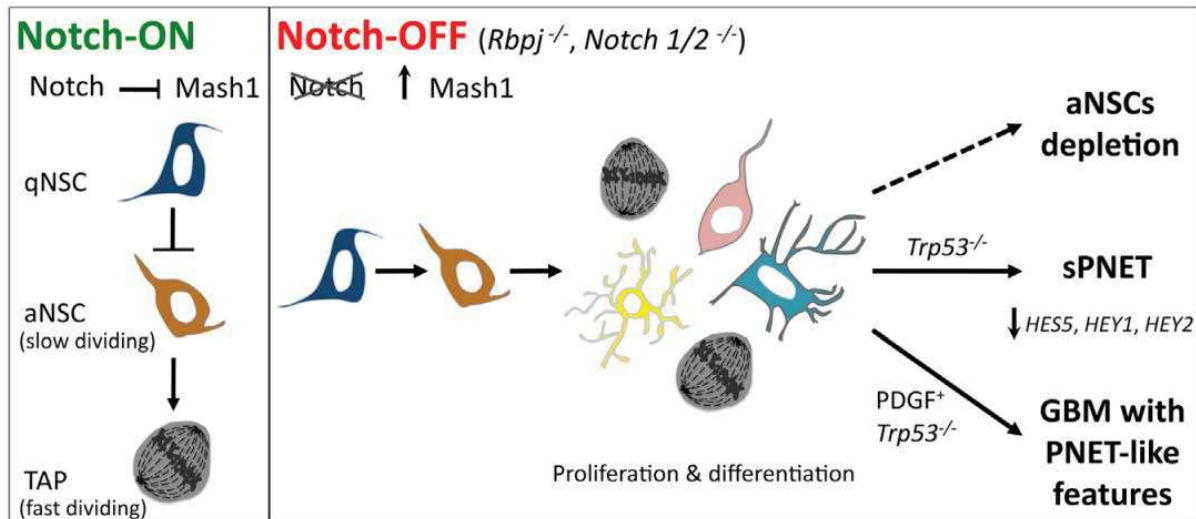


Figure 39 – Notch peut agir comme un suppresseur de tumeur dans les gliomes (d'après (Oldrini, Schuhmacher, and Squatrito 2015)).

De façon intéressante, une précédente publication montrait également Notch comme régulateur du phénotype progéniteur OPC « pré-malin ». En effet, la protéine Id2 peut réguler la répression transcriptionnelle de Hey1 sur le promoteur de Olig2 dans des NSC, les forçant et les bloquant au stade prolifératif OPC. Ainsi, ces cellules greffées en environnement tumorigène PDGF⁺ initient des tumeurs comparables aux GBM proneuraux. Là encore, l'inhibition ou non de l'action de Hey1 engage les cellules dans la malignité (Havrda et al. 2014).

d. Notch dans l'écosystème complexe des GBM

Les hypothèses évoquées précédemment ont tendance à considérer Notch de manière intrinsèque dans les cellules tumorales mais cette signalisation nécessite le contact avec les cellules voisines. Une publication récente démontre que l'inhibition latérale caractéristique de Notch dans la neurogénèse peut également être observée dans des GSC *in vitro*. Sous l'effet de l'hypoxie, les auteurs observent que l'expression différentielle du ligand Jagged-1 dans les GSC spécifie deux populations de cellules : une population faible en ligand présentant une voie Notch active, et une population forte en ligand pour laquelle le ligand via son domaine intracellulaire réprime les gènes cibles de Notch. Ce processus réminescent de l'inhibition latérale physiologique rajoute une complexité à la fonction de Notch dans la gliomagénèse et nécessite des études complémentaires (Lim et al. 2015) (Figure 40).

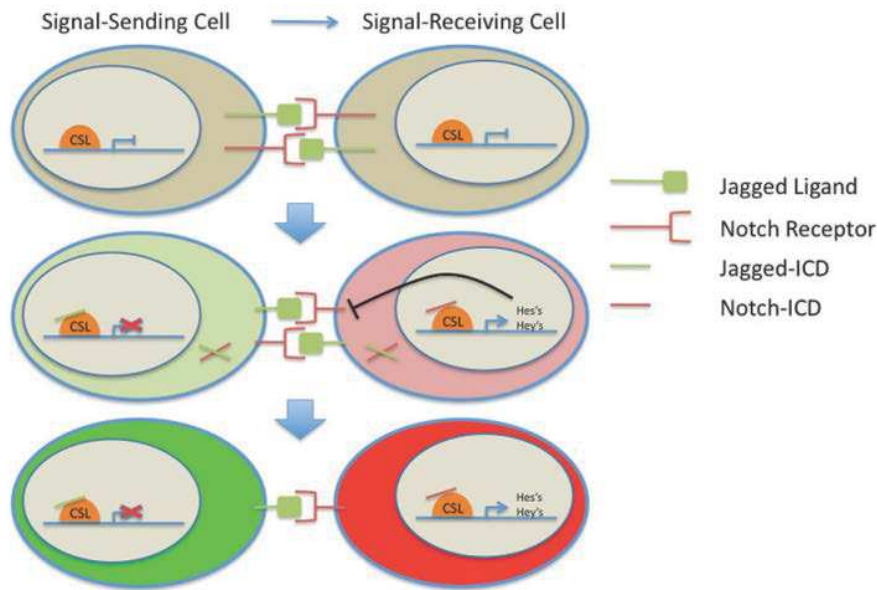


Figure 40 – Mécanisme d'inhibition latérale par Notch observé récemment dans les GSC (d'après (Lim et al. 2015)).

Une vision intégrée de Notch dans le microenvironnement tumoral reste encore peu explorée mais de nouvelles analyses dévoilent peu à peu un rôle beaucoup plus complexe en relation avec les composants cellulaires et moléculaires des niches tumorales. L'écosystème des niches tumorales est en effet crucial à la progression des GBM. Précisément, les niches périvasculaires et hypoxiques fournissent aux GSC des signaux moléculaires nécessaires à leur survie et au maintien de leur réservoir. En retour, les GSC maintiennent l'intégrité de leurs niches en stimulant la vascularisation et les conditions hypoxiques (Hambardzumyan and Bergers 2015). Parmi ces signaux complexes, HIF-1 α et HIF-2 α régulent la cascade Notch et maintiennent la prolifération des GSC *in vitro* (Bar et al. 2010; Qiang et al. 2012; Hu et al. 2014).

De manière comparable aux niches neurogéniques, les GSC communiquent étroitement avec les cellules endothéliales, notamment via la signalisation Notch. En effet, les GSC peuvent exprimer à la fois Notch1, Notch2 et le ligand Dll4 et ainsi activer l'angiogénèse des cellules endothéliales en coopération avec le VEGF, comme dans la situation embryonnaire. En effet, l'inhibition de Dll4 dans les GBMs réduit fortement la vascularisation et la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (Li et al. 2007). En retour, les cellules endothéliales expriment aussi Dll4 qui favorise via interaction avec Notch1 l'auto-renouvellement et le potentiel tumorigène des GSC. Cette interaction pourrait également favoriser la quiescence des GSC (Zhu et al. 2011). D'autres effecteurs coopèrent avec Notch pour maintenir le dialogue entre cellules endothéliales et GSC au sein des niches, comme par exemple l'oxide nitrique NO

(Jeon et al. 2014) ou les signalisations sHH, VEGF et SDF1-CXCR4 (Filatova, Acker, and Garvalov 2013)

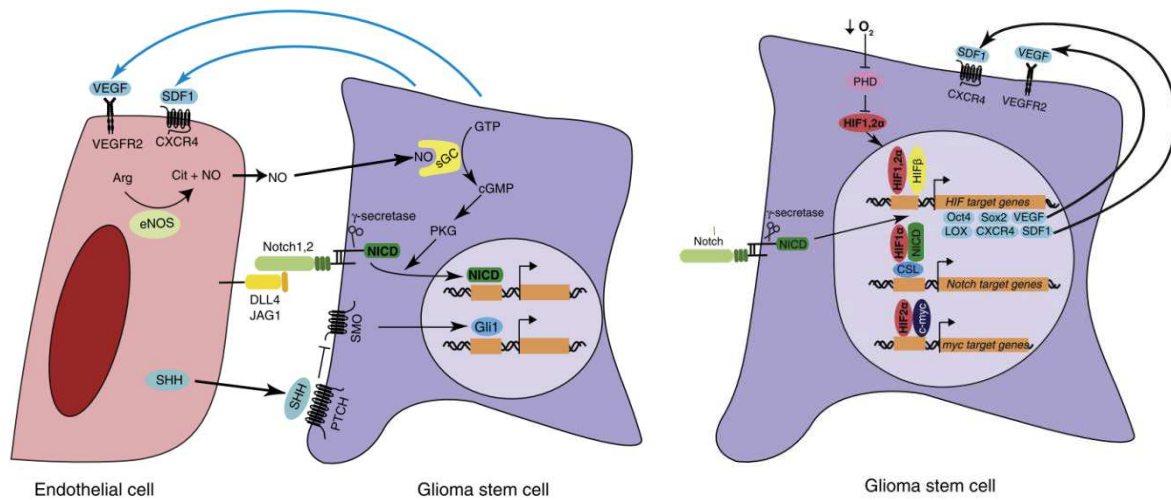


Figure 41 – Fonctions de Notch dans la niche périvasculaire, et dans les GSC hypoxiques (d'après (Filatova, Acker, and Garvalov 2013).

4. Thérapies anti-Notch et résistance des GSC

La majorité des thérapies disponibles, comme les chimio-radiothérapies ou les traitements anti-angiogéniques, se révèlent inefficaces pour traiter les glioblastomes, précisément à cause de la résistance des GSC qui par leur biologie complexe contrebalancent l'action d'agents thérapeutiques. La plupart des travaux positionnant Notch au centre de la progression des gliomes, l'idée d'inhiber cette signalisation par différents moyens a été très rapidement développée *in vitro*, *in vivo* chez les rongeurs, et en phases cliniques chez les patients. Cependant, Notch ayant un rôle plus complexe et pas totalement compris dans la gliomagénèse, la plupart de ces essais se sont révélés non concluants (Figure 42).

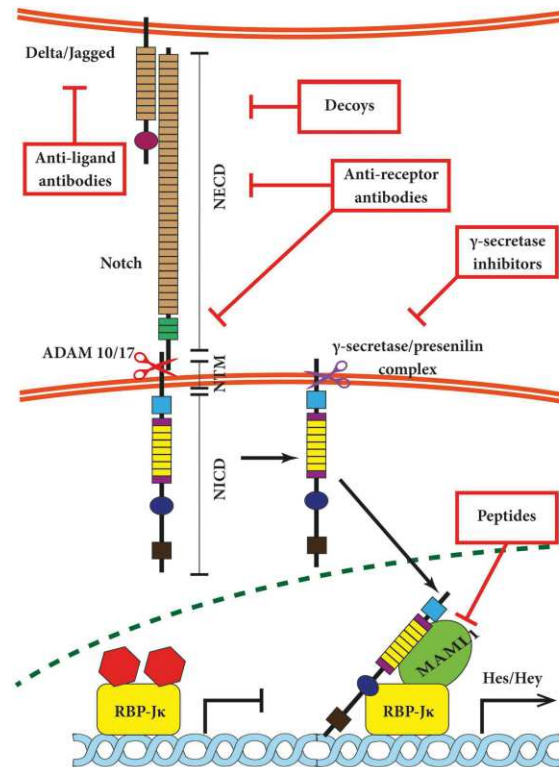


Figure 42 – Stratégies thérapeutiques anti-Notch (d'après (Teodorczyk and Schmidt 2014)).

a. Inhibiteurs de γ -sécrétase

Les inhibiteurs de γ -sécrétase (GSI) permettent de bloquer le clivage S3 responsable de la translocation du domaine NICD dans le noyau des cellules. Cet outil a été largement utilisé *in vitro* pour comprendre l'action mécanistique de Notch, et se révèle également efficace *in vivo* chez le rongeur pour bloquer la croissance tumorale et induire l'apoptose des cellules de gliome.

Les GSI ont fait l'objet de nombreux essais cliniques dans des cancers variés et sont également en cours de tests dans le contexte des tumeurs cérébrales (www.clinicaltrials.gov). Ces analyses peuvent employer les GSI seuls mais plus généralement combinés avec les thérapies actuelles, comme le Témazolomide (TMZ) ou le Bevacizumab.

La non spécificité du ciblage de la γ -sécrétase représente un inconvénient majeur à l'utilisation des GSI car cette enzyme est connue pour agir sur une variété importante d'autres protéines (De Strooper and Annaert 2010). Ainsi, l'administration systémique de ces inhibiteurs cause une certaine intolérance et toxicité gastro-intestinale à ne pas négliger (Teodorczyk and Schmidt 2014).

De plus, les effets se révèlent pour la plupart inefficaces sur le long terme, favorisant la résistance des GSC qui acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses et

angiogéniques et ne répondant plus à l'inhibition de Notch. En effet, il a récemment été montré *in vitro* que la réponse aux GSI serait dépendante du sous-type de GBM, avec une sensibilité forte dans les GBM proneuraux, ce qui corrèle avec l'observation d'une voie Notch active dans ce sous-type particulier (Saito et al. 2014). Au contraire, une publication de cette année montre que les GSC résistantes aux GSI présentent une forte expression de RBPJ- κ mais régulent la croissance tumorale indépendamment des acteurs canoniques de Notch, rendant donc inutiles l'inhibition au niveau du récepteur, et mettant en évidence un nouveau mécanisme moléculaire de résistance thérapeutique (Xie et al. 2016).

b. Anticorps bloquants

Le blocage par des anticorps des différents éléments moléculaires de la signalisation Notch représente une alternative séduisante. Plus spécifiques et moins toxiques que les GSI, on peut les diviser en deux catégories (Teodorczyk and Schmidt 2014) :

- Les anticorps agissant sur les récepteurs Notch : soit au niveau du domaine EGF-Like où interagissent Ligand et Récepteur ; soit au niveau du domaine NRR où le clivage S1 par ADAM se produit. Ils bloquent l'activation de Notch en agissant sur la composante extracellulaire de la cascade et ont été testés *in vitro* et en étape pré-clinique.
- Les anticorps agissant sur les ligands : le blocage de Dll4 est le plus étudié. En effet, Dll4 pourrait contrôler le mécanisme alternatif à l'origine de la résistance aux anti-VEGF (Li, Sainson, et al. 2011). Son blocage par l'utilisation de formes solubles stabilise le réseau vasculaire mais diminue la croissance tumorale *in vivo* en rendant l'angiogénèse non fonctionnelle (Li et al. 2007). Plusieurs études cliniques des anti-Dll4 sont actuellement en cours et en attente de résultats finaux. Cette approche présente néanmoins des effets secondaires importants, notamment la formation de néoplasmes vasculaires ou hémangioblastomes, ou l'apparition d'anomalies hématopoïétiques et hépatiques.

c. Peptides antagonistes solubles

Ces domaines extracellulaires solubles des récepteurs ou ligands Notch constituent une alternative aux anticorps bloquants et font l'objet de travaux de recherche *in vitro* et *in vivo*. Pour l'instant, aucun essai clinique n'a été proposé mais leur effet antagoniste sur la signalisation pourrait influencer sur la gliomagenèse. Par exemple, la protéine EGFL7 agit comme ligand non canonique antagoniste de Jagged1 et induit la néovascularisation de manière indépendante au VEGF. De manière similaire à Dll4, son inhibition pourrait rendre sensible au VEGF des GSC résistantes (Teodorczyk and Schmidt 2014).

d. Autres agents

Des molécules naturelles sont connues pour affecter la voie Notch et pourraient représenter une nouvelle classe d'agents thérapeutiques. Par exemple, le curcumin altère la croissance tumorale de manière Notch-dépendante, les mécanismes moléculaires demeurant inconnus. Cette molécule a notamment fait l'objet d'une étude clinique chez des patients atteints de GBM. Des peptides ou petits ARNs agissant sur les composants intracellulaires de Notch pourrait également se révéler efficaces.

OBJECTIFS

Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs cérébrales les plus dévastatrices et sont inévitablement associées à l'échec des thérapies conventionnelles actuelles. Plusieurs facteurs contribuent à cette difficulté dans le traitement des patients.

Ces tumeurs sont extrêmement hétérogènes, à la fois à l'échelle intertumorale, mais également à l'échelle intratumorale. La classification des GBM en différents profils moléculaires par des études génomiques marque une avancée majeure du domaine. Ces travaux ont démontré la complexité du « paysage génomique » des GBM : il s'avère nécessaire d'approfondir les réseaux moléculaires affectés dans la gliomagénèse, dans l'optique d'approches thérapeutiques ciblées et adaptées à chaque patient.

L'identification de sous-populations de cellules tumorales aux propriétés radio/chimiorésistantes ajoute un niveau de complexité à la compréhension de l'hétérogénéité des GBM. Ces cellules souches de glioblastome (GSC) conservent des caractéristiques comparables aux cellules souches neurales adultes. En effet, leur multipotence, leur auto-renouvellement et leurs propriétés tumorigènes assurent le maintien, la progression, et la résistance de l'état cancéreux. L'hétérogénéité de ces cultures est également reflet de l'hétérogénéité moléculaire des GBM. Beaucoup d'attention est donc portée sur la fonction biologique de ces cellules, notamment les voies de signalisation contrôlant leur prolifération, leur différenciation et leur agressivité. Ces réseaux moléculaires nécessaires à leur persistance sont réminescents de ceux actifs physiologiquement dans les cellules souches neurales embryonnaires et adultes.

L'étude de ces signaux spécifiques constitue la thématique principale de mon laboratoire d'accueil. Depuis plusieurs années, l'équipe a isolé différentes cultures de GSC directement à partir d'exérèses de patients. Ces cultures ont été caractérisées en détail et leurs propriétés cardinales de cellules souches cancéreuses ont été validées de manière robuste.

Lorsque j'ai rejoint l'équipe, un axe de recherche était centré sur l'étude de la signalisation Notch dans les GSC. Cette signalisation canonique est centrale durant l'embryogénèse du SNC. Elle agit à de multiples niveaux au cours de la spécification du lignage neural; mais intervient aussi dans le modelage du réseau vasculaire, composant abondant et essentiel à l'homéostasie du SNC. Chez l'adulte, la signalisation Notch est également active lors de la neurogénèse et lors des processus de néovascularisation. Dans les GBM, la majorité des études montrent que la cascade Notch favorise la gliomagénèse en activant la prolifération et l'auto-renouvellement des GSC au sein des niches périvasculaires. Néanmoins, les observations expérimentales divergent selon les études et l'implication moléculaire de Notch reste encore imprécise dans ce contexte.

Mon projet de thèse s'est alors articulé en deux objectifs principaux :

1. Etudier l'activation de la signalisation Notch1 dans les GSC

Durant la première partie de mes travaux, j'ai contribué à la compréhension de l'état d'activation de la signalisation Notch1 dans nos cultures de GSC. Contrairement à ce qui a été rapporté dans la majorité des publications, cette signalisation n'apparaît pas « suractivée » dans nos cultures. Le premier objectif a donc été d'examiner les conséquences d'une activation constitutive de cette voie sur le comportement *in vitro* et *in vivo* des GSC. Après transduction lentivirale du domaine NICD (Notch IntraCellular Domain), les GSC subissent une transition phénotypique drastique qui promeut leur différenciation vers le lignage vasculaire. Les cellules acquièrent des propriétés de cellules « péricyte-like » *in vitro*, par l'expression de protéines vasculaires caractéristiques. Cet état est également associé à l'augmentation de médiateurs majeurs du remodelage vasculaire. *In vivo*, cette transdifférenciation augmente la vascularisation des tumeurs par le contact étroit entre les GSC « péricyte-like » et les cellules endothéliales murines, qui à terme favorise la stabilisation du réseau vasculaire. Cette première étude montre un rôle inattendu de Notch1 dans la régulation phénotypique des GSC, qui favorise plutôt leur différenciation vers une identité vasculaire. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique pour laquelle j'ai contribué en tant que deuxième auteur (**Résultats Partie I, Publication 1**).

2. Elucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la transition neurovasculaire des GSC en aval de Notch1

La prolifération microvasculaire est une caractéristique majeure des GBM. Cette néovascularisation active implique des mécanismes moléculaires complexes qui pourraient expliquer l'échec des stratégies anti-angiogéniques. Les GSC favorisent activement ces processus au sein des niches périvasculaires. Précisément, leur plasticité vers le lignage endothélial ou péricytaire suggère leur capacité à constituer par elles-mêmes le réseau vasculaire. Cette idée de transdifférenciation vasculaire observée dans plusieurs études, dont la notre, est fortement débattue. En effet, la contribution réelle de cette plasticité à la vascularisation des GBM reste encore à être démontrée. De plus, les mécanismes transcriptionnels de cette reprogrammation sont encore très peu caractérisés.

Dans l'optique d'approfondir ces mécanismes, la deuxième partie de mon travail s'est attachée à étudier des facteurs de transcription pouvant réguler en aval de Notch1 le phénotype « péricyte-like » des GSC. Suite à l'expression forcée de NICD, les GSC expriment une signature moléculaire spécifique qui m'a orientée dans le choix de candidats originaux. Je me suis particulièrement intéressée aux facteurs de transcription TAL1 et SLUG,

tous deux impliqués dans la tumorigénèse et dans la vasculogénèse, mais très peu caractérisés dans le contexte spécifique des GBM.

Je me suis donc fixé comme deuxième grand objectif d'élucider leur fonction dans la transition neurovasculaire des GSC. Trois approches expérimentales ont été menées en parallèle afin d'atteindre cet objectif :

- Par une approche mécanistique classique, les conséquences phénotypiques de la modulation de l'expression de SLUG et TAL1 ont été examinées dans les GSC *in vitro*.
- D'après notre première étude, les GSC « péricyte-like » interagissent fortement avec les cellules endothéliales *in vivo* : ceci renforce l'hypothèse de régulations moléculaires spécifiques entre GSC et cellules endothéliales au sein des niches périvasculaires tumorales. La contribution de SLUG et TAL1 dans ce contexte plus physiologique a donc été testée *in vitro*, au moyen de co-cultures entre GSC et cellules endothéliales. De manière plus globale, l'impact physiologique des cellules endothéliales sur le phénotype « péricyte-like » des GSC via la co-culture a été examiné.
- Afin de replacer ces résultats dans le contexte pathologique réel des GBM, la présence de SLUG et TAL1 a été analysée directement sur des échantillons de patients. Ces facteurs de transcription sont notamment exprimés dans des populations de cellules vasculaires distinctes. Leur implication dans la transdifférenciation neurovasculaire des GSC a ensuite été examinée directement chez les patients, notamment par l'analyse *in situ* de leur origine tumorale ou non.

Cette deuxième partie de mes travaux fera l'objet d'une seconde publication soumise ces prochains mois (**Résultats Partie II**).

Enfin, en parallèle de cette étude au niveau transcriptionnel, j'ai observé de manière inattendue que Notch1 module l'activité du protéasome dans les GSC. Ces données préliminaires suggèrent une fonction centrale de ce système de dégradation dans la régulation du phénotype des GSC. Cet axe de recherche sera approfondi au cours des prochains mois au sein de l'équipe (**Résultats Partie III**).

Mon travail expérimental sera donc présenté dans l'ordre logique de ces trois parties : les résultats et perspectives seront discutés indépendamment dans chaque partie. Enfin, une conclusion plus générale et synthétique résumera les principaux résultats de ces travaux et les perspectives à développer dans de futurs projets.

RESULTATS

Partie I

Transdifférenciation des cellules souches de glioblastome en cellules «péricyte-like» par activation de la signalisation Notch1

Publication 1

Notch1 Stimulation Induces a Vascularization Switch with Pericyte-Like Cell Differentiation of Glioblastoma Stem Cells

Pierre-Olivier Guichet, Sophie Guelfi, Marisa Teigell, Liesa Hoppe, Norbert Bakalara, Luc Bauchet, Hugues Duffau, Katrin Lamszus, Bernard Rothhut et Jean-Philippe Hugnot

Publié dans *Stem Cells* en Janvier 2015

(Reproduction selon l'accord de Licence n° 4061361108114 conclu avec l'éditeur John Wiley and Sons)

Résumé de l'étude

Cette première étude a permis d'explorer la signalisation Notch1 dans des cultures de GSC isolées et précédemment caractérisées au sein de l'équipe (Gb4 et Gb7). A l'état basal, la forme activée du récepteur Notch1 est détectée dans les GSC mais le profil d'expression des répresseurs transcriptionnels « canoniques » Hes et Hey n'est pas clair en aval. Nous avons donc voulu observer les conséquences d'une forte activation constitutive de la signalisation Notch1 dans les GSC, par transduction lentivirale stable du domaine NICD (Notch Intracellular Domain) couplé à la fluorescence de la protéine YFP.

De manière inattendue, nous avons observé un changement phénotypique majeur des GSC *in vitro*. En effet, l'expression forcée de NICD dans les GSC provoque : 1-un changement de leur morphologie se traduisant par la perte de leur bipolarité, 2-une réduction drastique de leurs capacités migratoires et 3-une forte diminution de leurs capacités prolifératives en culture.

Ces résultats suggèrent que l'activation de Notch1 initie un programme de différenciation des GSC. En première analyse, nous avons constaté que les cellules maintiennent l'expression de marqueurs d'immaturité (nestine) mais perdent l'expression de facteurs de transcription essentiels à l'auto-renouvellement et la prolifération (Olig2, Sox2 et Ascl1).

Après une caractérisation phénotypique approfondie, il apparaît que la transduction de NICD induit l'expression de protéines typiques de cellules péricyaires (PDGFR β , NG2 et α SMA) ; et n'induit ni l'expression de marqueurs endothéliaux (vWF, CD31), ni l'expression de marqueurs astrocytaires (GFAP). Une analyse transcriptomique a aussi permis d'observer de manière globale les conséquences de l'activation de Notch1. Au niveau transcriptionnel, ces données génomiques ont confirmé une « reprogrammation » des GSC qui n'expriment plus Olig2, Sox2 et Ascl1 mais expriment d'autres facteurs candidats potentiellement au contrôle de cette spécification vasculaire, notamment le facteur SLUG. Ces données ainsi que des analyses protéomiques ont confirmé une transition vasculaire des GSC par la forte expression de médiateurs importants de la néovascularisation, notamment des protéines d'adhésion vasculaire (VCAM1 et ICAM1) ; des métalloprotéinases caractéristiques (MMP9) ; et enfin des cytokines majeures de l'angiogénèse (IL8, PLGF).

Ces observations *in vitro* ont été confirmées dans des GSC aux profils moléculaires différents provenant d'un autre laboratoire (Gunther et al. 2008). Un haut niveau protéique de NICD dans les GSC aurait donc des conséquences moléculaires conservées parmi l'hétérogénéité moléculaire connue de ces cellules. De plus, par l'utilisation d'un système

d'activation de Notch1 inductible à la doxycycline, nous montrons que cette transition phénotypique des GSC est réversible en ce qui concerne les effets anti-prolifératifs et l'antagonisme d'expression entre Olig2 et SLUG.

L'activation de Notch1 induit donc une transdifférenciation des GSC en cellules « péricyte-like », dont les propriétés favorisent la néovascularisation *in vitro*.

Après xéno greffes intracrâniennes et sous-cutanées chez la souris nude, ces résultats ont été confirmés par l'observation de tumeurs fortement vascularisées et denses après activation de Notch1, contrairement aux tumeurs contrôles qui sont peu vascularisées mais diffuses. La transdifférenciation des cellules activées par Notch1 en cellules « péricyte-like » a également été confirmée *in vivo* par 1- l'expression de protéines péricytaires par les GSC (PDGFR β , NG2 et α SMA) ; 2-la normalisation des vaisseaux qui se traduit par des cellules endothéliales stabilisées donnant lieu à des vaisseaux plus gros et plus ronds et 3- l'observation d'une interaction forte entre cellules tumorales et cellules endothéliales de l'hôte (CD31⁺) qui pourrait expliquer cette normalisation.

Nos résultats placent donc le programme Notch1 au centre du contrôle de la vascularisation des GBM, notamment par le contrôle réversible de la plasticité vasculaire des GSC (Figure 43).

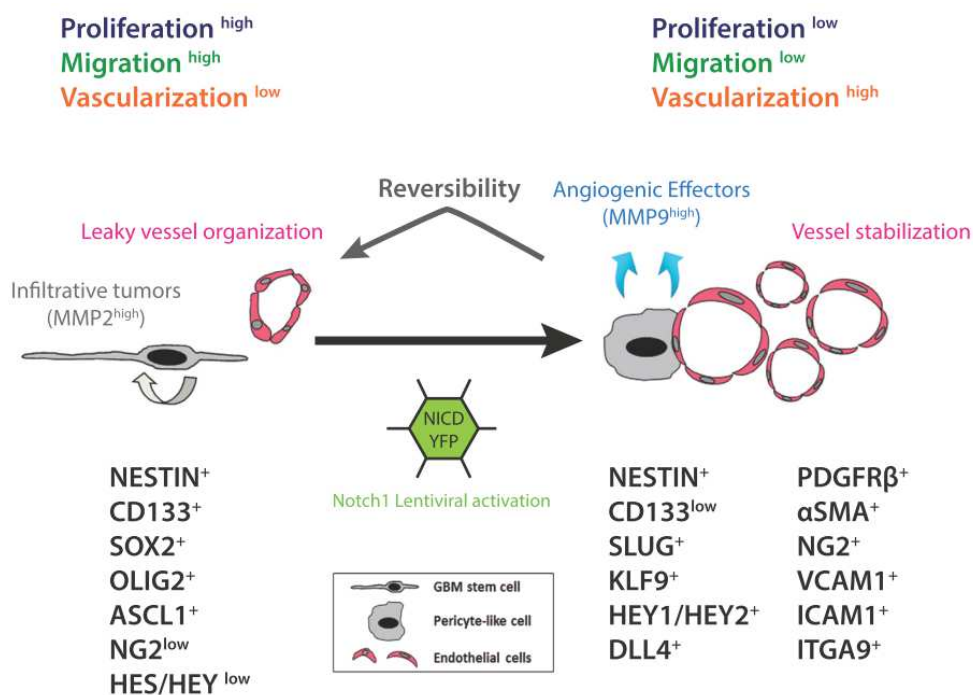


Figure 43 - Conséquences de l'activation de Notch1 dans les GSC : la transduction de NICD induit une transition en cellules « péricyte-like » favorisant la vascularisation. Ce changement phénotypique s'accompagne d'une signature moléculaire spécifique.

Notch1 Stimulation Induces a Vascularization Switch With Pericyte-Like Cell Differentiation of Glioblastoma Stem Cells

PIERRE-OLIVIER GUICHET,^a SOPHIE GUELFY,^a MARISA TEIGELL,^a LIESA HOPPE,^a NORBERT BAKALARA,^a LUC BAUCHET,^{a,b} HUGUES DUFFAU,^{a,b} KATRIN LAMSZUS,^c BERNARD ROTHHUT,^{a,*} JEAN-PHILIPPE HUGNOT^{a,d,*}

Key Words. Glioma • Glioblastoma • Notch • Vascularization

*Bernard Rothhut and Jean-Philippe Hugnot are joined last authors.

^aInstitut des Neurosciences de Montpellier, Hôpital St Eloi, Montpellier, Cedex, France; ^bCHU Montpellier, Hôpital Guy de Chauliac, Montpellier, France;

^cLaboratory for Brain Tumor Biology, Department of Neurosurgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ^dUniversité Montpellier, Place Eugène Bataillon, Montpellier, Cedex, France

Correspondence: Jean-Philippe Hugnot, Ph.D., INSERM U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, Hôpital St Eloi, 80 avenue Augustin Fliche 34091 Montpellier Cedex 05, France. Telephone: 33-499-636-008; Fax: 33-499-636-020; e-mail: hugnot@univ-montp2.fr; or Bernard Rothhut, Ph.D., INSERM U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, Hôpital St Eloi, 80 avenue Augustin Fliche 34091 Montpellier Cedex 05, France. Telephone: 33-499-636-056; Fax: 33-499-636-020; e-mail: bernard.rothhut@inserm.fr

Received October 16, 2013; accepted for publication May 10, 2014; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* June 4, 2014.

© AlphaMed Press
1066-5099/2014/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.1767>

ABSTRACT

Glioblastoma multiforms (GBMs) are highly vascularized brain tumors containing a subpopulation of multipotent cancer stem cells. These cells closely interact with endothelial cells in neurovascular niches. In this study, we have uncovered a close link between the Notch1 pathway and the tumoral vascularization process of GBM stem cells. We observed that although the Notch1 receptor was activated, the typical target proteins (HES5, HEY1, and HEY2) were not or barely expressed in two explored GBM stem cell cultures. Notch1 signaling activation by expression of the intracellular form (NICD) in these cells was found to reduce their growth rate and migration, which was accompanied by the sharp reduction in neural stem cell transcription factor expression (ASCL1, OLIG2, and SOX2), while HEY1/2, KLF9, and SNAI2 transcription factors were upregulated. Expression of OLIG2 and growth were restored after termination of Notch1 stimulation. Remarkably, NICD expression induced the expression of pericyte cell markers (NG2, PDGFR β , and α -smooth muscle actin [α SMA]) in GBM stem cells. This was paralleled with the induction of several angiogenesis-related factors most notably cytokines (heparin binding epidermal growth factor [HB-EGF], IL8, and PLGF), matrix metalloproteinases (MMP9), and adhesion proteins (vascular cell adhesion molecule 1 [VCAM1], intercellular adhesion molecule 1 [ICAM1], and integrin alpha 9 [ITGA9]). In xenotransplantation experiments, contrasting with the infiltrative and poorly vascularized tumors obtained with control GBM stem cells, Notch1 stimulation resulted in poorly disseminating but highly vascularized grafts containing large vessels with lumen. Notch1-stimulated GBM cells expressed pericyte cell markers and closely associated with endothelial cells. These results reveal an important role for the Notch1 pathway in regulating GBM stem cell plasticity and angiogenic properties. *STEM CELLS* 2015;33:21–34

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) are primitive brain tumors with a poor prognosis due to rapid brain infiltration and treatment resistance [1]. They are characterized by extensive vascularization associated with proliferation of endothelial cells. One current therapeutic approach against GBM aims at targeting this vascularization process to reduce tumoral cell growth. Neutralizing antibodies against proangiogenic cytokines such as vascular endothelial growth factor (VEGF) have been shown to reduce GBM growth [2]. GBM are heterogeneous tumors containing cells with distinct degrees of differentiation, notably highly tumorigenic neural stem-like cells have been identified [3]. These GBM stem cells are multipotent and can generate neuronal, glial, and even vascular cells after differentiation [4]. Recent studies suggest that there exist different types of GBM stem cells

[5]. Some generate very infiltrative but weakly angiogenic tumors upon xenotransplantation in mice [6]. Interestingly, such cultures can acquire angiogenic features after several passages in vitro. Others have greater angiogenic properties and form highly vascularized tumors in mice due to the release of high levels of proangiogenic mediators such as VEGF [7].

The Notch pathway is a complex and central regulator of many fundamental cellular processes [8]. Four Notch receptors and several canonical and noncanonical ligands have been identified triggering a cascade of events leading to the upregulation of bHLH transcription factors of the Hes and Hey families. Notch signaling is crucial for normal but also for tumoral vasculature development [9]. Indeed, inhibition of the Notch ligand DLL4 in gliomas led to disorganized and less functional vessels [10]. The contribution of Notch to the regulation of fate and maintenance of embryonic

and adult stem cells has been well-characterized [11] and more recent studies have also reported the importance of the Notch pathway in the maintenance and proliferation of GBM [12] and other cancer stem cells [13]. In contrast, the implication of the Notch pathway in the regulation of angiogenic properties and migration of stem cells is less documented.

We previously isolated and characterized two cultures (Gb4 and Gb7) derived from GBM [14]. These cells grow as neurospheres in defined media and meet criteria for classifying them as GBM stem cells, that is, multipotentiality, expression of neural stem cell markers (CD133, Nestin, Olig2, and Sox2), and generation of glioma-like tumors upon intracranial grafts. These cultures generated infiltrative but weakly vascularized tumors in orthotopic grafts. In this study, we questioned the level of Notch1 activity in these cells and explored the consequences of stimulating this pathway on the proliferation, migration, and tumoral vascularization. We found that Notch1 stimulation triggered an angiogenic program and the expression of pericyte cell markers in GBM stem cells, which resulted in highly vascularized tumors upon xenotransplantation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Isolation, culture, and characterization of Gb4 and Gb7 GBM stem cells were described in [14]. Medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 1:1 (Life Technologies, Saint Aubin, France), N2 and B27 supplements (Life Technologies, Saint Aubin, France), 2 mM glutamine (Life Technologies, Saint Aubin, France), 0.6% glucose (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA), 20 µg/ml bovine insulin (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented by 2 µg/ml Heparin (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA), 20 ng/ml EGF (PeproTech France, Neuilly-Sur-Seine, France), and 10 ng/ml FGF2 (PeproTech France, Neuilly-Sur-Seine, France). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Fig. 2E) were cultured in endothelial cell media MV2 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany).

Growth Assay

To assess the effect of Notch1 (NICD) on cell growth, 10,000 infected cells were dissociated and seeded in 1 ml of media in 24 well plates coated with poly-HEMA (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) to inhibit cell adherence. After 7 days, the neurospheres were directly dissociated by addition of trypsin in the wells (0.5% final) and the cell number was measured with an automated Z2 coulter cell counter (Beckman Coulter France, Villepinte Roissy, France).

Lentiviral Constructs

Flag-NICD-IRES-yellow fluorescent protein (YFP) and control IRES-YFP lentiviruses were gifts from Dr. Sutton (Yale, USA). NICD cDNA contains the sequence coding for amino acids 1762 to 2556 of the human Notch1 receptor [15]. To construct the doxycycline-inducible NICD lentivirus, the small hairpin RNA sequence from the pTRIPZ lentiviral plasmid (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) was removed by Agel and Mlu1 cuts and replaced by the Flag-NICD-IRES-YFP or IRES-YFP cassettes generated by polymerase chain reaction (PCR) from plasmids provided by Dr. Sutton. Infected cells were selected with puromycin (0.125 µg/ml). Viral particles were

produced and concentrated as described in [16]. For infection, 100 ng of p24 was used for 1×10^5 cells corresponding to a multiplicity of infection of six. QPCRs and protein analyses (Western blot [WB] and angiogenesis-related antibody array) were performed 5 days after viral transduction.

Transfection and Luciferase Assays

pHes5-DsRed2 (Hes5 promoter), pCLIG-Hes5 (expression vector) (Pr. Kageyama, Riken Institute, Kyoto, Japan), pMMP9-Luc (matrix metalloproteinases 9 [MMP9] promoter 1723 bp) (Dr. Tacon, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada), and pcDNA3-NICD (expression vector) plasmids were transfected into GBM stem cells using an Amaxa apparatus and neural stem cell kit (Lonza, Verviers, Belgium). Transfected cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) or lysed for luciferase assay (Promega France, Charbonnières, France) 48 hours after infection. Purified Jagged1 ligand (R&D Systems Europe, Lille, France) was added to the cell medium for 5 days (zymography and QPCR) or 2 days (MMP9 promoter luciferase assays) (Fig. 4C–4E).

Xenotransplantation

Cells (2×10^5) were injected as described in [14] into the striatum of nude mice (Harlan France, Gannat, France) under isoflurane anesthesia with the authorisation of the local ethical committee. Animals were fixed by intracardiac perfusion with PBS-4% paraformaldehyde 2 months post-grafting. For subcutaneous transplantations, 5×10^6 cells in 150 µl of medium supplemented with 50% of Matrigel (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) were injected into the flanks of nude mice. Two months later, the tumors were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde for 4 hours before processing for cryostat sectioning.

Statistical Analysis

All in vitro experiments were performed at least two times and most of them were done three times. Data are represented as means \pm SEM. Statistical differences in experiments were analyzed using the Mann-Whitney rank sum test (GraphPad Prism software). Significances are ***, $p < .001$; **, $p < .01$; *, $p \leq .05$.

Additional material and methods are provided in the Supporting Information Method section.

RESULTS

Expression of Notch1-Regulated Transcription Factors in GBM Stem Cells

We started our study by questioning the level of Notch1 activation in GBM stem cells by using the Gb4 and Gb7 cultures [14]. Upon binding to its ligand, Notch1 receptor is cleaved by γ -secretase enzyme to release the activated intracellular domain (NICD, 90 kDa). This truncated form was readily detected in Gb4/Gb7 protein extracts (Fig. 1A) thus confirming activation of the Notch1 receptor in GBM stem cells as observed by others [17]. Notch1 controls several transcription factors and *Hes1*, *Hes5*, *Hey1*, and *Hey2* bHLH repressors are considered as primary readouts of Notch1 pathway activation. First, we examined the expression of these repressors in control Gb4/Gb7 cells by QPCR and WB analysis. At the mRNA level, *Hes1* and *Hey2* were

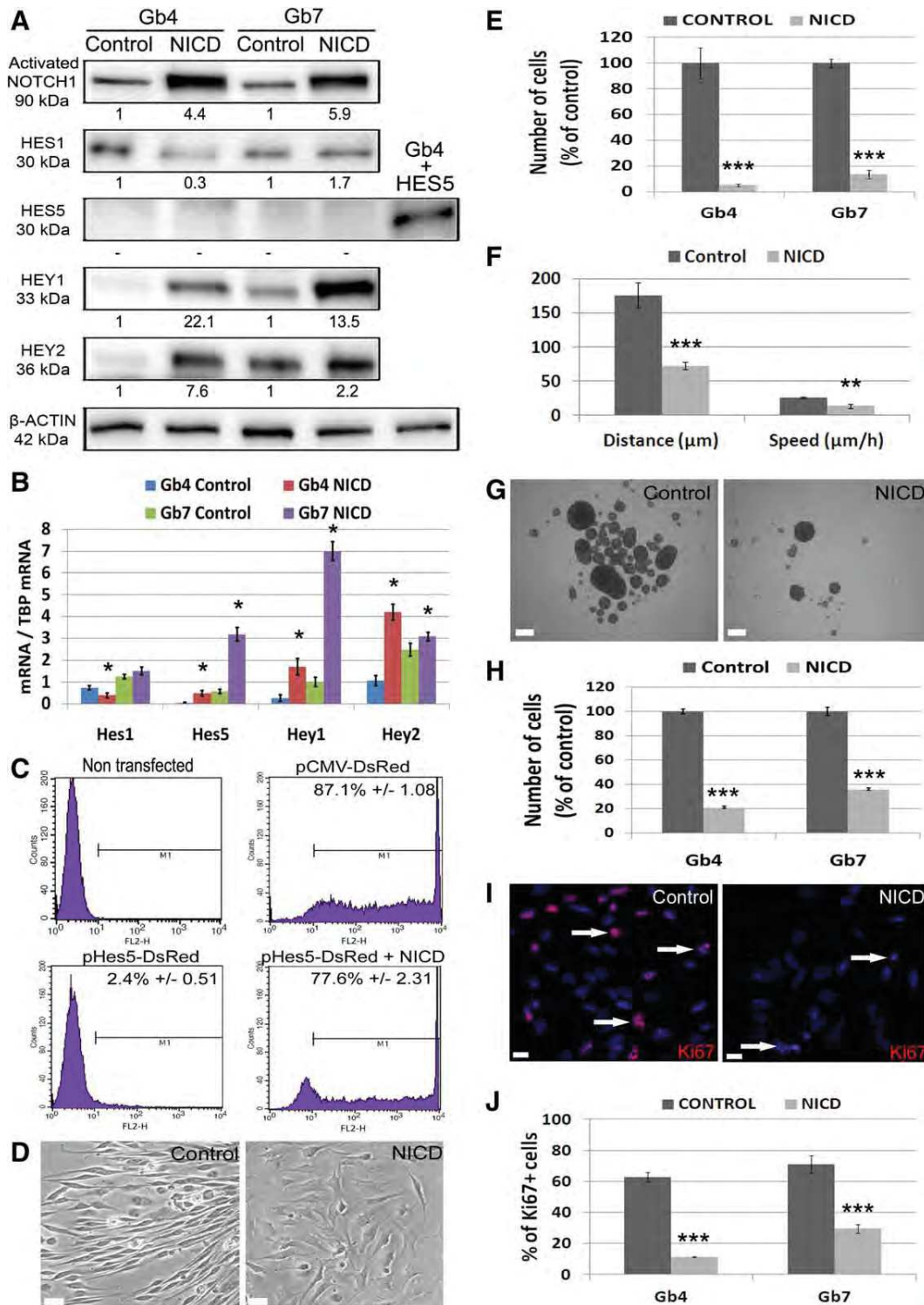


Figure 1. Notch1 (NICD) pathway stimulation affects GBM cell morphology, proliferation, and migration. **(A):** Western blot detection of the indicated proteins from control and NICD-virus infected Gb4 and Gb7 cells. The HES5 lane shows a positive control obtained by transfection of Gb4 cells with a HES5-expressing plasmid. Numbers under each blot represent the fold change (NICD/control) in protein expression normalized to β -actin. **(B):** QPCR analysis of the indicated Notch1-target transcription factors in control and NICD-infected Gb4 and Gb7 cells ($n = 4$ wells). $^* p \leq .05$. **(C):** Effect of NICD expression on Hes5 promoter activity. Gb4 cells were left untransfected (control) or transfected with pCMV-DsRed, pHes5-DsRed alone or together with NICD and then analyzed by flow cytometry (FL2-H channel). The percentage of DsRed⁺ cells (delimited by horizontal bars) is shown ($n = 3$ independent experiments). **(D):** Morphological changes in Gb4 cells induced by NICD. Cells become more polymorphous compared with the bipolar shaped control cells. **(E):** Transwells migration of control and NICD virus infected cells. Numbers indicate the percentage of cells found in the lower compartment of the transwells after 24 hours of incubation ($n = 4$ wells). The data are representative of three independent experiments. $^{***} p < .001$. **(F):** Time-lapse video microscopy analysis of Gb4 cell migration plated on laminin. Speed and distance of migration were measured ($n = 10$ cells). The data are representative of three independent experiments. Videos are provided as Supporting Information Videos 2 and 3. $^{**} p < .01$; $^{***} p < .001$. **(G):** Aspect of Gb4 neurosphere cell cultures 7 days after infection with control or NICD virus. **(H):** Quantification of the growth experiment presented in (G) for Gb4 and Gb7 cells. The percentage of cells obtained 7 days after infection is indicated ($n = 6$ wells). The data are representative of three independent experiments. $^{***} p < .001$. **(I):** Ki67 staining by immunofluorescence of control and NICD virus infected Gb4 cells. Arrows show positive nuclei. **(J):** Quantification of the experiment presented in (I) ($n = 4$ coverslips). $^{***} p < .001$. Scale bars = 10 μ m (D, I), 100 μ m (G). Abbreviations: NICD, Notch1; pCMV, cytomegalovirus promoter; TBP, TATA box binding protein.

predominantly expressed, while in comparison, *Hes5* and *Hey1* expression was less abundant in these cells (Fig. 1B). At the protein level, whereas HES1 was detected both in Gb4 and Gb7, HEY1 and HEY2 were readily detectable only in Gb7 and HES5 was absent in both cultures (Fig. 1A). Then we further investigated the level of activation of the Notch1 pathway by transfecting Gb4/Gb7 cells with a *Hes5* promoter-DsRed construct, which has been shown to be a good readout of Notch1 activity in neural cells [18]. Gb4 cells were transfected with p*Hes5*-DsRed or pCMV-DsRed control constructs and the number of red fluorescent cells was quantified by flow cytometry 48 hours later. Compared with control, we detected only a very small fraction (2.4%) of positive cells (Fig. 1C; Supporting Information Fig. 1A). The same result was obtained with Gb7 (data not shown).

The regulation of *Hes* and *Hey* proteins by Notch1 is highly dependent on the examined cell type. Thus, we questioned whether these genes were upregulated upon Notch1 pathway stimulation in GBM stem cells. This was carried out by transducing Gb4/Gb7 cells with lentiviruses expressing NICD and an IRES-YFP cassette to easily monitor infected cells. The majority of the cells (>80%) were infected and a four- and sixfold increase in the intracellular form of Notch1 was detected by WB in Gb4 and Gb7 cells respectively (Fig. 1A). In Gb4 cells, *Hey1/2* and *Hes5* messengers were sharply upregulated, while *Hes1* was reduced (Fig. 1B). In Gb7 cells, only *Hes5*, *Hey1*, and *Hey2* were significantly upregulated by NICD. This increase in *Hes5* gene expression was also revealed by transfection of the p*Hes5*-DsRed construct as most of the Gb4 cells were now positive in NICD-transduced cells (Fig. 1C). At the protein level, HES5 protein could still not be found while HEY1 and HEY2 expression were increased both in Gb4 and Gb7. HES1 protein level was reduced (Gb4) or slightly increased (Gb7) after NICD expression.

Stimulation of Notch1 Signaling Affects the Proliferation, Migration, and Morphology of GBM Stem Cells

This unanticipated low level of Notch1 pathway effectors in GBM stem cells invited us to explore further the effect of Notch1 stimulation in these cells. Compared with control cells, stimulation of Notch1 signaling by NICD resulted in an overt change in the cellular morphology as evidenced by the acquisition of a polymorphous shape instead of the typical bipolar shape displayed by Gb4 and Gb7 cells (Fig. 1D) and the alteration of the forward/side scatter distribution on a flow cytometer (Supporting Information Fig. 1B). These morphological modifications suggested that important cytoskeleton rearrangements were induced upon activation of Notch1 pathway which could also affect cell migration. This incited us to assess the migratory behavior of Gb4 and Gb7 cells in vitro using three-dimensional (Boyden chambers) and two-dimensional (motility on laminin) assays. Indeed, we observed that cells transduced with NICD virus were markedly inhibited in their ability to migrate through porous membranes (Fig. 1E). In addition, their average speed and distance of migration on laminin was also sharply reduced (Fig. 1F; Supporting Information Videos 2, 3). Finally, we noticed an alteration in the growth of NICD infected cells (Fig. 1G). This observation was quantified by measuring the cell number obtained 7 days after viral transduction (Fig. 1H) and also by quantifying the number of Ki67⁺ cells by immunofluorescence (IF) (Fig. 1I,

1J). These results revealed that Notch1 stimulation resulted in an important decrease in cell proliferation. A same growth reduction was observed using transient transfection of a NICD-expressing plasmid thus ruling out a nonspecific effect due to the use of virus (Supporting Information Fig. 1C).

Pericyte Marker Expression but no Endothelial-Transdifferentiation Induced by Notch1

The Notch pathway is a central regulator of stem cell differentiation and self-renewal. We thus characterized the phenotype of Gb4 and Gb7 cells upon Notch1 stimulation by WB and IF (Fig. 2A, 2B). Gb4 and Gb7 cells express a high level of SOX2, a critical transcription factor for the maintenance of stem cells together with OLIG2 and ASCL1 which are typically expressed by oligodendrocyte precursor cells. Remarkably, NICD induced a drastic reduction in these three transcription factors (Fig. 2A, 2B). These results prompted us to explore whether stimulation of the Notch1 pathway promoted the differentiation of our cells. The expression of NESTIN, a marker for neural immature cells was in fact slightly increased after NICD expression (Fig. 2A–2C). In contrast, while the expression of the CD133 stem cell marker was still detectable, its mean intensity and the number of positive cells were reduced after NICD expression both in Gb4 and Gb7 (Fig. 2D). We then examined the astrocytic lineage as Notch1 was reported to be central to astrocytic differentiation of neural stem cells [19]. Undifferentiated Gb4 and Gb7 cells express a low level of GFAP (Supporting Information Fig. 1D), a typical marker for astrocytes. However, expression of NICD was not able to upregulate its expression suggesting the absence of astrocytic differentiation induced by Notch1 in these cells. Recently, several groups reported a Notch pathway-dependent transdifferentiation of GBM cells into endothelial cells (reviewed in [4]). To test whether NICD induced an endothelial phenotype in our cells, we explored by IF the expression of two typical endothelial markers, namely CD31 (PECAM1) and the von Willbrand factor (vWF). For these experiments, Gb4 and Gb7 cells were cultured in endothelial cell medium to provide trophic factors for this cell type. Human endothelial cells derived from umbilical cord (HUVEC) were used as positive controls. As shown on Figure 2E, we were unable to detect CD31⁺ or vWF⁺ cells in Gb4 or Gb7 cultures after expression of NICD. Finally, as Notch1 signaling has been shown to have a key role in the formation of vascular smooth muscle cells [20], we explored the expression of three markers of pericyte cells, namely α -smooth muscle actin (α SMA or ACTA2), NG2, and PDGFR β . WB analysis showed that indeed, NICD induced a conspicuous level of these three proteins in both cultures (Fig. 2A). This was confirmed by IF analysis which revealed the expression of pericyte cell markers in a fraction of NICD virus infected cells (Fig. 2F, 2G).

Reversible Effect of Notch1 on OLIG2 and Growth

The loss of OLIG2 expression in parallel with the reduction in growth noted after Notch1 stimulation, could be either irreversible or conversely, a transient state acquired by cells and maintained by NICD expression but lost upon its release. We addressed this issue in Gb4 cells by constructing a lentivirus in which NICD expression was controlled by a doxycycline-inducible promoter. A scheme for the experimental procedure used to examine the reversibility of NICD effects is shown in Supporting Information Figure 2A. Doxycycline (Dox) added to the media of

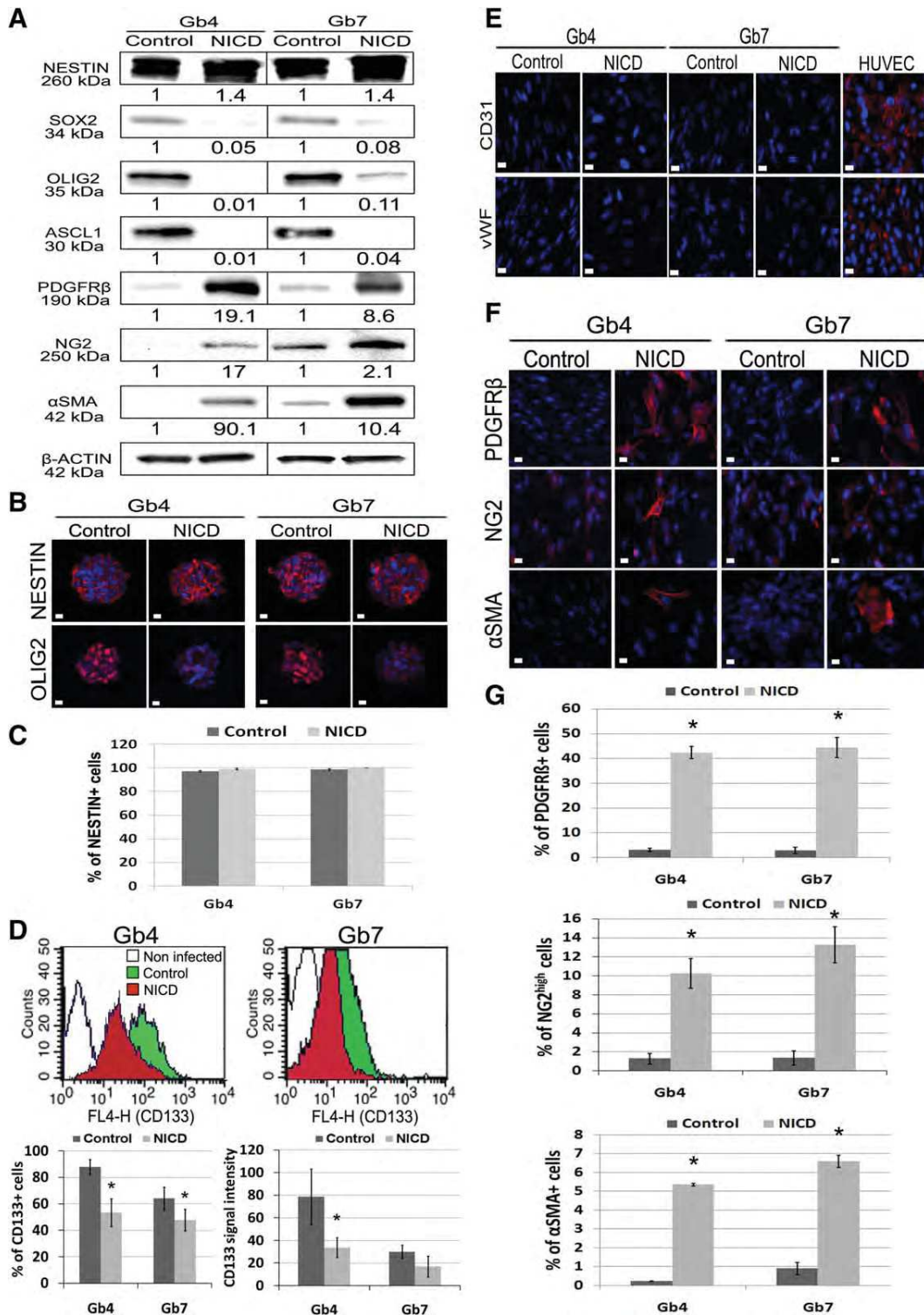


Figure 2. Notch1 (NICD) stimulation induces a phenotypic switch into pericyte-like cells but no endothelial transdifferentiation of GBM cells. **(A):** Western blot analysis of control and NICD infected Gb4 and Gb7 cells for the indicated proteins. Numbers under each blot represent the fold change (NICD/control) in protein expression normalized to β -actin. **(B):** immunofluorescence (IF) against NESTIN and OLIG2 in Gb4 and Gb7 control and NICD-virus infected neurospheres. A strong reduction in OLIG2 expression is observed, conversely NESTIN expression is unaffected. **(C):** Quantification of the percentage of NESTIN+ cells in control or NICD-infected Gb4 and Gb7 cells. Approximately 300 cells were analyzed per condition ($n = 4$ coverslips). **(D):** Effect of Notch1 stimulation on CD133 expression. Gb4 and Gb7 cells were transduced with control or NICD-virus, incubated for 5 days and then processed for CD133 cytometry (FL4-H channel). The percentage of CD133+ cells and the mean of CD133 signal intensity cells are shown ($n = 4$ independent experiments). *, $p \leq .05$. **(E):** IF detection of the indicated markers in adherent Gb4 and Gb7 control and NICD-infected cells compared with human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). In contrast to HUVEC, Gb4 and Gb7 cells did not show any staining for the endothelial markers CD31 and vWF. **(F):** IF staining of the indicated proteins. Notch1 stimulation induced the expression of pericyte cell markers (platelet-derived growth factor receptor β , NG2, and α -smooth muscle actin) in a fraction of the cells. Of note, control Gb4/Gb7 cells expressed an endogenous low level of NG2 but NICD expression induced the formation of a new cell population showing a higher NG2 staining (NG2^{high} in G) and a larger size. **(G):** Quantification of the experiment presented in (F). Approximately 300 cells were analyzed per condition ($n = 4$ coverslips). *, $p \leq .05$. Scale bars = 10 μ m (B, E, F). Abbreviations: HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; NG2, neuron-gial antigen 2; NICD, Notch1; OLIG2, oligodendrocyte transcription factor 2; PDGFR β , platelet-derived growth factor receptor β ; α SMA, α -smooth muscle actin; vWF, von Willbrand factor.

infected cells for 3 days induced NICD (visualized by an antibody against the FLAG epitope) and a sharp reduction in the number of OLIG2⁺ cells (Supporting Information Fig. 2B). Then Dox was removed (–Dox) or maintained (+Dox) for 6 days. Supporting Information Fig. 2C, 2D shows that removing of Dox enabled the cells to reexpress OLIG2 at the level observed in control-virus infected cells. Conversely, the SNAI2 transcription factor which is induced by NICD (see next paragraph) was downregulated upon doxycycline removal (Supporting Information Fig. 2C, 2E). To get insight into the reversibility of NICD on growth, we measured the cell number and the percentage of Ki67⁺ cells in the different conditions. We observed that removal of Dox induced an increase (30%) in cell number, equaling the number found in control-virus infected cells, and this was paralleled by an increase in Ki67⁺ cells (Supporting Information Fig. 2F, 2G). Collectively, these results indicated that the effects of Notch1 on OLIG2/SNAI2 expression and growth were reversible. The same results were obtained with Gb7 cells (data not shown).

Transcriptional Profiling and Proteomic Analysis Revealed a Vascularization Switch Induced by Notch1 Stimulation in Glioma Cells

A broader view of the transcriptomic modifications induced by Notch1 stimulation was explored using microarray analysis in Gb4 and Gb7 cultures. Forty eight hours following infection with NICD or control viruses, approximately 210 and 60 genes showed respectively a fourfold increase or decrease in their expression in both Gb4 and Gb7 cells (Supporting Information File 1). This analysis confirmed the observed sharp downregulation of *ASCL1* and *OLIG2*, while *SOX2* transcript expression was only moderately affected (Supporting Information Table 3). More interestingly, this uncovered the strong upregulation by NICD of *SNAI2* and *KLF9* transcription factors. The presence of the corresponding proteins was checked by WB and IF analysis (Fig. 3A, 3B), showing that most nuclei stained positive for SNAI2 and KLF9.

A gene ontology analysis was used to classify the cellular functions altered by Notch1 stimulation. As expected from our in vitro analysis, the expression of several genes associated with cell proliferation was reduced by NICD (Supporting Information Tables 3, 4). More surprisingly, this analysis revealed that Notch activation upregulated the expression of several genes typically associated with angiogenesis and vessel remodeling. Most notably, several endothelial cell adhesion proteins (vascular cell adhesion molecule 1 [*VCAM1*], intercellular adhesion molecule 1 [*ICAM1*], integrin alpha 9 [*ITGA9*]), angiogenic cytokines (*ANGPT2*, *IL8*, *PLGF*, heparin binding epidermal growth factor [*HB-EGF*]) and the angiogenic metalloproteinase *MMP9* were sharply upregulated by NICD (Supporting Information Table 3). In addition, the expression of *DLL4*, a Notch ligand well-known for its critical role in embryonic and tumoral angiogenesis was substantially increased. Some of these transcriptional variations were validated at the protein level. First, commercial antibody arrays designed for assessing angiogenesis-related factors were probed. The supernatant of Gb4 and Gb7 cultures infected with control or NICD virus were used with these membranes. Results shown on Figure 3C and 3D confirmed that NICD triggered the production of IL8, HB-EGF, PLGF, and *MMP9* in Gb4 and Gb7 cells, as well as endostatin, an angiogenic inhibitor derived from collagen XVIII. Conversely, the level of VEGF was reduced in both cultures. Second, we explored the presence

of the three vascular adhesion proteins (*VCAM1*, *ICAM1*, and *ITGA9*) and *DLL4* by IF or WB. While these markers were barely detected in control-virus infected cells, NICD triggered a strong increase in the expression of these proteins (Fig. 3A, 3B, 3E, 3F). Interestingly, not all cells expressing NICD (detected by YFP thanks to the NICD-IRES-YFP construct) were positive for *VCAM1* or *ICAM1* (Fig. 3F), suggesting that other unknown and probably limiting factors cooperate with NICD to induce these vascular-associated markers in glioma cells.

A MMP2 to MMP9 Switch Induced by Notch1 Stimulation

MMPs are zinc-dependent endopeptidases that are capable of degrading extracellular matrix proteins and a number of bioactive molecules such as cell surface receptors and chemokines/cytokines. MMPs play a major role on cell behavior such as proliferation, migration, differentiation, inflammation and angiogenesis [21]. Interestingly, upon NICD expression, microarray analysis revealed a remarkable switch, in both Gb4 and Gb7 cells, in the level of transcripts coding for *MMP2* and *MMP9*, two gelatinases members of the family of MMPs (Supporting Information Table 3). *MMP9* expression was increased 121-fold, while *MMP2* expression was decreased eightfold. We confirmed this MMP switch by WB and detection of MMP activity by zymography. In control Gb4 and Gb7 cells, no *MMP9* protein (Fig. 4A) or enzymatic activity (Fig. 4B) was detected. In contrast, these cells expressed a low level of *MMP2* which generated a band at 72 kDa detected by zymography (Fig. 4B) and WB (not shown). Remarkably, upon NICD expression, both *MMP9* activity and protein were now readily detectable while *MMP2* activity was hardly observed. These results confirmed the opposite and Notch1-regulated expression of these two gelatinases in GBM stem cells.

We also examined whether *MMP9* induction could be obtained by activation of the Notch pathway using the soluble ligand Jagged1 which can increase the expression of *Hey1* and *Hes5* mRNA in our cells (Fig. 4E). Indeed, addition of Jagged1 in growing Gb4 cells was able to induce, in a dose-dependent manner, a low level of secreted *MMP9* detected by zymography (Fig. 4C). Moreover, using a luciferase assay with a *MMP9* promoter construct, we confirmed that incubation of cells with Jagged1 significantly enhanced the *MMP9* promoter activity in both Gb4 and Gb7 cells (Fig. 4D).

Effects of NICD on GS2 and GS8 GBM Stem Cells

To extend our results to GBM stem cell cultures derived in a different laboratory, we used GS2 and GS8 cells published in [22]. These cells have distinct transcriptional profiles (cluster 1 and 2 in [22]). As observed in Gb4 and Gb7, NICD expression in these cells induced a growth reduction (Supporting Information Fig. 3A–3C) associated with a decrease in OLIG2 expression and the upregulation of NESTIN, SNAI2, and KLF9 together with the expression of pericyte markers (PDGFR β and α SMA) (Supporting Information Fig. 3C, 3D). This was also accompanied by a *MMP2* to *MMP9* switch (Supporting Information Fig. 3E).

Notch1 Stimulation Generates Highly Vascularized and Poorly Disseminating Grafts Containing Glioma-Derived Pericyte-Like Cells

Collectively, these molecular data suggested that stimulation of Notch1 pathway in GBM stem cells might promote tumoral

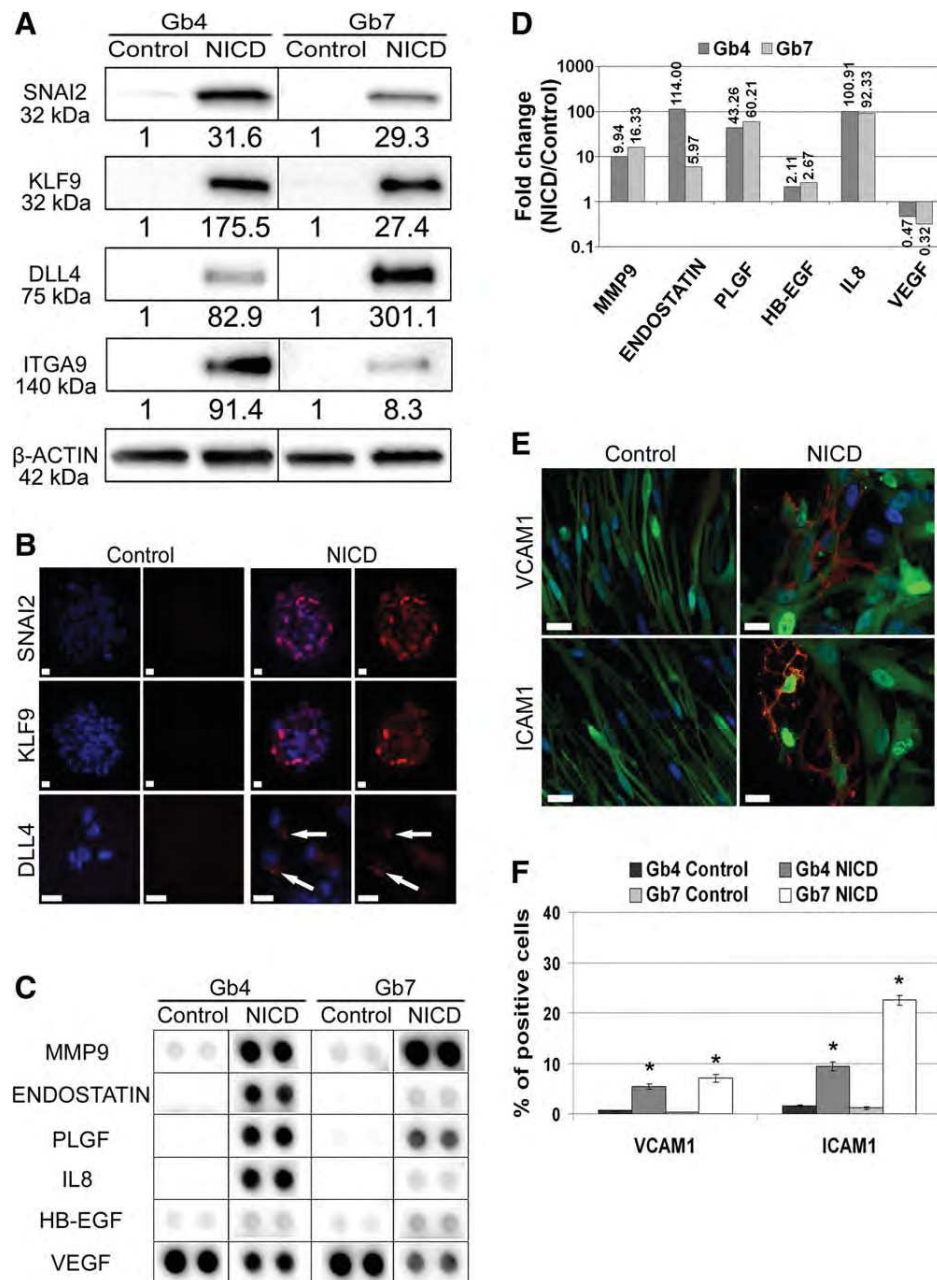


Figure 3. Notch1 (NICD) stimulation induces proteins involved in vascularization. **(A):** Detection of the indicated proteins by Western blot in Gb4 and Gb7 cells 5 days after infection with control or NICD virus. Numbers under each blot represent the fold change (NICD/control) in protein expression normalized to β -actin. **(B):** Immunostaining of Gb4 neurospheres confirms that NICD induced the strong nuclear expression of SNAI2 and KLF9. DLL4 staining was observed in NICD-infected cells as dots in the cytoplasm (arrows). **(C):** Detection of angiogenesis-related proteins in Gb4 and Gb7 supernatants by antibody arrays. The main variations are shown. The angiogenic factors matrix metalloproteinases 9 (MMP9), endostatin, PLGF, IL8, and heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF) increased in response to NICD infection, whereas that of vascular endothelial growth factor decreased. **(D):** Quantification of the experiment presented in (C). Fold change differences in secretion (NICD/control infected cells) are indicated. **(E):** NICD triggered an increase in the expression of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), as assessed by immunostaining of Gb4 cells. **(F):** Quantification of VCAM1⁺ and ICAM1⁺ cells in control and NICD-virus infected Gb4 and Gb7 cells. Approximately 300 cells were analyzed per condition ($n = 4$ coverslips). *, $p \leq .05$. Scale bars = 10 μ m (B, E). Abbreviations: DLL4, delta like ligand 4; HB-EGF, heparin binding epidermal growth factor; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; IL8, interleukin 8; ITGA-9, integrin alpha 9; KLF9, kruppel-like factor 9; MMP9, matrix metalloproteinases 9; NICD, Notch1; PLGF, placental growth factor; SNAI2, snail family zinc finger 2; VCAM1, vascular cell adhesion molecule 1; VEGF, vascular endothelial growth factor.

vascularization. However, being a very complex process, only in vivo experiments can uncover the actual influence of this pathway on the tumoral vessel content. This was assessed by

intracranial grafts of Gb4 and Gb7 cells. Typically, upon transplantation, Gb4 cells formed diffuse and poorly vascularized tumors as evidenced by the rarity of vessels in areas

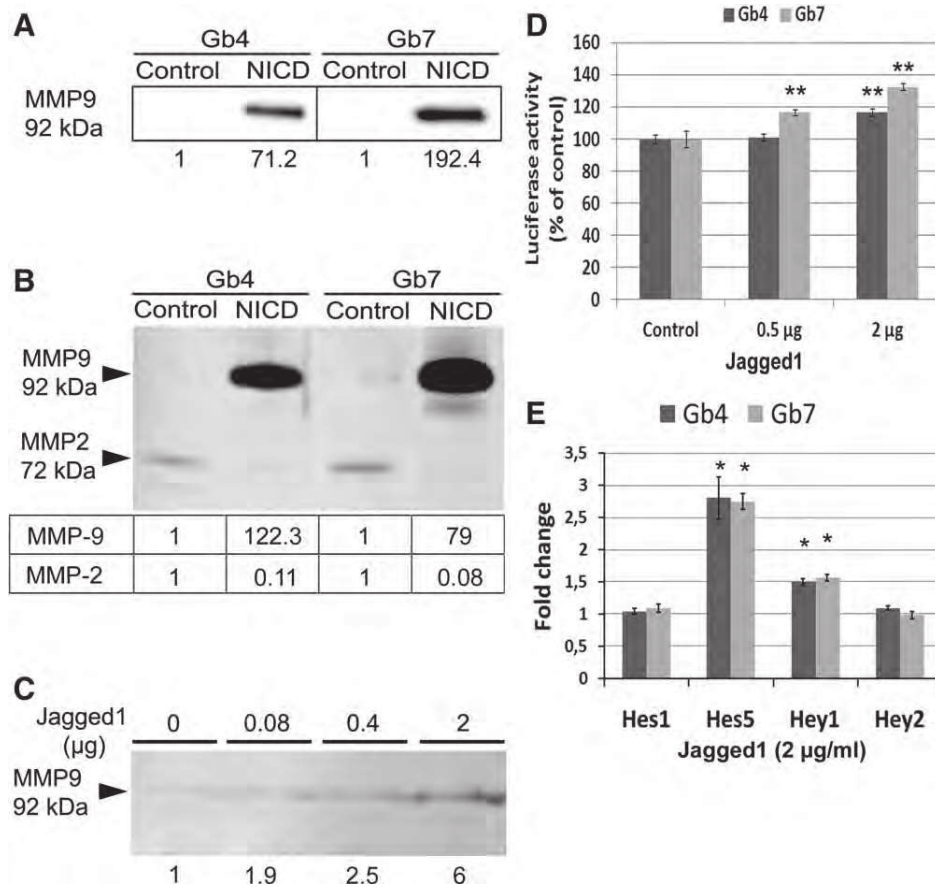


Figure 4. Notch1 (NICD) stimulation has opposite effects on the expression of matrix metalloproteinases 2 (MMP2) and MMP9. **(A):** MMP9 detection by Western blot in the supernatants of control and NICD-virus infected Gb4 and Gb7 cells. Numbers under each blot represent the fold change (NICD/control) in MMP9 expression. **(B):** Gelatin zymography of Gb4 and Gb7 cell supernatants. NICD triggered the secretion of MMP9 and inhibited that of MMP2. Gel images were inverted from black to white for easier visual comparison and quantification. Numbers under gelatin zymography represent the fold change (NICD/control) in MMP9 and MMP2 expression. **(C):** Zymography of supernatants of Gb4 cells treated with soluble Jagged1 for 5 days. Secretion of MMP9 is induced in a dose-dependent manner. Relative quantification of MMP9 band is indicated at the bottom. **(D):** Dose-response effect of treatment with soluble Jagged1 on the activity of a MMP9 promoter-luciferase construct. Gb4 and Gb7 cells were transfected with a pMMP9-Luc construct and then treated with the indicated amounts of Jagged for 2 days. Relative luciferase activity is expressed as percentage of untreated control cells ($n = 3$ wells). The data are representative of three independent experiments. **, $p < .01$. **(E):** Expression of indicated genes analyzed by QPCR in Gb4 and Gb7 cultures, 5 days after treatment with soluble Jagged1. Fold change expressions (Jagged1/control) are indicated ($n = 4$ wells). *, $p < .05$. Abbreviations: MMP9, matrix metalloproteinases 9; NICD, Notch1.

containing tumoral cells (Supporting Information Fig. 4A). Gb4 tumors were highly infiltrative without defined tumor mass and always invaded the contralateral hemisphere through the corpus callosum (10/10 examined tumors) (Supporting Information Fig. 4B). To explore the influence of Notch1 stimulation on tumoral cell behavior in vivo, we injected Gb4 cells infected with control or NICD virus. After two months, histological examination revealed that YFP⁺ control cells had disseminated away from the injection point and no tumoral mass was observed (Fig. 5A–5C, upper panels). Most grafted cells showed a bipolar elongated morphology and groups of YFP⁺ cells were found aligned in the same direction (Fig. 5A, upper panel). Cells were frequently observed migrating individually in the corpus callosum (Fig. 5C, upper panel). In sharp contrast, grafted Gb4 cells expressing NICD remained close to the site of injection where they formed large compact clusters showing little dispersion in the parenchyma and no spread to the contralateral hemisphere (3/3 examined tumors) (Fig. 5A–

5C, lower panels; Supporting Information Fig. 4C). These cells were less elongated than YFP⁺ control cells and were rounded or polygonal in shape. They were tightly packed together leaving very little intercellular space reminiscent of epithelial organization. Remarkably, compared with control transplanted cells, grafts with NICD-expressing cells contained a higher number of vessels (Fig. 5E) with a well-defined lumen (Fig. 5A, 5B, lower panels). Importantly, using mouse-specific CD31 antibody, we observed that these endothelial cells were derived from the host and not from the human transplanted cells (Fig. 5A, 5B, 5D). These in vivo results reinforce the absence of endothelial transdifferentiation induced by NICD as previously observed in vitro (Fig. 2E). In normal vessels, endothelial cells are covered by smooth muscle cells or pericytes which participate in the regulation of vascular formation, remodeling, stabilization and function. Remarkably, we found that endothelial cells in NICD grafts were closely associated with glioma cells which surround the vessels

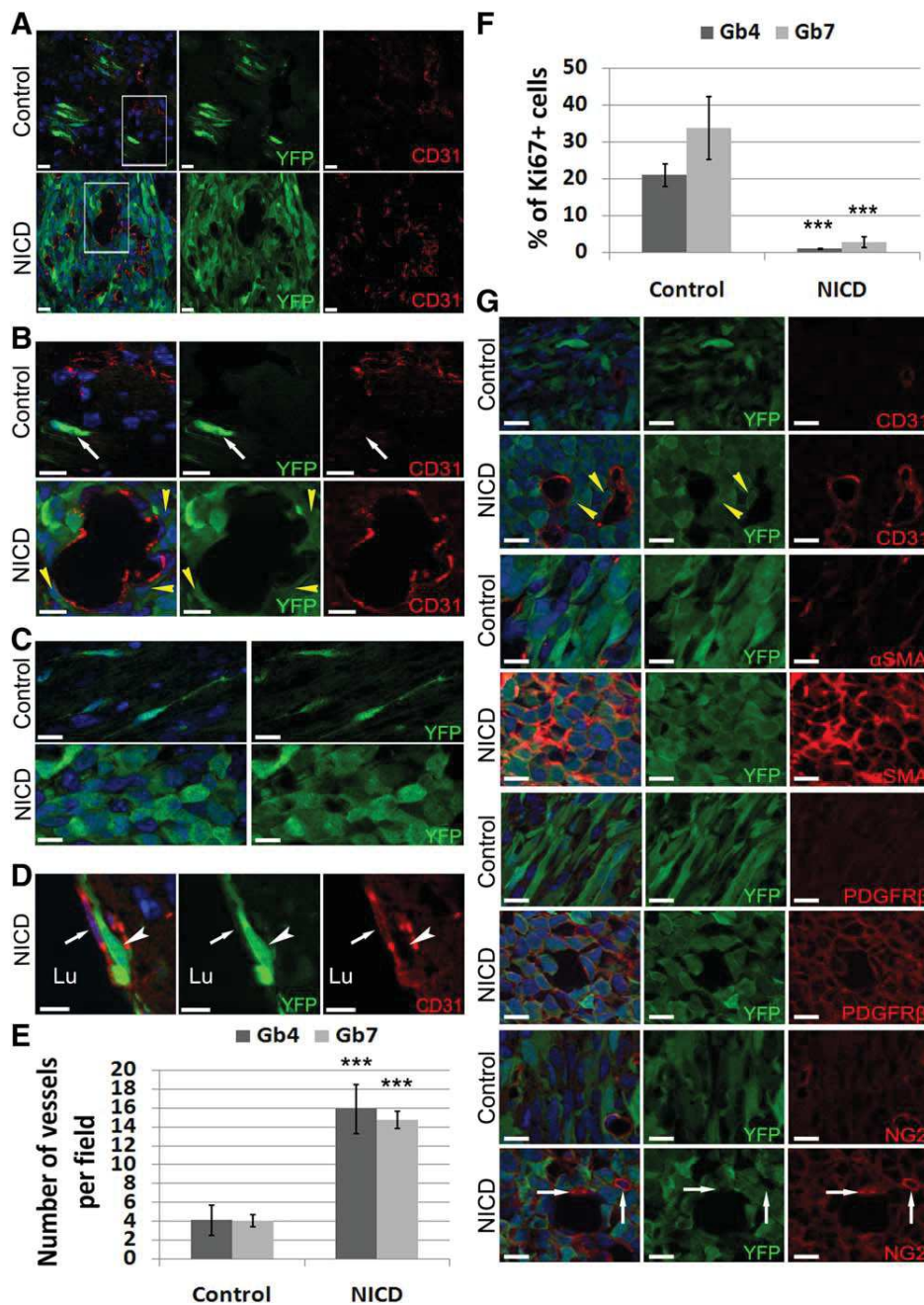


Figure 5. Notch1 (NICD) stimulation induces highly vascularized intracranial grafts. **(A):** Two months after transplantation, Gb4 control YFP⁺ cells are found migrating alone or in aligned small clusters in the parenchyma (upper images). In contrast, grafts of NICD-expressing cells remained close to the injection site (lower images, see also Supporting Information Fig. 4C) where they formed cellular masses containing numerous CD31⁺ cells lining vessels with well-defined lumina. CD31⁺ cells are detected with an anti-CD31 mouse-specific antibody (BD Pharmingen). **(B):** High magnification of the areas delimited by white boxes in (A). Compared with control (upper panels), where cells are located away from the vessels (arrow), some NICD infected cells (lower panels) are in close contact with vessels which have an obvious visible lumen. Yellow arrowheads indicate glioma cells in close contact with endothelial cells. **(C):** High magnification of YFP⁺ control cells in the corpus callosum showing a typical elongated and bipolar shape evocating migration (upper images). In contrast, YFP⁺ NICD cells (lower panels) displayed a rounded shape and formed compact clusters with limited dispersion. **(D):** Example of a Gb4 NICD-infected YFP⁺ cell (arrowhead) interacting in a pericyte-like manner with a host CD31⁺ endothelial cell (arrow). Lu = vessel lumen. **(E):** Quantification of the number of blood vessels per field (x20 objective) in control or NICD-expressing Gb4/Gb7 cell grafts (*n* = 10 sections). **(F):** Quantification of the percentage of Ki67⁺ YFP⁺ cells in control or NICD-expressing Gb4/Gb7 cell grafts 2 months after transplantation (*n* = 7 sections). **(G):** Immunofluorescence for CD31, α -smooth muscle actin, platelet-derived growth factor receptor β , and NG2 in Gb7 control or NICD-expressing cell grafts. Note that control YFP⁺ cells are often elongated and aligned in parallel whereas YFP⁺ NICD cells organized as a cobblestone-like tissue. Yellow arrowheads in the CD31 staining panels indicate glioma cells closely apposed to CD31 endothelial cells. In the NG2 staining panels, note that in addition to NG2⁺ glioma cells, grafts also contained mouse pericytes (YFP⁻ cells) expressing a high level of NG2 (arrows). Scale bars = 10 μ m (A–D, G). Abbreviations: NG2, neuron-gliar antigen 2; NICD, Notch1; PDGFR β , platelet-derived growth factor receptor β ; α SMA, α -smooth muscle actin; YFP, yellow fluorescent protein.

(yellow arrowheads on Fig. 5B) evoking a pericyte function for these cells. Finally, reminiscent of the *in vitro* situation, numerous tumoral cells were observed proliferating as assessed by Ki67 staining in control transplantations, while the presence of such cells was rare in NICD-infected cell grafts (Fig. 5F).

Similar results were obtained upon intracranial transplantation of Gb7 cells (Fig. 5E–5G). Histological analysis of tumors revealed that YFP⁺ control cells were elongated in shape and frequently aligned in the same direction (Fig. 5G). This contrasts with YFP⁺ NICD cells which were less proliferative (Fig. 5F) and had a rounded shape. These cells organized as a cobblestone-like tissue containing numerous vessels with lumen (Fig. 5E,5). IF analysis revealed that most YFP⁺ NICD cells expressed pericyte markers (α SMA, PDGFR β , and NG2). Host endothelial cells in these grafts were surrounded and contacted by glioma cells (yellow arrowheads in Fig. 5G) suggesting a pericyte function for these cells.

The effect of Notch1 stimulation on tumor vascularization was also obvious using subcutaneous injections of Gb7 cells. After 2 months, control cells generated pale tumors (4/4) whereas NICD-expressing Gb7 cells generated highly vascularized grafts (4/4), as evidenced by their purple appearance, sometimes hemorrhagic, which contained pockets of blood giving them a swollen aspect (Fig. 6A). As observed with intracranial tumors, NICD-expressing tumors organized as a cobblestone-like tissue (Fig. 6B; Supporting Information Fig. 4D), expressed pericyte markers (Fig. 6C) and contained numerous well-formed vessels with large and round lumina (Fig. 6B, 6D) which were perfused as indicated by the presence of red blood cells (Supporting Information Fig. 1I). These vessels were lined by thin murine endothelial cells with typical flat elongated nuclei (Fig. 6D, 6E, lower panels). This contrasted with vessels in control grafts which were less numerous (Fig. 6F) and appeared disorganized with smaller and uneven lumina (Fig. 6B, 6D, 6G, 6H). Endothelial cells in these grafts were larger with no characteristic flat nuclei (Fig. 6E, upper panels).

Taken together, these intracranial and subcutaneous graft experiments revealed the positive influence of Notch1 signaling on GBM stem cell vascularization.

DISCUSSION

In this study, we have uncovered an unanticipated link between the Notch1 pathway and the vascularization process of GBM stem cells, which is summarized in Figure 7. Notch1 stimulation was found to activate an angiogenic program composed of adhesion proteins, cytokines and a metalloprotease. This vascularization switch was associated with the acquisition of pericyte markers by GBM stem cell in addition to a sharp reduction in their proliferation and migration rates. Using xenotransplantation experiments, we found that a fraction of Notch1-stimulated GBM stem cells adopted a pericyte-like behavior, whereby they closely associated with endothelial cells to generate large regular vessels.

In the Gb4/Gb7 cultures, we observed that despite the presence of cleaved Notch1 receptors, the main downstream transcription factors were expressed at low levels. The HES1 protein often considered as a downstream effector of Notch1 in glioma cells [23–25], was in fact downregulated by Notch1

stimulation in Gb4 and slightly increased in Gb7, suggesting that its presence results from the activation of other pathways as observed in other cell types [26]. Even after expression of NICD, the HES5 protein was not detected despite sharp activation of the Hes5 promoter and increase in the *Hes5* RNA (Fig. 1B, 1C). This suggests the existence of tonic mechanisms inhibiting the Notch1 signaling in GBM cells as reported in neural stem cells during brain development [27, 28]. In contrast to HES effectors, we observed that the level of HEY1 and HEY2 proteins were upregulated by NICD, indicating that they may represent the predominant Notch1 targets in our examined GBM stem cells.

Both in Gb4 and Gb7 cells, Notch1 stimulation strongly reduced the cell growth by downregulating numerous transcripts involved in cell division as assessed by microarray analysis (Supporting Information Table 3). These results contrast with those obtained by other groups showing that Notch activation increased glioma cell proliferation and that its inhibition, either pharmacologically or using RNA interference, led to proliferation decrease accompanied with cell differentiation [24, 29–31]. This discrepancy could be explained by the existence of different subtypes of GBMs [32] and GBM stem cells [5, 33, 34]. Nevertheless, considering that the phenotypic modifications, notably the acquisition of pericyte markers, and the growth reduction associated with Notch1 stimulation were observed in four GBM stem cell cultures (Gb4, Gb7, GS2, and GS8) showing distinct transcriptional profiles [22], it is anticipated that the observed effects may apply to a large number of GBM stem cell subtypes. It is well-established that depending on the cellular context, Notch stimulation can have pro- or anti-proliferative activity [35] but the molecular mechanisms underlying this dichotomy are still unclear. In the examined GBM stem cells, the NICD-induced proliferation reduction was accompanied by a transcriptional switch whereby OLIG2 and SOX2 were downregulated while KLF9 and SNAIL2 were strongly induced. OLIG2 and SOX2 are two transcription factors known to play a central role in normal and tumoral neural stem cell proliferation [36, 37], thus their negative regulation by Notch1 may be implicated in the observed proliferation reduction. In other contexts such as prostate cancer stem cells [38] and muscle satellite stem cells [39, 40], the Notch signaling is deeply involved in the dormancy and quiescent state of the cells. In our study, we found that after termination of NICD expression, the growth rate and OLIG2 expression were restored (Supporting Information Fig. 2D, 2F, 2G) suggesting that Notch1 could act as an important switch governing dormancy versus proliferation of GBM stem cells.

One central finding of this study is the remarkable enhancement of the vascularization process induced by Notch1 stimulation in GBM stem cells. This was evidenced by transcriptional profiling, by examining the secretion of angiogenic cytokines and metalloproteases together with histological analysis of subcutaneous and intracranial tumors. In contrast to control transplantations, NICD-expressing grafts contained a high number of well-formed vessels with wide lumina lined by characteristic endothelial cells closely associated with GBM cells. Importantly, this vascularization process was not caused by endothelial cell differentiation of grafted GBM cells, as recently reported [4]. Indeed, in xenotransplantation experiments, tumoral vessels were lined by mouse CD31⁺ endothelial cells and not by human cells and *in vitro*,

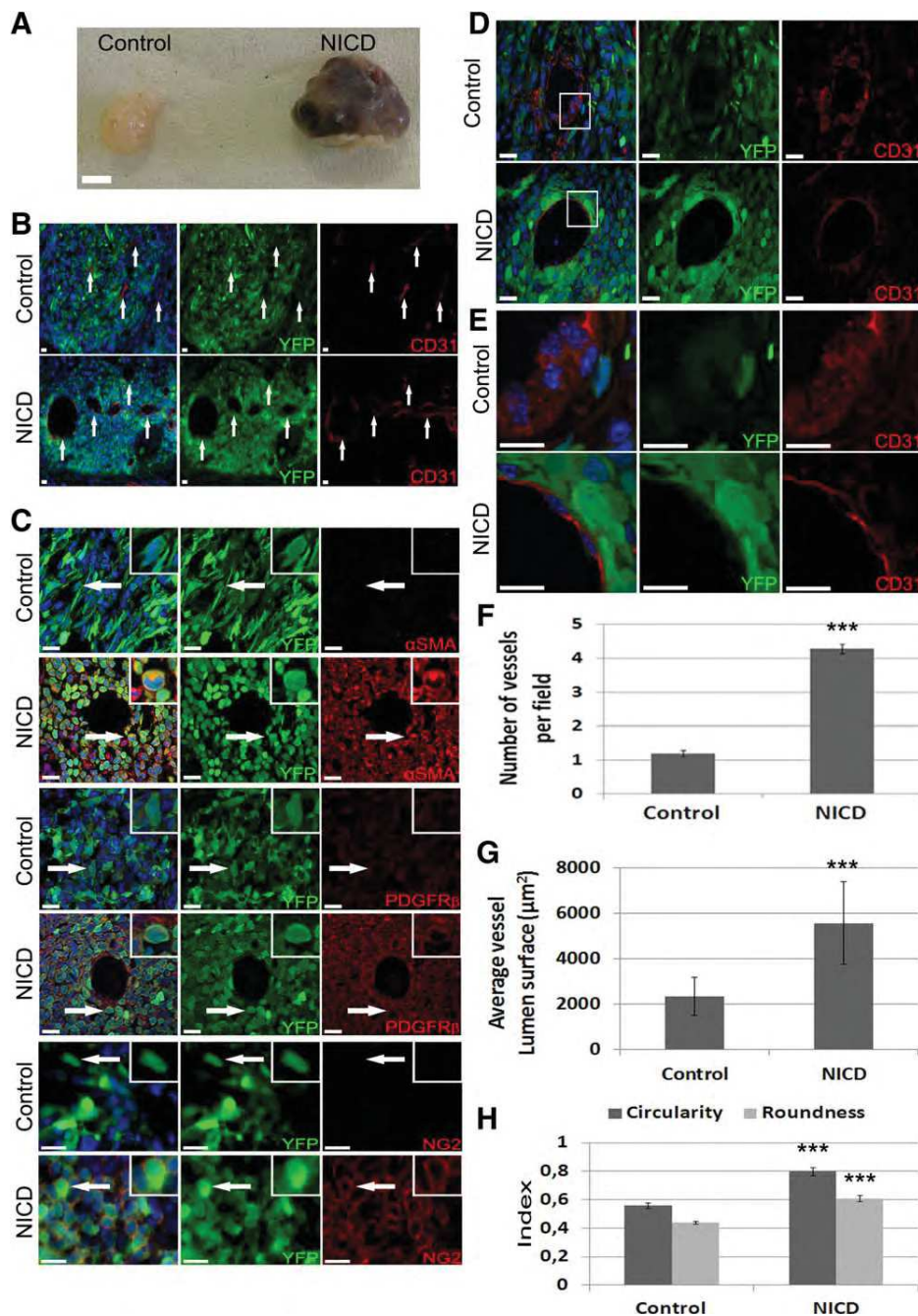


Figure 6. Notch1 (NICD) stimulation induces highly vascularized subcutaneous grafts. **(A):** Typical aspect of dissected subcutaneous grafts obtained after 2 months using control (left) or NICD-expressing (right) Gb7 cells. **(B):** Detection of vessels by CD31 staining in control or NICD-infected cell grafts (arrows). Note the presence of vessels with a well-defined lumen (lower panels) in the NICD-infected grafts compared with control transplantations (upper panels). CD31⁺ cells are detected with an anti-CD31 mouse-specific antibody (BD Pharmingen). **(C):** Immunofluorescence for α -smooth muscle actin, platelet-derived growth factor receptor β , and NG2 in control or NICD-expressing Gb7 cell grafts. Boxed areas are close-ups of cells indicated by the arrows. **(D, E):** Examples of vessels detected with CD31 stainings in control or NICD-expressing cell grafts. Note the irregular organization of CD31 cells in control grafted vessels compared with the flat and typical endothelial cells which line the lumina of vessels in NICD-infected cell grafts. Images in (E) are close-ups of white boxes shown in (D). NICD-expressing cells (green) provide coverage for endothelial cells in a pericyte-like manner. **(F, G)** Quantification of the number of blood vessels per field (x20 objective) **(F)** ($n = 10$) and the average lumen surface **(G)** ($n = 35$) in control or NICD-expressing cell grafts. *******, $p < .001$. **(H):** Morphology of the vessels assessed by calculating the circularity and the roundness indexes (between 0 and 1, where 0 is a line and 1 is a perfect circle) ($n = 35$). *******, $p < .001$. Scale bars = 0.5 cm (A) = 10 μ m (B–E). Abbreviations: NG2, neuron-gial antigen 2; NICD, Notch1; PDGFR β , platelet-derived growth factor receptor β ; α SMA, α -smooth muscle actin; YFP, yellow fluorescent protein.

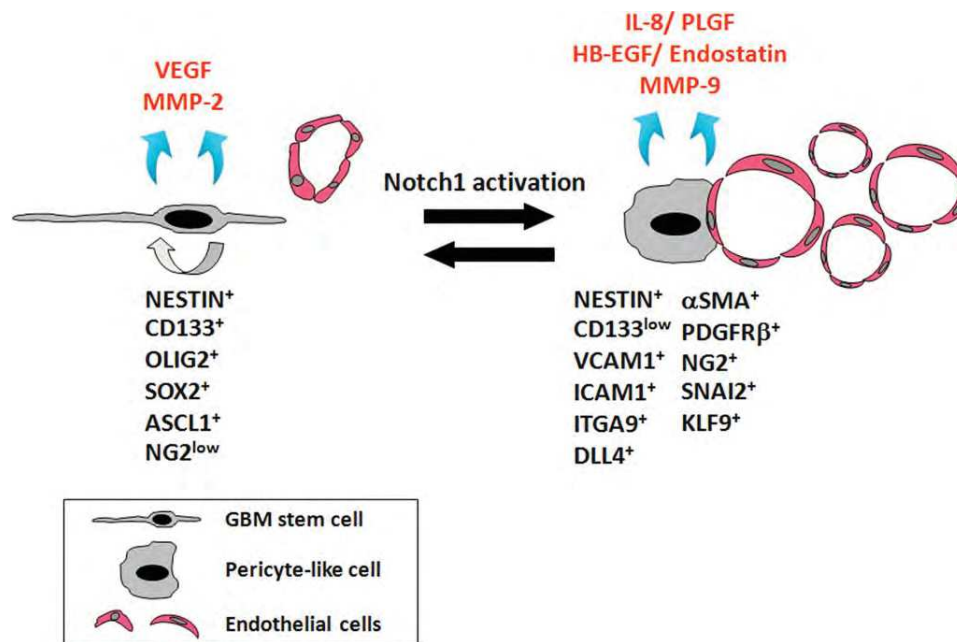


Figure 7. Schematic representation summarizing the effects of Notch1 stimulation in GBM stem cells. Abbreviations: HB-EGF, heparin binding epidermal growth factor; IL-8, interleukin 8; MMP9, matrix metalloproteinases 9; PLGF, placental growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

expression of CD31 and vWF could not be observed after NICD expression. In contrast, we observed that upon Notch1 stimulation, GBM stem cells reduced the expression of neural stem cell markers (ASCL1, CD133, OLIG2, and SOX2) and acquired typical markers for pericytes. Some of these cells were observed closely associated with mouse endothelial cells in xenotransplantation experiments. This situation is reminiscent of the process of pericyte coverage of endothelial cells which is important for “vascular normalization” and formation of functional vessels in tumors [41]. The strong expression of angiogenesis-related adhesion molecules (ICAM1, VCAM1, and ITGA9) triggered by NICD in GBM stem cells is likely to participate in these tumoral cells-endothelial cells association.

In addition to the acquisition of pericyte cell markers, Notch1 strongly stimulated the expression of several angiogenesis-related factors. Three pro-angiogenic cytokines (IL8, PLGF, and HB-EGF) were found to be strongly increased in the supernatant of the two examined cell cultures. PLGF is a member of the VEGF family and is a strong inducer of tumor vasculature remodeling and normalization [42]. It promotes the transition of primitive and disorganized vasculature into vessels with large lumina, few branching and high coverage pericytes. IL8 is a key pro-inflammatory cytokine but is also a potent mediator of angiogenesis [43]. Its level correlates with histologic grade in gliomas where it is found to be expressed by cells around necrotic areas [43]. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis [44] and is highly expressed in GBM [45]. In addition to proangiogenic cytokines, Notch1 stimulation paradoxically reduced the level of VEGF found in the supernatant and also led to the secretion of endostatin, an antiangiogenic cytokine known to inhibit endothelial cell proliferation [46]. The extent and quality of vascularization are dependent on the balance between positive and negative regulatory factors present around endothelial cells. Therefore the

modulation of pro- versus anti-angiogenic cytokines by NICD illustrates the complexity of the process resulting in the observed intensification of tumoral vascularization. In addition to cytokines, two likely important components of the observed phenomenon are the Notch ligand DLL4 and the metalloprotease MMP9 which are not detected in control GBM cultures but which are strongly induced by NICD. DLL4 is an essential regulator of tumor vessel formation [47]. Upon DLL4 inhibition, tumor vessels become highly branched and proliferative yet less functional with reduced pericyte coverage [48]. Conversely, its overexpression in tumoral cells acts on endothelial cells to improve vascular functions notably by forming large blood vessels with well-defined lumina [49]. Our observation of such vessels upon grafting of GBM stem cells expressing NICD suggests an important role for DLL4 in this process. Last, we demonstrated that Notch1 pathway stimulation induced a striking switch between MMP2 and MMP9. These metalloproteases regulate the vascularization process by degrading a wide range of extracellular matrix proteins, cytokines, receptors and enzymes [21]. Our observation of the parallel increase in MMP9 with the tumor vascularization suggests a particular role for this metalloprotease compared with MMP2. Indeed in a model of pancreas carcinogenesis, MMP9 but not MMP2 triggered an angiogenic switch by the release of matrix-entrapped bioactive endothelial cell growth factors such as VEGF [50]. MMP9 expression is controlled by a number of factors [51] and its upregulation by Notch was also observed in pancreatic cancer cells [52] and endothelial cells [53]. In contrast to MMP9, we found that Notch1 stimulation led to a sharp downregulation of MMP2 transcript and activity. The opposite regulation of MMP9 and MMP2 by Notch signaling was also observed in endothelial cells [53]. In addition to angiogenesis, MMPs are important proteins involved in tumoral cell migration and indeed in gliomas, MMPs have

been shown to be required to migrate on myelin by degrading Nogo proteins [54]. Furthermore, Du et al. [55] showed that GBM cells deficient in MMP2 became less infiltrative into the parenchyma but more invasive by moving along blood vessels. Similarly, the decline in MMP2 that we observed in tumoral cells expressing NICD might be associated with their tendency to form dense cellular clusters around vessels close to the point of injection as opposed to the highly infiltrating behavior of control cells.

CONCLUSION

In conclusion, in the nonpathological brain, neural stem cells closely interact with vascular cells to create the so-called neurovascular niche [56]. Similarly, in patients, GBM stem cells are located close to vessels where they closely interact with endothelial cells [57]. The latter provide DLL4 ligands resulting in Notch activation in GBM stem cells [58]. Reciprocally, in this study, we established that stimulation of Notch1 in GBM stem cells triggered a coordinated angiogenic switch resulting in the formation of large and functional vessels and close association with endothelial cells. While this work was in progress, Cheng et al. reported that in GBM, a large proportion of pericytes are derived from differentiation of GBM stem cells and that the TGF-β pathway was involved in this process [59]. There exists important cross-talks between the Notch and the TGF-β/BMP pathways [60] and NICD has been shown to physically interact with Smad transcription factors [61]. It is therefore plausible that both pathways contribute to the regulation of GBM cell-endothelial cell associations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. R. Sutton, Yale, USA, Dr. C.E. Tacon, Calgary, Canada, and Prof. R. Kageyama, Kyoto, Japan, for gifts of NICD, pMMP9, and Hes5 constructs, respectively. We also thank Dr. D. Mathieu and Dr. V. Deleuze, IGMM, France, for helpful discussions and gift of HUVEC cells; Dr. T. Reme, INSERM, and Dr. P. Chuchana, INSERM, for advice on microarray analysis and I. Sasseti and C. Ripoll for help in brain histology. RAM, RHEM, RIO, Montpellier vectorology facilities, and Institut Curie microarray laboratory were used for this work. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer, ARC, France, the Association pour la Recherche contre les Tumeurs Cérébrales, ARTC Sud, France, and the l'Institut National pour la Recherche sur le Cancer, INCA, France.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.-O.G., B.R., and J.-P.H.: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript; S.G., M.T., and L.H.: collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation; N.B.: conception and design, final approval of manuscript; L.B., H.D., and K.L.: provision of study material or patients.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Ricard D, Idbaih A, Ducray F et al. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2012; 379:1984–1996.
- 2 Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol* 2012;124:763–775.
- 3 Venero M, Fine HA, Dirks PB et al. Cancer stem cells in gliomas: Identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia* 2011;59:1148–1154.
- 4 Hardee ME, Zagzag D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* 2012;181:1126–1141.
- 5 Hjelmeland AB, Rich JN. The quest for self-identity: Not all cancer stem cells are the same. *Clin Cancer Res* 2012;18:3495–3498.
- 6 Sakariassen PO, Prestegarden L, Wang J et al. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:16466–16471.
- 7 Hjelmeland AB, Lathia JD, Sathornsumetee S et al. Twisted tango: Brain tumor neurovascular interactions. *Nat Neurosci* 2011;14:1375–1381.
- 8 Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. The Notch signalling system: Recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 2012;13:654–666.
- 9 Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: A team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 2009;16:196–208.
- 10 Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ et al. Blockade of DLL4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006;444:1032–1037.
- 11 Liu J, Sato C, Cerletti M et al. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol* 2010;92:367–409.
- 12 Stockhausen MT, Kristoffersen K, Poulsen HS. Notch signaling and brain tumors. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:289–304.
- 13 Wang J, Sullenger BA, Rich JN. Notch signaling in cancer stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:174–185.
- 14 Guichet PO, Bieche I, Teigell M et al. Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia* 2013;61:225–239.
- 15 Engin F, Yao Z, Yang T et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med* 2008;14:299–305.
- 16 Salmon P, Trono D. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Prot Hum Genet* 2007;Chapter 12:Unit 12.10.
- 17 Purow BW, Haque RM, Noel MW et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 2005; 65:2353–2363.
- 18 Mizutani K, Yoon K, Dang L et al. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature* 2007;449:351–355.
- 19 Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J et al. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 2001; 29:45–55.
- 20 Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development* 2007;134:2709–2718.
- 21 Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011;41:271–290.
- 22 Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS et al. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 2008;27:2897–2909.
- 23 Kanamori M, Kawaguchi T, Nigro JM et al. Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 2007;106:417–427.
- 24 Fan X, Khaki L, Zhu TS et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* 2010;28:5–16.
- 25 Kristoffersen K, Villingshoj M, Poulsen HS et al. Level of Notch activation determines the effect on growth and stem cell-like features in glioblastoma multiforme neurosphere cultures. *Cancer Biol Ther* 2013;14:625–637.
- 26 Zheng Y, Lin L, Zheng Z. TGF-alpha induces upregulation and nuclear translocation of Hes1 in glioma cell. *Cell Biochem Funct* 2008;26:692–700.

- 27** Gulino A, Di Marcotullio L, Screpanti I. The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res* 2010;316:900–906.
- 28** Chi Z, Zhang J, Tokunaga A et al. Notch promotes neurogenesis by antagonizing Notch. *Dev Cell* 2012;22:707–720.
- 29** Zhang XP, Zheng G, Zou L et al. Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. *Mol Cell Biochem* 2008;307:101–108.
- 30** Wang J, Wang C, Meng Q et al. siRNA targeting Notch-1 decreases glioma stem cell proliferation and tumor growth. *Mol Biol Rep* 2012;39:2497–2503.
- 31** Saito N, Fu J, Zheng S et al. A high Notch pathway activation predicts response to gamma secretase inhibitors in proneural subtype of glioma tumor initiating cells. *Stem Cells* 2014;32:301–312.
- 32** Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17:98–110.
- 33** Beier CP, Beier D. CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma. *Front Biosci* 2011;3:701–710.
- 34** Schulte A, Gunther HS, Phillips HS et al. A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. *Glia* 2011;59:590–602.
- 35** Lobry C, Oh P, Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: It's NOTCH what you think. *J Exp Med* 2011;208:1931–1935.
- 36** Gangemi RM, Griffiro F, Marubbi D et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 2009;27:40–48.
- 37** Ligon KL, Huillard E, Mehta S et al. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 2007;53:503–517.
- 38** Valdez JM, Zhang L, Su Q et al. Notch and TGFbeta form a reciprocal positive regulatory loop that suppresses murine prostate basal stem/progenitor cell activity. *Cell Stem Cell* 2012;11:676–688.
- 39** Mourikis P, Sambasivan R, Castel D et al. A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells* 2012;30:243–252.
- 40** Bjornson CR, Cheung TH, Liu L et al. Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells* 2012;30:232–242.
- 41** Goel S, Duda DG, Xu L et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev* 2011;91:1071–1121.
- 42** Hedlund EM, Hosaka K, Zhong Z et al. Malignant cell-derived PIGF promotes normalization and remodeling of the tumor vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:17505–17510.
- 43** Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neurooncol* 2005;7:122–133.
- 44** Ongusaha PP, Kwak JC, Zwible AJ et al. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:5283–5290.
- 45** Mishima K, Higashiyama S, Asai A et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates mitogenic signaling and is highly expressed in human malignant gliomas. *Acta Neuropathol* 1998;96:322–328.
- 46** Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB et al. Endostatin: Current concepts about its biological role and mechanisms of action. *Biochemistry* 2007;72:235–246.
- 47** Kume T. Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:210–222.
- 48** Ridgway J, Zhang G, Wu Y et al. Inhibition of DLL4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006;444:1083–1087.
- 49** Patel NS, Dobbie MS, Rochester M et al. Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:4836–4844.
- 50** Bergers G, Brekken R, McMahon G et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737–744.
- 51** Labrie M, St-Pierre Y. Epigenetic regulation of mmp-9 gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:3109–3124.
- 52** Wang Z, Banerjee S, Li Y et al. Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:2778–2784.
- 53** Funahashi Y, Shawber CJ, Sharma A et al. Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing matrix metalloprotease activity. *Vasc Cell* 2011;3:2.
- 54** Hensel T, Amberger VR, Schwab ME. A metalloprotease activity from C6 glioma cells inactivates the myelin-associated neurite growth inhibitors and can be neutralized by antibodies. *Br J Cancer* 1998;78:1564–1572.
- 55** Du R, Petritsch C, Lu K et al. Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neurooncol* 2008;10:254–264.
- 56** Goldberg JS, Hirschi KK. Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche. *Regen Med* 2009;4:879–897.
- 57** Calabrese C, Poppleton H, Kocak M et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007;11:69–82.
- 58** Zhu TS, Costello MA, Talsma CE et al. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res* 2011;71:6061–6072.
- 59** Cheng L, Huang Z, Zhou W et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 2013;153:139–152.
- 60** Kluppel M, Wrana JL. Turning it up a Notch: Cross-talk between TGF beta and Notch signaling. *Bioessays* 2005;27:115–118.
- 61** Dahlqvist C, Blokzijl A, Chapman G et al. Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development* 2003;130:6089–6099.



See www.StemCells.com for supporting information available online.

Supplementary methods

Immunofluorescence and imaging

IFs were performed as described previously [1] with primary antibodies listed in supplementary table 1. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue on images). Images were captured with an AxioImager microscope (Zeiss). Cell countings and the extent of vascularization were performed using ImageJ software. Only vessels with an obvious lumen lined by endothelial cells were considered for counting. Circularity and roundness of vessels were determined using Image J functions (index between 0-1).

Migration assays

For transwell migration assays, 5×10^4 cells in 200 μ l of medium containing EGF and FGF2 were placed in the upper chamber of a modified Boyden chamber unit with polycarbonate filters of 8 μ m pore size (Corning science products). This chamber was then placed in a 24-well culture dish precoated with poly-HEMA containing 500 μ l of medium supplemented with 2.5% of fetal bovine serum used as a chemoattractant. Transmigrated cells were counted after 24h of incubation. For time-lapse video microscopy, control and NICD infected cells seeded on laminin-coated culture dishes were recorded for 15 h with a 20 min. interval using a Zeiss AxioVert 200M inverted microscope. The speed (μ m/h) and distance (μ m) of cell migration were determined over a 6-hour recording using ImageJ software with the MTrackJ plugin [2].

QPCR

Total RNA was reverse-transcribed (superscript II, Life technology) with hexamers 5 days after infection with control and NICD viruses. Quantitative PCR was performed with 15 ng of

cDNA using a SYBR PCR kit (Qiagen) and a lightcycler apparatus (Roche). TBP (tata binding protein) RNA was used as an internal reference. Primer list is given in supplementary table 2.

Affimetrix microarray

Total RNA was extracted 2 days after infection with control and NICD viruses using RNeasy kit (Qiagen) and checked for quality with the Agilent Bioanalyzer. GeneChip Human Gene 1.1 ST arrays (Affymetrix) were hybridized at the Institut Curie microarray core facility according to the manufacturer's recommendations. Robust Multi-Array Analysis (RMA) normalization of the data was performed with the Expression Console software (Affymetrix). Full microarray data have been deposited in the Geo Datasets/Profiles database (accession number GSE44561). Differential gene expression analysis was carried out using Babelomics' set of tools (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>). Simple enrichment analysis was performed using the Babelomics 4.3 FatiGO tool in order to identify biological processes affected by Notch1 stimulation.

Western blot and antibody arrays

Protein preparation and WB procedure were performed as described previously [1]. Briefly, cells were harvested in RIPA lysis buffer (Sigma) consisting of 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 5 mM Sodium Fluoride, 0.5 mM Sodium Vanadate and 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche) then incubated for 30 min. at 4°C. Lysates were cleared by centrifugation at 13,000 r.p.m. for 20 min at 4°C, then protein concentrations were determined by DC Protein Assay (BioRad).

Samples were mixed with reducing Laemmli buffer and proteins were separated by SDS-PAGE, blotted onto 0.2 µm PVDF membranes (Bio-Rad) and soaked with 5% non-fat dried milk in TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween-20) for 1 hour, then incubated overnight with a primary antibody at 4°C. After washing with TBST, HRP-linked

secondary antibodies were incubated with the blot for 1 hour at room temperature then proteins of interest were detected by chemiluminescence reaction (Millipore). The primary antibodies used are listed in supplementary table 1. Human angiogenesis arrays (R&D Systems #ARY-007) were probed with GBM stem cell supernatants conditioned for 3 days, and cleared by centrifugation at 13,000 r.p.m. for 20 min at 4°C. Membranes were incubated and processed as recommended by the manufacturer. Data were captured with the ChemiDoc™ XRS Imaging system and quantified using Image Lab software (BioRad). For WB, the intensity of each band was normalized to β -actin taken as a protein loading control.

Gelatin Zymography

Culture supernatants were mixed with nonreducing Laemmli sample buffer and zymography was performed on a 7.5% polyacrylamide gel containing 1 mg/ml gelatine (Sigma) as described in [3]. Briefly, after electrophoresis, the gel was washed in enzyme renaturing buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 μ M ZnCl₂, 2.5% (v/v) Triton X-100) for 1 hour at room temperature and incubated in developing buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 μ M ZnCl₂) for 16 hours at 37°C. The gel was stained with 0.125% Coomassie brilliant blue R-250 solution in methanol:acetic acid:water (5:2:3) and destained in the same solution without the dye until clear MMP bands were visible. MMP-2 and MMP-9 gelatinases were identified by their corresponding molecular weights.

References

1. Guichet PO, Bieche I, Teigell M et al. Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. **Glia** 2013;61:225-239.
2. Meijering E, Dzyubachyk O, & Smal I Methods for cell and particle tracking. **Methods in enzymology** 2012;504:183-200.
3. Troeberg L & Nagase H Zymography of metalloproteinases. **Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al** 2004;Chapter 21:Unit 21 15.

Supplementary figure legends

Supplementary Figure 1:

(A) Gb4 cells transfected with pCMV-DsRed control or pHes5-DsRed promoter constructs observed 2 days after transfection. Only a small fraction of cells transfected with pHes5-DsRed promoter was positive (red). **(B)** Flow cytometry analysis show alterations of cell size (FSC + 16%) and cell granularity (SSC + 41%) of Gb4 cells activated by NICD. (n= 3 independent experiments). **(C)** Effect of transient NICD expression (transfection) on Gb4 GBM stem cell growth. A LacZ expressing plasmid was used as control. The percentage of cells obtained 7 days after transfection is indicated (n= 6 wells). These data are representative of three independent experiments. **, $p < 0.01$. **(D)** Western blot detection of GFAP in control or NICD-virus Gb4/Gb7 infected cells cultured in the presence of growth factors. Notch activation did not increase the expression of GFAP. In contrast, as expected, an important increase was observed after differentiation of Gb4 and Gb7 cells for 5 days without growth factors. Numbers under each blot represent the fold change versus control normalized to the expression of β -actin. Scale bars =10 μm **(A)**.

Supplementary Figure 2:

(A) Scheme describing the experimental procedure used to examine the reversibility of NICD effects. **(B)** Induction of NICD by treating pTRIPZ-Flag-NICD-IRES-YFP lentivirus infected cells with doxycycline for three days. Control cells are infected with pTRIPZ-IRES-YFP lentivirus. NICD is detected by IF against the FLAG epitope tag fused to NICD. OLIG2 and SNAI2 expression in pTRIPZ-Flag-NICD-IRES-YFP lentivirus infected cells cultured with doxycycline are respectively reduced and increased. **(C)** Expression of OLIG2 and SNAI2 six days after keeping (+Dox) or removing (-Dox) the doxycycline. Compared to (+Dox)

cultures, OLIG2 was re-expressed and SNAI2 was downregulated upon doxycycline removal in NICD infected cells. Note that after Dox removal, the YFP expression is reduced as this protein is part of the NICD-IRES-YFP cassette which is controlled by the Dox-regulated promoter. **(D)** Quantification of OLIG2 expression in the experiment shown in **(C)**. Approximately 300 cells were analysed per condition (n=6 fields). **, $p<0.01$. **(E)** Quantification of SNAI2 expression in the experiment shown in **(C)**. Approximately 300 cells were analysed per condition (n=6 fields). **, $p<0.01$. **(F)** Reversible effect of NICD on Gb4 cell growth. The cell_numbers were measured 6 days after keeping (+Dox) or removing (-Dox) the doxycycline. The percentage of cells obtained after 6 days are indicated (n=6 wells). **, $p<0.01$. **(G)** Quantification of Ki67⁺ expression in cells derived from the experiment shown in **(F)**. The data presented here are representative of two independent experiments. **, $p<0.01$. Scale bars =10 μm (B, C).

Supplementary Figure 3:

(A) Effect of NICD expression on GS2 and GS8 cell growth. The number of cells (percentage of control) obtained 7 days after infection with control or NICD virus are indicated (n=6 wells). **, $p<0.01$. **(B)** Expression of Ki67⁺ in GS2 and GS8 cells infected with control or NICD virus. Approximately 300 cells were analysed per condition (n=7 fields). **, $p<0.01$. **(C)** IF for the indicated proteins in GS2 and GS8 cells infected with control- or NICD-virus. NICD induced a reduction of OLIG2 and Ki67 expression whereas SNAI2, KLF9 and PDGFR β were upregulated. Note that in GS8 cells, OLIG2 is mainly present in the cytoplasm. **(D)** WB detection of the indicated proteins in control and NICD-virus infected GS2 and GS8 cells. Numbers under each blot represent the fold change (NICD/control) in protein expression normalized to β -actin. **(E)** Gelatin zymography of GS2 and GS8 cell supernatants. NICD triggered the secretion of MMP9 and inhibited that of MMP2. Gel images

were inverted from black to white for easier visual comparison and quantification. Numbers under gelatin zymography represent the fold change (NICD/control) in MMP9 and MMP2 expression. Scale bars = 10 μ m (C).

Supplementary Figure 4

(A) Detection of CD31⁺ vessels (red) in non-tumoral and tumoral cell-invaded areas taken from the same brain 2 months after grafting. Gb4 cells were detected by the expression of NESTIN filaments using a human specific antibody (green). Non-tumoral areas (selected adjacent to tumoral areas) contained mainly small capillaries (arrows) and very few vessels with large-lumina (upper images). No conspicuous increase of the presence of capillaries and large-lumina vessels was observed in areas containing a dense number of tumoral cells (lower images). **(B)** Typical aspect of a grafted brain obtained 2 months after transplantation of 2x10⁵ Gb4 cells. Gb4 cells (green) are detected by IF using a human nuclei specific antibody (HuNu). Note the absence of defined tumoral masses and the widespread dissemination throughout the brain of tumoral cells. Invasion of the contralateral hemisphere and of the corpus callosum (arrow) is observed. **(C)** Typical aspect of a grafted brain 2 months after transplantation of Gb4 cells expressing NICD. YFP⁺ Gb4 cells remained close to the injection site (arrow). **(D)** High magnification of control YFP⁺ cells from Gb7 subcutaneous grafts showing a bipolar morphology. In contrast, YFP⁺ cells infected with NICD virus showed a cobblestone-like organization. **(E)** Perfusion of large vessels observed in the subcutaneous grafts of Gb7 NICD-virus infected cells (Fig. 6) are identified by the presence of a high density of red blood cells in the lumen. These cells were revealed by their natural expression of peroxidase which generates a brown precipitate upon incubation with diaminobenzidine. Scale bars =10 μ m (A, D, E) =1mm (B, C).

Supplementary tables and files**Supplementary table 1:** Antibody list**Supplementary table 2:** Oligonucleotide primer sequences**Supplementary table 3:** Microarray analysis data (list of selected genes)**Supplementary table 4:** Gene ontology analysis (Top 15 biological processes affected)**Supplementary file 1:** Microarray analysis data (full gene list)**Supplementary file 2:** Video of control-virus infected Gb4-cells on laminin. Total duration=15h, scale bar =20 μ m**Supplementary file 3:** Video of NICD-virus infected Gb4-cells on laminin. Total duration =15h, scale bar =20 μ m

Supplementary table 1

Antibody list

Name	Species	References	IF Dilution	WB Dilution	Distributors
Activated- NOTCH1	Rabbit	Ab8925	NT	1 :500	Abcam
Ascl1	Mouse	556604	1:200	1:100	BD Pharmingen
α SMA	Mouse	A2547	1:2000	1:2000	Sigma
α SMA	Rabbit	Ab15267	1:1	NT	Abcam
β -Actin	Mouse	A5316	NT	1:5000	Sigma
CD31	Rat	553370	1:1000	NT	BD Pharmingen
CD31	Mouse	IR610	1:40	NT	Dako
CD133	Mouse	130-090-422	1:5	NT	Miltenyi Biotec
DLL4	Mouse	346501	1:100	NT	BioLegend
DLL4	Rabbit	2589	NT	1:1000	Cell Signaling
DYKDDDDK Tag (FLAG)	Rabbit	2368	1:250	1:1000	Cell Signaling
GFAP	Rabbit	Z 0334	1:5000	1:5000	Dako
HES1	Rabbit	Ab108937	NT	1 :1000	Abcam
HES5	Rabbit	Ab25374	NT	1 :500	Abcam
HEY1	Rabbit	19929-1-AP	NT	1 :1000	Proteintech
HEY2	Rabbit	GTX128029	NT	1 :1000	GeneTex
HuNu	Mouse	MAB1281	1:250	NT	Millipore
hNestin	Rabbit	AB5922	1:1000	1 :10000	Millipore
ICAM-1	Mouse	14-0549	1:100	NT	eBioscience
ITGA9	Mouse	H00003680- M01	NT	1:500	Abnova
ITGA9	Rabbit	Ab140599	1:500	NT	Abcam
Ki67	Mouse	556003	1:500	NT	BD Pharmingen
Klf9	Mouse	sc-376422	1:200	1:200	Santa Cruz
MMP-2	Mouse	ab7033	NT	1:200	Abcam
MMP-9	Mouse	ab3159	NT	1:200	Abcam
NG2	Rabbit	AB5320	1:500	1:500	Chemicon
PDGFR <input type="checkbox"/>	Rabbit	3169	1:250	1 :1000	Cell Signaling
Olig2	Rabbit	18953	1:500	1:300	IBL
Snai2	Rabbit	9585	1:400	1:1000	Cell Signaling
Sox2	Goat	sc-17320	1:200	1:200	Santa Cruz
von Willbrand factor	Mouse	M0616	1:100	NT	Dako
VCAM-1	Mouse	14-1069	1:100	NT	eBioscience

NT: not tested

Supplementary table 2

Primer sequences

GENE	OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENCE	PCR Product Size (bp)
<i>HES1</i>	Upper primer	5' - AGAAGGCGGACATTCTGGAA - 3'	139
	Lower primer	5' - GTCACCTCGTTCATGCACTC - 3'	
<i>HES5</i>	Upper primer	5' - GGGGTTGTCTGTGTTTGCA - 3'	132
	Lower primer	5' - GGCCCTGAAGAAAGTCCTCT - 3'	
<i>HEY1</i>	Upper primer	5' - GGCAGGAGGAAAGGTTACT - 3'	103
	Lower primer	5' - GATGCTCAGATAACGCGCAA - 3'	
<i>HEY2</i>	Upper primer	5' - TGTTTGGTTCAAGGCAGCTC - 3'	116
	Lower primer	5' - TGATGCACTGCTGGATGGTA - 3'	
<i>TBP</i>	Upper primer	5' - TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA - 3'	132
	Lower primer	5' - CACATCACAGCTCCCCACCA - 3'	

Supplementary table 3

Microarray data analysis – List of selected genes

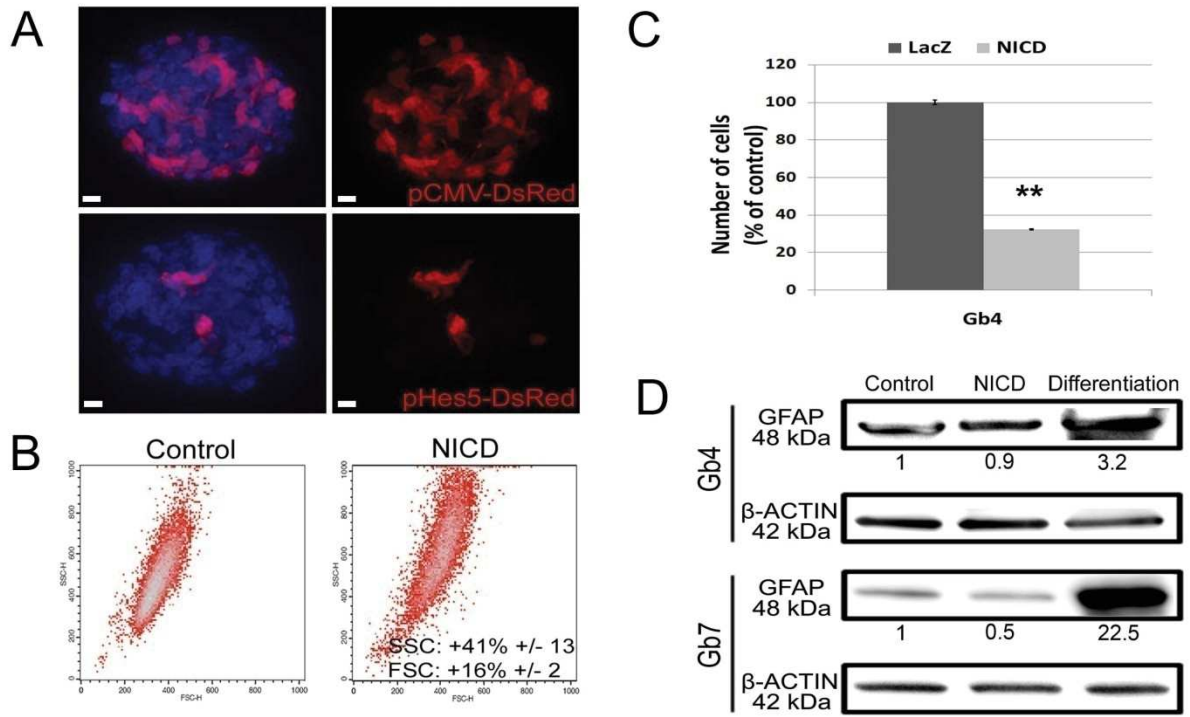
Gene Name	Gene Symbol	Probe Set ID	Fold Change (NICD/Control)	p-value	adj_pvalue
Transcription/Differentiation					
Kruppel-like factor 9	KLF9	8161648	9,50	1,2E-04	0,099
snail homolog 2	SNAI2	8150698	7,49	6,9E-03	0,193
oligodendrocyte lineage transcription factor 2	OLIG2	8068231	0,26	6,3E-03	0,187
achaete-scute complex homolog 1	ASCL1	7958051	0,07	1,4E-02	0,253
Cell Adhesion/Migration					
integrin, alpha 9	ITGA9	8078619	26,80	5,8E-06	0,049
fibronectin 1	FN1	8048139	20,62	1,0E-03	0,123
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	7903358	20,27	7,1E-04	0,121
intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	8025601	17,40	1,9E-03	0,139
Angiogenesis					
matrix metalloproteinase 9	MMP9	8063115	121,40	1,3E-05	0,087
angiopoietin 2	ANGPT2	8149071	23,64	2,4E-04	0,105
placental growth factor	PGF	7980233	10,28	7,1E-04	0,121
heparin-binding EGF-like growth factor	HBEGF	8114572	4,11	2,0E-02	0,287
collagen, type XVIII, alpha 1	COL18A1	8069208	4,03	1,2E-02	0,243
interleukin 8	IL8	8095680	3,54	4,7E-02	0,392
matrix metalloproteinase 2	MMP2	7995681	0,12	7,0E-05	0,099
Notch Pathway					
delta-like 4	DLL4	7982854	7,91	1,8E-02	0,275
hairy and enhancer of split 5	HES5	7911750	7,36	5,2E-03	0,175
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	HEY1	8151457	5,43	5,3E-03	0,175
Cell proliferation					
aurora kinase A	AURKA	8067167	0,47	4,4E-02	0,381
NIMA-related kinase 2	NEK2	7924096	0,34	3,3E-03	0,159
polo-like kinase 1	PLK1	7994109	0,29	3,4E-03	0,159
forkhead box M1	FOXM1	7960340	0,28	2,1E-03	0,144
discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	DLGAP5	7979307	0,27	1,2E-03	0,132
topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	TOP2A	8014974	0,25	4,6E-04	0,109
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	MKI67	7937020	0,25	7,9E-03	0,206
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	BUB1	8054580	0,24	8,7E-04	0,121
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	BUB1B	7982663	0,21	4,2E-04	0,109

Supplementary table 4

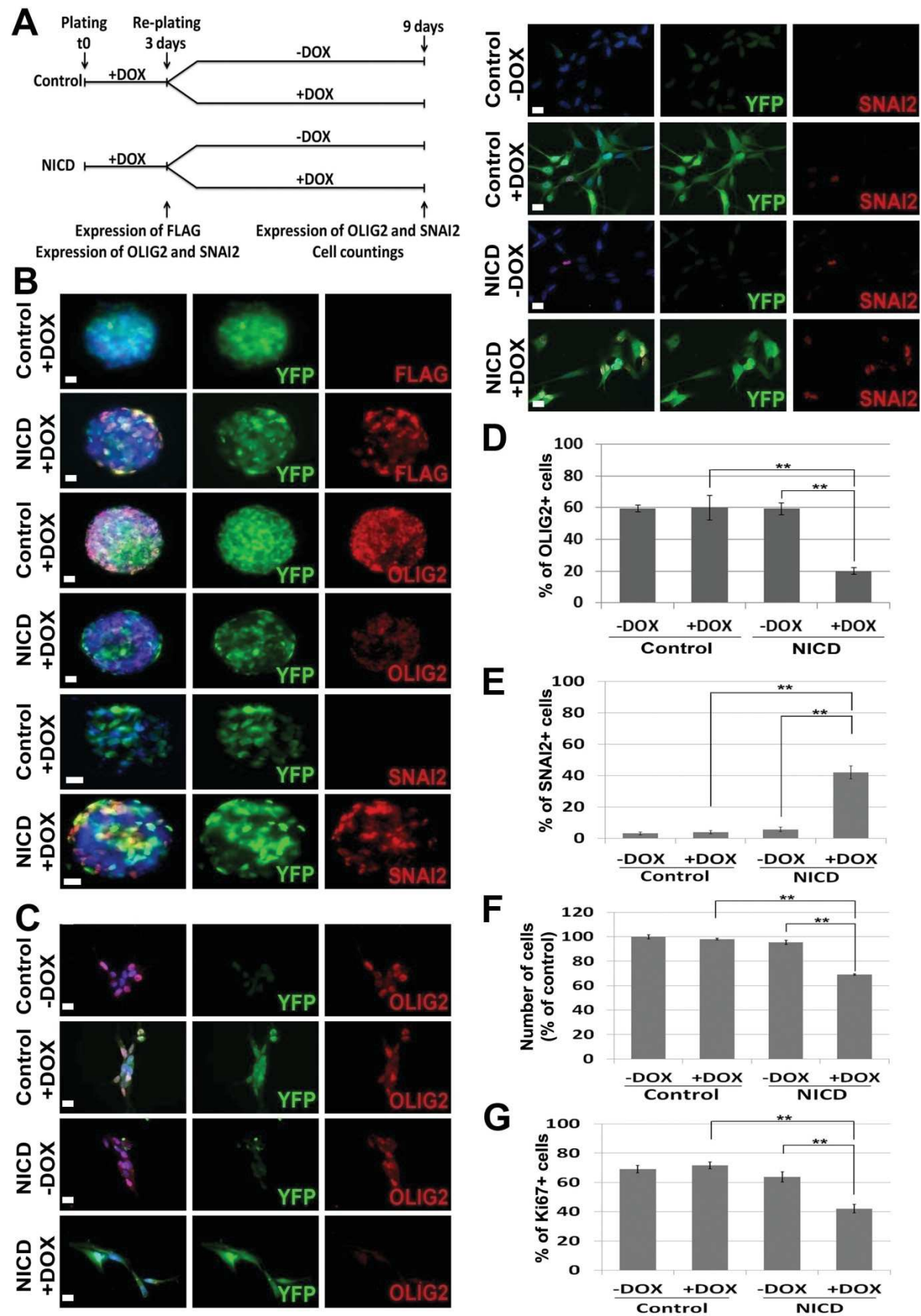
Gene ontology analysis – Top 15 biological processes affected

Biological process (downregulated)	pvalue	adj_pvalue
M phase of mitotic cell cycle (GO:0000087)	5.65298E-20	5,21E-17
mitotic cell cycle (GO:0000278)	5.52107E-20	5,21E-17
M phase (GO:0000279)	7.11584E-20	5,21E-17
microtubule-based process (GO:0007017)	1.03934E-19	5,70E-17
microtubule-based movement (GO:0007018)	9.27692E-19	4,07E-16
cell cycle (GO:0007049)	2.10324E-18	7,69E-16
spindle organization (GO:0007051)	1.85624E-13	5,82E-11
mitosis (GO:0007067)	3.96001E-8	1,09E-05
cell cycle process (GO:0022402)	2.31568E-7	5,65E-05
cell division (GO:0051301)	9.89396E-7	2,17E-04
chromosome segregation (GO:0007059)	1.6654E-6	3,32E-04
regulation of mitosis (GO:0007088)	3.29155E-6	6,02E-04
mitotic metaphase/anaphase transition (GO:0007091)	5.87374E-6	9,92E-04
mitotic cell cycle checkpoint (GO:0007093)	6.92664E-6	1,09E-03
regulation of mitotic cell cycle (GO:0007346)	1.35784E-5	1,99E-03
Biological process (upregulated)	pvalue	adj_pvalue
regulation of cell migration (GO:0030334)	8.34063E-18	1,49E-14
response to external stimulus (GO:0009605)	1.82723E-17	1,63E-14
regulation of locomotion (GO:0040012)	2.75917E-17	1,64E-14
cell migration (GO:0016477)	9.04155E-17	4,03E-14
regulation of cellular component movement (GO:0051270)	1.41838E-16	5,05E-14
cell motility (GO:0048870)	7.08627E-16	2,10E-13
response to wounding (GO:0009611)	1.15962E-15	2,95E-13
vasculature development (GO:0001944)	6.62268E-15	1,47E-12
cellular component movement (GO:0006928)	3.04656E-14	6,03E-12
blood vessel development (GO:0001568)	6.85424E-14	1,22E-11
blood vessel morphogenesis (GO:0048514)	1.05028E-13	1,70E-11
organ development (GO:0048513)	8.1097E-13	1,20E-10
cell adhesion (GO:0007155)	1.56337E-12	2,14E-10
wound healing (GO:0042060)	2.06125E-12	2,45E-10
regulation of inflammatory response (GO:0050727)	1.94439E-12	2,45E-10

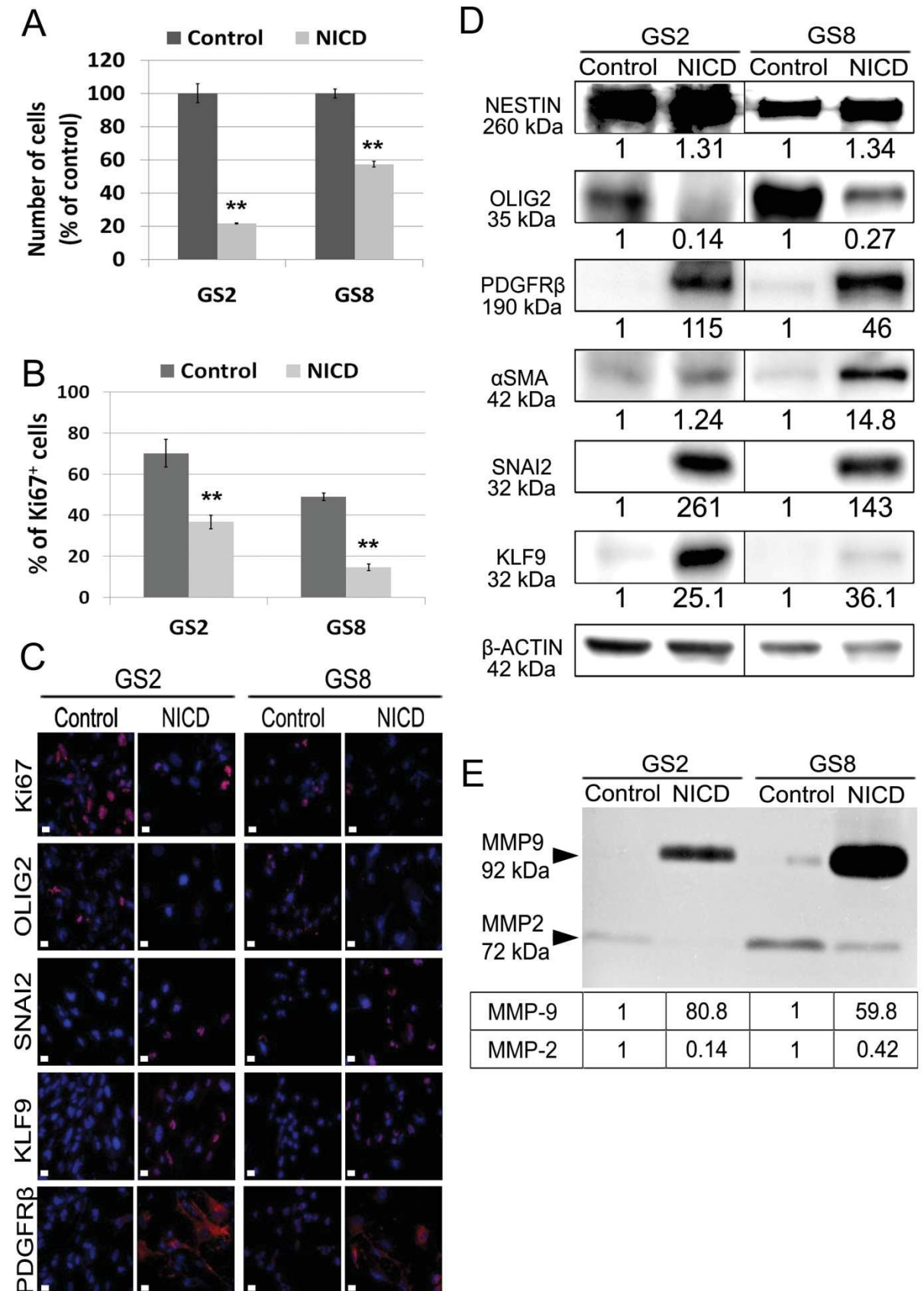
Supplementary Figure 1



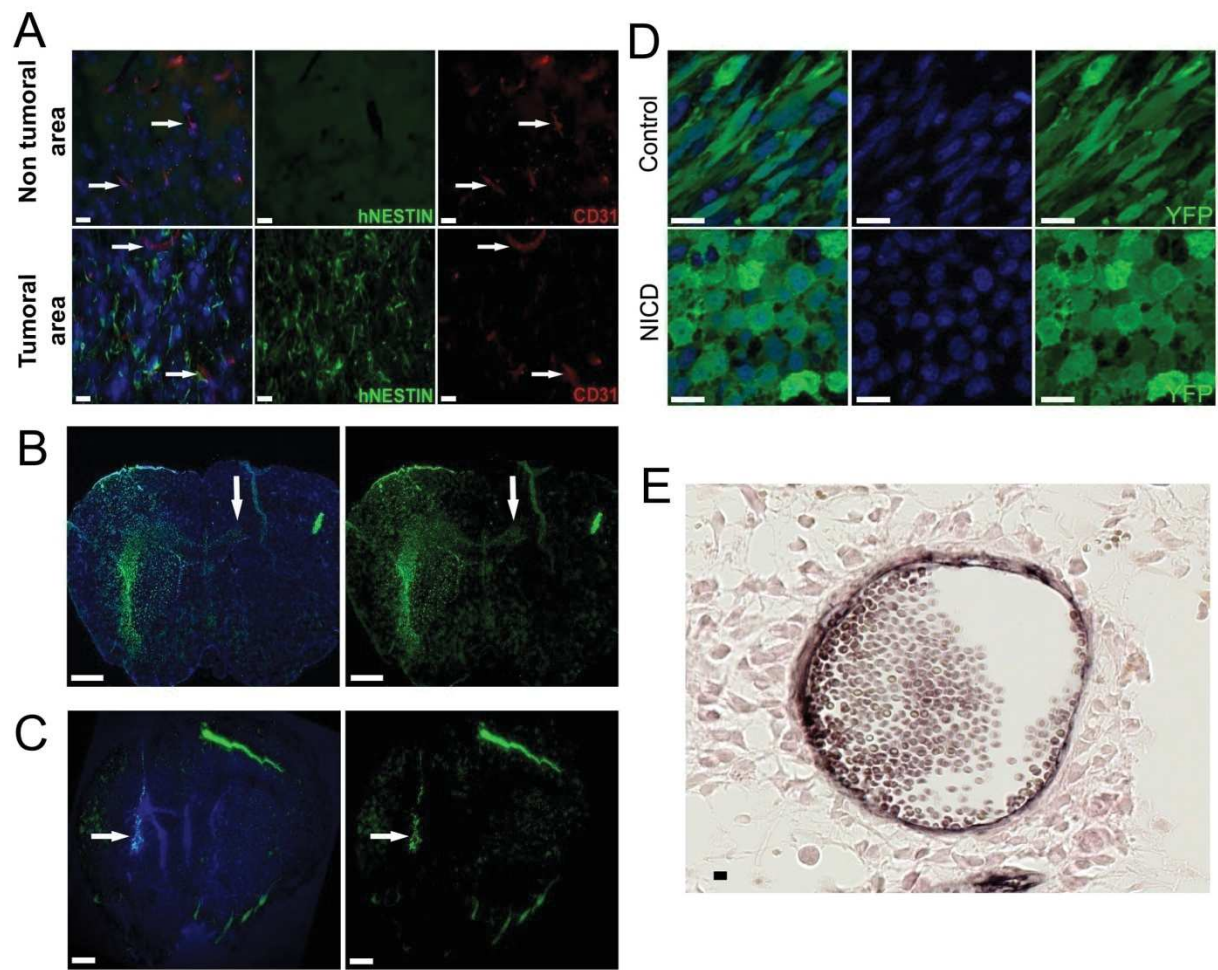
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Discussion et perspectives

Ces observations confirment ce qui a pu être observé dans d'autres travaux: les GSC ont la capacité de se transdifférencier en cellules « péricyte-like » dans notre travail, « G-péricytes » selon (Cheng et al. 2013) ou « cellules murales » selon (Scully et al. 2012). Notre étude apporte un éclairage supplémentaire sur les mécanismes moléculaires contrôlant ce processus et démontre la contribution de la signalisation Notch à ce changement d'identité. Comme tout problème scientifique, ces résultats amènent à de nouvelles perspectives et questions en suspens.

L'état basal d'activation de la signalisation Notch1 dans nos GSC n'est pas clair, le récepteur étant activé mais les gènes cibles canoniques faiblement détectés. Ceci suggère une modulation complexe de l'expression des composants de Notch1 par une potentielle interaction avec d'autres signalisations majeures. Suite à la transduction de NICD, l'activation préférentielle de Hey1 et Hey2 laisse à supposer que cet axe influe sur les conséquences phénotypiques observées dans les GSC. Les mécanismes en aval restent néanmoins à être élucidés.

L'abondance d'informations fournie par notre analyse transcriptomique a été centrale à la compréhension biologique des effets de Notch1 sur les GSC. Par des analyses bioinformatiques complémentaires des données (Ingenuity Pathway Analysis), nous renforçons certains résultats. Le phénotype « péricyte-like » induit par Notch1 serait également dépendant de l'axe TGF β (**Figure 44**), comme démontré dans les travaux de Cheng et collègues (Cheng et al. 2013). De plus, la transduction de NICD induit, au niveau du messenger, l'augmentation de Notch3, récepteur documenté dans l'homéostasie vasculaire entre cellules endothéliales et péricytes (**Figure 44**).

La fonction biologique du phénotype « péricyte-like » des GSC est à examiner dans de futurs travaux. Nos résultats suggèrent un effet stabilisateur de ces cellules sur les cellules endothéliales murines *in vivo*. Néanmoins, nous observons également une augmentation de la vascularisation des tumeurs suggérant des processus pro-angiogéniques ou pro-vasculogéniques. Cette idée est confortée par la signature génomique des GSC activées par Notch1. En effet, nous observons l'induction forte de signaux déstabilisateurs de l'intégrité vasculaire, comme Dll4 et l'angiopoiétine2 (**Figure 44**). La question du bénéfice ou non de cette transition vasculaire des GSC sur la progression tumorale et la survie des animaux est à investiguer dans de futurs travaux, par l'étude de la fonctionnalité des vaisseaux stabilisés *in vivo*.

La validation de cette première étude a été nécessaire à la suite logique de mon travail de thèse. J'ai ensuite posé la question des mécanismes moléculaires qui découlent de cette transdifférenciation des GSC dépendante de Notch1.

De nos résultats ont émergées plusieurs hypothèses concernant la régulation transcriptionnelle de cette transition :

Un premier indicateur a été l'observation de la réversibilité de l'expression des facteurs Olig2 et SLUG *in vitro*, qui implique que le phénotype « péricyte-like » représenterait un état transitoire des GSC. Selon le contexte et la nécessité, les GSC pourraient se « reprogrammer », ce qui suggère la mise en place d'un réseau transcriptionnel finement régulé.

Nos données transcriptomiques ont à nouveau été informatives pour choisir des facteurs candidats pouvant contrôler la transition vasculaire des GSC. Etant donné leur forte induction après activation de Notch1 (en ARNm) (**Figure 44**), j'ai choisi de me focaliser sur les facteurs de transcription SLUG et TAL1. Leur rôle dans l'oncogénèse et la vascularisation est documenté, mais leur implication dans le contexte spécifique des GBM reste encore peu étudiée.

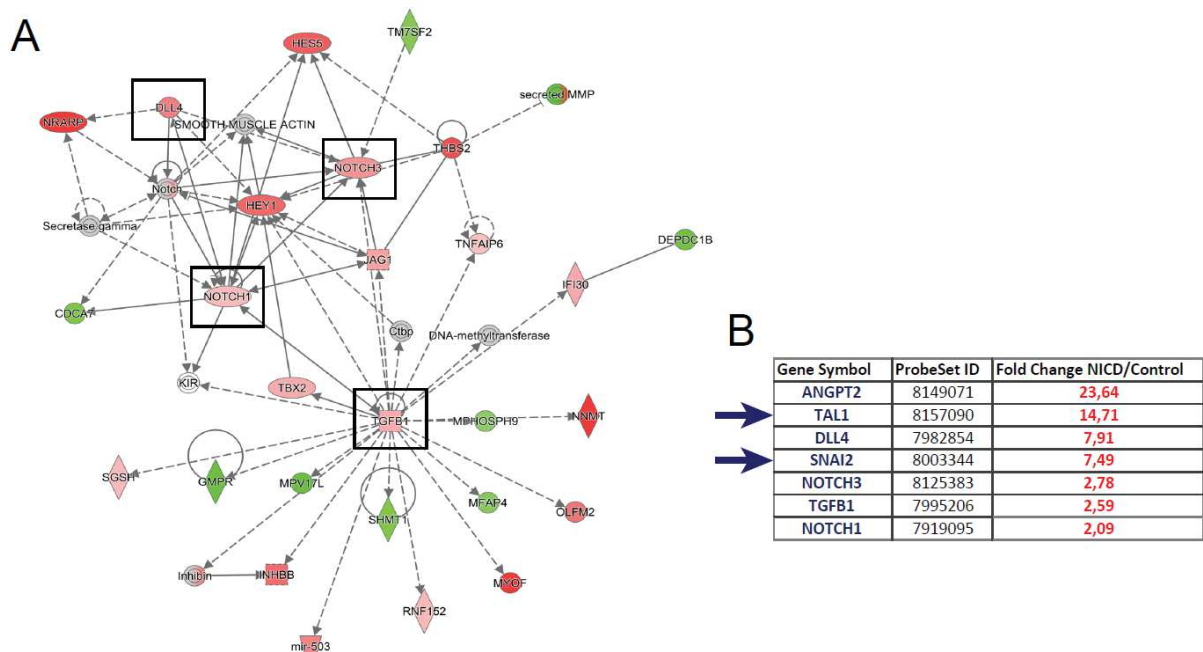


Figure 44 - Analyses complémentaires des données transcriptomiques de l'activation de Notch1 dans les GSC : A. Analyse Ingenuity Pathway Analysis des réseaux de gènes suite à la transduction de NICD. Le seuil choisi pour l'analyse correspond à un « fold change » de 2. Les gènes augmentés sont en rouge, les gènes diminués sont en vert. On observe une augmentation de Notch1, Notch3, TGFB1 et Dll4 dans un réseau interconnecté. B. Tableau de gènes complémentaires modulés par NICD, les « fold change » par rapport à la condition contrôle sont indiqués en rouge. Les signaux pro-angiogéniques ANGPT2 et Dll4 sont fortement induits. Les facteurs de transcription TAL1 et SNAI2 (ou SLUG) sont aussi augmentés dans la condition NICD.

Partie II

Contribution moléculaire des facteurs de transcription TAL1
et SLUG à la plasticité neurovasculaire des GSC

Contexte

La première partie de mon travail de thèse s'est attachée à observer et confirmer les conséquences de l'activation de Notch1 dans les GSC. Cette première étude a mis en évidence plusieurs candidats transcriptionnels potentiellement au contrôle de la transition vasculaire des GSC. J'ai choisi de concentrer mon attention sur les facteurs de transcription TAL1 et SLUG ; et d'étudier leur contribution moléculaire au phénotype « péricyte-like » des GSC. Pour justifier ce choix, il est tout d'abord utile de résumer les données bibliographiques concernant ces protéines ; notamment leurs fonctions connues dans le SNC, dans le système vasculaire, et dans la gliomagénèse.

A. Le facteur de transcription TAL1

1. Structure et fonctions principales

Le gène TAL1 (ou SCL pour Stem Cell Leukemia) fut découvert par son implication dans des réarrangements chromosomiques spécifiques des leucémies aiguës lymphoblastiques de type T (T-ALL) (Lecuyer and Hoang 2004). Il code pour un facteur de transcription appartenant à la famille des bHLH de classe II. Ces facteurs interagissent sous forme de dimères avec les bHLH de classe I tels que les protéines E. Au niveau de l'ADN, ils reconnaissent la séquence spécifique E-Box retrouvée dans les régions cis-régulatrices de nombreux gènes cibles (Mathieu 2009).

La fonction répressive ou activatrice de TAL1 dépend entièrement de la nature de ses interactions avec différents partenaires pour constituer un complexe multiprotéique actif. Parmi ses partenaires, on retient notamment les protéines E (E2A, E47) dont l'expression est très étendue ; les co-facteurs transcriptionnels GATA (GATA1-3) ; et les co-activateurs LMO (LMO1-4) qui permettent de stabiliser le complexe (Hoang, Lambert, and Martin 2016).

Plusieurs isoformes de TAL1 ont été identifiées, notamment la forme complète PP42 contenant les résidus 1-331 et une forme tronquée PP22 contenant les résidus 176-331. Ces deux isoformes contiennent le domaine bHLH mais la PP22 est démunie du domaine transactivateur en N-terminal. Il a ainsi été suggéré qu'elle pourrait agir comme un dominant négatif en titrant les partenaires de TAL1-PP42. La régulation de l'expression de TAL1 est extrêmement complexe: les isoformes peuvent ainsi résulter soit d'une initiation interne de la traduction (Calkhoven et al. 2003), soit de la transcription à partir d'un promoteur cryptique interne (Bernard et al. 1992) (**Figure 45**). La fonction de l'isoforme PP22 demeure

encore très méconnue et a notamment été étudiée au cours de l'embryogénèse du poisson zèbre.

Au niveau post-traductionnel, TAL1 subit plusieurs modifications qui modulent son mode d'action selon la spécificité du contexte (adressage au protéasome, phosphorylation) (Mathieu 2009).

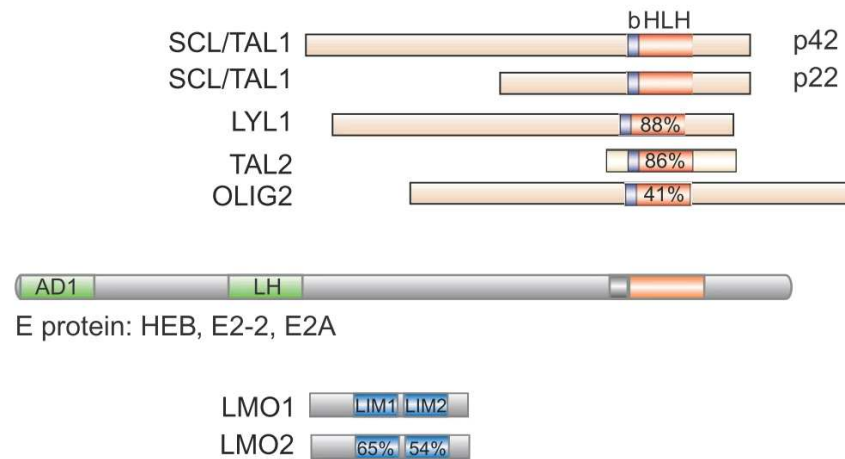


Figure 45 - Les différentes isoformes de TAL1, leur homologie avec d'autres facteurs bHLH, et leurs partenaires principaux (d'après (Hoang, Lambert, and Martin 2016)).

En rapport au contexte de son identification, la fonction de TAL1 est très documentée dans le lignage hématopoïétique et notamment dans le contexte des leucémies T-ALL. TAL1 est un oncogène majeur de ces cancers et son expression aberrante est observée dans 60% des cas cliniques (Ferrando et al. 2002). Dans ce contexte, TAL1 agit comme un régulateur transcriptionnel bi-fonctionnel (activateur et inhibiteur) (Correia et al. 2016); interagit avec de nombreux partenaires, dont certains récemment mis en évidence (Kolodziej et al. 2014; Fleskens et al. 2016); et ainsi favorise le maintien anormal de progéniteurs hématopoïétiques par le blocage de leur différenciation (Sanda et al. 2012). Précisément, il a été montré dans plusieurs études que la coopération entre Notch, TAL1 et les protéines LMO augmente les capacités prolifératives et le potentiel tumorigène des progéniteurs de thymocytes (Tatarek et al. 2011).

2. TAL1 au cours du développement hématopoïétique et vasculaire

Rappelons tout d'abord qu'au cours de l'embryogénèse, les systèmes hématopoïétiques et cardiovasculaires sont les premiers à être mis en place et qu'ils dérivent tous les deux du mésoderme. L'hématopoïèse s'établit en plusieurs étapes distinctes au niveau de sites anatomiques multiples et est intimement liée à la vasculogénèse. L'étape la plus précoce se situe au niveau des îlots sanguins du sac vitellin et implique plusieurs vagues spécifiant

d'abord les érythrocytes et les précurseurs myéloïdes primitifs. Enfin, une deuxième étape conduit à la génération des cellules souches hématopoïétiques (HSC) à la fois dans les tissus intra-embryonnaires (aorte dorsale, gonades, mésonéphros) et les tissus extra-embryonnaires (sac vitellin, placenta). Ces précurseurs hématopoïétiques vont ensuite coloniser les sites utiles à leur maturation et vont finalement s'établir dans la moelle osseuse adulte (Montel-Hagen, Van Handel, and Mikkola 2013). L'origine cellulaire des HSC fait depuis longtemps l'objet de débats et controverses. Un premier modèle propose que les HSC et les angioblastes aient pour origine l'hémangioblaste, un progéniteur bipotent putatif (Bautch 2011). Mais ce modèle a été réfuté par de nombreuses études *in vivo* qui prouvent que les HSC dérivent plutôt de l'endothélium hémogénique (Bertrand et al. 2010), un endothélium spécialisé qui subirait une transition phénotypique endothélio-hématopoïétique (EHT) pour générer les HSC (Kissa and Herbomel 2010). D'autres modèles « hybrides » réconciliant les deux hypothèses ont également été proposés (Figure 46). La divergence entre ces hypothèses réside surtout dans la variation des conditions expérimentales mises en place et dans le choix du site embryonnaire étudié. A ce jour, les caractéristiques de l'endothélium hémogénique et les mécanismes de l'EHT restent encore méconnus : il pourrait constituer un tissu spécialisé différent de l'endothélium vasculaire (Ditadi et al. 2015), et la transition EHT ferait intervenir les signalisations Notch, sHH et TGF- β (Monteiro et al. 2016).

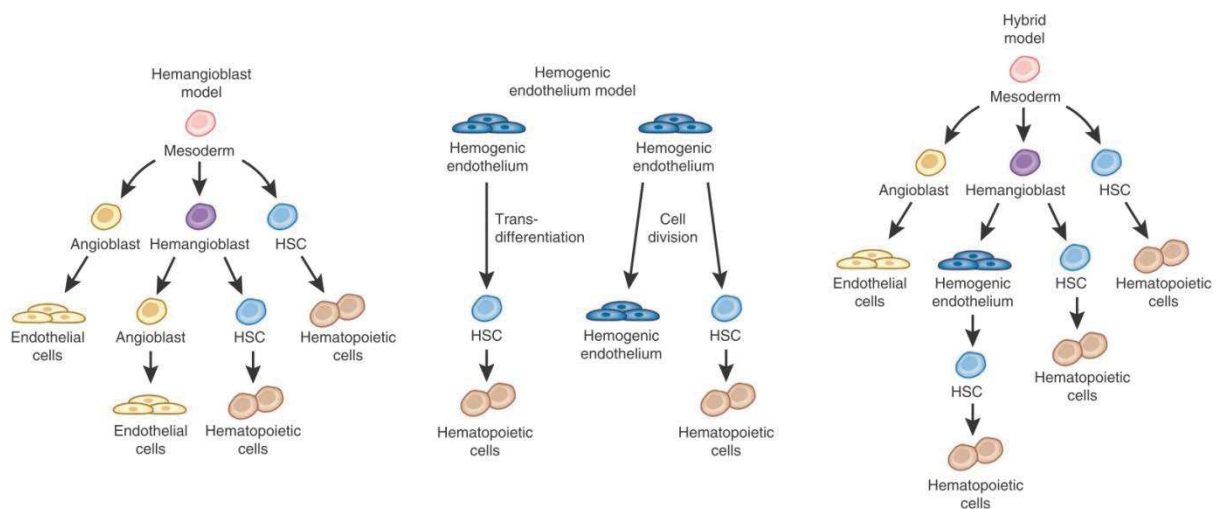


Figure 46 - Les différents modèles de l'origine des cellules hématopoïétiques et endothéliales au cours du développement (d'après (Bautch 2011)).

Au cours du développement, TAL1 est détecté à des stades très précoces dans les progéniteurs hématopoïétiques et les progéniteurs vasculaires. Son expression est nécessaire à leur spécification à partir du mésoderme, en coopération avec la signalisation VEGF/VEGFR1/Fli1 (Ema et al. 2003). TAL1 intervient également dans la génération des

différents lignages hématopoïétiques à des stades plus tardifs, notamment au cours de l'érythropoïèse (Mathieu 2009). TAL1 est donc lié à la controverse de l'origine embryonnaire des HSC : il pourrait notamment définir l'identité de l'hémangioblaste (D'Souza, Elefanty, and Keller 2005) ou spécifier l'endothélium hémogénique. Très récemment, il a été démontré que TAL1 coopère avec les cascades sHH et Notch pour contrôler la transition EHT de l'endothélium hémogénique (Kim et al. 2013). Chez le poisson zèbre, les isoformes de TAL1 joueraient un rôle à différents stades de l'EHT : l'isoforme courte β (ou PP22) serait nécessaire au maintien de l'état hémogénique de l'endothélium alors que l'isoforme α (ou PP42) agirait à des étapes plus tardives dans le maintien des HSC immatures (Zhen et al. 2013). Cette fonction différentielle des isoformes de TAL1 avait déjà été observée dans la lignée myéloïde, où la PP22 favorise la différenciation érythrocytaire alors que la PP42 favorise la différenciation des mégakaryocytes (Calkhoven et al. 2003). Il semble donc que l'expression des différentes isoformes de TAL1 peut moduler l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques vers différents lignages (**Figure 47**).

Etant donné l'origine embryonnaire commune entre les cellules hématopoïétiques et les cellules endothéliales, TAL1 est également acteur de la spécification des angioblastes par le contrôle de l'expression des gènes de l'identité endothéliale (De Val and Black 2009). *In vitro*, des travaux suggèrent aussi que TAL1 inhiberait la différenciation des angioblastes en cellules murales α SMA⁺ (Ema et al. 2003; D'Souza, Elefanty, and Keller 2005). L'ontologie des cellules murales demeurant encore obscure, celles-ci pourraient se différencier à partir des angioblastes vasculogéniques. Ces hypothèses et l'implication de TAL1 n'ont pas été approfondies et restent donc encore imprécises.

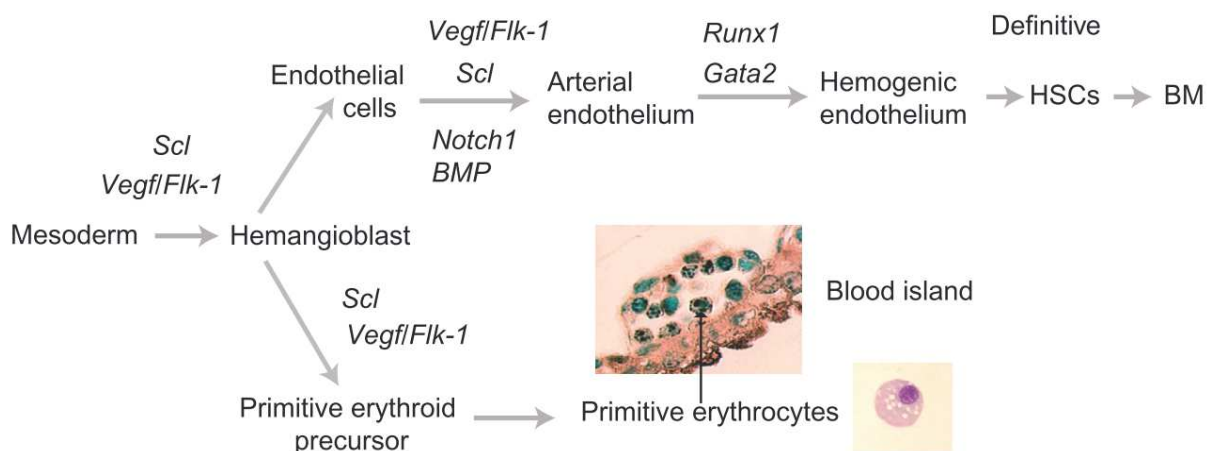


Figure 47 – Implication de TAL1 (SCL) dans le lignage hématopoïétique (d'après (Hoang, Lambert, and Martin 2016)).

En résumé, TAL1 est considéré comme un régulateur central de l'hématopoïèse et vasculogénèse embryonnaires. En combinaison avec un « cocktail » d'autres facteurs majeurs, il favorise la reprogrammation *in vitro* de cellules ES ou de cellules iPS vers ces lignages (Moreau et al. 2016; Han et al. 2014; Elcheva et al. 2014).

3. TAL1 est actif au cours de l'angiogénèse et du remodelage vasculaire

Chez l'adulte, TAL1 demeure exprimé dans les précurseurs hématopoïétiques des organes lymphoïdes majeurs ; mais également dans des cellules vasculaires de certains tissus. En effet, les deux isoformes sont détectées dans quelques cellules endothéliales du rein, du thymus et de la rate. Dans l'utérus, des cellules musculaires lisses l'expriment également (Pulford et al. 1995). TAL1 pourrait donc participer à des processus vasculaires post-nataux physiologiques ou pathologiques. Ainsi, son expression serait généralement associée à des vaisseaux en formation et un état activé de l'endothélium dans les tissus (Mathieu 2009). D'un point de vue fonctionnel, l'activité de TAL1 est corrélée au phénotype angiogénique des CE adultes. *In vitro*, son expression est élevée dans des CE en prolifération et diminuée dans des CE quiescentes stabilisées. En effet, TAL1 est requis pour les étapes précoces de morphogénèse tubulaire des CE en matrice bi ou tri-dimensionnelle (Lazrak et al. 2004). Moléculairement, TAL1 régule directement l'expression de la VE-Cadhérine au sein d'un complexe composé de E2A, LMO2 et GATA2. Via l'expression de la VE-Cadhérine, TAL1 impacte donc sur la capacité des CE à former les vacuoles et lumières nécessaires à la tubulogénèse (Deleuze et al. 2007). Plus récemment, l'angiopoïétine 2 qui est cruciale au bourgeonnement angiogénique a également été prouvée comme cible directe de TAL1 complexé avec LMO2 et LYL1 (Deleuze et al. 2012). Le mode d'action moléculaire de TAL1 dans les cellules endothéliales *in vitro* semble donc comparable aux données accumulées dans le lignage hématopoïétique (Figure 48).

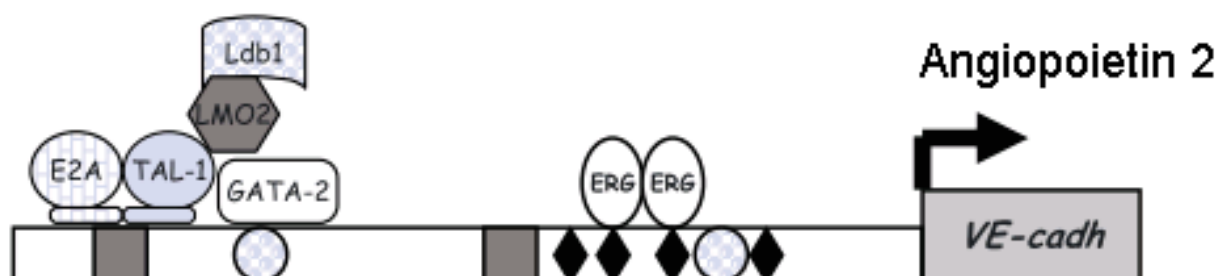


Figure 48 - TAL1 agit au sein d'un complexe transcriptionnel spécifique dans les cellules endothéliales et active l'expression de la VE-Cadhérine et l'angiopoïétine 2 (adapté de (Mathieu 2009)).

Quelques études ont analysé le potentiel rôle de TAL1 dans la néovascularisation des tissus adultes. En 2014, Palii et collègues montrent *in vivo* après transplantation, que TAL1 est requis pour l'adhésion et la migration de progéniteurs endothéliaux (EPC-like) vers des sites ischémiques. L'expression de TAL1 module le chimiotactisme des EPC putatifs en contrôlant l'axe CXCR4/SDF1. TAL1 coopère avec l'acétyltransférase p300 pour réguler l'expression de gènes endothéliaux cibles parmi lesquels la VE-Cadhérine et EphrinB2. Enfin, la stabilisation de l'interaction entre TAL1 et p300 par la trichostatine améliore la revascularisation des tissus ischémiques par les EPC *in vivo*. TAL1 apparaît donc nécessaire à la réparation vasculaire adulte et son ciblage spécifique pourrait avoir des conséquences intéressantes en médecine régénérative des pathologies vasculaires (Palii et al. 2014).

Dans le contexte tumoral, l'angiogénèse est fortement réactivée pour subvenir aux besoins en oxygène, métabolites et signaux prolifératifs des cellules cancéreuses. TAL1 étant un facteur positif de l'angiogénèse, son expression pourrait être réactivée au cours de la néovascularisation tumorale. A ce jour, TAL1 a seulement été observé chez l'adulte dans des lésions vasculaires bénignes et malignes (Chetty et al. 1997). Dans ce contexte, TAL1 serait co-exprimé avec VEGFR2 dans des progéniteurs endothéliaux de type EPC associés aux lésions et aux sites de néovascularisation actifs (Tang et al. 2006). Les hémangioblastomes sont des tumeurs vasculaires très rares du SNC dont l'origine cellulaire est inconnue : elles seraient composées à la fois de cellules vasculaires et de cellules stromales réminiscentes du « supposé » hémangioblaste embryonnaire. TAL1 serait spécifiquement exprimé dans le stroma hémangioblastique mais aucune étude fonctionnelle n'a permis d'élucider la raison de son expression (Glasker et al. 2006). Dans les tumeurs solides, aucune étude n'a analysé la contribution de TAL1 à la néovascularisation.

4. TAL1 dans le SNC

De façon intéressante, TAL1 est exprimé dans le SNC au cours du développement. Précisément, le facteur de transcription est détecté dans des neurones post-mitotiques céphaliques du mésencéphale, du rhombencéphale et de la moelle épinière (Green et al. 1992; Elefanty et al. 1999). TAL1 serait donc impliqué dans la neurogénèse précoce en coopération avec GATA2-3 et pourrait spécifier certains précurseurs neuronaux dans des régions spécifiques du SNC (Herberth et al. 2005; van Eekelen et al. 2003). Précisément dans la moelle épinière, des travaux impliquent TAL1, GATA2-3 et LMO4 dans la spécification des interneurons V2 immatures de la partie ventrale du tube neural. Sous l'influence directe de Notch, ce complexe transcriptionnel contrôle finement la balance entre les neurones inhibiteurs GABAergiques V2b et les neurones excitateurs glutamaergiques V2a (Smith et al.

2002; Peng et al. 2007; Joshi et al. 2009). Cette régulation transcriptionnelle de l'identité GABAergique neuronale a aussi été mise en évidence dans les circuits monoaminergiques du cerveau (Lahti et al. 2016). TAL1 a aussi été associé à la gliogénèse dans la moelle épinière ventrale. Il induit l'astrogénèse au profit de l'oligodendrogénèse, par inhibition de l'action transcriptionnelle de Olig2 (Muroyama et al. 2005).

Hormis son expression stromale dans le contexte pathologique des hémangioblastomes, TAL1 ne semble pas exprimé dans les cellules neurales du cerveau adulte. Une étude récente de 2015 mentionne son expression spécifique dans des cellules microgliales: TAL1 ferait partie d'un réseau transcriptionnel majeur réminescent de l'hématopoïèse embryonnaire; et favoriserait l'homéostasie de la microglie adulte. L'implication de ce réseau de gènes serait corrélée au vieillissement cérébral. TAL1 pourrait donc aussi être réactivé dans les cellules immunitaires du cerveau en conditions pathologiques (Wehrspaun, Haerty, and Ponting 2015).

Enfin, TAL1 n'a jamais été étudié dans les gliomes. Une étude très récente montre que son partenaire LMO2 favorise la gliomagénèse et le phénotype « endothelial-like » des GSC, précisément sous le contrôle de la voie Notch, et via régulation directe de l'expression de la VE-Cadhérine. LMO2 est également exprimé chez les patients (Kim et al. 2015). Le facteur LMO2 est l'un des premiers acteur transcriptionnel identifié pouvant contrôler la plasticité neurovasculaire des GSC.

B. Le facteur de transcription SLUG

1. Structure et fonctions générales :

SLUG (ou SNAI2) est un facteur de transcription à doigt de zinc faisant partie de la superfamille Snail. Cette famille de répresseurs transcriptionnels possède une structure spécifique conservée chez tous les vertébrés, et reconnaît la séquence d'ADN consensus CAGGTG, un motif apparenté aux séquences E-Box ciblées par les facteurs bHLH. Au niveau de sa structure, SLUG se différencie de ses homologues par la présence du domaine SLUG, une région centrale unique dont la fonction moléculaire demeure encore imprécise. Celle-ci pourrait être à l'origine de fonctions spécifiques attribuées à SLUG au cours du développement, et ainsi expliquer des conséquences phénotypiques contradictoires avec son homologue Snail (Cobaleda et al. 2007) (**Figure 49**).

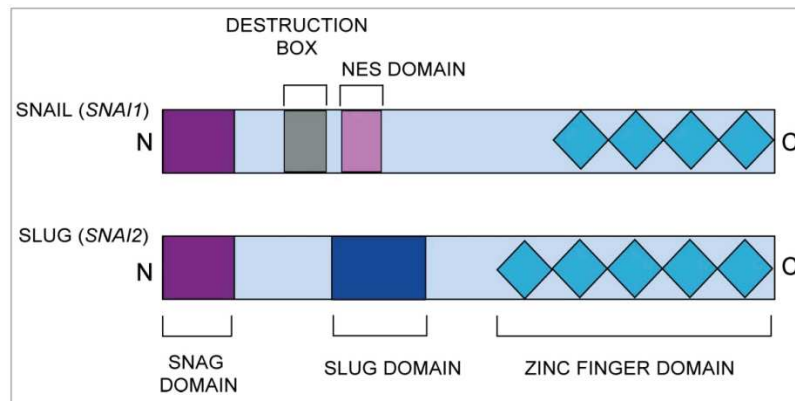


Figure 49 - Structure de SLUG et Snail (d'après (Phillips and Kuperwasser 2014)).

Au cours de l'embryogénèse, SLUG est impliqué dans de multiples processus associés à la spécification du mésoderme : on le retrouve donc exprimé à différents niveaux dans de nombreux tissus, comme le cœur, les poumons, les reins, les cartilages osseux et cranio-faciaux. Il participe aussi à la mise en place de l'asymétrie du plan du corps (Cobaleda et al. 2007). SLUG et ses homologues sont donc majeurs dans les étapes précoces du développement, et contrôlent finement la prolifération cellulaire, notamment par leur action anti-apoptotique (Inukai et al. 1999). Chez l'adulte, SLUG demeure exprimé dans certains tissus, notamment le cœur, les poumons, le pancréas, la glande mammaire (Parent et al. 2004). Ainsi, la dérégulation de son expression est souvent associée à la progression de tumeurs d'origine épithéliale.

2. SLUG et le phénotype mésenchymateux

A ce jour, SLUG est principalement étudié dans la motilité et la migration cellulaire. En effet, son action transcriptionnelle est essentielle à la délamination des cellules de la crête neurale à partir du tube neural ; et par la suite leur migration vers différents sites d'embryogénèse (Nieto et al. 1994). Ce processus physiologique appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) implique un changement phénotypique réversible des cellules épithéliales qui adoptent une morphologie mésenchymateuse migratoire. D'un point de vue moléculaire, SLUG favorise la rupture des jonctions d'adhérence intercellulaires par inhibition transcriptionnelle directe de la E-Cadhérine ; et induit l'expression de protéines mésenchymateuses, comme la vimentine et la fibronectine. L'EMT fait également intervenir d'autres facteurs de transcription et facteurs épigénétiques qui coopèrent de manière extrêmement complexe avec SLUG (Nieto et al. 2016).

Lors de la progression tumorale, le processus d'EMT est souvent réactivé et confère des propriétés métastatiques, invasives et tumorigènes aux cellules cancéreuses épithéliales (Mani et al. 2008). De façon intéressante, SLUG apparait comme central dans ces phénomènes. Précisément dans le cancer du sein, SLUG inhibe l'expression de la E-cadherine permettant l'invasion tumorale (Hajra, Chen, and Fearon 2002); favorise l'expression de CD133 et CD44, deux marqueurs putatifs de cellules souches tumorales; et inhibe le programme apoptotique permettant la survie des cellules cancéreuses (Phillips and Kuperwasser 2014).

Au niveau moléculaire, l'expression de SLUG peut être modulée par plusieurs voies de signalisation qui interagissent entre elles. Les plus importantes sont les cascades BMP et TGFβ qui induisent directement l'expression de SLUG. Il a également été montré dans différents contextes que la signalisation Notch induit directement l'expression de SLUG et régule l'EMT et la survie des cellules (Nieto et al. 2016; Nieto 2002) (Figure 50).

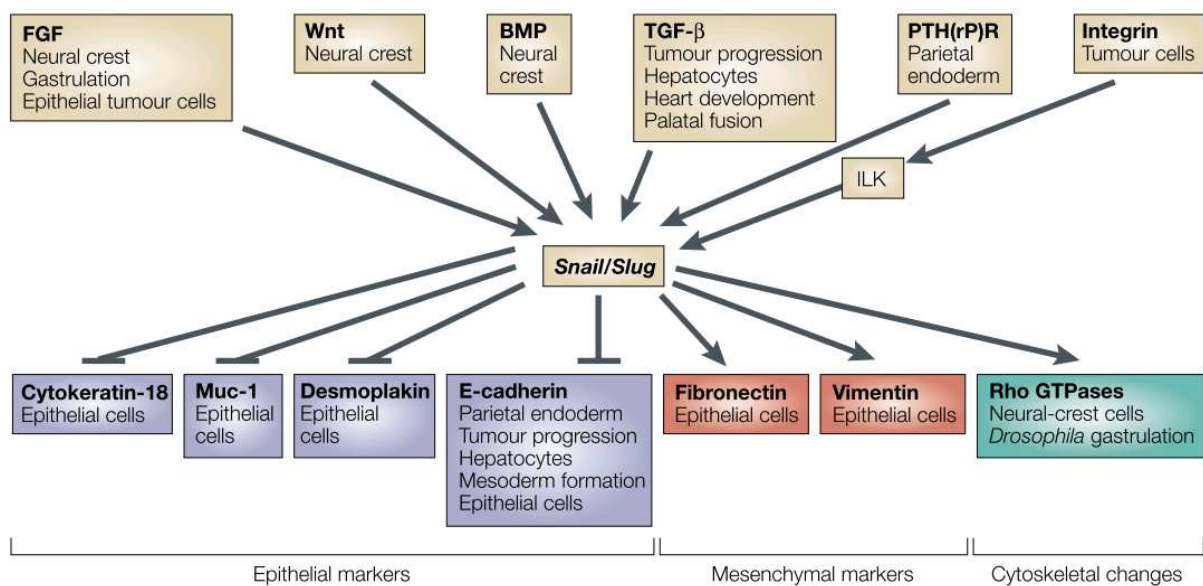


Figure 50 – De multiples voies de signalisations convergent vers SLUG et il régule en aval différentes cibles (d'après (Nieto 2002)).

3. SLUG et le phénotype vasculaire

Au cours de l'embryogénèse cardiaque, les cellules endothéliales peuvent subir une transition phénotypique mésenchymateuse comparable à l'EMT, qui leur permet de migrer et former les valves et le septum cardiaques (Kinsella and Fitzharris 1980). Chez l'adulte, cette transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) (**Introduction, Chapitre I**) peut être réactivée dans les situations pathologiques. Dans différents organes, elle permet de

disposer localement d'une source de précurseurs mésenchymateux utile à l'angiogénèse et au remodelage vasculaire (Bautch 2011). Dans le cœur, l'EndoMT fournit une source de fibroblastes contribuant à la fibrose cardiaque lors des infarctus (Lin, Wang, and Zhang 2012). Dans le contexte tumoral des carcinomes, l'EndoMT serait à l'origine d'une majorité des « fibroblastes associés aux cancers » (CAF) (Zeisberg et al. 2007).

Ce mécanisme a des conséquences morphologiques similaires à l'EMT, notamment l'inhibition de la VE-Cadherine et l'induction de la fibronectine, vimentine et α SMA. Cette transition cellulaire semble aussi contrôlée par la famille Snail et précisément SLUG (Welch-Reardon, Wu, and Hughes 2015). Dans le cœur, SLUG est directement induit par la coopération des cascades BMP, TGF β et Notch et réprime l'expression de la VE-cadhérine et du marqueur endothélial CD31 (Niessen et al. 2008) (**Figure 51**).

Ceci suggère un rôle de SLUG dans la plasticité des cellules endothéliales. Quelques études *in vitro* ont en effet montré que SLUG est associé à la vasculogénèse et l'angiogénèse. A partir de cultures de cellules embryonnaires, SLUG peut être exprimé sous l'effet du VEGF-A et les cultures adoptent un phénotype endothélial et mural, capables de former des tubules (Zippo et al. 2004). Sous la dépendance de Notch, SLUG favorise également la survie des cellules endothéliales (Chang et al. 2013). Une autre publication suggère que SLUG est nécessaire au bourgeonnement angiogénique, à la migration et à la vacuolisation des cellules endothéliales, par la régulation indirecte de l'expression des métalloprotéinases MMP2 et MMP9 (Welch-Reardon et al. 2014). Récemment, d'autres analyses ont montré que SLUG contrôle la prolifération et la migration de cellules musculaires lisses et qu'il est exprimé au niveau de sites de remodelage vasculaire dans les artères pulmonaires (Coll-Bonfill et al. 2016).

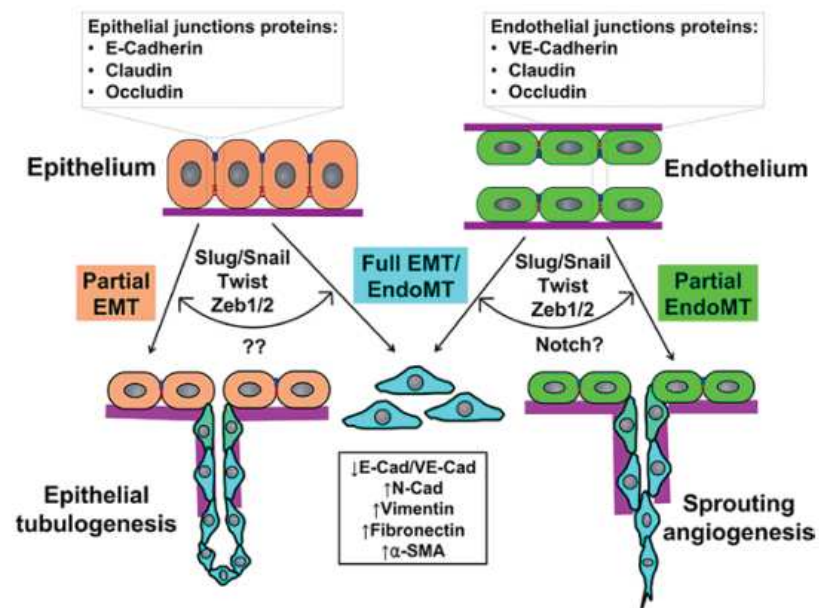


Figure 51 – Comparaison entre l’EMT et l’EndMT : SLUG est impliqué dans les deux processus (d’après (Welch-Reardon, Wu, and Hughes 2015)).

4. SLUG dans le système nerveux central et les gliomes

Très peu de données sont disponibles concernant l’expression de SLUG dans le lignage neural. Chez la drosophile, le poisson zèbre et *C. Elegans*, certains homologues de la famille Snail jouent un rôle dans la différenciation neuronale (Ashraf et al. 1999). Dans le SNC des embryons vertébrés, SLUG est observé principalement dans les structures dérivées des cellules de crête neurale. Dans les embryons de poulet, SLUG est détecté dans la moelle épinière et le cerveau, il est spécifiquement co-exprimé avec α SMA dans les péricytes et vSMCs accompagnant les cellules endothéliales vasculogéniques du plexus intraneural (Marin and Nieto 2004).

Dans le cerveau adulte, SLUG n’est pas exprimé à l’état physiologique. Notre équipe a rapporté son expression *in vitro* dans des cultures adhérentes isolées à partir de moelle épinière humaine adulte. Ces cellules d’origine mésenchymateuse co-expriment SLUG, α SMA, calponine et caldesmone et présentent des caractéristiques de cellules musculaires lisses (Mamaeva et al. 2011). Ceci suggère que SLUG pourrait être exprimé dans certaines cellules vasculaires du SNC adulte.

En comparaison des cancers épithéliaux, la fonction de SLUG dans la gliomagénèse a été très peu explorée. Une première étude en 2010 associe la présence de SLUG avec le grade des tumeurs et la malignité : SLUG serait très fortement exprimé dans les GBM où la néovascularisation et l’invasion sont maximales (Yang et al. 2010). Plus récemment, une seconde étude corrèle SLUG et une combinaison de gènes dont CD44, α SMA, MMP2 et

PDGFR β , à une signature de GBM mésenchymateux. L'expression de ce réseau de gènes dans certains échantillons pourrait traduire une transition semblable à une EMT, et rendrait plus sensible à la récurrence ces tumeurs après thérapies. Les auteurs suggèrent également en perspectives que SLUG pourrait être un régulateur majeur de cet état (Cheng et al. 2012).

D'un point de vue fonctionnel, une seule publication a analysé les conséquences du gain/perte de fonction de SLUG dans la gliomagenèse. A partir de lignées immortalisées de gliome, la surexpression de SLUG augmente la croissance et la prolifération des cellules de manière dépendante à la signalisation EGFR. Cette surexpression favorise aussi la migration et l'invasion cellulaire *in vitro*. Après xéno greffes sous cutanées de ces cellules, la taille et la vascularisation des tumeurs est augmentée. Enfin, l'inhibition de SLUG endogène dans des lignées l'exprimant fortement augmente la survie de souris après xéno greffes intracrâniennes (Yang et al. 2010). Des travaux complémentaires impliquent également SLUG dans l'invasion et la potentielle EMT des cellules de gliome, mais plutôt comme une conséquence observée plutôt qu'une cause centrale des phénomènes observés. Par exemple, les miARNs miR-124 et miR-203 répriment directement SLUG, et ainsi inhibent le potentiel tumorigène, l'invasion, et la résistance aux chimiothérapies de lignées immortalisées de gliome (Xie et al. 2012; Xia et al. 2012; Liao et al. 2015). En résumé, SLUG semble assurer une fonction dans la gliomagenèse et plus particulièrement dans les GBM mésenchymateux. Néanmoins, ses cibles précises dans ce contexte sont à découvrir.

Hypothèses et Stratégie

Ces données bibliographiques nous ont permis de formuler les hypothèses suivantes concernant la fonction de TAL1 et SLUG :

Etant donné son rôle très documenté dans l'angiogénèse et la vasculogénèse, TAL1 pourrait coordonner de manière centrale la transdifférenciation vasculaire des GSC. En effet, Il est majoritairement associé à un phénotype endothélial selon la littérature, mais peut également être exprimé dans des cellules musculaires lisses au cours de l'embryogénèse. Son partenaire LMO2 a récemment été démontré comme un inducteur du phénotype vasculaire endothélial dans les GSC. Ces données renforcent donc l'hypothèse que l'action transcriptionnelle de TAL1 puisse être impliquée dans ces même processus.

En ce qui concerne SLUG, la littérature démontre clairement son association à un phénotype vasculaire endothélial ou mural, et de manière plus générale à une identité cellulaire mésenchymateuse (EMT et EndMT). Il apparait donc comme un candidat majeur en aval de Notch1 pour contrôler le changement d'état des GSC : il pourrait ainsi contrôler l'expression des protéines caractéristiques de l'identité péricytaire (PDGFR β , NG2 ou α SMA), ou bien réprimer un phénotype endothélial et favoriser indirectement un état mésenchymateux/périvasculaire.

A ce jour, ni SLUG, ni TAL1 n'ont été étudiés dans des cultures primaires de GSC. Etant donné qu'ils régulent des processus cellulaires communs de vascularisation au niveau embryonnaire et adulte, la question du lien entre ces deux facteurs se pose. Les données bibliographiques montrent qu'ils peuvent tous les deux réguler directement l'expression de la VE-Cadhérine ; TAL1 étant activateur (Deleuze et al. 2007) et SLUG étant inhibiteur (Niessen et al. 2008). D'autres fonctions pour SLUG et TAL1 ne sont pas à écarter. Néanmoins, nous avons choisi de nous focaliser sur l'influence de ces deux facteurs sur le phénotype « péricyte-like » des GSC. Plusieurs questions ont alors été posées :

- Coordonnent-ils la transition vasculaire « péricyte-like » des GSC en aval de Notch1 ?
- Par quels mécanismes moléculaires ? Quels gènes régulent-ils ?
- Agissent-ils en synergie, en opposition ou bien indépendamment ?
- Sont-ils des effecteurs moléculaires clés au sein des niches périvasculaires des GSC ?
- Quelle est leur contribution au sein des tumeurs ?
- Sont-ils associés à une transdifférenciation vasculaire *in vivo* ?

Pour y répondre, nous avons examiné leur fonction potentielle par trois approches :

In vitro, nous avons tout d'abord analysé leur expression dans nos cultures de GSC suite à l'activation de Notch1 et précisé le phénotype de ces cellules. Ensuite, par une approche mécanistique classique en gain/perte de fonction, nous avons analysé les conséquences de la modulation de l'expression de SLUG ou TAL1 sur l'expression de gènes cibles candidats associés au phénotype « péricyte-like » des GSC.

D'un point de vue plus physiologique, nous avons souhaité mieux comprendre l'induction de SLUG et TAL1 dans les GSC. Dans notre première étude sur Notch1, les cellules « péricytes-like » interagissent étroitement avec les cellules endothéliales et stabilisent le réseau vasculaire *in vivo*. De plus, outre un contrôle actif des GSC sur la vascularisation tumorale, il est également admis que les cellules vasculaires participent au maintien du réservoir de GSC au sein des niches périvasculaires tumorales. Ce dialogue entre GSC et cellules vasculaires est crucial à la gliomagénèse et place la signalisation Notch comme un des effecteurs centraux à ces mécanismes. Nous avons donc voulu observer l'expression de SLUG et TAL1 dans ce contexte physiologique, et examiner les modalités moléculaires du dialogue entre GSC et cellules endothéliales de manière plus globale. Pour se faire, nous avons établi un système de co-culture en deux dimensions entre GSC et cellules endothéliales à partir duquel des analyses fonctionnelles et génomiques ont été réalisées.

Dans le but d'être pertinent vis-à-vis du contexte pathologique des GBM, nous avons finalement examiné la contribution de SLUG et TAL1 *in vivo* ; en travaillant directement à partir de coupes histologiques de patients. Nous avons notamment associé l'expression de ces deux facteurs à des cellules vasculaires par une caractérisation approfondie. Enfin, la question de l'origine tumorale ou non de ces cellules a été posée.

Méthodologie

Les techniques utilisées pour ce deuxième axe du projet sont principalement les mêmes que celles évoquées dans la **Publication 1** (Guichet et al. 2015) (**Résultats, Partie I**). Néanmoins, certains outils spécifiques ont été développés:

Echantillons de glioblastomes humains

Les prélèvements tumoraux issus d'exérèses chirurgicales ont été obtenus grâce à une collaboration avec les services de neurochirurgie (Dr. Duffau et Dr. Bauchet) et d'anatomopathologie (Dr. Rigau) du CHU Gui de Chauliac. L'analyse histologique a confirmé le diagnostic glioblastome de grade IV selon la classification OMS 2007/2016. L'utilisation des prélèvements est en accord avec la législation INSERM et le consentement des patients. Les prélèvements tumoraux ont été récupérés sur glace juste après la fin de l'intervention chirurgicale ; et subdivisés en plusieurs fragments destinés à différentes analyses biologiques (mise en culture, extraction de protéines, coupes histologiques). Pour l'analyse histologique, les tumeurs sont fixées dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 2 heures, sous agitation à 4°C. Elles sont ensuite incubées une nuit dans des solutions de sucrose de concentration croissante (7, 15 et 30 %) pour conserver l'intégrité du tissu avant congélation. Les échantillons sont ensuite inclus dans du Tissue Tek OCT (Sakura) et congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Les blocs congelés sont stockés à -80°C pour une préservation histologique optimale. Par la suite, ils sont coupés à 14 µm grâce à un cryostat (Leica 2800 E ou CM 3050) ; et recueillis sur des lames porte-objet en verre (Superfrost Plus).

Immuno-FISH séquentiel

L'immunohistochimie combinée à une analyse par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a été mise au point sur les coupes de GBM afin d'examiner le statut EGFR amplifié ou non des cellules SLUG⁺. Le FISH est une technique de cytogénétique pouvant être utilisée comme outil diagnostique en cancérologie, notamment pour détecter les aberrations chromosomiques typiques des cellules cancéreuses (amplification, délétions). Cette technique utilise des sondes d'ADN « locus-spécifiques » couplées à des fluorophores et peut s'appliquer sur des coupes histologiques en paraffine ou cryoconservées. Par collaboration avec B Orsetti (IRCM, Montpellier), un protocole spécifique séquentiel en 2 grandes étapes a été optimisé sur nos prélèvements de GBM. Brièvement, les blocs congelés sont coupés à 6µm au cryostat puis traités dans un premier temps pour immunohistochimie classique (Guichet et al. 2015). Les lames sont observées sur un microscope à fluorescence pourvu d'une platine motorisée pour enregistrer les positions des cellules positives sur les coupes (Zeiss AxioImager Apotome Z2). Dans un deuxième temps, les lames sont démontées, pré-traitées, puis hybridées avec la sonde spécifique du locus

EGFR. Elle consiste en un mélange de deux sondes directement couplées à des fluorophores : la sonde locus spécifique EGFR est couplée au PlatinumBright550 et s'hybride au niveau de la région 7p11.2 ; la sonde contrôle d'énumération (Satellite Enumeration Probe) est couplée au PlatinumBright 495 et s'hybride au niveau de la région centromérique du chromosome 7 (Kreatech, KBI-10702). Après hybridation et montage, les lames sont à nouveau observées au microscope au niveau des positions enregistrées précédemment. Le statut amplifié est déterminé par le nombre de points rouges nucléaires rapporté au nombre de points verts : une cellule normale possède 2 points rouges, 2 points verts alors qu'une cellule anormale présente plus de 2 points rouges, également plus de 2 points verts si une duplication entière du chromosome se produit (Figure 52).

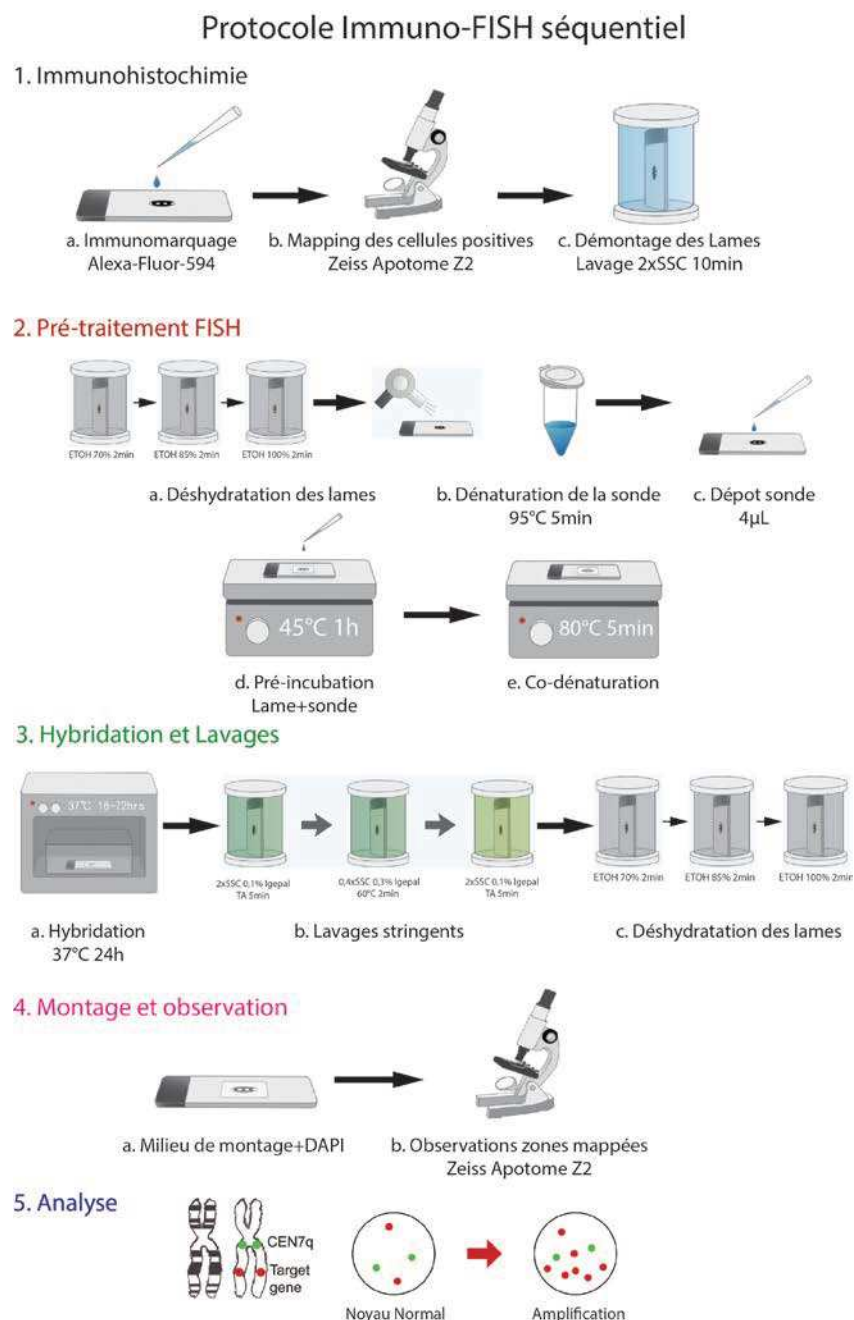


Figure 52–Protocole d'Immuno-FISH séquentiel (illustrations adaptées du protocole de Abnova).

Cultures de cellules souches de glioblastome (GSC)

Les cultures Gb4 et Gb7 isolées et caractérisées par l'équipe ont à nouveau été utilisées et sont entretenues selon un protocole identique, en conditions neurosphères normoxiques et en milieu de prolifération (Guichet et al. 2013). En 2015, nous avons également isolé et caractérisé *in vitro* une nouvelle lignée Gb21, qui a été utilisée pour certaines expériences (Guichet et al. 2016) (**Annexes, Publication 3**). Pour les analyses en immunofluorescence (IF), les GSC sont aussi cultivées en monocouches adhérentes sur support de culture traité à la poly-D-Lysine (25µg/ml) et laminine (2µg/cm²), dans le même milieu de prolifération.

Transfections

Pour les approches mécanistiques en gain/perte de fonction, la transfection transitoire des GSC a été envisagée par un protocole de nucléofection précédemment optimisé et validé au sein de l'équipe. Cette technique associe une méthode chimique impliquant un tampon spécifique, à une électroporation classique. L'ADN plasmidique ou petit ARN interférent est alors introduit directement au niveau du noyau, ce qui permet une expression plus stable et durable du transgène, jusqu'à 6 jours après transfection. Les transfections sont réalisées avec 5 millions de cellules additionnées de 7,5 µg d'ADN total (1,5 µg d'ADN/million de cellules) ; ou 100 pmoles de siRNA (1µM final). Le kit utilisé « Mouse Neural Stem Cells Nucleofector Kit » (Lonza) et le programme A-033 de l'électroporateur (Amaxa Nucleofector II) s'avèrent très efficaces sur des GSC humaines, avec un taux de transfection de 50 à 60% et une viabilité supérieure à 70%.

Plusieurs constructions plasmidiques ont été utilisées. Pour la surexpression transitoire de l'isoforme PP22 de TAL1, la construction murine CMV-TAL1PP22 a été obtenue via collaboration avec D Mathieu et V Deleuze (IGMM, Montpellier). Concernant la surexpression transitoire de SLUG, la construction murine pRc/CMV-SLUG provient de P Savagner (IRCM, Montpellier). Pour l'activation transitoire de Notch1 dans les GSC, le plasmide pCDNA3.1-NICD a été utilisé. Concernant les rapporteurs d'activation des promoteurs de SLUG et α SMA, le plasmide pSLUG-GFP provient à nouveau de P Savagner (IRCM, Montpellier) ; et la construction p α SMA-mCherry a été obtenue via collaboration avec M Kronenberg (University of Connecticut, USA). Les duplex de siRNAs humains ; contrôle négatif, anti-SLUG et anti-TAL1; ont été obtenus commercialement (Ambion, ThermoFisher) et manipulés selon les recommandations du fournisseur.

Transductions lentivirales

Les lentivirus constituent un outil très efficace pour introduire un transgène dans des cellules humaines se divisant ou non, sans tropisme pour un type cellulaire spécifique. La surexpression stable de la forme active NICD s'est à nouveau avérée utile: la construction lentivirale pHIV-NICD-IRES-YFP a été introduite dans les GSC de manière identique à précédemment. Cette transduction s'avère très efficace, avec notamment des taux d'infection avoisinant les 90% et une mortalité faible de l'ordre de 5% (Guichet et al. 2015).

Dans le but de surexprimer de manière stable TAL1 et SLUG, nous avons conçu et fait produire des constructions lentivirales humaines, en choisissant un promoteur fort ubiquitaire EF1A, et en intégrant la fluorescence via la GFP sous le contrôle d'un promoteur CMV indépendant. Ces « constructions doubles » permettent donc une observation directe de l'efficacité de transduction (VectorBuilder, Cyagen, USA). Les particules lentivirales ont été produites par C Lemmers sur la plateforme de vectorologie de Montpellier. Le test préliminaire de ces virus a été effectué en infectant les GSC avec un nombre de particules lentivirales théorique de 10 pour 1 cellule, soit une MOI de 10 (Multiplicity Of Infection).

Lignées Knock-Out CRISPR-Cas9

La protéine Cas9 est une endonucléase impliquée dans la réponse immunitaire adaptative chez la bactérie *Streptococcus Pyogenes*. Grâce à son association avec un ARN guide, cette enzyme reconnaît l'ADN au niveau de séquences palindromiques spécifiques CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*) (Jinek et al. 2012). Cet appariement provoque la coupure double brin de l'ADN qui est ensuite majoritairement réparé par le mécanisme de jonctions d'extrémités non homologues (NHEJ). Cette réparation « de fortune » provoque des erreurs dans la séquence d'ADN génomique (délétions, insertions, mésappariements); et conduit à « l'inactivation » fonctionnelle de la région spécifique ciblée, par apparition d'un codon stop prématuré. Ce mécanisme utilisé naturellement par *S. Pyogenes* contre les bactériophages a été détourné au profit de la biologie moléculaire eucaryote (Ran et al. 2013). Le système CRISPR-Cas9 constitue un outil très prometteur d'édition de l'ADN, avec notamment de multiples variantes permettant des modifications très spécifiques du génôme (Wright, Nunez, and Doudna 2016; Doudna and Charpentier 2014) (**Figure 53**).

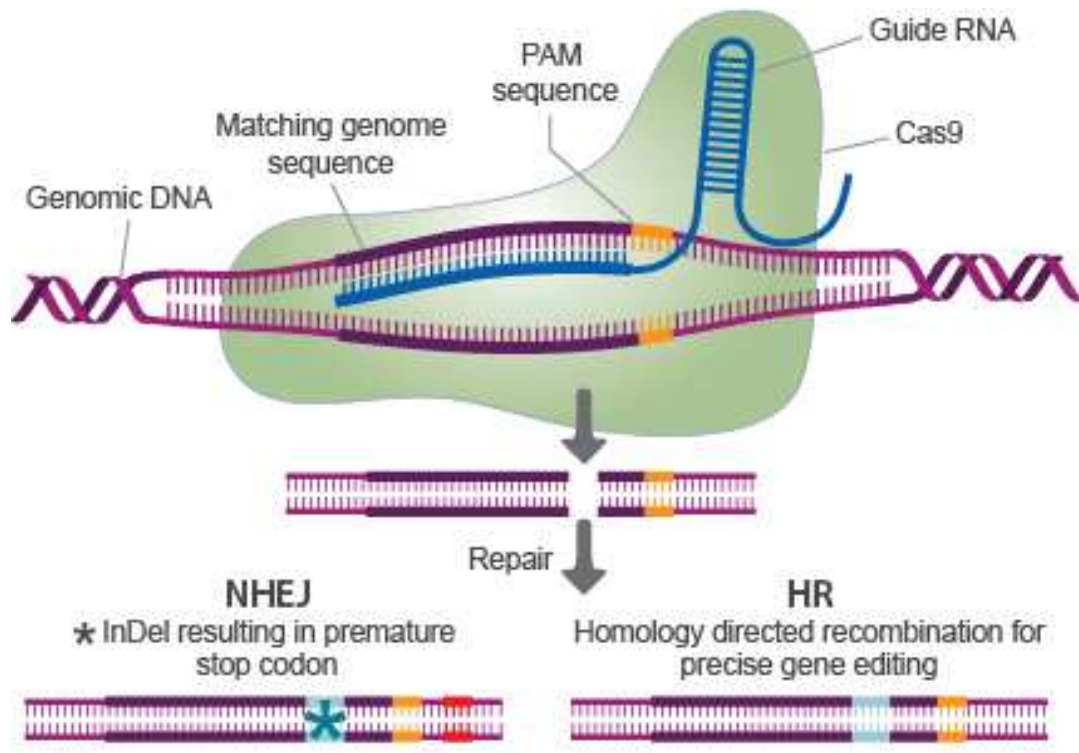


Figure 53 - Le système CRISPR-Cas9 : La complémentarité de l'ARN guide avec la séquence cible induit une cassure double brin de l'ADN par la Cas9 en amont de la séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif). Deux mécanismes de réparation peuvent être induits en conséquence: le NHEJ est majoritaire et conduit à un codon stop prématuré; la recombinaison homologue plus minoritaire permet d'éditer le génôme, si un ADN « donneur » est co-transfecté avec le complexe Cas9-ARNg (d'après (Transomic-Technologies 2015)).

En parallèle de l'approche par siRNA, nous avons souhaité invalider les gènes TAL1 et SLUG dans nos GSC en utilisant le système CRISPR-Cas9 basique effectuant les cassures doubles brins. Pour établir ces lignées *knock-out* (KO), nous avons tout d'abord conçu des ARNs guides double brins en utilisant les algorithmes disponibles en ligne (DNA2.0.com, CRISPR gRNA design tool). Pour le cas particulier de TAL1, l'ARNg a été conçu de telle sorte que toutes les isoformes de la protéine soient affectées; situé précisément au niveau de l'exon 2, juste après le codon initiateur putatif de l'isoforme PP22. Les séquences ont ensuite été synthétisées sous forme d'oligonucléotides simple brins (Sigma Aldrich), annealés en ADNs double brins, et clonés dans le plasmide pUC57attBU6 via digestion par BbsI (ThermoFisher). Ce vecteur a été obtenu en collaboration avec F Lionneton sur la plateforme MGC au CRBM (Montpellier); et optimisé pour une structure optimale de l'ARNg final. Les séquences des guides conçus sont indiquées dans le **Tableau 5**. Ces constructions ont ensuite été co-transfectées avec le plasmide pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene, Référence PX458) dans Gb4 et Gb7. Les cellules sont triées 48h après transfection sur la base de l'expression de la GFP, indicateur de l'expression de l'endonucléase Cas9: une cellule par

puits de plaque 96 est alorsensemencée, afin d'établir des cultures monoclonales. Après 3 semaines de pousse, les sphères monoclonales sont dissociées, entretenues et congelées : au minimum 10 clones par conditions ont été isolés. Pour cribler les clones, les cellules sont testées par IF après infection par NICD ; et leur ADN génomique est extrait pour séquencer la région d'intérêt où la cassure double brin se produit. Les séquences ont été analysées avec le logiciel BioEdit. Les amorces conçues pour l'amplification et séquençage sont présentées dans le **Tableau 6**.

Co-cultures entre cellules souches de glioblastome et cellules endothéliales (HUVECS)

Les cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, Promocell) ont été choisies pour les expériences de co-cultures avec les GSC. Ces cultures primaires issues de veines ombilicales humaines sont cultivées en monocouches sur une matrice de gélatine de porc à 0,2%; dans un milieu spécifique (Endothelial Cell Basal Medium, Promocell) auquel sont rajoutés du sérum de veau fœtal 5%, de l'EGF (5ng/mL), du bFGF (10ng/mL), de l'IGF (20ng/mL), du VEGF (0,5ng/mL), de l'hydrocortisone (0,2µg/mL), de l'acide ascorbique (1µg/mL) et de l'héparine (22,5µg/mL) (Endothelial Cell Growth Supplement, Promocell). Pour la co-culture, les cellules HUVEC sont cultivées du passage 2 au passage 6 en conditions normoxiques (21% O₂, 5% CO₂), à 37°C sous atmosphère humide. Les GSC sont préalablement transduites par les particules lentivirales intégratives pHIV-IRES-YFP (Guichet et al. 2015) afin de les discerner des cellules HUVEC. Par la suite, les GSC infectées sont dissociées etensemencées sur une monocouche de cellules HUVEC confluentes à 80%, puis cultivées en conditions endothéliales classiques. Les contrôles expérimentaux incluent la croissance sur lamelles des GSC-YFP seules, et cellules HUVEC seules en milieu endothélial et support de gélatine. La proportion cellulaire est d'environ 40000 GSC pour 80000 cellules HUVEC par lamelle de plaque 24 puits. Les lamelles sont ensuite fixées 72h après ensemencement des GSC pour les analyses ultérieures en IF.

En ce qui concerne les analyses génomiques, les co-cultures sont effectuées en flasques T75 cm², également en milieu endothélial et sur support de gélatine 0,2%. Préalablement à la co-culture, les GSC sont à nouveau transduites pour exprimer la YFP, et les cellules HUVEC sont incubées avec un composé perméable aux membranes cellulaires; stable sur plusieurs jours de culture ; et fluorescent dans le rouge (Red CMPTX Dye, Life Technologies, 1,5µM final). Après 48h de co-culture, les cellules sont dissociées et les populations YFP⁺ et Red⁺ sont triées en tubes 15mL contenant du milieu endothélial complet (Facs Aria BD, Plateforme MRI). Les contrôles incluent des cultures de GSC-YFP⁺ seules, et des cellules HUVEC-RedCMPTX⁺ seules. A la sortie du tri, les culots cellulaires sont rapidement congelés à -80°C pour extraction ultérieure des ARNs cellulaires totaux.

Analyses génomiques

Les ARNs cellulaires totaux sont extraits à l'aide du kit ReliaPrep RNA Cell Miniprep (Promega) puis rétro-transcrits (superscript II, Life technology). Les PCR quantitatives en temps réel sont effectuées avec 10 ng de cDNA, à l'aide du kit SYBR Fast qPCR (Kapa Biosystems) et un thermocycleur Lightcycler 480 à plaques (Roche). Les expériences sont menées en triplicat pour chaque gène. Le gène de la GAPDH est utilisé comme contrôle interne de référence. Pour les analyses quantitatives, la méthode des $\Delta\Delta C_t$ a été employée et les résultats sont présentés en différences de « N-fois » (fold change) entre la condition expérimentale et la condition contrôle. Les amorces utilisées sont décrites dans le **Tableau4**.

Pour les analyses transcriptomiques, l'intégrité des ARNs totaux extraits est d'abord vérifiée à l'aide d'un bioanalyseur (Agilent). Les puces HumanGene 2.1 ST (Affymetrix) sont hybridées par V. Pantesco (Plateforme Montpellier Genomix (MGX)) selon les recommandations du fournisseur. La normalisation des données RMA (Robust Multi-Array Analysis) est effectuée via le logiciel « Expression Console » d'Affymetrix. Les analyses d'expression génique différentielle sont menées via le logiciel « Transcriptome Analysis Console » (Affymetrix). Des analyses plus approfondies ont aussi été effectuées via le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen), qui permet à partir d'algorithmes puissants d'identifier des effecteurs moléculaires majeurs, des réseaux de signalisations et des processus biologiques différentiellement impliqués entre deux conditions comparées.

Cytométrie

La cytométrie est une technique très sensible qui permet de caractériser rapidement des populations importantes de cellules en suspension. Les cellules sont d'abord entraînées par un flux liquide, puis chaque cellule se retrouve séparée dans une gouttelette. Ces gouttelettes sont excitées par un faisceau laser : la lumière réémise est séparée par des filtres optiques, collectée par un photomultiplicateur et finalement analysée par un ordinateur connecté au cytomètre. Il est donc possible de catégoriser des populations cellulaires en fonctions de paramètres physiques (taille, granularité, fluorescence), tout en éliminant les agrégats et les cellules mortes. Deux types de cytomètres sont disponibles : les trieurs permettent de récupérer en culture une population d'intérêt dans différents supports (tubes, plaques); alors que les analyseurs permettent une étude statistique de l'hétérogénéité d'une population cellulaire. Les tris sont effectués sur le Facs Aria (BD Biosciences) contrôlé par C Duperray et E Lopez (Plateforme de cytométrie, IRMB). Plusieurs analyseurs ont été utilisés selon les besoins expérimentaux, notamment le FacsCalibur (BD Biosciences), le BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences) et le Gallios (Beckman Coulter). L'iodure de propidium (1 $\mu\text{g/ml}$) ainsi que les marqueurs de viabilité cellulaire LIVE/DEAD (Life Technology) ont été utilisés

pour mesurer la mortalité cellulaire, en fonction des paramètres de fluorescence définis par les différentes expériences.

Analyse de la croissance des cellules

Les cultures sontensemencées par tri cellulaire à 30000 cellules par puits contenant du milieu de prolifération complet. Au moment d'effectuer les mesures, les sphères sont directement dissociées dans le puit par ajout de trypsine 2,5% et trituration mécanique. Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'un compteur automatique Z2 cell counter (Beckman Coulter). L'appareil est calibré pour compter des cellules de taille comprise entre 10 et 30 μm .

Immunocytochimie, immunohistochimie et western blot

Les expériences d'immunofluorescence (IF) et western blot (WB) sur cellules et échantillons de GBM ont été effectuées selon les méthodes décrites précédemment (Guichet et al. 2015). Pour les WB, entre 15 et 30 μg de protéines totales ont été déposées pour migration. Les anticorps utilisés et leurs dilutions respectives sont représentés dans le **Tableau 3**.

Co-immunoprécipitation

Pour la co-immunoprécipitation de TAL1, le kit Pierce Co-IP a été utilisé selon les recommandations du fournisseur (Thermofisher). Les protéines sont extraites des GSC/HUVEC dans un tampon spécifique qui maintient les interactions protéines-protéines. Une première étape de « pré-clearing », via incubation avec 2 μg d'IgG Goat puis 30 μl de billes d'agarose protéines A/G, permet de retirer les protéines non spécifiques. Ensuite, les lysats sont incubés 1 nuit à 4°C avec 2 μg d'anticorps anti-Tal1 (sc-12984, Santa Cruz) ; puis précipités dans 30 μl de billes d'agarose protéines A/G. Après différents lavages, les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide pour migration (SDS-PAGE). Les étapes successives du western blot sont identiques à celles évoquées précédemment (Guichet et al. 2015).

Imagerie

Les lames et lamelles sont observées grâce à un microscope optique à épifluorescence (Zeiss AxiolmagerZ2/Apotome). L'acquisition des images est effectuée via le logiciel Zen (Zeiss). Le traitement ultérieur des images est réalisé grâce à ImageJ.

Analyses statistiques

La significativité des phénomènes biologiques observés a été mesurée par le test non paramétrique des rangs Mann-Whitney pour comparer 2 échantillons non appariés. Ce test a l'avantage de pouvoir être utilisé sur des effectifs d'échantillons très petits ce qui est souvent le cas dans le domaine de la biologie. Les quantifications sont représentées par la moyenne des données \pm SEM (erreur standard moyenne). Les tests ont été réalisés avec le logiciel Graphpad Prism.

Anticorps utilisés

Nom	Espèce	Référence	Dilution IF	Dilution WB	Distributeur
TAL1	Goat	Sc-12984	1:200	1:200	Santa Cruz
SLUG	Rabbit	9585	1:400	1:1000	Cell Signaling
α SMA	Mouse	M0851	1:1000	NT	Dako
LMO2	Goat	AF2726	1:100	1:1500	R&D Systems
Ang2	Mouse	MAB0983	1:200	1:1800	R&D Systems
CD31	Mouse	IR610	1:100	NT	Dako
CD34	Rabbit	ab81289	1:250	NT	Abcam
CD44	Mouse	559046	1:500	NT	BD Pharmingen
GATA2	Goat	AF2046	1:200	1:300	R&D Systems
VE-Cadherin	Mouse	14-1449-80	1:100	NT	eBioscience
ICAM-1	Mouse	14-0549	1:100	NT	eBioscience
VCAM-1	Mouse	14-1069	1:100	NT	eBioscience
PDGFR β	Rabbit	3169	1:250	NT	Cell Signaling
GFAP	Rabbit	Z 0334	1:5000	NT	Dako
Olig2	Rabbit	18953	1:500	NT	IBL
Sox2	Goat	sc-17320	1:200	NT	Santa Cruz
Ibal	Rabbit	019-19741	1:200	NT	Wako Chemicals
Id4	Rabbit	BCH9/82-12	1:400	NT	Biocheck
β -Actin	Mouse	A5316	NT	1:5000	Sigma
GAPDH	Rabbit	BLE631401	NT	1:1000	BioLegend

NT : non testé pour les expériences

Tableau 3 – Liste des anticorps utilisés pour les études en IF et western blot.

Amorces utilisées en qPCR

GENE	OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENCE	Taille Produit de PCR (bp)
<i>SLUG</i> (<i>SNAI2</i>)	Sens	5' - CCCATGCCATTGAAGCTGAA - 3'	112
	Anti-sens	5' - TTTCTAGACTGGGCATCGCA - 3'	
<i>TAL1</i>	Sens	5' - TCAATGACCAGGAGGAGGAG - 3'	124
	Anti-sens	5' - ACGTCTTGCCAGGAGGTTCATC - 3'	
<i>ASCL1</i>	Sens	5' - CATCTCCCCAACTACTCCA - 3'	86
	Anti-sens	5' - GGTCGTAAGAGCCCTCGTC - 3'	
<i>Id4</i>	Sens	5' - TGCAGTGCATATGAACGAC - 3'	98
	Anti-sens	5' - GTGCTGCAGGATCTCCACTT - 3'	
<i>CD31</i>	Sens	5' - AGGCCCAATACACTTCACA - 3'	141
	Anti-sens	5' - GGAAGGATAAAACGCGGTCC - 3'	
<i>Ang2</i>	Sens	5' - GCATGTGGTCTTCCAATT - 3'	112
	Anti-sens	5' - CCTTGAGCGAATAGCCTGAG - 3'	
<i>VE-Cadh</i> (<i>CDH5</i>)	Sens	5' - ACCCCACAGGAAAAGAATC - 3'	102
	Anti-sens	5' - ACACACTTTGGGCTGGTAGG - 3'	
<i>MMP9</i>	Sens	5' - CGCTACCACCTCGAACTTTG - 3'	147
	Anti-sens	5' - ATAGGGTACATGAGCGCCTC - 3'	
<i>PDGFRβ</i>	Sens	5' - GGTGACTGCACGAGAAGA - 3'	113
	Anti-sens	5' - CAATGGTGGTTTTGCAGATG - 3'	

Tableau 4 – Liste des amorces utilisées en qPCR.

Séquences des ARN guides

GENE	SEQUENCE	OLIGONUCLEOTIDES Clonage	Score
<i>SLUG</i> (<i>SNAI2</i>)	5' - GUGUCCAGUUCGUGUAGUU - 3'	5' - GTGTCCAGTTCGCTGTAGTT - 3'	100
	3' - CACAGGUCAAGCGACAUCAA - 5'	3' - CACAGGTCAAGCGACATCAA - 5'	
<i>TAL1</i>	5' - UUGCUGAGCUUCUUGUCCGG - 3'	5' - TTGCTGAGCTTCTTGTCCGG - 3'	65,56
	3' - AACGACUCGAAGAACAGGCC - 5'	3' - AACGACTCGAAGAACAGGCC - 5'	

Tableau 5 – Séquences des ARNg conçus pour TAL1 et SLUG grâce à l'outil DNA2.0 : le score chiffre de manière théorique la spécificité de l'ARNg.

Amorces utilisées pour le criblage des clones CRISPR

GENE	OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENCE	Taille Produit de PCR (pb)
<i>SNAI2</i>	Sens	5' - AAACGGGCTCAGTTCGTAAA - 3'	391
	Anti-sens	5' - GCTCCCTTTTCAGGACACTGTT - 3'	
<i>SNAI2</i> <i>séquençage</i>	Sens	5' - GGAGCCGGGTGACTTCAGAG - 3'	
<i>TAL1</i>	Sens	5' - CATA CGGTCCCTGTCTCAA - 3'	688
	Anti-sens	5' - CTCCTCCGTGTAGCTGTCC - 3'	
<i>TAL1</i> <i>séquençage</i>	Sens	5' - GGAGGGAGACAAGCACAGAA - 3'	

Tableau 6 – Liste des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des régions mutées par le système CRISPR-Cas9.

Résultats

1. TAL1 est exprimé *in vitro* et *in vivo* après activation de Notch1 dans les GSC

L'intention d'étudier TAL1 dans la transition neurovasculaire des GSC a été motivée par la forte augmentation de son ARNm dans les GSC « péricyte-like » activées par Notch1. Précisément, nos données transcriptomiques révèlent des « fold change » élevés à la fois pour Gb4 (9,54) et Gb7 (24,53) comparé aux cellules contrôles. La première étape de notre étude a donc été de valider biologiquement l'induction de TAL1, en examinant son expression au niveau protéique. Après 5 jours d'infection par NICD, une première analyse en immunofluorescence (IF) révèle que TAL1 est induit dans les 3 cultures Gb4, Gb7 et Gb21: un marquage strictement nucléaire est observé dans Gb7, alors qu'un marquage nucléaire et périnucléaire est observé dans Gb4 et Gb21 (**Figure 1A**). Après comptages des cellules positives, TAL1 est significativement exprimé dans une sous-population cellulaire plus importante pour Gb7 (30%) que pour Gb4 (10%). Son expression n'est pas observée dans les conditions contrôles (**Figure 1B**). Afin de confirmer nos observations en IF, nous avons ensuite analysé l'expression de TAL1 par western blot (WB), technique plus communément utilisée pour étudier ce facteur de transcription. De façon intéressante, nous observons l'induction préférentielle de l'isoforme courte PP22 (24kDa) dans Gb4 et Gb7, au dépend de la forme complète PP42 (48kDa), qui elle est normalement exprimée dans le contrôle HUVEC. De plus, la forme PP22 est absente des cellules HUVEC, confirmant des observations faites par d'autres (Deleuze et al. 2007). La quantification des bandes confirme une induction plus importante dans Gb7 (18,8 fois) que dans Gb4 (4,5 fois) ; et aucune des deux isoformes n'est détectée dans les cellules contrôles (**Figure 1C**). L'anticorps ici utilisé reconnaît toutes les isoformes décrites (**Méthodologie**) et par conséquent nous l'avons utilisé pour la suite de notre étude en IF et WB (**Figure 1C**).

Afin d'entrevoir la fonction de ce facteur de transcription dans le phénotype « péricyte-like » des GSC, nous avons examiné son expression *in vivo* après xénogreffes de cellules Gb4 Contrôle/NICD. Après injections sous-cutanées chez la souris nude, TAL1 est exprimé *in vivo* dans les xénogreffes NICD, et n'est pas détectée dans les xénogreffes contrôles. Plus précisément, l'analyse microscopique révèle que TAL1 est présent dans les cellules Gb4 humaines discernées par l'expression de la YFP lentivirale (**Figure 1D**). Quelques cellules TAL1⁺ isolées sont observées dans la masse tumorale. La grande majorité des cellules marquées est retrouvée à proximité des structures vasculaires : certaines sont en contact étroit avec des cellules vasculaires murines YFP⁻ (**Figure 1D**).

En résumé, l'ensemble de ces observations démontre que le facteur de transcription TAL1 est induit par l'activation de Notch1 dans une sous-population de GSC *in vitro* et *in vivo*; et qu'il pourrait assurer une fonction importante dans le phénotype vasculaire des GSC.

2. Etude de l'expression des partenaires et cibles connus de TAL1 après NICD

Dans le lignage endothélial, TAL1 agit au sein d'un complexe transcriptionnel spécifique comprenant notamment les facteurs E47 et GATA2, et le co-activateur LMO2. Ce complexe active la transcription des gènes VE-Cadhérine et angiopoïétine 2 (Ang2), et promeut la morphogénèse vasculaire, et le bourgeonnement angiogénique des cellules endothéliales (Deleuze et al. 2012; Deleuze et al. 2007). Lors de notre première étude sur les conséquences de l'activation de Notch1 dans les GSC, nous avons écarté la possibilité d'une transdifférenciation endothéliale sur la base de l'expression de CD31, facteur VIII et vWF, des marqueurs de cellules endothéliales différenciées (**Résultats, Partie I**). Néanmoins, les GSC « péricyte-like » synthétisent et sécrètent des médiateurs importants de l'angiogénèse et favorisent la vascularisation *in vivo* des tumeurs, ce qui n'écarte pas la possibilité de caractères « endothélial-like » également induits par Notch1. De plus, nos données transcriptomiques NICD montrent une induction forte de l'angiopoïétine 2, mais pas de modification de l'expression de la VE-Cadhérine. Afin de mieux comprendre la fonction transcriptionnelle de TAL1 dans ce contexte, nous avons examiné le profil d'expression de ses partenaires GATA2 et LMO2; ainsi que ses cibles VE-Cadhérine et Ang2 dans 3 cultures de GSC induites par Notch1. Après mesures en qPCR, nous observons que GATA2 et VE-Cadhérine sont très faiblement exprimés en conditions basales en comparaison de l'expression seuil dans les cellules HUVEC; et ils sont très faiblement induits par l'activation de Notch1 (**Figure 2A**). Ces observations sont confirmées pour GATA2 en IF et WB où nous ne détectons pas de protéine, sauf dans quelques cellules Gb7 NICD (**Figure 2B, 2C**). Concernant l'Ang2, celle-ci est fortement induite en qPCR après Notch1 dans les 3 cultures, mais à des niveaux inférieurs au seuil d'expression des contrôles HUVEC (**Figure 2A**). Au niveau protéique, elle n'est pas exprimée et un marquage diffus cytoplasmique non spécifique est observé en IF; contrairement aux cellules HUVEC qui présentent un marquage ponctiforme caractéristique du stockage de l'Ang2 dans les corpuscules de Weibel-Palade (**Figure 2B, 2C**). De façon intéressante, LMO2 est fortement induit en ARNm après NICD dans les 3 cultures; à des niveaux comparables et même supérieurs au seuil d'expression des contrôles HUVEC (**Figure 2A**). Ceci est également confirmé en WB et IF: un marquage nucléaire ponctiforme très intense est observé dans les cultures (**Figure 2B, 2C**). Etant donné l'interaction entre TAL1 et LMO2 rapportée dans le contexte endothélial, nous avons ensuite testé cette hypothèse dans Gb7 par une expérience préliminaire de co-

immunoprécipitation par TAL1 puis détection par WB de LMO2 dans des lysats cellulaires contrôle/NICD. Les résultats montrent bien une interaction entre ces deux protéines dans le contrôle positif des HUVECs, et nous observons également une bande au poids moléculaire théorique de LMO2 dans les lysats Gb7 NICD immunoprécipités par TAL1 (**Figure 2D**). Néanmoins, nous n'observons pas une induction contrôle de la PP22 dans les lysats totaux, ni sa présence après immunoprécipitation. Cette expérience étant préliminaire, des contrôles supplémentaires doivent être effectués (**Figure 2D**). Néanmoins, elle suggère que TAL1-PP22 et LMO2 interagissent dans les GSC et pourraient constituer un complexe transcriptionnel régulant l'expression de gènes cibles spécifiques.

En résumé, l'ensemble de ces données montre que le partenaire LMO2 est induit en parallèle de TAL1-PP22 après NICD, et que ces deux facteurs pourraient interagir ensemble au sein d'un complexe pour réguler l'expression de gènes spécifiques autre que l'Ang2 ou VE-Cadhérine, qui ne sont pas modulés en amont par l'expression de NICD.

3. SLUG est exprimé *in vitro* et *in vivo* dans les GSC après activation de Notch1 et est associé à l'expression de α SMA

L'induction de SLUG par Notch1 a déjà été validée dans notre précédente étude et son expression a aussi été montrée réversible après utilisation de constructions lentivirales NICD inductibles à la doxycycline (Guichet et al. 2015) (**Résultats, Partie I**). Néanmoins, il est judicieux d'examiner plus en détail les modalités de son expression dans les GSC, et sa répartition dans différentes sous-populations cellulaires. Après transduction par Notch1, une forte induction de SLUG dans Gb4, Gb7 et Gb21 est observée en IF et WB (**Figure 3A 3C**). Après quantifications, nous remarquons qu'il est présent dans les cultures Gb4 contrôles dans 20% des cellules puis induit dans 60% des cellules Gb4 NICD (**Figure 3B 3C**).

Comme pour TAL1, nous avons analysé l'expression de SLUG *in vivo* après xénotransplantes sous-cutanées de cellules Gb4 Contrôle/NICD. Des cellules SLUG⁺ YFP⁺ bipolaires sont observées dans les tumeurs contrôles (**Figure 3D**); néanmoins SLUG est surtout exprimé après activation de Notch1 dans des cellules YFP⁺ (humaines). Une partie des cellules SLUG⁺ est située à proximité des vaisseaux: certaines interagissent très étroitement avec les cellules vasculaires murines YFP⁻ et présentent une morphologie « péricyte-like » (**Figure 3D**).

Ces résultats confirment l'expression forte de SLUG dans une proportion majoritaire de GSC après activation de Notch1. Les cellules SLUG⁺ ont un phénotype péricytaire « péricyte-like » *in vivo*.

Afin de mieux caractériser les GSC exprimant SLUG, nous avons étudié l'activation de son promoteur conjointement à l'activation du promoteur de α SMA, après induction de Notch1. La protéine α SMA est un marqueur mésenchymateux, pouvant être exprimé par les péricytes ; et son expression est induite dans les GSC suite à l'expression forcée de NICD (**Résultats, Partie I**). Dans la culture Gb4, nous avons co-transfecté les plasmides rapporteurs pSLUG-GFP et p α SMA-mCherry avec soit une construction contrôle, soit une construction NICD. Par imagerie en fluorescence et mesures en cytométrie (FACS), nous observons dans les contrôles des sous-populations GFP⁺ (5,4%), mCherry⁺ (1%), ainsi qu'une faible sous-population GFP⁺/mCherry⁺ (2,1%). Après transfection de NICD, les sous-populations sont globalement augmentées, précisément la population GFP⁺/mCherry⁺ (7 fois). Les cellules GFP⁺ seules sont diminuées, car une partie devient aussi mCherry⁺ (**Figure 3E 3F**). Ces résultats suggèrent que l'activation de SLUG suite à NICD est associée à celle de α SMA dans une sous-population spécifique. SLUG est donc être associé à l'identité « péricyte-like » et pourrait contrôler cette identité en aval de Notch1.

4. Conséquences de la surexpression de SLUG et TAL1 sur le phénotype des GSC natives

Nous avons confirmé l'expression de SLUG et TAL1 dans des sous-populations de GSC après activation de Notch1 : notre analyse *in vivo* montre que chacun de ces facteurs est exprimé dans la population périvasculaire de GSC « péricyte-like » ; et ceci suggère qu'ils puissent chacun être importants à la transition neurovasculaire des GSC et au maintien de ce phénotype. Plusieurs études ont montré que SLUG et TAL1 sont au centre de la spécification vasculaire physiologique, et qu'ils régulent l'expression de gènes communs nécessaires à cette identité. En prémisses de notre étude fonctionnelle, nous avons d'abord examiné la co-expression de SLUG et TAL1 dans les GSC activées par Notch1. Après transfection transitoire de NICD, nous observons en IF des cellules doubles positives TAL1⁺SLUG⁺ (**Figure 4A**) ; l'expression de ces deux facteurs n'est donc pas mutuellement exclusive ; et ils pourraient coordonner un programme commun contrôlant la reprogrammation vasculaire des GSC.

Par une approche mécanistique classique en gain/perte de fonction, nous avons ensuite exploré leur fonction moléculaire précise dans la régulation du phénotype « péricyte-like » des GSC.

Dans un premier temps, nous avons surexprimé séparément SLUG et TAL1 dans des GSC natives sans contrôle en amont de Notch1, puis observé les conséquences de cette expression forcée. Etant donné son induction spécifique après NICD, nous avons surexprimé l'isoforme TAL1-PP22 par transfection transitoire puis validé cette surexpression en WB

(**Figure 4B**). Notre étude antérieure montre que Notch1 induit une très forte diminution de la croissance des cellules en culture (**Résultats, Partie I**). Nous avons donc examiné ce paramètre dans les cellules surexprimant TAL1-PP22 et SLUG ; et une diminution significative de la croissance est observée dans Gb4 et Gb7 (**Figure 4C 4D**). Par ailleurs, cette diminution n'est pas aussi drastique que celle induite par NICD. TAL1 ou SLUG ne sont donc pas suffisants au ralentissement majeur de la croissance des GSC en aval de Notch1, ce qui suggère la participation attendue d'autres effecteurs moléculaires.

Nous avons alors examiné plus en détail l'impact de la surexpression de TAL1 ou SLUG sur le phénotype des GSC. Dans le but d'une surexpression stable et facile à valider, des constructions lentivirales TAL1-PP22 et SLUG couplées à la GFP ont été utilisées. La transduction de ces virus dans Gb4 et Gb7 est validée par la détection de cellules GFP⁺, et nous confirmons la surexpression par IF (**Figure 4E 4F**). Sachant que SLUG et TAL1 peuvent être co-exprimés dans une même sous-population de cellules suite à l'activation de Notch1 (**Figure 4A**), nous avons testé l'impact de la surexpression de SLUG sur l'expression de TAL1-PP22 et inversement : SLUG n'induit pas TAL1-PP22 dans Gb7 ; TAL1-PP22 n'induit pas SLUG dans Gb4 (**Figure 4E 4F**). La forte diminution de la prolifération des GSC après NICD est associée à la baisse du facteur Olig2. Nous avons donc analysé son expression après surexpression de SLUG ou TAL1-PP22 et celle-ci n'est pas modifiée (**Figure 4E 4F**). TAL1-PP22 et SLUG ne sont donc pas suffisants au contrôle du « switch » transcriptionnel sous-jacent à Notch1.

Nous avons effectué une analyse transcriptomique de la surexpression de TAL1-PP22 dans Gb4 pour identifier à grande échelle des gènes potentiellement sous son contrôle. Ces données ne montrent pas des grandes variations d'expression génique. Néanmoins, l'utilisation du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen) a permis de mettre en évidence des réseaux de gènes modulés par TAL1-PP22 (**Figure 5A**). Le réseau le plus affecté est associé à plusieurs processus biologiques incluant le développement cellulaire et tissulaire, et la motilité cellulaire. Au sein de ce réseau, TAL1-PP22 activerait notamment l'expression de l'Intégrine $\alpha 8$, une protéine d'adhérence extracellulaire pouvant être exprimée dans des cellules musculaires lisses (Schnapp et al. 1995) ; la périostine, une protéine sécrétée par les GSC qui favorisent la progression et l'angiogénèse des GBM (Zhou et al. 2015) (Park et al. 2016) ; et l'Interleukine 33, une cytokine impliquée dans l'inflammation, l'angiogénèse, et l'activation des cellules endothéliales (Liew, Girard, and Turnquist 2016) (Stojkovic et al. 2016) (**Figure 5B**).

Cette analyse génomique suggère que TAL1-PP22 confère un caractère mésenchymateux aux GSC, et pourrait contrôler certaines caractéristiques vasculaires des GSC « péricyte-like ». De façon intéressante, TAL1-PP22 inhiberait ID4 (Inhibitor of DNA-

binding protein 4), une protéine qui se dimérise avec différents facteurs de transcription bHLH et inhibe leur action transcriptionnelle (**Figure 5B**). Dans les GBM, la fonction de ID4 est multiple : il promeut la gliomagénèse (Jeon et al. 2008); et favorise l'auto-renouvellement et la vascularisation des GSC au sein des niches périvasculaires, précisément par régulation indirecte de la voie Notch (Jeon et al. 2014; Kuzontkoski et al. 2010). Une analyse préliminaire en IF montre qu'après activation transitoire de Notch1, l'expression de ID4 est diminuée dans une sous-population de cellules. Les cellules TAL1⁺ présentent un marquage ID4 diminué dans leurs noyaux sous forme de « foci » (**Figure 5C**).

Cette inhibition de ID4 par TAL1-PP22 pourrait contrôler la diminution de la croissance observée dans les GSC après surexpression, et plus globalement participer à la diminution de la prolifération cellulaire après activation de la voie Notch1 (**Figure 4C**).

5. Inhibition spécifique de SLUG et TAL1 en aval de Notch1 dans les GSC

De manière complémentaire à l'approche par surexpression des GSC natives, nous avons examiné l'inhibition spécifique de SLUG ou TAL1 en aval de l'activation de Notch1 dans Gb4 et Gb7. Après transfection de siRNAs humains anti-control, anti-SLUG, anti-TAL1 ; et transduction des lentivirus Control/NICD, nous avons validé par WB et IF l'inhibition respective de SLUG et TAL1 (**Figure 6A 6B**).

Par mesures en qPCR, nous avons analysé la modulation de l'expression de gènes cibles candidats ; et l'expression de gènes induits ou inhibés par l'activation de Notch1 (**Résultats, Partie I**). Les résultats ne sont pas homogènes entre les deux cultures pour certains gènes et sont représentatifs d'une seule expérience.

Après inhibition de SLUG dans la condition NICD, nous observons une augmentation de TAL1, Ang2, MMP9 et PDGFR β dans Gb4 et pas dans Gb7. CD31 est augmenté dans les deux cultures (**Figure 6C**). SLUG pourrait agir ici comme un répresseur en aval de Notch1. L'induction de SLUG par NICD inhibe l'expression de CD31, et pourrait ainsi favoriser le phénotype « péricyte-like » par répression d'un phénotype endothélial.

Après inhibition de TAL1 dans la condition NICD, nous observons une augmentation de ID4 seulement dans Gb4. Dans les deux cultures, Ang2 n'est pas modifié; SLUG et la VE-Cadherine sont faiblement diminués ; et MMP9 est diminué d'un facteur 3 (**Figure 6D**). TAL1 pourrait agir ici à la fois comme un inhibiteur et comme un activateur en aval de Notch1. L'induction de TAL1 par NICD inhibe l'expression de ID4 ; et activerait l'expression de MMP9. TAL1 serait donc acteur du « switch » des MMP observé dans notre précédente étude (**Résultats, Partie I**).

Pour induire une inhibition constitutive de SLUG et TAL1 dans les GSC, nous avons mis au point des cultures Gb4 et Gb7 « knock out » (KO) en utilisant le système CRISPR-Cas9. Nous avons conçu et cloné des ARNg ciblant spécifiquement SLUG et toutes les isoformes théoriques de TAL1. Après co-transfection des ARNg avec l'enzyme Cas9 dans Gb4 et Gb7, nous avons dérivé des cultures monoclonales puis isolé au minimum 10 clones par conditions. Par transduction avec le virus NICD, nous avons ensuite criblé par IF l'expression de SLUG et TAL1 dans les cultures. Les résultats montrent une absence totale d'expression de SLUG et TAL1 dans Gb4 NICD (**Figure 6E**). Pour confirmer ces observations, nous avons ensuite criblé les clones par séquençage des régions d'ADN génomiques où la Cas9 effectue la cassure double brin. Les séquences révèlent des délétions pour les KO TAL1 ; et des insertions pour les KO SLUG. Les mutations sont également fidèles à la région théorique de la coupure par la Cas9 (**Figure 6F**). Des clones additionnels sont actuellement en cours de criblage, mais pour l'instant ce système montre une efficacité d'au moins 50% parmi les clones testés. L'utilisation de ces cultures KO est à envisager pour confirmer/infirmier notre étude par siRNA et également dans l'optique d'études *in vivo* après transplantations orthotopiques.

6. Induction du phénotype « péricyte-like » par la co-culture des GSC avec les cellules endothéliales

Cette première étude mécanistique *in vitro* implique SLUG et TAL1 comme régulateurs du phénotype « péricyte-like » des GSC suite à l'activation constitutive de Notch1. Cette expression forcée de NICD n'étant pas physiologique, nous avons voulu replacer ces observations dans le contexte d'une interaction physique avec les cellules endothéliales. En effet, nos données *in vivo* sont en accord avec la littérature qui suggère un rôle fort de Notch dans le dialogue entre cellules endothéliales et GSC au sein de la niche périvasculaire. Afin d'examiner la contribution de TAL1 et SLUG dans ce contexte, nous avons co-cultivé nos GSC natives avec des cellules HUVEC, en adhérence et en conditions de cultures endothéliales. La culture Gb4 a été préalablement transduite avec un lentivirus YFP permettant de la discerner des cellules endothéliales. Par analyse en IF après 72h de co-cultures, nous observons une induction significative de l'expression de SLUG uniquement dans les Gb4 YFP⁺, par rapport aux cultures contrôles exprimant un niveau basal observé précédemment (**Figure 7A 7B**). De manière remarquable, la co-culture n'induit pas l'expression de TAL1 dans Gb4 YFP⁺. Néanmoins, la protéine est détectée dans les HUVECs (**Figure 7A**).

Nous avons ensuite analysé l'expression des facteurs de transcription Olig2 et Sox2, qui sont fortement inhibés suite à l'activation de Notch1. La co-culture induit une diminution

significative de Olig2, et une diminution modérée de SOX2 dans les Gb4 YFP⁺ (**Figure 7C 7D**). Enfin, nous observons l'induction des marqueurs vasculaires α SMA, VCAM1, et ICAM1 dans les Gb4 YFP⁺. De façon intéressante, nous observons aussi l'induction de ICAM1 dans les cellules HUVEC (**Figure 7E**).

Ces données montrent que la co-culture avec les cellules endothéliales favorise un phénotype comparable au phénotype « péricyte-like » dépendant de Notch1, notamment par l'induction de SLUG, la diminution de Olig2, et l'induction de marqueurs vasculaires. SLUG pourrait donc être un facteur déterminant de l'interaction des GSC avec les cellules endothéliales, notamment par sa régulation du phénotype « péricyte-like ». TAL1 n'est pas requis dans les GSC dans ce contexte physiologique.

Afin de comprendre de manière intégrée les régulations moléculaires spécifiques entre GSC et cellules endothéliales, nous avons effectué une analyse transcriptomique de cette co-culture après 48h de contact ; en triant les populations GSC YFP⁺ (Gb4 et Gb7) et les cultures HUVEC rendues fluorescentes par incorporation d'un colorant fluorescent dans le rouge (RedCMPTX). Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience et sont encore préliminaires. Du fait de certaines difficultés techniques concernant les cellules HUVEC, nous n'avons pour l'instant considéré que les conséquences de la co-culture sur les GSC YFP⁺ triées. Après analyse via Ingenuity Pathway Analysis, les signalisations les plus modulées après co-culture concernent notamment la pluripotence des cellules souches, les signalisations TGF β et BMP (**Figure 7F**). L'analyse des données est actuellement en cours mais nous avons sélectionné certains gènes intéressants différemment exprimés dans les cellules co-cultivées (**Tableau 7 p197**). Il ressort notamment de cette étude que la co-culture augmenterait des effecteurs de la signalisation TGF β (SMAD 6/7/9, TGF β 1/ β 2, ID1), des effecteurs de la signalisation BMP (BMPR1A, BMPR2, ID3) et de manière remarquable des effecteurs de la voie Notch (Hey1, Hey2) (**Tableau 7 p197**).

Ces données transcriptomiques confirment aussi certaines de nos observations en IF, à savoir une induction de SLUG (SNAI2) et α SMA dans Gb4 ; et une diminution de Olig2 dans les deux cultures. Nous observons aussi une diminution de Ascl1 dans les deux cultures, diminution également observée suite à l'activation de Notch (**Résultats, Partie I**).

En résumé, la co-culture entre GSC et cellules endothéliales implique des effecteurs des signalisations BMP, TGF β , Notch et nous avons identifié une signature de gènes potentiellement cruciaux au maintien de ces interactions. Ce contact induirait aussi une diminution de la prolifération des GSC. Le contact avec les cellules endothéliales pourrait favoriser un état quiescent des GSC, hypothèse déjà prouvée dans le contexte des cellules souches neurales (Ottone et al. 2014).

7. TAL1 et SLUG sont exprimés dans des cellules vasculaires distinctes *in vivo* chez les patients atteints de GBM

Nous avons montré *in vitro* et *in vivo* après xénogreffes que SLUG et TAL1 sont associés au phénotype vasculaire des GSC et qu'ils régulent l'expression de gènes spécifiques favorisant cet état.

Afin de tester *in vivo* ces hypothèses et d'être pertinent vis-à-vis du contexte pathologique réel des GBM, nous avons examiné directement chez les patients la présence de cellules similaires aux GSC « péricyte-like » induits dans notre système *in vitro*. Nous avons précisément recherché la présence de SLUG et TAL1 dans des zones périvasculaires tumorales, et nous avons caractérisé ces populations de cellules.

Préalablement à notre étude expérimentale, nous avons examiné le profil d'expression de SLUG et TAL1 grâce aux données bioinformatiques disponibles sur les gliomes. A partir des données transcriptomiques REMBRANDT incluant 412 échantillons de gliomes, nous observons que SLUG est en moyenne plus exprimé dans les GBM. L'expression de TAL1 est plus faible à travers les échantillons et est la plus faible dans les GBM (**Figure 8A 8B**). A partir des données transcriptomiques du TCGA classant les GBM en sous-types moléculaires (173 échantillons) (Verhaak et al. 2010), SLUG est plus exprimé dans les GBM mésenchymateux. Ces données confirment aussi la faible expression globale de TAL1 qui semble plus exprimé dans les GBM mésenchymateux et neuraux (**Figure 8C 8D**). Spécifiquement dans le sous-type proneural, une forte expression SLUG est inversement corrélée à la survie des patients de manière significative. Ceci n'est pas observé dans les autres sous-types, notamment le sous-type mésenchymateux (**Figure 8E**). Une forte expression de TAL1 ne corrèle pas à une survie diminuée des patients dans tous les sous-types, y compris les mésenchymateux et proneuraux (**Figure 8F**). Enfin, les données de RNA-seq spécifiques de différents types cellulaires de cerveaux murins sains (Zhang et al. 2014) montrent que TAL1 est majoritairement exprimé dans la composante cellulaire microgliale et endothéliale ; et que SLUG est exprimé faiblement dans les astrocytes, neurones et OPC, et fortement dans les cellules endothéliales (**Figure 8G 8H**). Cette étude a également purifié des péricytes de cerveaux sains, et il n'est donc pas à exclure que SLUG et TAL1 soient aussi exprimés dans ce sous-type cellulaire.

L'expression de SLUG dans les GBM mésenchymateux est à relier à sa fonction que nous avons entrevue dans notre étude *in vitro*. Il pourrait donc au sein des tumeurs réguler un caractère mésenchymateux des cellules tumorales, ou bien être associé significativement à la composante parenchymale qui contribue notamment à la néovascularisation des tumeurs. Selon ces données génomiques, TAL1 n'apparaît pas comme un indicateur pathologique

significatif dans les GBM. Néanmoins, son expression dans la composante endothéliale de cerveaux sains justifie son étude dans les tumeurs, et il pourrait être associé *in vivo* à des cellules vasculaires.

Ces analyses préliminaires ont donc justifié une étude histologique directe de l'expression de SLUG et TAL1 dans des échantillons de GBM. Nous avons considéré au total 13 prélèvements de glioblastomes validés selon les critères de la classification OMS 2007/2016. Le diagnostic anatomopathologique confirme dans la majorité des cas une prolifération microvasculaire avec hyperplasie endothélio-capillaire marquée ; des zones de nécroses palissadiques ; et des profils immunohistochimiques hétérogènes (**Figure 9**).

Une première analyse par simples marquages montre que TAL1 est exprimé dans des cellules disséminées dans la masse tumorale, et également dans des zones vasculaires. Nous observons un marquage majoritairement nucléaire (et parfois périnucléaire) réparti dans une sous-population représentant environ 2 à 8% des cellules totales selon les tumeurs (**Figure 10A 10B**). SLUG est également exprimé, de manière strictement nucléaire et dans des territoires vasculaires. Le marquage est observé dans une sous-population plus importante qui représente environ 2 à 20% des cellules totales selon les tumeurs (**Figure 10C 10D**). Par une analyse globale en WB, nous avons examiné la répartition de SLUG dans différents échantillons de gliomes classés selon le grade et la composante cellulaire majoritaire après diagnostic. Nous observons une expression variable de SLUG dans tous les GBM considérés, et peu d'expression dans des gliomes de diagnostic différents et de grades inférieurs (**Figure 10E**).

Nos données *in vitro* montrent que SLUG et TAL1 peuvent être co-exprimés dans les GSC après activation de Notch1, et qu'ils favoriseraient leur état « péricyte-like ». Dans l'optique d'examiner la présence de telles cellules chez les patients, nous avons effectué des co-marquages SLUG/TAL1 sur les coupes histologiques. Après analyse et quantifications des IF sur 6 GBM, nous concluons que SLUG et TAL1 définissent deux sous-populations distinctes pouvant néanmoins interagir par des contacts très étroits (**Figure 11A 11B**).

Après une caractérisation approfondie de ces deux populations, les cellules SLUG⁺ n'expriment pas les marqueurs neuraux Sox2 et GFAP, ni le marqueur tumoral putatif CD44. Les cellules TAL1⁺ n'expriment pas Olig2, et une sous-population exprime Iba1, un marqueur validé des macrophages et de la microglie (**Figure 12**).

Enfin, nous avons analysé la co-expression de SLUG ou TAL1 avec des marqueurs vasculaires endothéliaux et péricyaires. SLUG est exprimé dans des cellules α SMA⁺ et PDGFR β ⁺. Les cellules SLUG⁺ sont majoritairement CD31⁻, mais il est difficile de conclure pour certaines cellules situées extrêmement proches des vaisseaux. Enfin, SLUG n'est pas

co-exprimé avec le facteur de transcription endothélial LMO2, qui marque des cellules vasculaires mais aussi des cellules tumorales comme démontré récemment par Kim et collègues (Kim et al. 2015) (**Figure 13A**). Concernant TAL1, il est retrouvé dans des cellules CD31⁺, CD34⁺ et VE-Cadhérine⁺. Les cellules TAL1⁺ sont majoritairement PDGFR β . Néanmoins, nous observons quelques cellules isolées positives, et certaines cellules étant extrêmement proches des vaisseaux, il est à nouveau difficile de conclure sur leur statut (**Figure 13B**).

Cette caractérisation histologique nous permet de conclure que dans les GBM, SLUG est exprimé dans des cellules périvasculaires au phénotype comparable à celui induit *in vitro* dans les GSC. Nous mettons aussi en évidence la présence de TAL1, exprimé dans une sous-population distincte, au phénotype hématopoïétique et vasculaire endothélial.

8. SLUG est exprimé dans une minorité de cellules présentant une amplification du locus EGFR

Nous avons identifié SLUG dans des cellules périvasculaires « péricyte-like » directement chez les patients. Pour savoir si ces cellules résultent d'une éventuelle transdifférenciation neurovasculaire des GSC *in vivo*, nous avons analysé le statut EGFR des cellules SLUG⁺ par hybridation *in situ* sur les cryosections de GBM. Cette approche de FISH combiné à l'immunomarquage (IF-FISH) a précédemment été utilisée dans les premières études publiées sur la transdifférenciation vasculaire des GSC (Cheng et al. 2013; Ricci-Vitiani et al. 2010). Suite à des difficultés de mises au point pour combiner les deux techniques, nous avons opté pour une stratégie séquentielle. Nous avons tout d'abord analysé le statut d'amplification EGFR simple dans 4 GBM. L'observation du signal en FISH montre une amplification plus ou moins importante et hétérogène selon les tumeurs. Gli23 est la tumeur la plus amplifiée (50% des cellules environ). Les autres tumeurs présentent en moyenne 20% d'amplification (**Figure 14A 14B**). Nous avons ensuite examiné ces mêmes tumeurs après immunomarquage de SLUG, puis quantifié la proportion de cellules SLUG⁺ amplifiées sur la base de 3 copies EGFR ou plus (points rouges). Selon la clarté du signal EGFR, qui n'a parfois pas été détecté à cause de l'immunomarquage Alexa594, nous avons aussi considéré comme amplifiées des cellules SLUG⁺ présentant 3 copies du chromosome 7 entier (points verts). Dans Gli21 et Gli24, nous observons en majorité des cellules SLUG⁺ non amplifiées (**Figure 14C**), et quelques cellules SLUG⁺ ayant 3 copies du chromosome 7 (**Figure 14D**). Dans Gli23 et Gli26, les cellules SLUG⁺ non amplifiées sont également majoritaires (**Figure 14D 14F**) ; mais nous identifions de manière fiable une minorité de cellules SLUG⁺ amplifiées ayant 3 copies EGFR (**Figure 14D 14E**).

Ces résultats montrent que SLUG est exprimé dans une sous-population très minoritaire de cellules tumorales considérées anormales par l'amplification du locus EGFR. SLUG peut donc être associé *in vivo* à des cellules périvasculaires d'origine tumorale, résultant potentiellement d'une transdifférenciation neurovasculaire. La majorité des cellules SLUG⁺ n'est pas amplifiée pour EGFR, ce qui suggère que SLUG favorise majoritairement la vascularisation tumorale par son expression dans des cellules parenchymales. Ces résultats nécessitent l'analyse d'un nombre plus important de cellules et de tumeurs. Une analyse semblable est également en cours pour analyser le statut EGFR des cellules TAL1⁺.

Légendes des figures

Figure 1 : TAL1 est exprimé dans les GSC après l'activation de Notch1

(A) Expression de TAL1 en IF dans les cultures Gb4, Gb7 et Gb21, 5 jours après transduction lentivirale par NICD. Les cellules HUVEC sont utilisés comme contrôle positif de l'expression de TAL1. Les flèches indiquent des cellules positives. Echelle 20µm. (B) Quantification des populations de cellules TAL1⁺ en IF après infection par NICD dans Gb4 et Gb7. Données représentatives de 2 expériences indépendantes, quantifications effectuées sur n=3 lamelles (300 cellules comptées). Les étoiles indiquent la significativité en test de rang Mann-Whitney : ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p \leq 0,05$. (C) Expression de TAL1 dans Gb4 et Gb7 NICD détectée en western blot. L'isoforme PP22 est préférentiellement induite (24kDa): une bande en doublet est observée, représentative de l'état de phosphorylation ou non de TAL1-PP22 (Bernard et al. 1992). Les cellules HUVEC sont utilisées comme contrôle positif de l'expression de TAL1-PP42 et comme contrôle négatif de l'expression de TAL1-PP22. Les quantifications de l'induction de TAL1-PP22 ont été rapportées au contrôle de charge β -Actin. (D) Expression de TAL1 *in vivo* après xénogreffes sous-cutanées de Gb4 infectée par Contrôle/NICD. Les cellules TAL1⁺ sont d'origine humaine (YFP⁺) et sont situées à proximité des vaisseaux normalisés par l'effet de Notch1. Les étoiles indiquent les zones agrandies dans le coin supérieur gauche de chaque photo. Les flèches indiquent la positivité de cellules spécifiques. Echelles 20µm.

Figure 2 : Expression des partenaires et cibles de TAL1 dans les GSC activées par NICD

(A,B,C) Expression des partenaires LMO2, GATA2 et des cibles Ang2 et VE-Cadhérine dans Gb4, Gb7 et Gb21 transduites par Contrôle/NICD (à 5 jours). Les cellules HUVEC sont utilisées comme contrôle positif. (A) Quantification en qPCR dans Gb4, Gb7 et Gb21. Ces données confirment une très forte induction de TAL1 en ARNm, à des niveaux comparables aux cellules HUVEC. Les amorces utilisées ont précédemment été validées (Deleuze et al. 2012; Deleuze et al. 2007). La quantification est effectuée par une méthode absolue et rapportée à l'expression de la GAPDH (collaboration D. Mathieu, V. Deleuze, IGMM). (B) Expression en IF de LMO2, GATA2 et Ang2 dans Gb4 et Gb7. Les flèches indiquent des cellules positives. Echelles 20µm. (C) Expression en WB de LMO2, GATA2 et Ang2 dans Gb4 et Gb7. Les quantifications de l'induction de LMO2 ont été rapportées au contrôle de charge GAPDH. (D) Co-immunoprécipitation par TAL1 de lysats totaux Gb7 Contrôle/NICD (n=1). Les cellules HUVEC sont utilisées comme contrôle positif. Le contrôle d'expression sur lysats totaux est représenté par la partie gauche, LMO2 est bien exprimé après NICD (panel en haut) mais TAL1-PP22 n'est pas détectée (panel en bas). Le panel en haut à droite représente

la Co-IP par TAL1, LMO2 est exprimé dans les cellules HUVEC et Gb7. Les bandes de poids moléculaires supérieurs représentent l'immunoréactivité de l'anticorps LMO2 (chèvre) avec les chaînes légères d'IgG de l'anticorps TAL1 utilisé pour la co-immunoprécipitation. Le panel en bas à droite représente le contrôle d'expression de TAL1 après co-immunoprécipitation par TAL1, celle-ci est bien exprimée dans les cellules HUVEC (TAL1-PP42), mais l'isoforme PP22 n'est pas détectée dans Gb7 NICD. **Co-IP** : Co-immunoprécipitation ; **Whole Cell Lysate** : lysats cellulaires totaux ; **IB** : Immuno-blot.

Figure 3 : SLUG est exprimé dans les GSC après l'activation de Notch1

(A) Expression nucléaire de SLUG en IF dans les cultures Gb4 et Gb21, 5 jours après transduction lentivirale par NICD. Les flèches indiquent des cellules positives. Echelles 20 μ m. **(B)** Quantification des populations de cellules SLUG⁺ en IF après infection par NICD dans Gb4. Données représentatives de 2 expériences indépendantes, quantifications effectuées sur n=3 lamelles (300 cellules comptées). Les étoiles indiquent la significativité en test de rang Mann-Whitney : ***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p \leq 0,05. **(C)** Expression de SLUG dans Gb4 et Gb7 NICD en western blot. Les quantifications de l'induction de SLUG ont été rapportées au contrôle de charge β -Actin. **(D)** Expression de SLUG *in vivo* après xéno greffes sous-cutanées de Gb4 infectée par Contrôle/NICD. Les cellules SLUG⁺ sont majoritairement d'origine humaine (YFP⁺) et sont situées à proximité des vaisseaux normalisés par l'effet de Notch1. Les étoiles indiquent les zones agrandies dans le coin supérieur gauche de chaque photo. Les flèches indiquent la positivité de cellules spécifiques. Echelles 20 μ m. **(E,F)** Notch1 augmente la sous-population de cellules SLUG⁺/ α SMA⁺. **(E)** Photos en contraste de phase de Gb4 co-transfectée par les plasmides pCDNA3.1Contrôle/NICD, et les rapporteurs fluorescents des promoteurs de SLUG (pSLUG-GFP) et α -SMA (p α SMA-mCherry). **(F)** Quantification en FACS des sous-populations pSLUG-GFP⁺ et p α SMA-mCherry⁺ après transfection transitoire de Contrôle/NICD. Des sous-populations distinctes pSLUG-GFP⁺ et p α SMA-mCherry⁺ sont minoritairement représentées à l'état basal, l'activation de NICD augmente la proportion de cellules doubles positives. Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes et ont aussi été effectuées sur Gb7.

Figure 4 : Conséquences de la surexpression de SLUG et TAL1 dans les GSC natives

(A) Co-marquages en IF de SLUG et TAL1 après transfection transitoire des plasmides pCDNA3.1-Contrôle/NICD dans Gb4. Les cellules SLUG⁺ sont majoritaires, et certaines cellules TAL1⁺ expriment SLUG. Les flèches indiquent les cellules doubles positives ou simplement marquées. Echelles 20 μ m. **(B)** Contrôle de la surexpression de l'isoforme TAL1-PP22 dans Gb4. **(C)(D)** Conséquences de la surexpression transitoire de TAL1-PP22 **(C)** et SLUG **(D)** sur la croissance de Gb4 et Gb7. Les cellules ont été co-transfectées avec un

plasmide pCMV-GFP, puis triées sur la base de la GFP 48h après transfection en plaques 24 puits. Les mesures au compteur de cellules ont été effectuées 3 jours après l'ensemencement au trieur. Les données sont indiquées en % par rapport à la condition contrôle (plasmide luciférase) ; et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Les étoiles indiquent la significativité en test de rang Mann-Whitney : ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p \leq 0,05$. **(E)(F)** Surexpression de SLUG et TAL1-PP22 au moyen de constructions lentivirales GFP transduites avec une MOI de 10. L'expression de la GFP est un contrôle de l'infection. Echelles 20 μ m. **(E)** Phénotypage en IF des cellules Gb4 surexprimant TAL1-PP22. **(F)** Phénotypage en IF des cellules Gb7 surexprimant SLUG.

Figure 5 : Analyse des données transcriptomiques de la surexpression de TAL1-PP22 dans Gb4

(A) Représentation graphique du réseau de gènes les plus différenciellement exprimés après surexpression de TAL1-PP22 dans Gb4. L'analyse bioinformatique des données transcriptomiques est effectuée via le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen). Les effecteurs moléculaires en rouge ont une expression génique augmentée alors que les effecteurs en vert ont une expression génique diminuée. Le « fold change » seuil choisi pour l'analyse IPA est de 1,5. **(B)** Tableau de gènes candidats interagissant ensemble dans ce réseau. Les « fold change » associés sont indiqués en rouge ou vert selon leur augmentation ou diminution. Les grandes fonctions documentées dans la littérature sont également indiquées. **(C)** Analyse en IF de la co-expression de TAL1 et Id4 dans Gb4, après transfection transitoire par les constructions pCDNA3.1-Contrôle/NICD. L'expression de Id4 diminue après activation de Notch1. Certaines cellules exprimant TAL1 montrent un marquage Id4 diminué et localisé en « foci » dans le noyau, en comparaison d'autres cellules conservant un marquage fort et n'exprimant pas TAL1 (voir flèches). Echelles 20 μ m.

Figure 6 : Inhibition sélective de SLUG et TAL1 en aval de l'activation par Notch1 dans les GSC

(A) Analyse en WB de l'inhibition de SLUG et TAL1 par siRNA après transduction par Contrôle/NICD dans Gb4. Les cellules ont été transfectées par 1 μ M (ou 100 pmoles) de siRNA Control et TAL1/ou SLUG, puis directement infectées par les lentivirus Contrôle/NICD. Les protéines sont extraites 72h après transfection et transduction. Le panel du haut représente l'inhibition de TAL1, celui du bas l'inhibition de SLUG. Les quantifications ont été rapportées au contrôle β -Actin. TAL1-PP22 est inhibée à 100% dans la condition NICD, SLUG est inhibé à 70% dans la condition NICD et n'est plus détecté dans la condition contrôle. **(B)** Analyse en IF de l'inhibition de SLUG et TAL1 après infection par NICD dans Gb4. Echelles 20 μ m. **(C)(D)** Analyses en qPCR de l'expression de gènes candidats après inhibition sélective de SLUG **(C)** et TAL1 **(D)** dans Gb4 et Gb7 infectés par NICD. Les

résultats sont présentés en « fold change » normalisés par rapport à la condition siControl/NICD. Ces données sont représentatives d'une expérience. **(E)** Criblage par IF des clones « knock-out » CRISPR TAL1 ou SLUG dans Gb4. Des cultures Gb4 sauvages (Wild Type) ont été utilisées comme contrôles positifs de l'induction de TAL1 et SLUG après NICD. Echelles 20µm. Les clones testés n'expriment plus TAL1 ou SLUG après infection. **(F)** Criblage des clones Gb4/Gb7 CRISPR TAL1 ou SLUG par alignement de séquence des régions géniques où la Cas9 effectue la coupure double brin. L'ADN de cellules Gb4 et Gb7 sauvages a été séquencé comme contrôle. L'appariement du complexe Cas9-ARNg se situe au niveau du motif PAM et de la séquence complémentaire aux ARNs guides conçus. Une fois cette séquence reconnue, la Cas9 induit la coupure double brin 3 à 4 nucléotides en aval de la séquence PAM (les guides conçus ici sont anti-sens). Les flèches rouges indiquent les erreurs de séquences pour les différents clones : ces insertions (clones KO-SLUG) ou délétions (clones KO-TAL1) sont toutes situées de manière correcte par rapport au motif PAM.

Figure 7 : Modulation physiologique du phénotype des GSC par la co-culture en adhérence avec les cellules HUVEC

(A)(B)(C)(D)(E) Analyses en IF des modifications phénotypiques de Gb4 après 72h de co-culture avec les cellules HUVEC en adhérence et en milieu de culture endothélial. Les cultures Gb4 ont été transduites au préalable par un virus YFP permettant de les discerner des cellules HUVEC. Les conditions contrôles représentent Gb4 YFP cultivée seule en milieu de culture endothélial. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes dans Gb4 et ont été observées dans Gb7. **(A)** Analyse de l'expression de TAL1 et SLUG. **(B)** Quantification des cellules SLUG⁺ après co-culture. **(C)** Analyse de l'expression de Olig2 et Sox2. **(D)** Quantification des cellules Olig2⁺ après co-culture dans Gb4 et Gb7 (n=3 lamelles, 300 cellules comptées). Les étoiles indiquent la significativité en test de rang Mann-Whitney : ***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p ≤ 0,05. **(E)** Analyse de l'expression des marqueurs vasculaires αSMA, VCAM1 et ICAM1. Echelles 20µm. **(F)** Analyse Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) des données transcriptomiques de la co-culture de Gb4 et Gb7 avec les cellules HUVEC. Ce tableau représente les signalisations canoniques les plus augmentées dans les GSC co-cultivées. Une valeur p est attribuée selon les algorithmes de calcul du logiciel. Le nombre de gènes impliqués théoriquement dans ces réseaux et différentiellement exprimés dans nos conditions est indiqué dans la colonne « overlap ». Le **Tableau 7** ci-dessous indique une liste préliminaire de gènes candidats intéressants et leur variation d'expression dans les GSC co-cultivées. Les gènes sont classés selon un « fold change » décroissant dans Gb4. Les gènes surexprimés sont en rouge, les gènes sous-exprimés en vert.

Gènes candidats différentiellement exprimés dans les GSC co-cultivées avec les cellules HUVEC par rapport aux GSC seules

Gène	Fold Change Gb4 co-cultivé/Gb4 contrôle	Fold Change Gb7 co-cultivé/Gb7 contrôle
SMAD9	5,19	3,46
ID1	3,83	2,40
Hey1	3,59	4,62
SMAD7	3,05	3,66
SMAD6	2,64	3,31
GFAP	2,53	4,27
ID3	2,46	2,23
SNAI1	2,33	4,56
BMPR2	1,84	2,29
FBN1	1,84	1,73
Hey2	1,82	3,34
BMPR1A	1,68	2,53
Hes1	1,60	1,36
TGFBI	1,57	1,53
α SMA	1,43	0,88
TGFB2	1,27	1,39
Hes5	1,18	1,09
VCAM1	1,07	0,96
NOTCH1	1,06	0,92
NOTCH3	0,98	0,90
SOX2	0,86	1,17
ASCL1	0,86	0,49
OLIG2	0,54	0,60

Tableau 7 – Liste de gènes candidats différentiellement exprimés dans les GSC co-cultivées avec les HUVECS.

Figure 8 : Analyse bioinformatique de l'expression de SLUG et TAL1 à partir de bases de données disponibles sur les gliomes.

(A)(B) Analyse du profil d'expression génique de SLUG (SNAI2) et TAL1 dans différents sous-types de gliomes et dans du tissu sain. Les diagrammes en boîte à moustaches ont été tracés à partir des données transcriptomiques de la base de données REMBRANDT (en valeurs \log_2), qui inclut ici 412 échantillons totaux classés selon la composante histologique majoritaire des tumeurs. Les moustaches ont été tracées selon la méthode de Tukey. Les données incluent : 21 échantillons normaux, 55 oligodendrogliomes, 122 astrocytomes et

214 GBM. **(C)(D)** Analyse du profil d'expression génique de SLUG (SNAI2) et TAL1 dans les différents sous-types de GBM selon la classification moléculaire de Verhaak. Les données transcriptomiques de 173 échantillons de GBM ont été combinées entre les différentes plateformes de puces utilisées pour l'étude du TCGA. La valeur d'expression est normalisée par différents algorithmes et est représentative de la combinaison des valeurs obtenues par les plateformes Agilent, Exon et U133 (Factor Analysis) (Verhaak et al. 2010). Les diagrammes sont tracés de la même manière que pour (A)(B). Les données incluent : 38 GBM classiques, 56 GBM mésenchymateux, 26 GBM neuraux, 53 GBM proneuraux. **(E)(F)** Analyse de la probabilité de survie selon une expression faible ou forte de SLUG(SNAI2)**(E)** ou TAL1**(F)** en représentation de Kaplan-Meier ; dans les sous-types mésenchymateux et proneuraux. Les données transcriptomiques du TCGA ont été corrélées aux données cliniques de survie disponibles pour les patients. L'expression faible ou forte de SLUG et TAL1 a été déterminée en fonction de la valeur moyenne de leur expression dans chaque sous-type. La différence statistique entre les courbes a été calculée par le test de Mantel-Cox (test log-rank) et la valeur p est indiquée en cas de significativité. **(G)(H)** Expression génique de SLUG (SNAI2) et TAL1 dans différents types cellulaires purifiés à partir de cerveaux de souris. Ces données sont issues de l'étude transcriptomique en RNA-seq de Zhang et collègues (Zhang et al. 2014). Les valeurs d'expression sont représentées en unités normalisées FPKM (Fragment Per Kilobase of transcript per Million mapped reads).

Figure 9 : Diagnostic anatomopathologique des échantillons de GBM considérés pour l'étude

Tableau récapitulatif du diagnostic anatomopathologique effectué sur les prélèvements de GBM utilisés pour notre étude (V. Rigau et F. Lorcyc, CHU Gui de Chauliac). Certains prélèvements ont été réceptionnés antérieurement à la nouvelle classification des gliomes de l'OMS de 2016, et n'ont donc pas de précisions concernant le statut IDH1 WT ou muté. La validation des principaux critères histo-pathologiques a permis le diagnostic de GBM grade IV (attente précision diagnostic Gli29). Ces prélèvements ont par la suite été utilisés pour des analyses en IF et WB.

Figure 10 : Expression biologique de SLUG et TAL1 dans les échantillons de GBM

(A) Expression de TAL1 dans Gli8 et Gli9 : les cellules positives présentent en majorité un marquage nucléaire mais certaines cellules montrent une expression périnucléaire ; elles sont retrouvées à la fois disséminées dans la masse tumorale et au sein de territoires vasculaires. Echelles 20µm. **(B)** Quantification de la proportion des cellules TAL1⁺ en IF dans 8 prélèvements de GBM. Les comptages sont effectués sur un total d'au moins 500 cellules et sur plusieurs coupes du même prélèvement. **(C)** Expression nucléaire de SLUG dans Gli8

et Gli9. Les cellules positives sont retrouvées au niveau de territoires vasculaires présentant une conformation de type glomérulaire (Gli9). Echelles 20µm. **(D)** Quantification de la proportion des cellules SLUG⁺ en IF dans les 8 mêmes prélèvements de GBM. La même méthode de comptage a été employée. **(E)** Expression de SLUG détectée en WB à partir d'extraits protéiques de GBM totaux, ainsi que de gliomes de grades inférieurs (grade II et III). Les blots sont regroupés du grade le plus élevé au plus faible. GBMO : GBM à composante oligodendrogliale ; LG : Low grade ; OA : oligoastrocytome ; OL : oligodendrogliome. Des extraits de cortex humain ont été utilisés comme contrôle négatif de l'expression de SLUG. Contrôle de charge β -Actin.

Figure 11 : Analyse de l'expression combinée de SLUG et TAL1 dans les GBM

(A) Co-marquages en IF de SLUG et TAL1 dans Gli21, Gli24 et Gli26. Les cellules SLUG⁺ et TAL1⁺ représentent deux populations distinctes de cellules pouvant être en contact étroit. Les étoiles indiquent les zones agrandies dans le coin supérieur droit de chaque photo. Les flèches indiquent la positivité de cellules spécifiques. Echelles 20µm. **(B)** Représentation en diagramme de Venn des populations SLUG⁺ et TAL1⁺ comptées dans 6 tumeurs (Gli8, Gli21, Gli23, Gli24, Gli26 et Gli30). Chaque carré représente le nombre total de cellules comptées au sein de chaque prélèvement, les cercles rouges et vert représentent respectivement les populations TAL1⁺ et SLUG⁺ comptées.

Figure 12 : SLUG et TAL1 ne sont pas exprimés dans des cellules neurales au sein des tumeurs

Analyse de la co-expression de SLUG, ou TAL1 avec des marqueurs du lignage neural dans Gli24. Les 3 panels du haut représentent le co-marquage de SLUG avec Sox2, CD44 et GFAP ; les 2 panels du bas représentent le co-marquage de TAL1 avec Olig2 et Iba1. Les étoiles indiquent les zones agrandies dans le coin supérieur droit de chaque photo. Les flèches indiquent la positivité de cellules spécifiques. Echelles 20µm.

Figure 13 : SLUG et TAL1 sont exprimés dans des cellules vasculaires

(A) Analyse de la co-expression de SLUG avec les marqueurs du lignage vasculaire α SMA, PDGFR β , CD31 et LMO2 dans Gli18 et Gli24. **(B)** Analyse de la co-expression de TAL1 avec les marqueurs vasculaires CD31, CD34, PDGFR β , et VE-Cadhérine, dans Gli24. Les étoiles indiquent les zones agrandies dans le coin supérieur gauche ou droit de chaque photo. Les flèches indiquent la positivité de cellules spécifiques. Echelles 20µm.

Figure 14 : Immuno-FISH séquentiel sur les échantillons de GBM

(A) Analyse simple en FISH du statut EGFR amplifié dans 4 prélèvements de GBM (Gli21, Gli23, Gli24 et Gli26). Les photos ont été travaillées à partir d'images acquises au

grossissement 63x puis agrandies sur des noyaux isolés pour une représentation plus claire. Les flèches indiquent les cellules amplifiées, et si possible dans le même champ une cellule normale. DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole ; CEN7 : sonde centromérique contrôle du chromosome 7 ; EGFR : sonde locus spécifique de la région EGFR du chromosome 7. Echelles 5µm **(B)** Quantification de l'amplification EGFR dans ces 4 tumeurs. Pour l'analyse, au moins 200 cellules totales ont été comptées sur plusieurs coupes pour chaque prélèvement : le statut amplifié ou non est déterminé par le rapport entre le nombre de points rouges et le nombre de points verts nucléaires. Seules des cellules montrant un signal clair rouge et vert ont été considérées pour la quantification : une cellule est ici considérée amplifiée si elle présente au minimum 3 copies rouges dans son noyau. Des cellules présentant 3 copies vertes ont aussi été considérées comme amplifiées si le signal rouge n'était pas clairement détectable. **(C)(E)(F)** Immuno-FISH séquentiel SLUG/EGFR sur ces 4 prélèvements. Chaque panel de droite représente l'immuno-marquage de SLUG (alexafluor-594); chaque panel à gauche représente l'analyse FISH CEN7/EGFR sur la même cellule, après « mapping » de sa position précise. Les flèches indiquent le nombre de copies EGFR dans les noyaux. Echelles 5µm. **(D)** Tableau de quantification de l'amplification EGFR des cellules SLUG⁺ dans les 4 tumeurs.

Figure 1

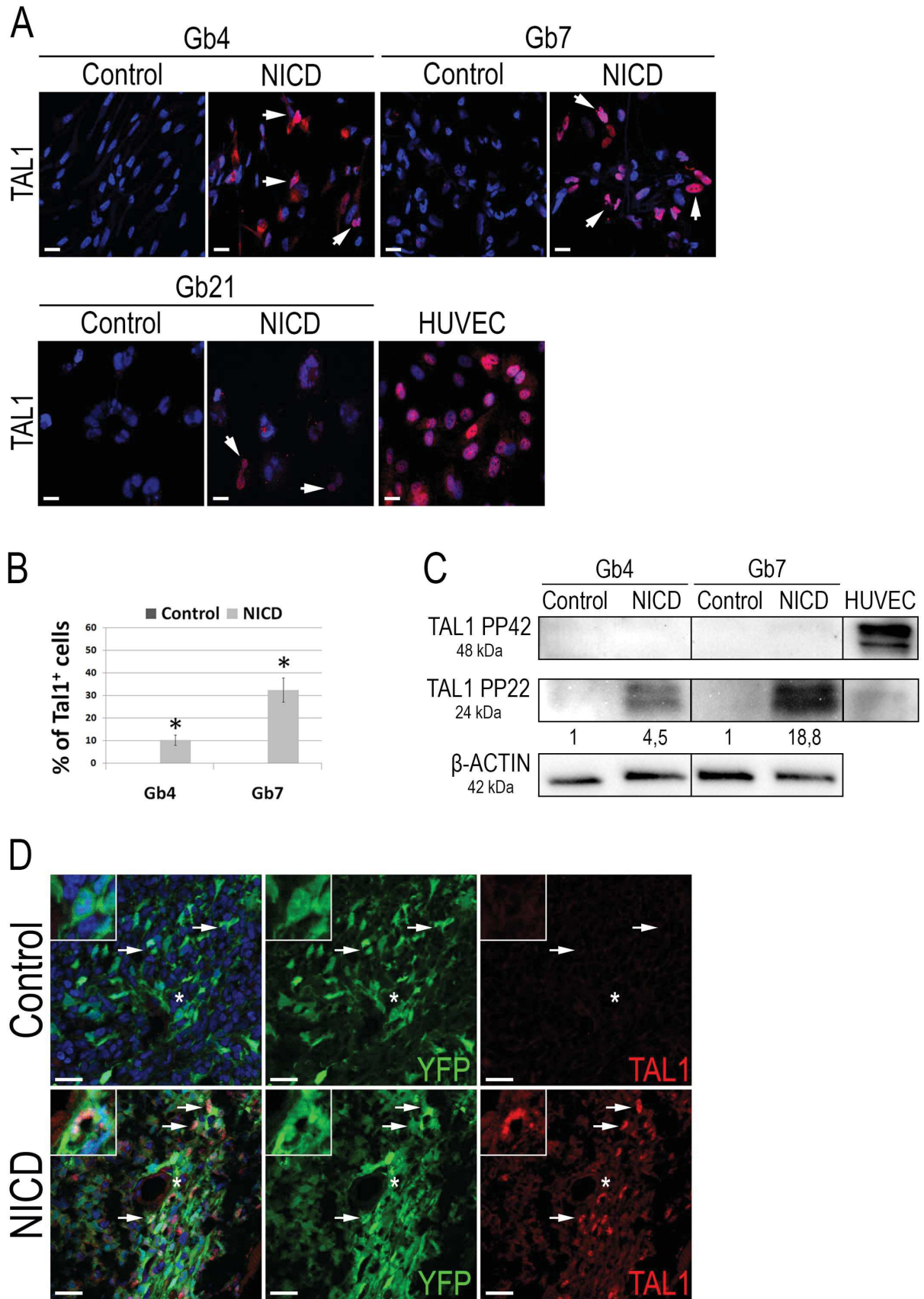
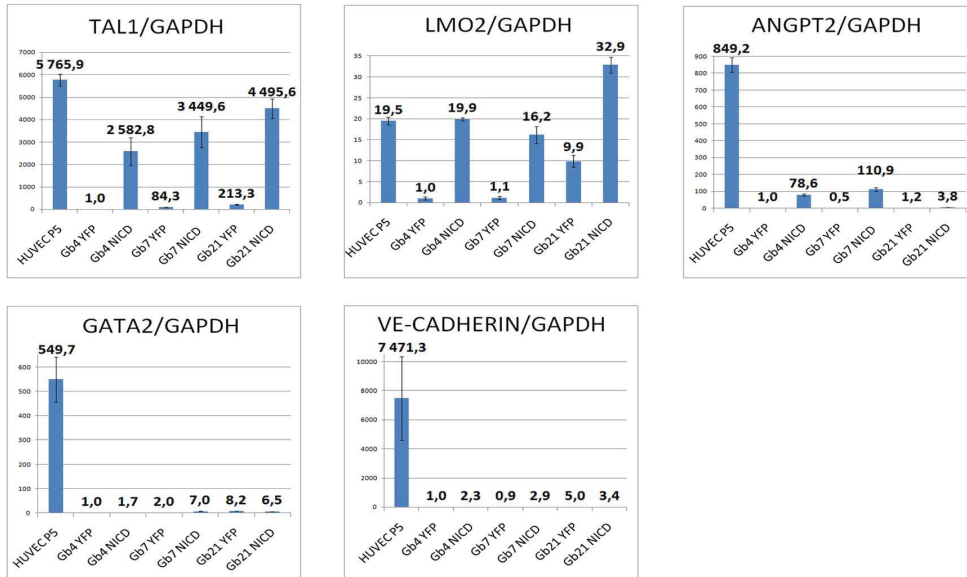
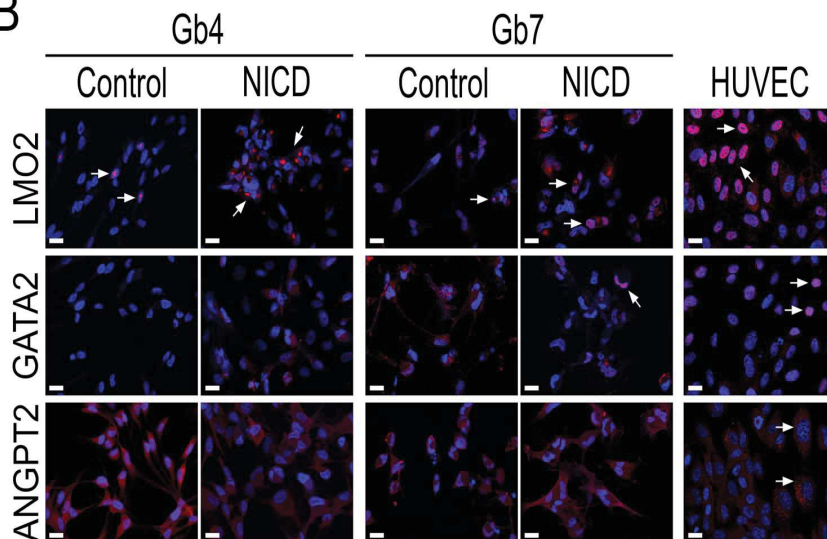


Figure 2

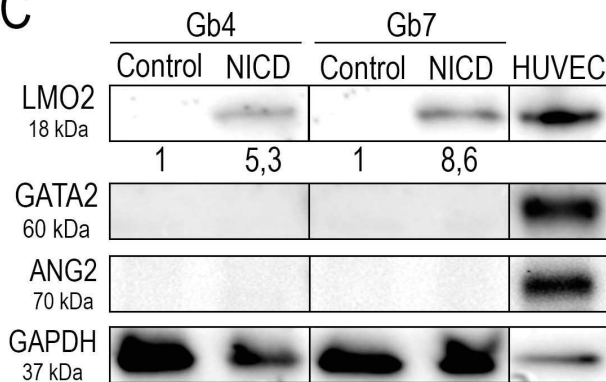
A



B



C



D

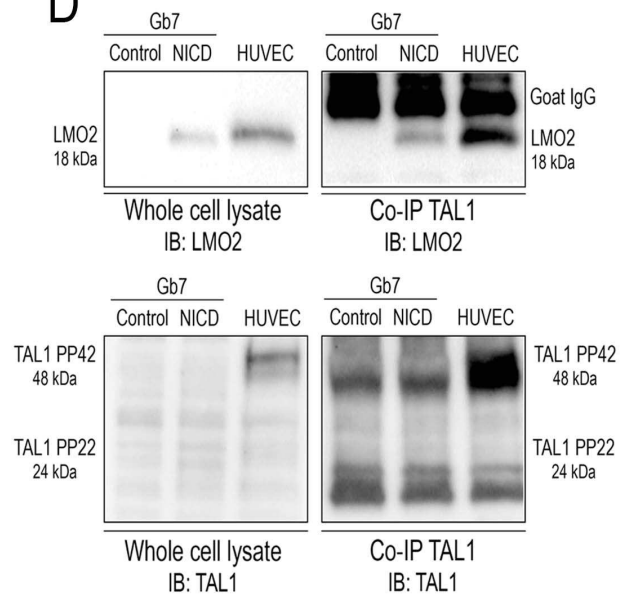


Figure 3

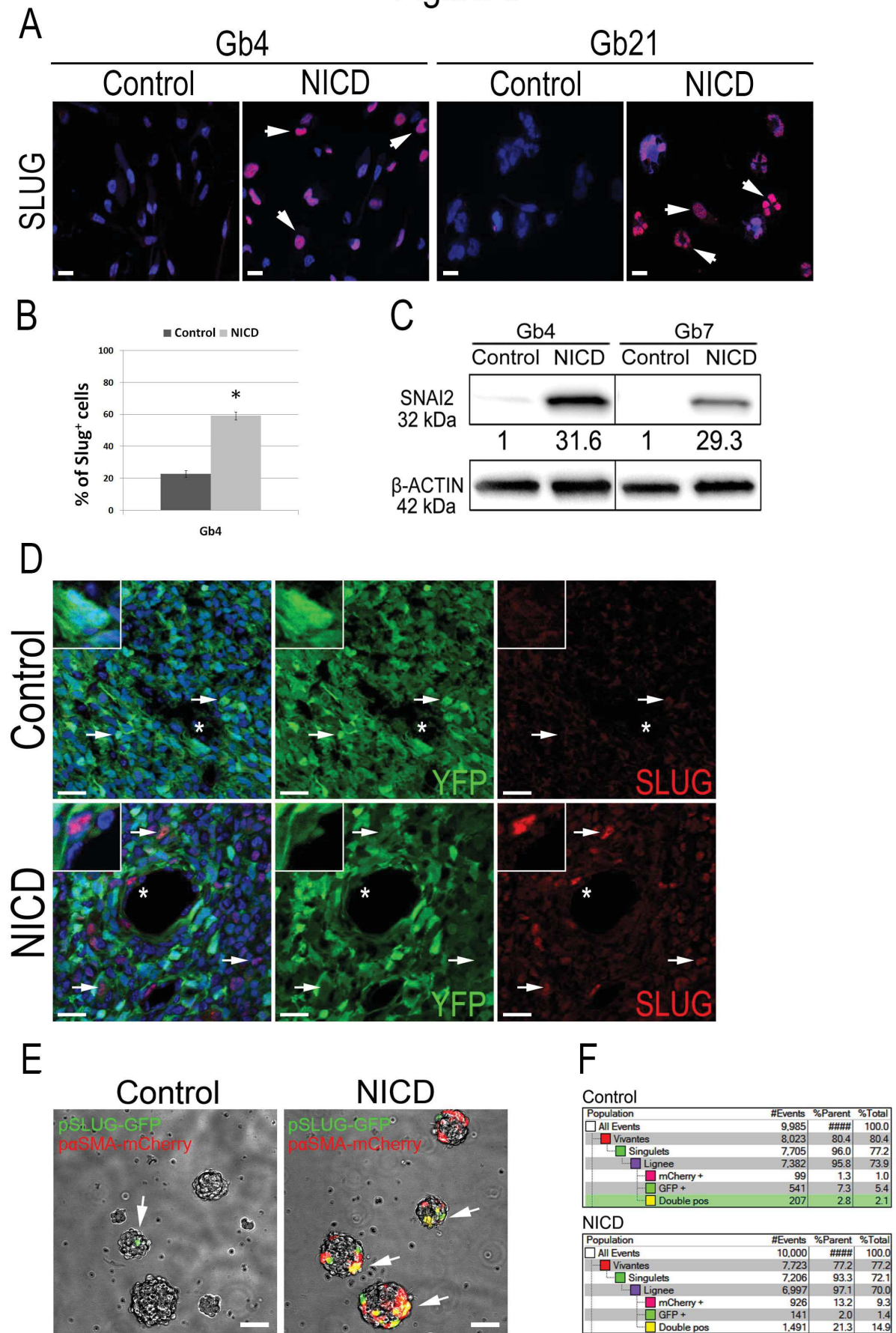


Figure 4

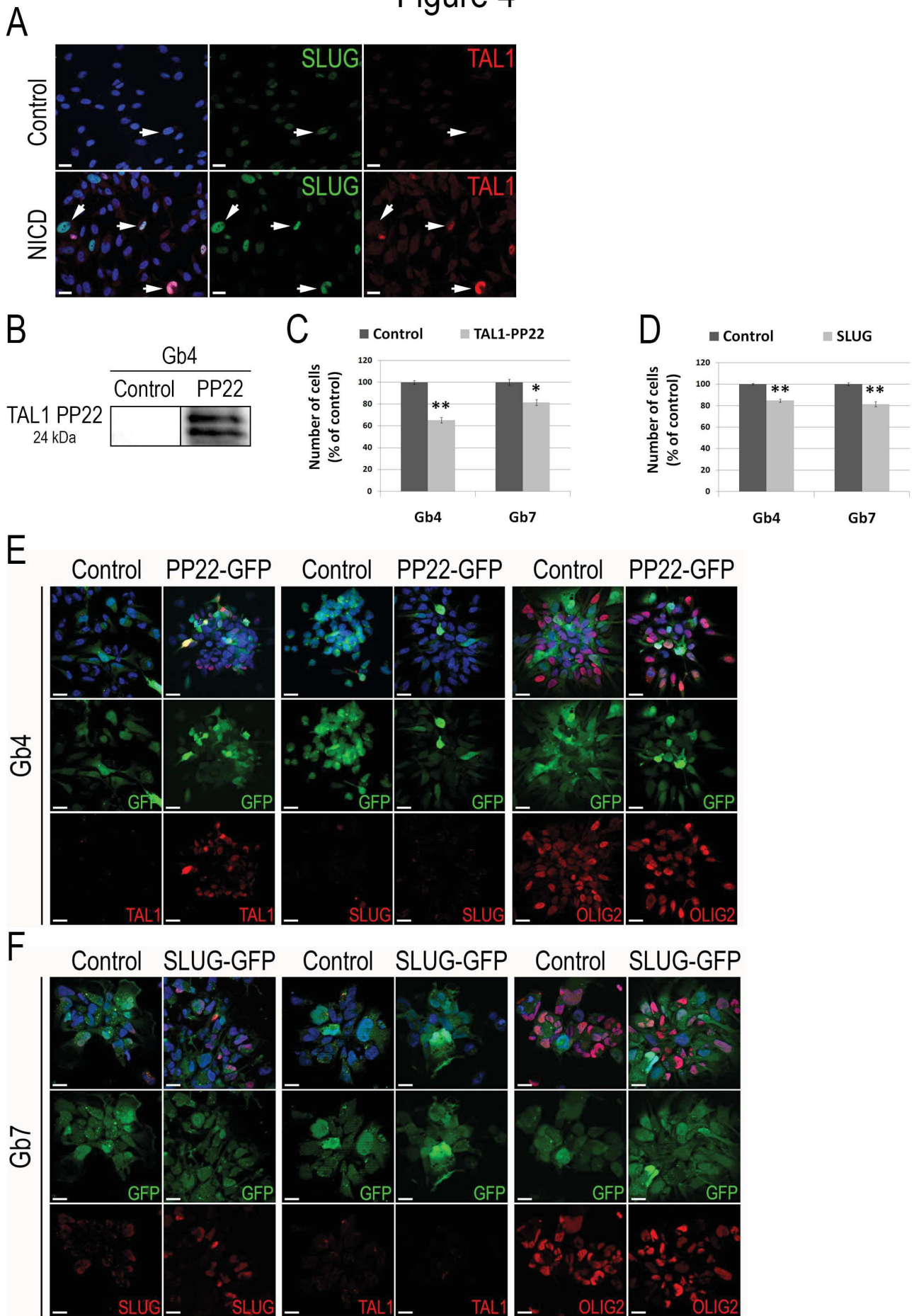
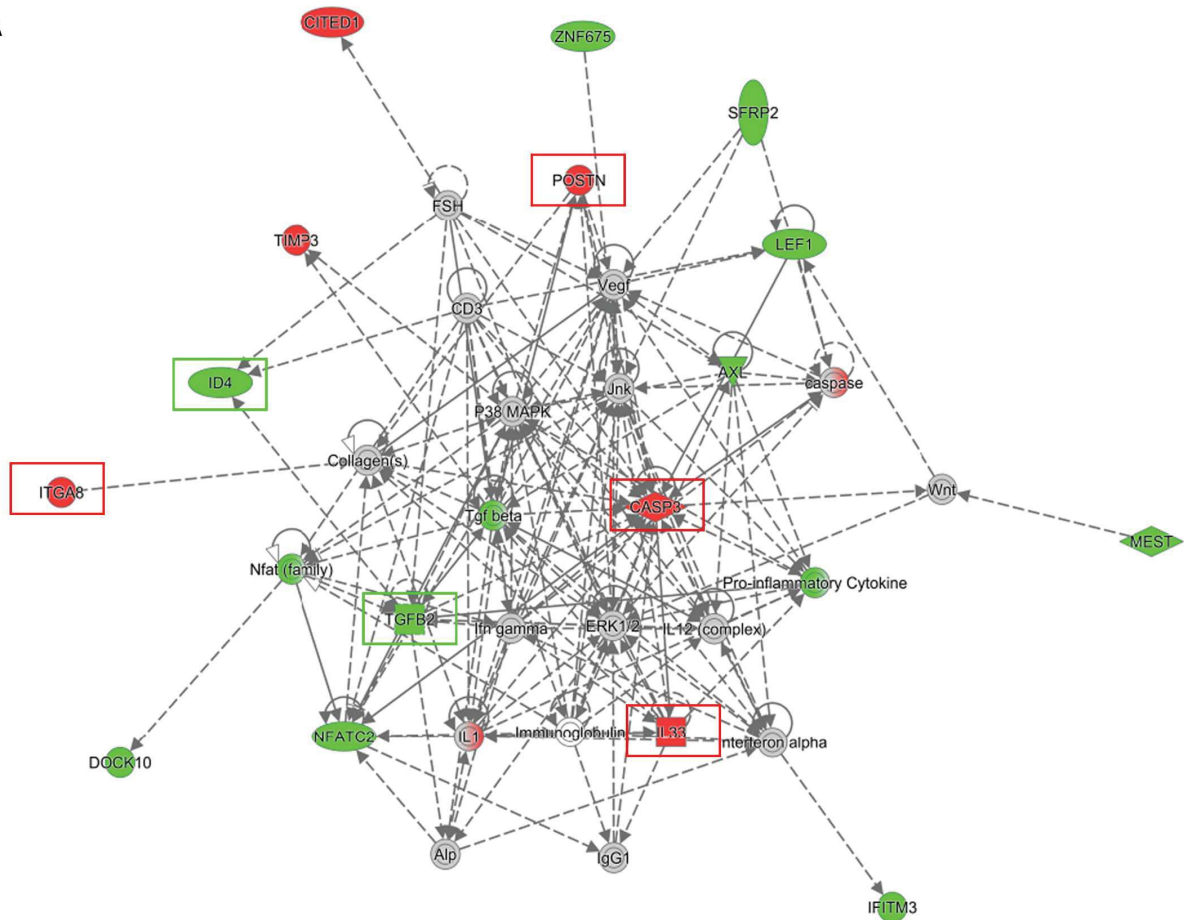


Figure 5

A



B

Gene ID	Name	Fold Change Gb4 PP22/Gb4 Control	Reported Functions
ITGA8	Integrin Alpha-8	1,96	Kidney morphogenesis, EMT, smooth muscle cell phenotype
POSTN	Periostin	1,86	Mesenchymal identity, EMT, Tissue remodelling, Recruitment of macrophages in GSC niche
IL33	Interleukin-33	1,59	Inflammation, Angiogenesis, Coagulation, Activated endothelial/smooth muscle cells
ID4	Inhibitor of DNA-binding protein 4	0,63	GSC Self renewal, Notch signaling, GSC perivascular niche, Angiogenesis, Invasion

C

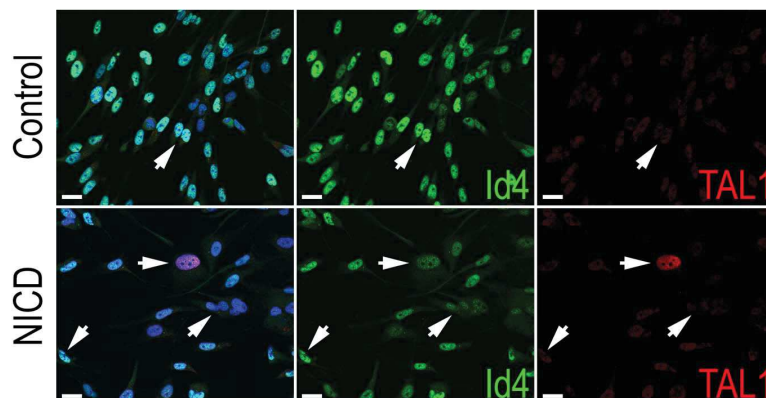


Figure 6

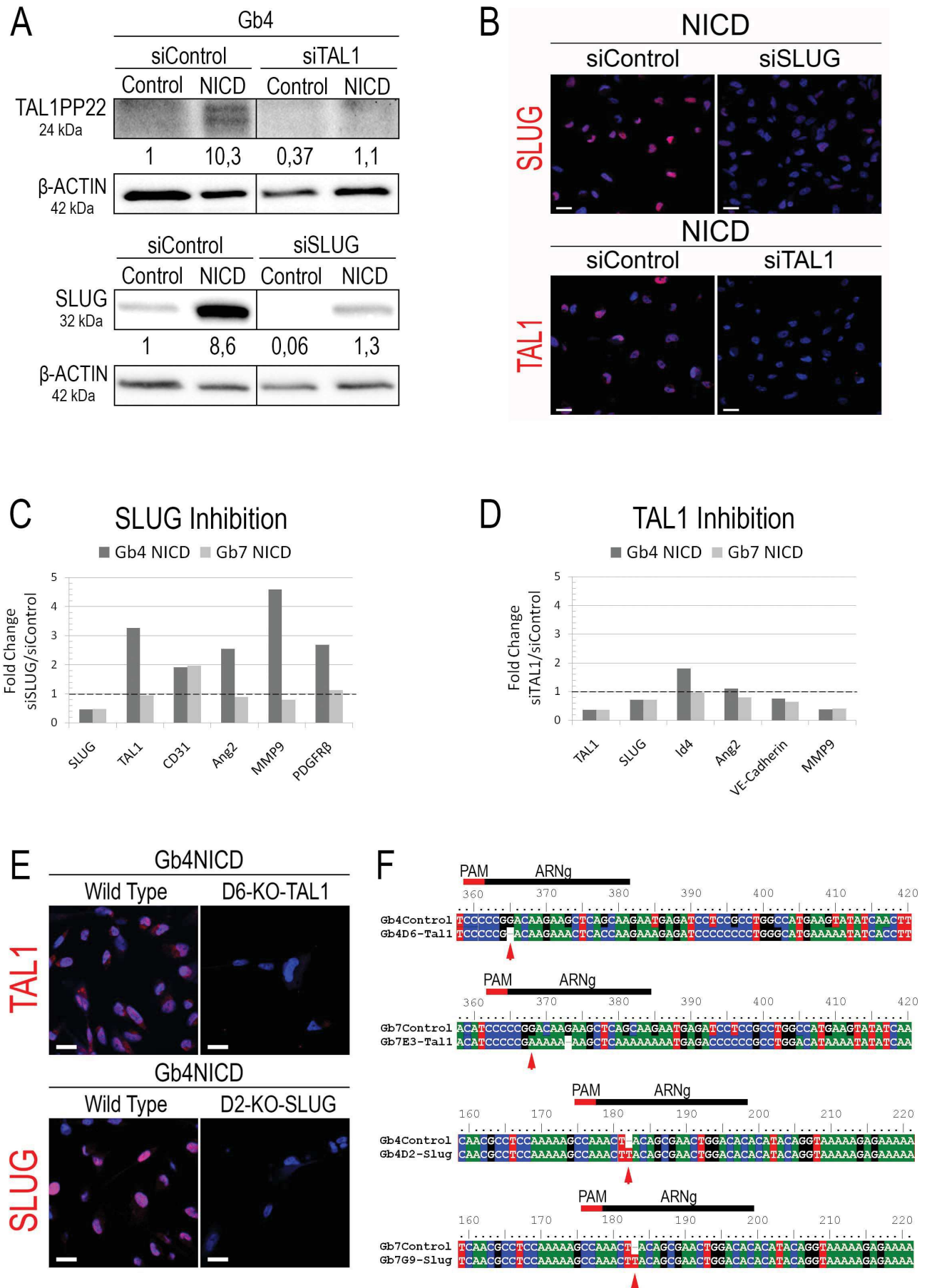
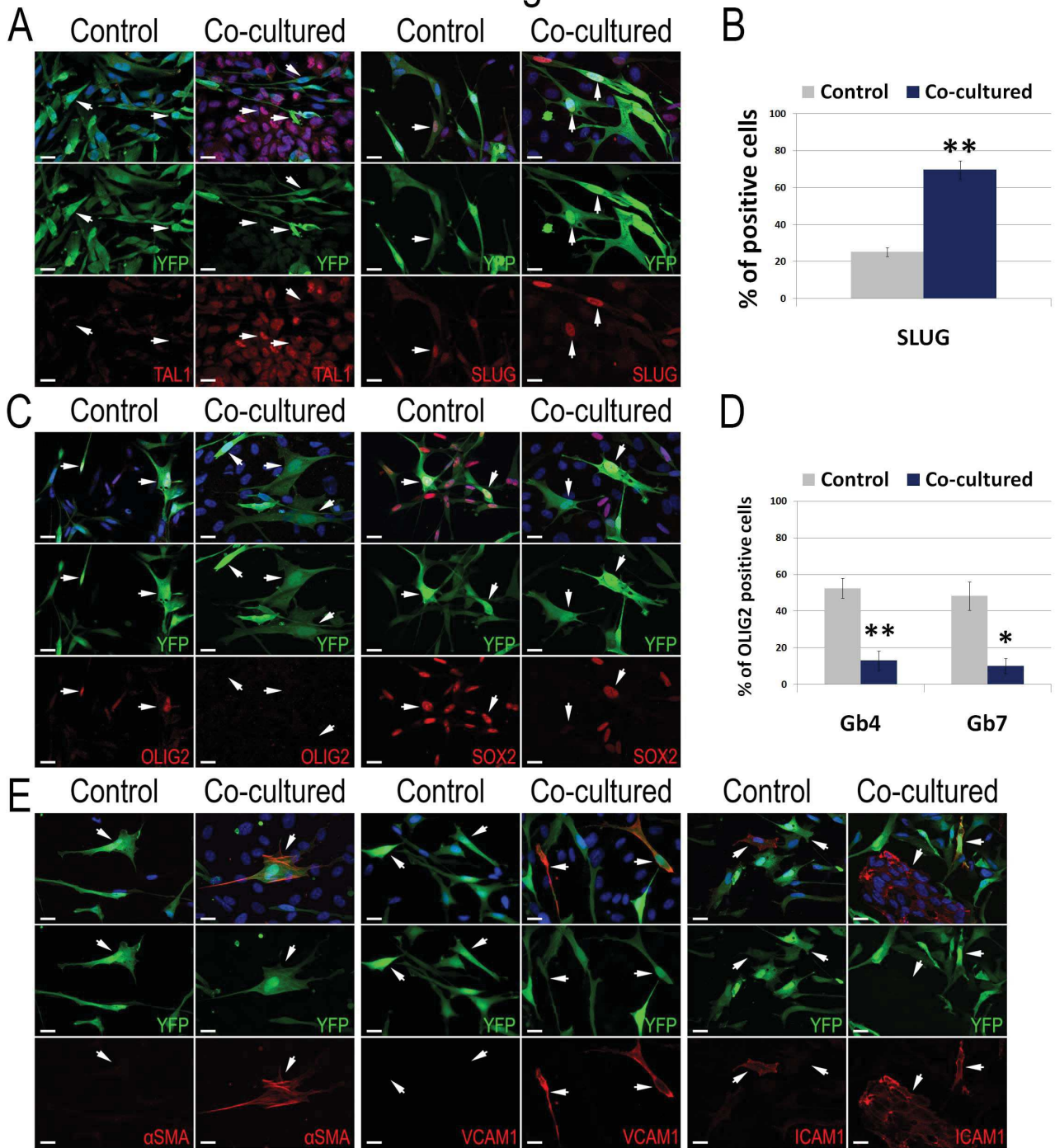


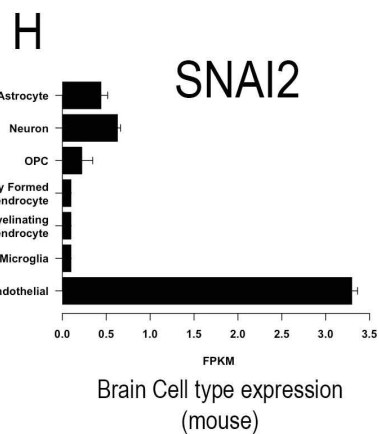
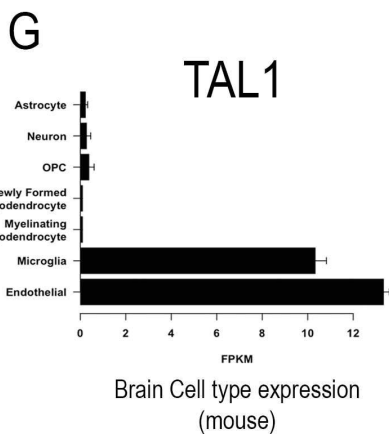
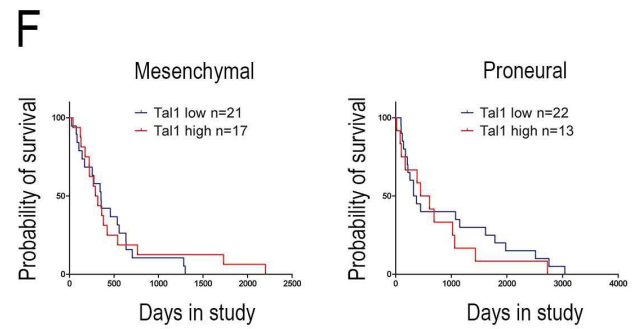
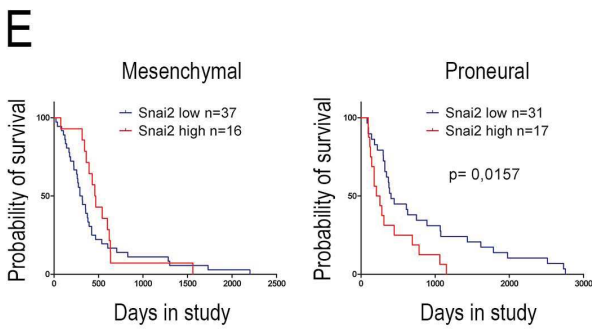
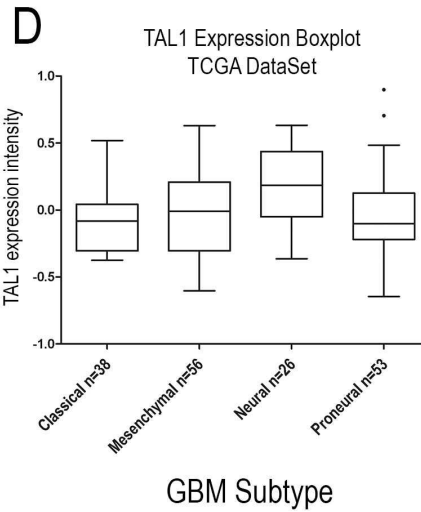
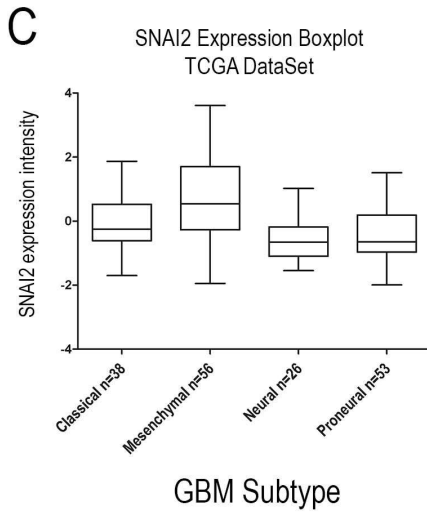
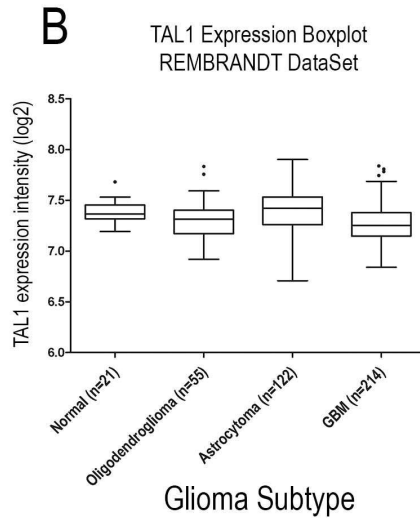
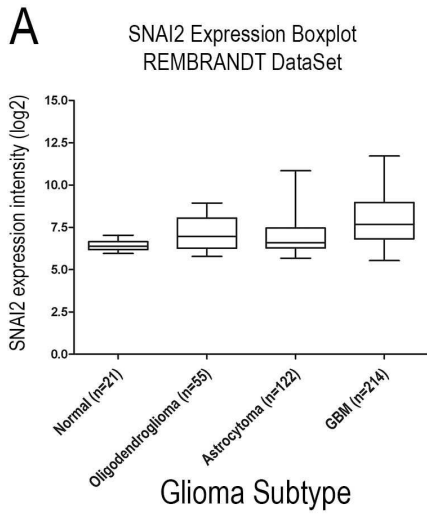
Figure 7



F

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Overlap
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	1,83E-06	9,7 % 9/93
TGF- Signaling	1,02E-05	9,2 % 8/87
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1,15E-05	6,1 % 11/179
BMP signaling pathway	2,50E-04	8,2 % 6/73
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	2,51E-04	4,7 % 10/211

Figure 8



	Gli1	Gli8	Gli9	Gli11	Gli18	Gli21	Gli23	Gli24	Gli25	Gli26	Gli27	Gli29	Gli30
Sexe	F	?	M	M	F	F	F	F	M	F	M	M	M
Age au diagnostic	75	70	69	79	46	62	77	39	65	69	60	69	65
Topographie	Temporale	Frontale droit	Frontale gauche	Pariétale gauche	?	?	Frontale Insulaire Droite	Frontale Droite Insulaire Droite	?	?	Temporale droite	?	?
Composante cellulaire majoritaire	Astrocytaire	Gliale	Astrocytaire	Astrocytaire	Astrocytaire	Gliale, composante à cellules géantes	Astrocytaire	Astrocytaire	Astrocytaire avec composante oligodendrogiale	?	Astrocytaire	?	Astrocytaire
Densité cellulaire	Modérée à élevée	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée	Modérée à élevée	Elevée	Très élevée	Elevée	Elevée	?	Elevée
Atypies cytonucléaires	Marquées	Modérées à marquées	Marquées	Marquées	Marquées	Très marquées	Modérées	Modérées à marquées	Marquées	Modérées à marquées	Marquées	?	Fortement marquées
Index mitotique	Elevé (15 pour 10 champs)	Elevé (20 pour 10 champs)	Elevé	Modéré (6 pour 10 champs)	Mitoses Fréquentes	?	?	Mitoses Augmentées	Mitoses Fréquentes	Mitoses Fréquentes	Mitoses Nombreuses	?	Mitoses Augmentées
Immunohistochimie													
<i>GFAP</i>	+	+	Diffus et intense	Diffus	Diffus	++	Diffus	Diffus	+	Diffus	Diffus	?	Diffus
<i>P53</i>	?	?	Négatif	Négatif	20%	80%	Négatif	Inf 10%	15%	40%	15%	?	Inf 5%
<i>Ki67</i>	Augmenté	30%	50%	20%	30%	20%	25%	30 à 40%	70%	60%	40%	?	30%
<i>EGFR</i>	?	?	?	?	?	?	Surexprimé	Surexprimé 50%	Surexprimé	Surexprimé	Surexprimé	?	Surexprimé
<i>Olig2</i>	?	?	Diffus et intense	?	?	Focal	Faible	Diffus	Diffus	Diffus	Diffus	?	Diffus
<i>IDH1 (muté)</i>	?	?	Négatif	?	?	?	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	?	Négatif
<i>ATRX (perte)</i>	?	?	?	?	?	?	?	Normal	Normal	?	Normal	?	Normal
<i>c-MET</i>	?	?	?	?	?	?	?	Négatif score 0	+	Minoritaire score 1	50%	?	Négatif score 0
Nécrose	Micronécrose palissadique et périphérique	Micronécrose palissadique et périphérique	Aspect palissadique Fréquentes Thromboses	Absente	Micronécrose palissadique et périphérique	Larges plages de nécrose	Micronécrose palissadique et périphérique Foyers macronécrose	Micronécrose palissadique et périphérique Calcosphérites fréquentes	Foyers Micronécrose	Micronécrose palissadique et périphérique	Foyers micronécrose et macronécrose	?	Micronécrose palissadique et périphérique
Vascularisation	?	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée Manches lymphoïdes périvasculaires	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée – vaisseaux thrombotiques	?	Prolifération microvasculaire Hyperplasie endothélio-capillaire marquée
Diagnostic	GBM Grade IV	GBM Grade IV	GBM Grade IV	GBM Grade IV	GBM Grade IV	Gb à cellules géantes Grade IV	GBM Grade IV	GBM Grade IV	Gb à composante oligodendrogiale Grade IV	Gb à petites cellules Grade IV	GBM Grade IV	Tumeur gliale de haut Grade	GBM Grade IV

Figure 10

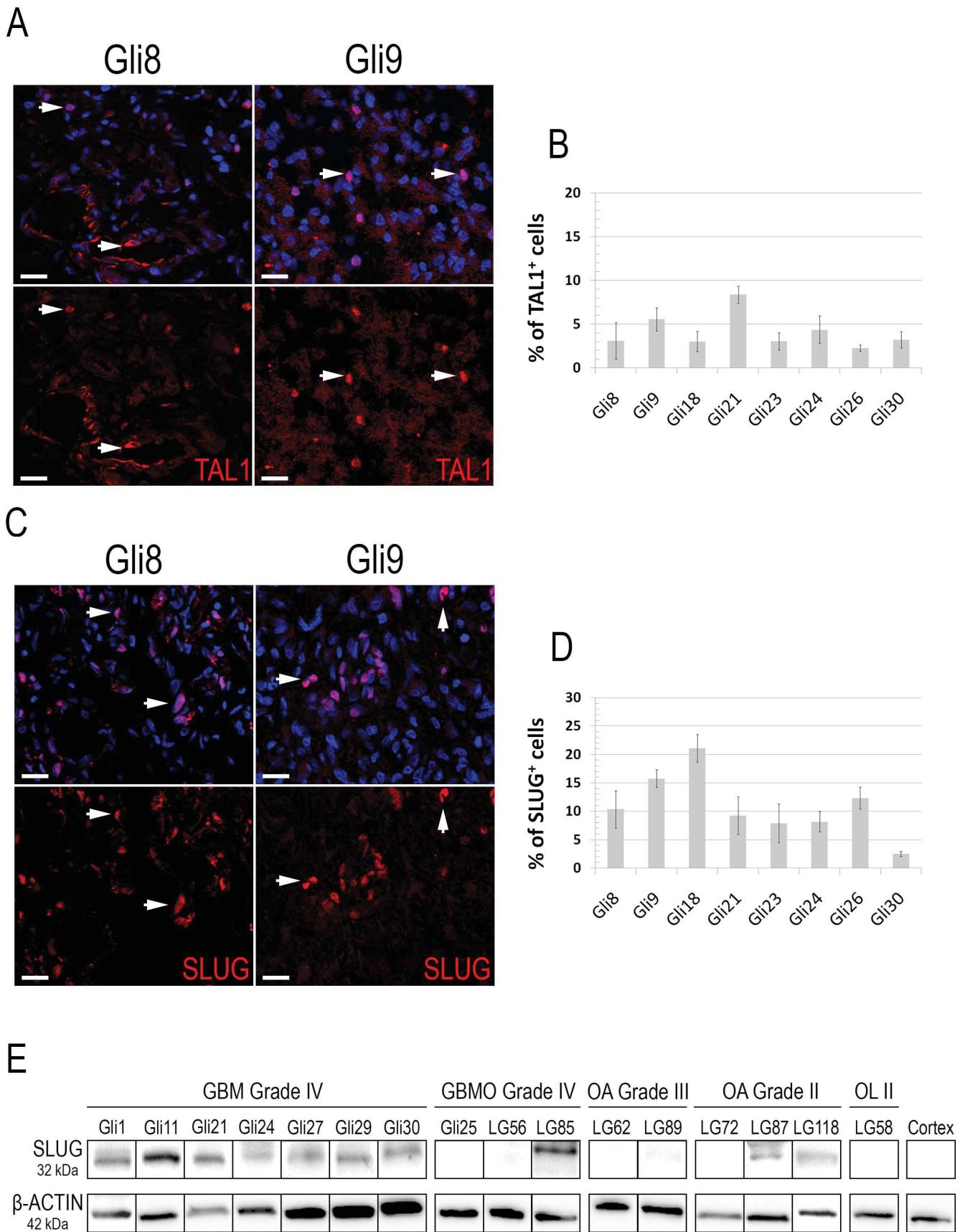
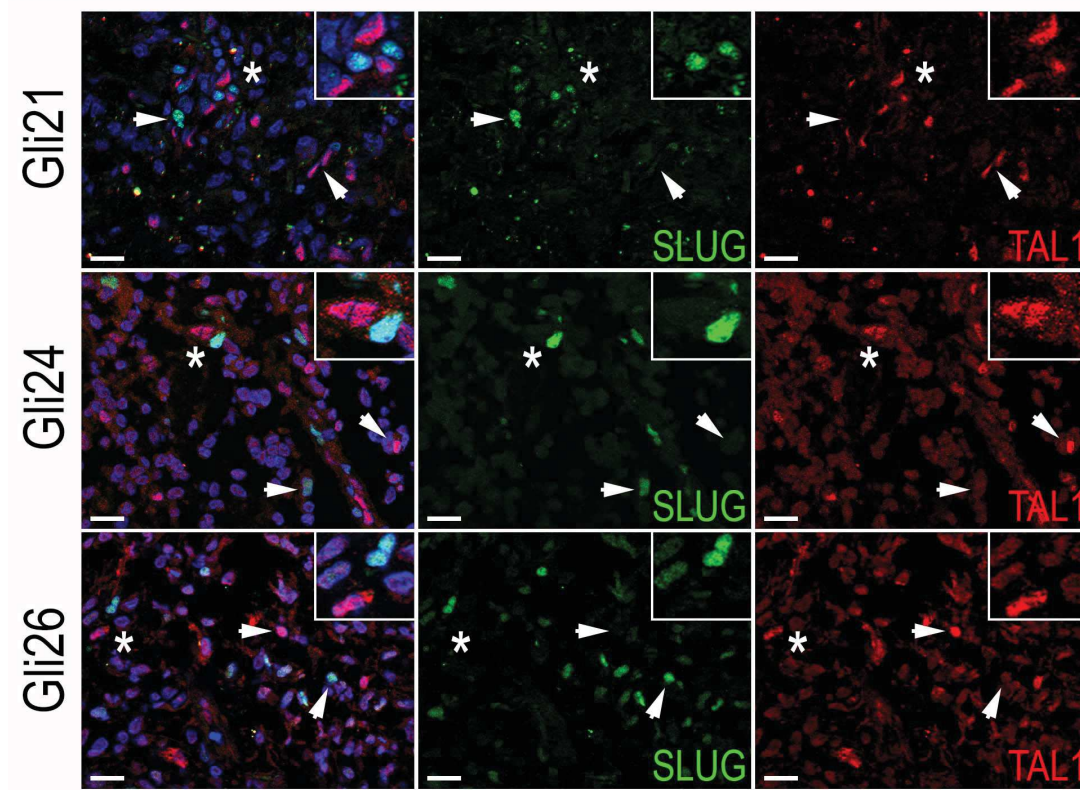


Figure 11

A



B



Figure 12

Gli24

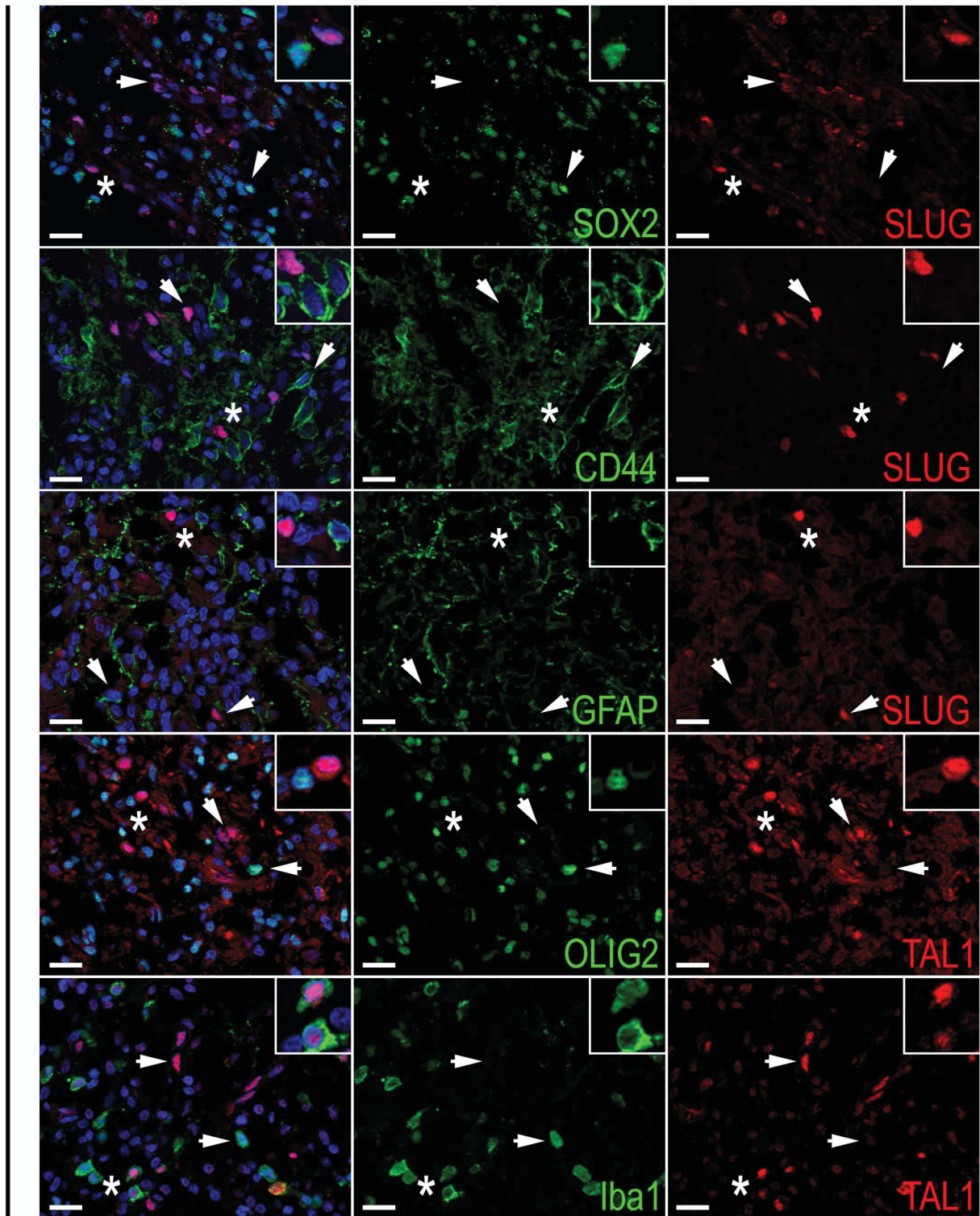


Figure 13

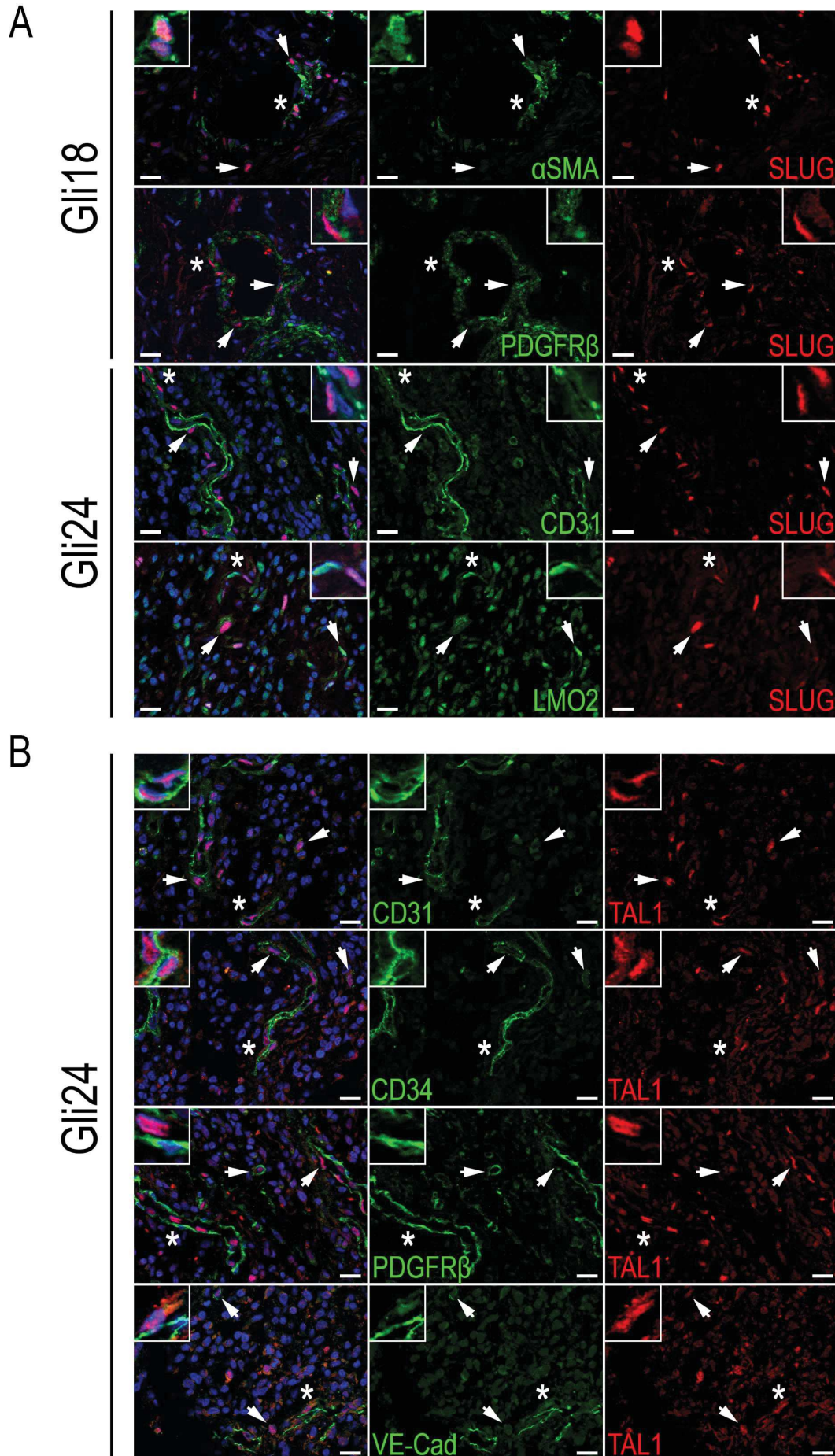
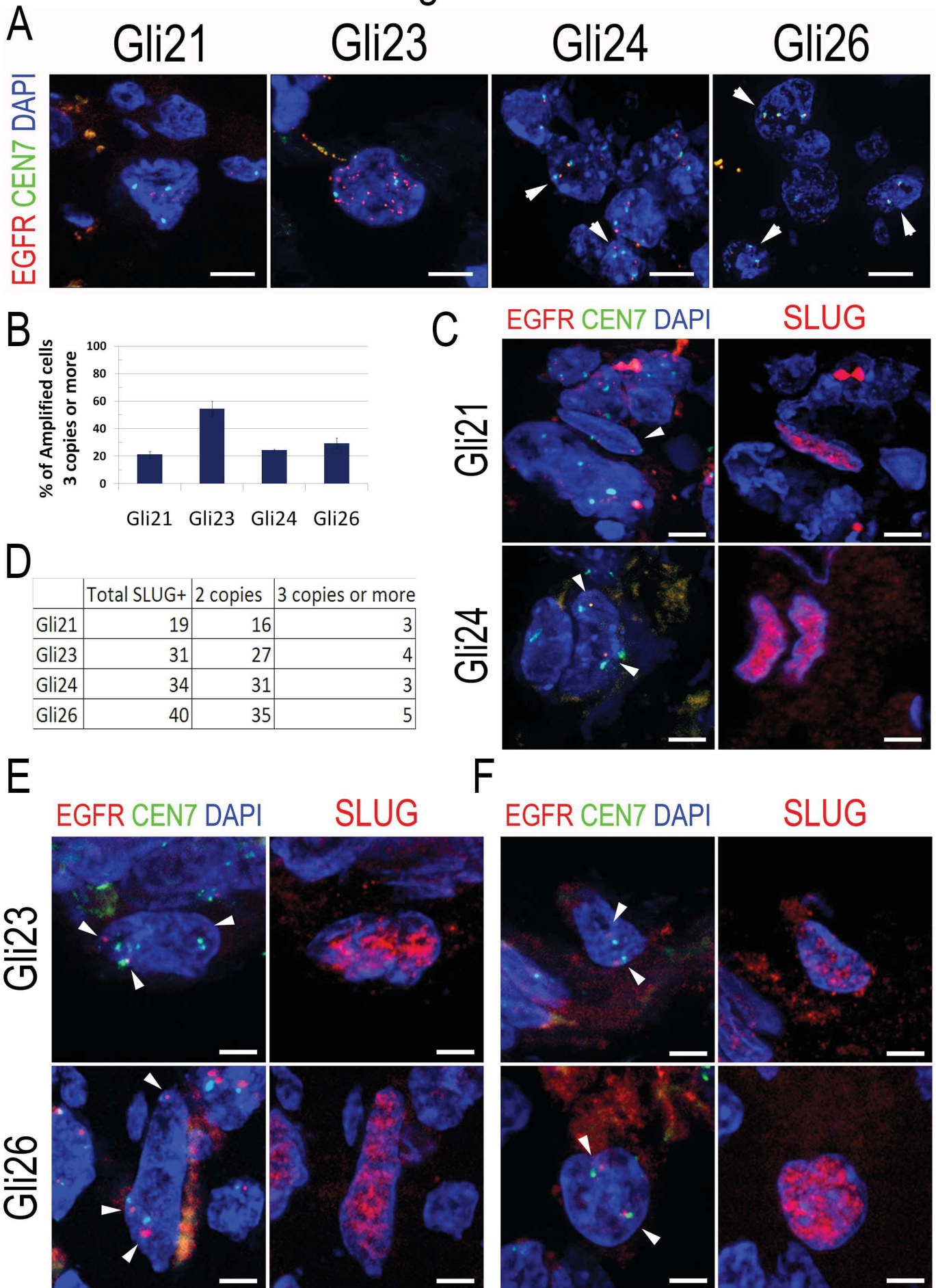


Figure 14



Discussion et perspectives

Notre première étude a mis en évidence un rôle surprenant de Notch1 dans la transition neurovasculaire des GSC vers un phénotype « péricyte-like ». L'objectif qui en découle a donc été de comprendre les régulations transcriptionnelles impliquées dans cette plasticité. Cette question des effecteurs moléculaires à l'origine de cette reprogrammation vasculaire des GSC est de premier plan, notamment pour comprendre les mécanismes de résistance employés par les GSC pour empêcher l'action de thérapies ciblant la vascularisation des GBM.

Notre étude s'est ainsi concentrée sur la fonction putative des facteurs de transcription TAL1 et SLUG, fortement induits dans nos données transcriptomiques et montrés comme associés à des mécanismes de vascularisation selon la littérature.

Afin d'examiner leur fonction, nous avons employé trois approches expérimentales en parallèle ; une approche mécanistique *in vitro* classique en gain/perte de fonction ; une approche plus physiologique par la co-culture des GSC avec les cellules endothéliales ; et enfin une approche *in vivo* par l'analyse directe d'échantillons de GBM.

Cette étude a fourni une quantité considérable de résultats qui apportent un nouvel éclairage sur les modalités moléculaires potentiellement mises en jeu dans la plasticité neurovasculaire des GSC. Nous montrons notamment que :

- TAL1 et SLUG sont exprimés *in vivo* après activation de Notch1 : ils sont associés à une fonction « péricyte-like » des GSC, et pourraient coordonner un programme commun de transdifférenciation.
- Notch1 contrôle préférentiellement l'expression d'une isoforme particulière de TAL1, l'isoforme PP22. Celle-ci peut former un complexe transcriptionnel avec le facteur LMO2, et ce complexe pourrait activer des gènes spécifiques en aval.
- TAL1-PP22 active une signature de gènes mésenchymateux/vasculaires dont MMP9 ; il inhibe Id4 ; mais n'active pas ses cibles canoniques angiopoïétine 2 et VE-Cadhérine.
- TAL1-PP22 et SLUG diminuent significativement la croissance des GSC *in vitro*.
- SLUG pourrait réprimer un programme endothélial des GSC, par l'inhibition de l'expression de CD31.
- SLUG est physiologiquement induit dans le contexte d'une interaction avec les cellules endothéliales. Cette interaction physiologique favorise le phénotype « péricyte-like » des GSC et implique les signalisations Notch, TGF β , et BMP.

- SLUG et TAL1 sont exprimés dans des populations de cellules vasculaires distinctes *in vivo* dans les GBM : TAL1 est associé à un phénotype endothélial ; SLUG est associé à un phénotype péricytaire.
- SLUG est exprimé dans des cellules tumorales qui pourraient représenter des cellules vasculaires issues d'une transdifférenciation.

Ces résultats ont permis d'entrevoir SLUG et TAL1 comme des régulateurs au centre du phénotype « péricyte-like » des GSC. Néanmoins, nous ne répondons pas de manière stricte et formelle à la question de leur fonction moléculaire précise dans cette transition. De nombreuses perspectives et études complémentaires sont donc à prévoir concernant ces travaux. Ceux-ci amènent également à beaucoup de questions non élucidées.

- **Quelle est la fonction de TAL1 dans le phénotype « péricyte-like » ?**

L'expression de TAL1 suite à l'activation de NICD dans les GSC est un résultat inattendu. Nous montrons pour la première fois que ce facteur peut être exprimé *in vitro* mais aussi *in vivo* dans des cellules souches tumorales isolées de GBM, et donc isolées d'une tumeur solide. En effet, les seules études sur TAL1 en cancérogénèse concernent les leucémies T-ALL (Hoang, Lambert, and Martin 2016), ou certaines tumeurs vasculaires rares telles que les hémangioblastomes (Glasker et al. 2006). De plus, nous observons après xénogreffes sous-cutanées de GSC exprimant NICD, que TAL1 est exprimé dans des cellules périvasculaires. Dans les CE, l'expression de TAL1 est généralement associée à un état activé de l'endothélium et à un phénotype pro-angiogénique (Mathieu 2009). L'observation directe de son expression suggère donc une fonction importante dans la vascularisation des GSC et plus généralement dans la vascularisation des GBM. En effet, nous observons aussi son expression directement sur des coupes de patients ; et ces observations sont pour l'instant complètement inédites. Après caractérisation des cellules TAL1⁺, nous concluons qu'elles sont majoritairement vasculaires et précisément endothéliales par l'expression des marqueurs CD31, CD34 et VE-Cadhérine. Nous associons donc le phénotype TAL1⁺ *in vivo* à un phénotype vasculaire. Nous avons pour l'instant caractérisé les cellules TAL1⁺ sur un nombre réduit de prélèvements : il faudra donc étendre ces observations à un nombre plus important d'échantillons afin de tirer des conclusions statistiques sur la présence des cellules TAL1⁺ chez les patients. Nous envisageons également une étude de l'expression de TAL1 en WB à partir de nos différents prélèvements, permettant une analyse plus globale de la tumeur et le test de plus d'échantillons en simultané. Néanmoins, l'expression de TAL1 étant restreinte à une sous-population de cellules au sein des tumeurs, l'analyse en WB peut s'avérer compliquée. Des approches complémentaires en qPCR permettraient une détection plus sensible de son expression.

Nos analyses des données transcriptomiques issues des bases de données REMBRANDT et TCGA ne montrent pas une expression élevée de TAL1 au sein des gliomes, ni au sein de sous-types moléculaires spécifiques de GBM. De plus, une expression forte ou faible de TAL1 ne constitue pas un indicateur de la survie des patients. Ces données étant représentatives d'un niveau d'expression en ARNm, elles ne sont pas forcément le reflet de la réalité biologique : nos analyses montrent que TAL1 est restreint à une sous-population de cellules dont la fréquence est plus ou moins variable selon les tumeurs, mais globalement inférieure à 10% des cellules totales. Cette expression spécifique à un groupe de cellules pourrait expliquer la non significativité des analyses bioinformatiques qui se basent sur des échantillons totaux.

Nous avons aussi observé des cellules TAL1⁺ exprimant Iba1, un marqueur de macrophages et de la microglie : ceci est en accord avec l'expression connue de TAL1 dans le lignage hématopoïétique (Correia et al. 2016) et son expression récemment rapportée dans la microglie de cerveaux âgés (Wehrspaun, Haerty, and Ponting 2015). Cette observation pourrait impliquer TAL1 dans les macrophages/microglie associés aux tumeurs. Nous n'avons utilisé que le marqueur Iba1, mais il s'avèrera utile de tester d'autres marqueurs du lignage hématopoïétique afin de caractériser cette sous-population particulière de cellules TAL1⁺.

L'ensemble de nos observations biologiques sur les échantillons corrèle aux données de RNA-seq issues de cerveaux murins (Zhang et al. 2014) ; qui suggèrent une expression endothéliale et microgliale de TAL1. En comparaison des techniques de puces, le RNA-seq pourrait se révéler plus efficace pour analyser l'expression de TAL1 : il faudra donc effectuer des études bioinformatiques complémentaires pour examiner son expression dans les bases de données de RNA-seq disponibles pour les GBM, et dans un grand nombre de prélèvements.

Il se pose ensuite la question logique de l'origine des cellules TAL1⁺ au sein des GBM : nous sommes actuellement en train d'examiner leur statut d'amplification EGFR, par la même approche utilisée pour l'analyse de SLUG. En effet, du fait de nos données *in vitro*, il s'avère judicieux de tester si l'expression de TAL1 est associée à une transdifférenciation vasculaire des cellules tumorales chez les patients.

Nos observations *in vivo* à partir des xénogreffes et sur les cryosections amènent à d'autres questions en lien avec nos travaux à partir des cultures de GSC. *In vitro*, nous démontrons de manière robuste que l'activation de Notch1 dans les GSC induit préférentiellement l'expression de l'isoforme courte TAL1-PP22. L'anticorps utilisé en IF

reconnait toutes les isoformes ; et ne permet donc pas en microscopie de discriminer l'isoforme PP42 de l'isoforme PP22.

La question de l'isoforme détectée *in vivo* se pose alors dans les xénogreffes, et chez les patients. Pour les xénogreffes, nous savons que les cellules TAL1⁺ observées sont d'origine humaine car elles expriment la YFP lentivirale : étant donné que seule la PP22 est détectée *in vitro*, il y a de fortes chances que cette même isoforme soit retrouvée dans les GSC xénogreffées. Pour les échantillons de patients, l'observation de cellules TAL1⁺ CD31⁺ suggère une expression dans des cellules endothéliales : il a clairement été démontré que les cellules endothéliales différenciées n'expriment pas la PP22, ce qui suggère que la protéine détectée chez les patients correspondrait plutôt à la PP42. Néanmoins, dans les deux cas, il faut pouvoir clairement tester ces hypothèses. Nous pourrions à nouveau envisager des analyses en WB sur des échantillons totaux qui permettraient d'identifier formellement l'isoforme de TAL1 impliquée ; mais ceci implique une expression forte de TAL1 dans l'échantillon, ce qui n'est pas le cas ; et ne discrimine pas l'existence potentielle de sous-populations exprimant la PP42 ou la PP22 dans une même tumeur. Pour examiner l'isoforme *in vivo*, nous pourrions envisager des amplifications par PCR spécifiques de cette isoforme. En effet, il a été montré que l'isoforme PP22 peut résulter d'une transcription à partir d'un promoteur cryptique, ce qui pourrait être détecté en qPCR par des amorces spécifiques. Néanmoins, cette approche peut s'avérer risquée car il a aussi été montré que la PP22 résulte d'une initiation interne de la traduction. La meilleure approche pour examiner l'isoforme de TAL1 exprimée chez les patients serait de purifier les cellules TAL1⁺ pour examiner en WB l'expression de la protéine. L'analyse de l'isoforme de TAL1 exprimée chez les patients apparaît comme centrale à la suite de ces travaux.

In vitro, l'induction préférentielle de l'isoforme courte PP22 a suscité énormément de questions et nous a fait formuler de nombreuses hypothèses. Les données bibliographiques sont peu nombreuses concernant la fonction de cette isoforme tronquée. Son expression régulerait des étapes précises au cours de la spécification hématopoïétique et la différenciation érythrocytaire (Qian et al. 2007). Afin d'examiner sa fonction potentielle dans les GSC, nous avons tout d'abord analysé l'expression de partenaires et cibles connues de TAL1 après activation de NICD. En effet, TAL1 fonctionne au sein d'un complexe transcriptionnel qui implique d'autres facteurs de transcription mais aussi des co-régulateurs spécifiques. Précisément dans les cellules endothéliales, le complexe formé par TAL1, LMO2 et GATA2 régule l'expression de la VE-Cadhérine dans les cellules endothéliales (Deleuze et al. 2007).

Après transduction de Notch1, nous observons une induction du partenaire LMO2. LMO2 permet notamment de faire le lien entre les facteurs bHLH, ici TAL1, et les facteurs GATA ; et ainsi module l'activité transcriptionnelle du complexe. LMO2 a récemment été démontré comme pouvant induire un phénotype vasculaire endothélial dans des GSC, précisément en aval de Notch et par régulation directe de la VE-Cadhérine (Kim et al. 2015). Nos résultats confirment en partie ces données. Par des expériences de Co-IP, nous montrons aussi que TAL1-PP22 et LMO2 interagissent et qu'ils peuvent former un complexe transcriptionnel. Ces résultats encore préliminaires seront reproduits de manière robuste très prochainement. Le rôle actif ou non de ce complexe TAL1-PP22-LMO2 est à examiner dans de futures études. En effet, la structure de l'isoforme PP22 lui confère des fonctions transcriptionnelles spécifiques encore peu caractérisées, et elle pourrait agir comme un piège et empêcher l'action transcriptionnelle des partenaires qu'elle fixe. On pourrait alors formuler l'hypothèse que TAL1-PP22 interagit avec LMO2 et empêche son action transcriptionnelle. Nous n'avons pas observé d'induction du facteur GATA2, qui demeure très peu exprimé dans les GSC. Il ne faut donc pas écarter la possibilité d'une régulation transcriptionnelle de TAL1-PP22 par l'interaction avec d'autres partenaires. Notamment dans le SNC, TAL1 peut interagir avec LMO4, GATA1/3 lors de la neurogénèse (Joshi et al. 2009). Nous pourrions alors envisager des expériences complémentaires pour examiner l'expression de ces facteurs, tout d'abord en analyse western blot, puis éventuellement par des co-IP.

Notre étude mécanistique a exploré les conséquences de la surexpression de TAL-PP22 dans les GSC natives, et également l'inhibition sélective de TAL-PP22 en aval de Notch1. Nous avons observé que TAL1-PP22 module l'expression de gènes spécifiques. Notre étude transcriptomique a révélé que TAL1-PP22 inhibe l'expression de ID4, et ce résultat a été confirmé après inhibition de TAL1-PP22 en aval de Notch. Cette observation assez inédite nécessite une validation biologique robuste : les vecteurs lentiviraux de surexpression couplés à la GFP pourront nous permettre de vérifier ce résultat à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les lignées CRISPR-Cas9 mises au point et validées ces derniers mois seront également utiles. Cette inhibition de ID4 est à relier avec l'observation de la diminution de la croissance des GSC après surexpression de TAL-PP22. ID4 est une protéine majeure à la prolifération des GSC sous l'influence de Notch (Jeon et al. 2008) ; et a également été proposée comme régulateur de l'auto-renouvellement des GSC au sein des niches périvasculaires (Jeon et al. 2014). On pourrait alors imaginer un scénario où TAL1-PP22 régulerait la différenciation des GSC. Ces données transcriptomiques ont également révélé une régulation par TAL1-PP22 de gènes associés à un phénotype mésenchymateux et vasculaire, notamment la périostine, l'intégrine alpha 8 et l'interleukine 33. Il s'avère nécessaire de confirmer ces résultats à l'échelle de la protéine, et également par l'approche complémentaire en perte de fonction.

Nous avons notamment constaté que l'expression de ces gènes varie selon la même tendance suite à l'activation de Notch1 dans les GSC ; ce qui appuie l'implication biologique de ces gènes dans la régulation du phénotype « péricyte-like ». Après inhibition sélective de TAL1, nous avons aussi observé la diminution de MMP9 en qPCR : TAL1-PP22 serait donc nécessaire à l'induction de MMP9 en aval de Notch1, et donc requis pour le « switch » des MMP mis en évidence au cours de notre première étude. Ce résultat surprenant montre que TAL1-PP22 participe au contrôle de la vascularisation par les GSC « péricyte-like ». Enfin, cette étude mécanistique montre que dans les GSC, TAL1-PP22 n'induit pas l'expression de ses cibles canoniques Ang2 et VE-Cadhérine. Toutes ces observations nous permettent de spéculer que TAL1-PP22 favorise plutôt un phénotype mésenchymateux des GSC. Afin de pouvoir clairement répondre quant au mode d'action moléculaire de TAL1-PP22, nous envisageons des approches par Chip-Seq afin d'identifier ses cibles directes.

Notre étude dans le contexte physiologique d'une interaction avec les CE n'a pas montré d'expression de TAL1 dans les GSC. Nous détectons néanmoins TAL1 dans les cellules HUVEC. Ce facteur n'est donc pas requis pour les GSC dans un contexte mimant *in vitro* la niche périvasculaire. Néanmoins, pour pouvoir étudier TAL1 dans le contexte de la niche périvasculaire, des études *in vivo* après xénogreffes s'avèrent nécessaires, à la fois en greffant des GSC natives, et des GSC surexprimant ou sous-exprimant TAL1. Nous pourrions aussi mettre en place des expériences utilisant des constructions rapporteurs des différentes isoformes : néanmoins de telles constructions s'avèrent complexes à concevoir ; et n'ont été utilisées que dans des études chez le poisson zèbre (Zhen et al. 2013). *In vitro*, il s'avère judicieux de mettre en place des systèmes de co-cultures plus fonctionnels, notamment en matrice de matrigel ou de collagène. TAL1 étant plutôt exprimé en situation de vascularisation active, nous pourrions éventuellement détecter sa présence dans ce contexte. Au cours de ce travail, nous avons mis en place des co-cultures en matrice de matrigel et observé une forte interaction entre GSC et CE. Nous n'avons pas approfondi ces études, mais le système est validé d'un point de vue expérimental. En complément de notre étude par les co-cultures, nous avons aussi examiné l'expression physiologique de TAL1 après différenciation des GSC et cultures en conditions hypoxiques : nous n'avons pas observé son induction. Ceci montre que son expression est dépendante de hauts niveaux de NICD dans les GSC. On pourrait alors formuler l'hypothèse d'une régulation directe de TAL1 par NICD. Des expériences de Chip-Seq se révéleraient à nouveau utiles pour répondre à cette question.

Enfin, une hypothèse séduisante quant à la fonction de l'isoforme PP22 dans les GSC serait qu'elle promeut un phénotype mésenchymateux/ « péricyte-like » intermédiaire, au dépend d'une identité endothéliale totalement différenciée. En effet, TAL1 peut réguler la

différenciation de cellules musculaires lisses au cours du développement ; et pour l'instant aucune étude n'a démontré un rôle de la PP22 dans ces processus, ni des mécanismes moléculaires précis. Cette hypothèse s'appuie sur nos données expérimentales mécanistiques qui montrent plutôt une signature mésenchymateuse après modulation de l'expression de TAL1-PP22 ; mais également sur nos données *in vivo* chez les patients. En effet, nous avons observé certaines cellules TAL1⁺ exprimant PDGFR β , ce qui suggère également également une sous-population plus minoritaire de cellules au caractère vasculaire mésenchymateux. La PP22 n'est pas exprimée dans les cellules HUVEC natives, et il faudrait donc examiner les conséquences de la surexpression de cette isoforme dans ces cellules. En effet, nous pourrions examiner si elle induit un phénotype mésenchymateux dans les CE, notamment par l'expression de α SMA ou PDGFR β .

- **Quelle est la fonction de SLUG dans le phénotype « péricyte-like » ?**

Nous avons également accumulé beaucoup de données concernant SLUG. L'étude *in vivo* chez les patients a montré les résultats les plus intéressants. En effet, nous montrons pour la première fois et de manière reproductible, que SLUG est exprimé dans une sous-population périvasculaire dans les GBM. Ces cellules présentent un phénotype semblable aux GSC « péricyte-like » de notre étude Notch, notamment par l'expression des marqueurs α SMA et PDGFR β . Ceci suggère une fonction centrale de SLUG dans l'intégrité du réseau vasculaire des GBM, et il pourrait contrôler de manière active des processus de néovascularisation. Ceci est également confirmé par nos observations après xénogreffes de cellules activées par Notch1 : SLUG est précisément retrouvé dans des cellules humaines YFP⁺ qui interagissent fortement avec les vaisseaux. Nos données biologiques corréleront également aux analyses bioinformatiques des bases de données TCGA et REMBRANDT, qui indiquent une expression de SLUG préférentiellement dans les GBM, et précisément dans les sous-types mésenchymateux. Ceci a déjà été rapporté (Cheng et al. 2012), néanmoins nos données histologiques le confirment directement sur les échantillons. Une forte expression de SLUG corréle à un mauvais pronostic dans les sous-types proneuraux. Les GBM proneuraux présentent un phénotype en général moins vascularisé ; et leur transition vers une signature mésenchymateuse est un indicateur de mauvais pronostic, notamment associé à une augmentation de la vascularisation, hypoxie, nécrose et invasion. L'expression de SLUG pourrait donc constituer un bon marqueur diagnostique de cette transition chez les patients. Comme pour TAL1, il sera nécessaire d'étendre l'expression de SLUG à un plus grand nombre de prélèvements afin de valider statistiquement nos observations. Il sera aussi intéressant d'avoir accès à des tissus correspondant à différents sous-types de GBM (tissu microarray), pour corréler directement sur les échantillons l'expression périvasculaire de SLUG à des profils moléculaires spécifiques. La question de l'origine tumorale ou non des

cellules SLUG⁺ au sein des tumeurs a également focalisé une grande partie de notre attention. La mise au point de la technique séquentielle d'immunomarquage puis analyse en FISH a nécessité des efforts considérables. Néanmoins, nous avons pu commencer à faire cette analyse. Dans un premier temps, l'analyse FISH seule a permis d'observer des profils d'amplification EGFR différents selon les échantillons; ce qui confirme une grande hétérogénéité intertumorale. Nous avons aussi observé que les cellules amplifiées interagissent fortement avec des cellules normales, ce qui souligne l'hétérogénéité intratumorale retrouvée au sein des GBM. Notre analyse combinée à l'immunomarquage de SLUG a révélé la présence de cellules SLUG⁺ amplifiées pour EGFR, ce qui démontre une origine maligne de ces cellules. Néanmoins, nous avons observé que les cellules SLUG⁺ sont majoritairement non amplifiées. Ceci n'écarte pas la possibilité que ces cellules soient tumorales; et elles présentent peut être d'autres aberrations chromosomiques qu'il faudra examiner dans de futures études. Les études centrées sur la transdifférenciation vasculaire des GSC ont utilisé des techniques combinant à la fois l'analyse du statut EGFR, et l'analyse de la délétion de PTEN (Cheng et al. 2013). Nous pourrions donc envisager une analyse de PTEN sur nos échantillons. Néanmoins, il s'avère assez complexe d'analyser des délétions sur des cryosections, du fait de nombreux artéfacts potentiels. De plus, SLUG étant associé aux GBM mésenchymateux, il se pourrait que ce facteur soit plutôt associé à des cellules tumorales présentant une délétion de NF1. En effet, cette altération est communément retrouvée dans les GBM mésenchymateux, alors que l'amplification EGFR est plus commune dans les GBM proneuraux et classiques (Verhaak et al. 2010). La présence majoritaire de cellules SLUG non amplifiées pour EGFR suggère aussi de manière logique, que ces cellules soient normales. On pourrait alors spéculer que ces cellules parenchymales périvasculaires sont des péricytes associés à la tumeur qui contribuent à la néovascularisation. Dans ce cas, même si elles ne sont pas d'origine tumorale, les cellules SLUG⁺ présentent un intérêt considérable à la compréhension des régulations transcriptionnelles du phénotype des cellules périvasculaires. En effet, très peu de données sont disponibles concernant les effecteurs intrinsèques contrôlant l'identité des péricytes. Ainsi, nous montrons SLUG comme un facteur de transcription important à la régulation phénotypique de ces cellules dans un contexte tumoral. La détection d'une minorité de cellules SLUG⁺ amplifiées pour EGFR est un résultat important: l'expression de SLUG peut être associée à la plasticité neurovasculaire directement chez les patients atteints de GBM. Cette observation corrèle à notre étude *in vitro*, et nous identifions *in vivo* des cellules semblables aux cellules que nous induisons *in vitro* dans les GSC suite à l'activation de Notch1. Ces études combinées d'immunomarquage SLUG et FISH EGFR devront être étendues à plus de prélèvements; car nous n'avons pour l'instant analysé que 4 tumeurs et énuméré peu de cellules dans notre étude. D'un point de vue statistique, ce n'est pas encore suffisant pour tirer des conclusions

formelles quant à la contribution réelle de cette transdifférenciation sur la vascularisation des GBM. En effet, de nombreuses études réfutent l'hypothèse d'une transdifférenciation vasculaire des GSC ; précisément par l'argument que ce mécanisme demeure rare et ne contribue que faiblement à la néovascularisation des GBM. Nos observations selon l'expression de SLUG, désormais considéré comme un bon marqueur périvasculaire, confirment cette idée. Cette analyse *in vivo* chez les patients justifie pleinement de s'attacher à comprendre le mode d'action précis de SLUG dans les GSC

In vitro, notre étude mécanistique concernant SLUG a été moins approfondie en comparaison de TAL1. Néanmoins, nous avons montré de manière robuste que ce facteur est exprimé dans les GSC. Suite à l'activation de Notch1, son expression est fortement induite dans une population majoritaire de cellules. Dans notre première étude (**Résultats I Partie I**), nous montrons aussi en utilisant un système inductible pour NICD, que son expression est réversible. Ceci suggère une régulation dynamique de son expression, et qu'il contrôlerait des caractéristiques importantes liées au phénotype « péricyte-like ». De façon intéressante, nous avons aussi observé une expression de SLUG dans les cultures de GSC natives, au sein d'une sous-population plus minoritaire. En effet, notre analyse via les rapporteurs fluorescents pSLUG-GFP et p α SMA-mCherry démontre l'existence d'une population GFP⁺/mCherry⁺ à l'état natif : les cellules SLUG⁺ seraient associées à l'expression de α SMA, et pourraient définir une identité mésenchymateuse périvasculaire aux GSC. Les co-cultures avec les CE démontrent aussi une induction physiologique de SLUG, sans la nécessité de l'activation par NICD. Ces observations suggèrent que SLUG peut être induit par d'autres effecteurs. Etant donné l'influence directe de la signalisation TGF β sur l'expression de SLUG dans d'autres contextes, notamment lors de l'EMT (Phillips and Kuperwasser 2014) ; nous avons analysé dans une étude encore préliminaire, l'effet d'un traitement au TGF β sur le phénotype des cultures : nous avons pu observer une induction significative de SLUG dans ce contexte. Ces observations sont à mettre en lien avec les études ayant démontré la transdifférenciation péricytaire des GSC. Le groupe de J Rich a en effet montré que le traitement des GSC au TGF β est inducteur du phénotype G-péricyte (pour glioma-derived pericyte) (Cheng et al. 2013). Nous observons une induction de SLUG, ce qui justifie l'hypothèse que SLUG puisse contrôler la transition en GSC « péricyte-like ». Nos données transcriptomiques de la co-culture entre GSC et CE confirment également cette hypothèse de manière indirecte. En effet, les analyses bioinformatiques de ce transcriptome révèlent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans les signalisations TGF β et BMP. La signalisation Notch est également induite physiologiquement dans ce système. Ceci suggère qu'une coopération entre ces différents effecteurs puisse réguler l'expression de SLUG dans les GSC. Après co-cultures, les GSC présentent un phénotype « péricyte-like » augmenté, notamment par l'expression de α SMA,

et VCAM1. Ces co-cultures ont également mis en évidence des gènes candidats potentiellement importants dans le dialogue entre GSC et CE. Une analyse approfondie en qPCR et à l'échelle protéique sera nécessaire pour valider ces données et examiner en détail l'implication de ces réseaux de gènes.

Concernant l'étude mécanistique de SLUG en gain/perte de fonction, les résultats sont encore préliminaires du fait de mises au point importantes qui ont nécessité du temps. Ils seront reproduits d'ici les mois prochains. Néanmoins, nous avons observé que la surexpression de SLUG induit une diminution significative de la croissance des cellules. Il se pose alors la question de comment SLUG médie cette diminution. Nous avons aussi observé que SLUG n'impacte pas sur l'expression de Olig2, ce qui suggère de multiples mécanismes pouvant expliquer la diminution de la croissance. Etant donné ses rôles multiples, SLUG pourrait induire de nombreux effets différents. Notre étude par inhibition est également encore préliminaire. Cependant, nous avons observé que l'inhibition sélective de SLUG en aval de NICD induit une augmentation de CD31 dans les cultures. Ceci montre que SLUG inhibe CD31 dans les GSC. Ce résultat très intéressant suggère que SLUG pourrait promouvoir un phénotype mésenchymateux périvasculaire en inhibant un programme endothélial dans les GSC. Ces résultats peuvent être liés à la non induction protéique de l'Ang2 suite à NICD: nous sommes actuellement en train d'analyser plus en détail cette potentielle régulation de SLUG.

Afin d'élucider avec plus de clarté la fonction de SLUG, il faut envisager l'étude *in vitro* et *in vivo* approfondie de la surexpression et inhibition, aux moyens respectifs des constructions lentivirale GFP⁺ et lignées CRISPR. Nous comptons également effectuer une analyse transcriptomique que la surexpression de SLUG dans les GSC : elle pourrait nous permettre d'avoir une vue globale des régulations moléculaires. Couplée à une approche en Chip-Seq, nous pourrions identifier les cibles directes de SLUG dans les GSC. De manière comparable à TAL1, nous envisageons aussi une étude *in vitro* plus fonctionnelle et physiologique par des co-cultures en matrice de matrigel ou en collagène.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que SLUG est impliqué dans la plasticité neurovasculaire des GSC. Précisément, il coordonnerait le programme « péricyte-like » en réprimant certains gènes d'identité endothéliale.

- **Existe-t-il un lien entre TAL1 et SLUG ?**

Etant donné leurs fonctions communes dans des processus de vascularisation physiologique et leur induction après NICD, la question d'un lien entre ces deux protéines s'est posée de manière logique. Nous n'avons pas vraiment répondu à cette question.

Néanmoins, nos observations *in vitro* montrent qu'ils peuvent être exprimés dans une même population de cellules suite à l'activation de Notch1. Par l'approche en gain de fonction, il apparaît qu'ils ne se régulent pas l'un l'autre. Par l'approche en perte de fonction après activation de NICD, SLUG réprimerait TAL1 dans Gb4 uniquement. Ce résultat très préliminaire doit être confirmé dans plusieurs lignées et de manière reproductible. *In vivo*, nous n'avons pas observé de lien entre les cellules SLUG⁺ et TAL1⁺ : cependant les deux populations de cellules interagissent très étroitement au sein des tumeurs dans des zones périvasculaires. TAL1 étant associé à un phénotype plus endothélial et SLUG étant associé à un phénotype péricytaire ; ces observations sont en discordance avec nos données *in vitro* dans les GSC. Ceci nécessite une analyse plus approfondie sur un plus grand nombre de tumeurs, afin d'éventuellement identifier une sous-population très minoritaire de cellules SLUG⁺/TAL1⁺. La discordance avec nos données *in vitro* peut aussi s'expliquer par le fait que les GSC expriment l'isoforme TAL1-PP22. Hors chez les patients, nous ne pouvons pas savoir quelle isoforme est exprimée, mais il est fortement probable que ce soit la forme complète PP42. L'observation de cellules TAL1⁺/PDGFR β ⁺ sous tend également qu'une population TAL1⁺ présente un phénotype périvasculaire mésenchymateux minoritaire par rapport au phénotype endothélial. Cette sous-population pourrait exprimer la PP22 selon cette hypothèse. L'analyse du statut amplifié des cellules TAL1⁺ s'avère également importante pour examiner si elles peuvent être issues d'une transdifférenciation vasculaire et ainsi mieux analyser le lien avec SLUG *in vivo* chez les patients.

En conclusion, cette étude a permis d'analyser la contribution potentielle de SLUG et TAL1 à la transdifférenciation neurovasculaire des GSC. Nous avons notamment mis en évidence un rôle central *in vivo* chez les patients, et entrevu *in vitro* les possibles régulations sous-jacentes à ces deux facteurs de transcription.

Partie III

Modulation de l'activité du protéasome dans les GSC par la signalisation Notch1

Contexte

La dernière partie expérimentale de ce travail s'appuie à nouveau sur notre première étude et les conséquences de l'activation constitutive de la signalisation Notch1 dans les GSC. Préalablement à la transduction de NICD, notre analyse de l'état d'activation de cette cascade a révélé une faible expression des gènes canoniques Hes/Hey dans les GSC natives. Afin d'étudier plus en détail les régulations de cet axe canonique en aval de Notch1, nous avons réalisé une série de transfections des gènes Hes/Hey dans les cultures de GSC natives en prolifération, avec différents vecteurs d'expression pour ces protéines. Contre toute attente et à la différence d'autres facteurs de transcription, nous avons rencontré des difficultés à détecter au niveau protéique cette surexpression.

Au cours de la spécification neurale embryonnaire, l'expression des protéines Hes/Hey est régulée à de multiples niveaux et de façon très dynamique ; notamment par phosphorylation, et dégradation rapide par le système Ubiquitine-Protéasome (Kageyama, Shimojo, and Imayoshi 2015; Imayoshi and Kageyama 2014). Nos observations dans les cultures de GSC suggèrent également une expression finement régulée de ces facteurs, qui pourraient être dégradés par la machinerie du protéasome.

Le système Ubiquitine-Protéasome (UPS) constitue un ensemble protéique responsable de la dégradation des protéines intracellulaires endommagées. Il implique 1- la fixation de l'ubiquitine sur les substrats protéiques cibles via une cascade enzymatique spécifique ; puis 2- l'adressage des substrats polyubiquitinylés au protéasome 26S qui catalyse leur dégradation. Le protéasome 26S est une machinerie multiprotéique complexe composée d'une sous-unité catalytique 20S et de deux sous-unités régulatrices 19S (Adams 2003). L'activité de ce complexe est contrôlée de manière très dynamique, et sa dérégulation est associée à de nombreuses pathologies (Schmidt and Finley 2014). Dans les gliomes, le système UPS apparaît comme un acteur central à la survie et à la prolifération des cellules tumorales. Il a notamment été impliqué dans la suractivation des signalisations EGFR, PDGFR et TGF β (Vlachostergios, Voutsadakis, and Papandreou 2013). Les régulations moléculaires de l'activité du protéasome dans des cultures primaires de GSC demeurent encore peu explorées.

Hypothèses

Nos données expérimentales sur l'expression des protéines Hes/Hey nous ont fait émettre l'hypothèse que l'activité du protéasome est très élevée dans les cultures de GSC. Après transduction de NICD, nous observons une induction de Hey1, mais également

d'autres facteurs de transcription au contrôle de la transition « péricyte-like ». Nous avons alors formulé la seconde hypothèse que l'activation de Notch1 réduit l'activité du protéasome. Via la dérégulation du protéasome, Notch1 favoriserait l'expression de certains des effecteurs majeurs de la « signature Notch » (dont Hey1), en empêchant leur dégradation.

Afin de tester ces deux hypothèses, nous avons opté pour une approche *in vitro* par transfection d'un rapporteur fluorescent de l'activité du protéasome dans les GSC. L'effet de Notch1 a ensuite été testé dans les GSC par co-transfection de NICD avec ce rapporteur.

Méthodologie

Les techniques utilisées ici sont identiques à celles évoquées dans la Partie I et II. Les cultures Gb4 et Gb7 ont été cultivées en conditions neurosphères normoxiques et en milieu de prolifération. Les transfections sont effectuées selon le protocole de nucléofection mis au point et validé précédemment sur les cultures (Kit Amaxa Mouse Neural Stem Cells). Pour mesurer l'activité du protéasome, le plasmide Proteasome Sensor Vector a été transfecté (pZsProSensor-1, Clontech) (**Figure 54**). Cette construction code pour le gène de la protéine fluorescente ZsGreen (isolée du corail *Zoanthus sp*), fusionnée au domaine de dégradation MODC (Mouse Ornithine DeCarboxylase). Le motif MODC adresse la ZsGreen directement au protéasome 26S, de manière Ub indépendante. Par analyse directe de la fluorescence ZsGreen, l'activité du protéasome peut donc être mesurée. Ainsi, une cellule ayant un protéasome actif présentera une fluorescence ZsGreen faible ; alors qu'une cellule au protéasome inactif présentera une fluorescence ZsGreen augmentée. Pour valider la transfection et l'activité rapporteur de ce vecteur, nous avons traité les cellules au MG132 (2 μ M), un inhibiteur chimique puissant et réversible du protéasome 26S. Pour mesurer l'effet de Notch1 sur l'activité du protéasome, les plasmides pCDNA3.1 Contrôle/NICD ont été co-transfectés avec la construction pZsProSensor-1. Pour contrôler l'efficacité globale de transfection, le plasmide pCMV-GFP a été utilisé. La fluorescence de la ZsGreen a été mesurée par cytométrie (Filtre GFP) (BD FACSCalibur). Les cellules vivantes ont été photographiées grâce à un microscope inversé à contraste de phase et fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Pour les immunomarquages en IF, le protocole détaillé précédemment a été utilisé (Guichet et al. 2015).

Anticorps utilisés

Nom	Espèce	Référence	Dilution IF	Dilution WB	Distributeur
Ki67	Mouse	556003	1:500	NT	BD Pharmingen

Tableau 8 – Anticorps Utilisés.

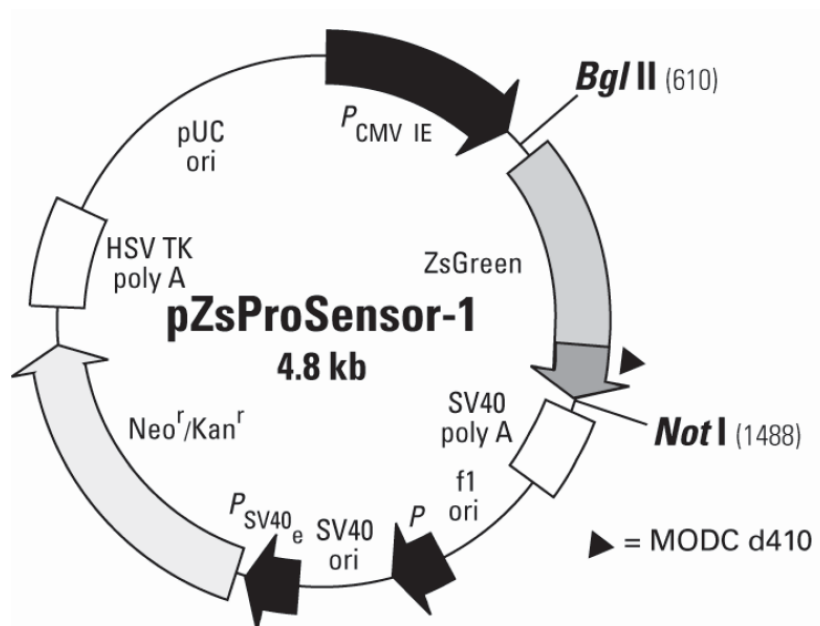


Figure 54 - Carte de restriction du plasmide Proteasome Sensor Vector (adapté de la fiche technique Clontech) : Le domaine d'adressage au protéasome MODC a été fusionné à la protéine fluorescente ZsGreen, permettant ainsi de mesurer directement par fluorescence l'activité du protéasome.

Résultats

1. L'activité du protéasome est élevée dans les GSC

Afin de tester l'hypothèse d'un protéasome élevé dans les GSC, nous avons tout d'abord transfecté la construction pZsProsensin-1, et contrôlé sa validité par traitement des cellules au MG132 (2 μ M). De manière remarquable, l'expression de la ZsGreen est restreinte à une sous-population minoritaire de cellules Gb4 (2,18%). Après traitement au MG132, nous validons l'efficacité du vecteur, avec 41,42% de cellules ZsGreen⁺ (**Figure 15A**). L'activité du protéasome est donc élevée dans les GSC natives.

2. L'activation de Notch1 diminue l'activité du protéasome dans les GSC

Après co-transfection des constructions NICD et pZsProsensin-1, la population ZsGreen⁺ augmente d'un facteur 10 par rapport à la condition contrôle (**Figure 15B**). Nous observons également un décalage de la population ZsGreen⁺ quand Notch1 est activé (**Figure 15C**). Après quantification de la fluorescence dans 4 expériences indépendantes (**Figure 15D**), nous en concluons que l'activation de Notch1 induit une inhibition significative de l'activité du protéasome. Ces observations sont confirmées par l'observation directe des cellules vivantes au microscope inversé (**Figure 15E**).

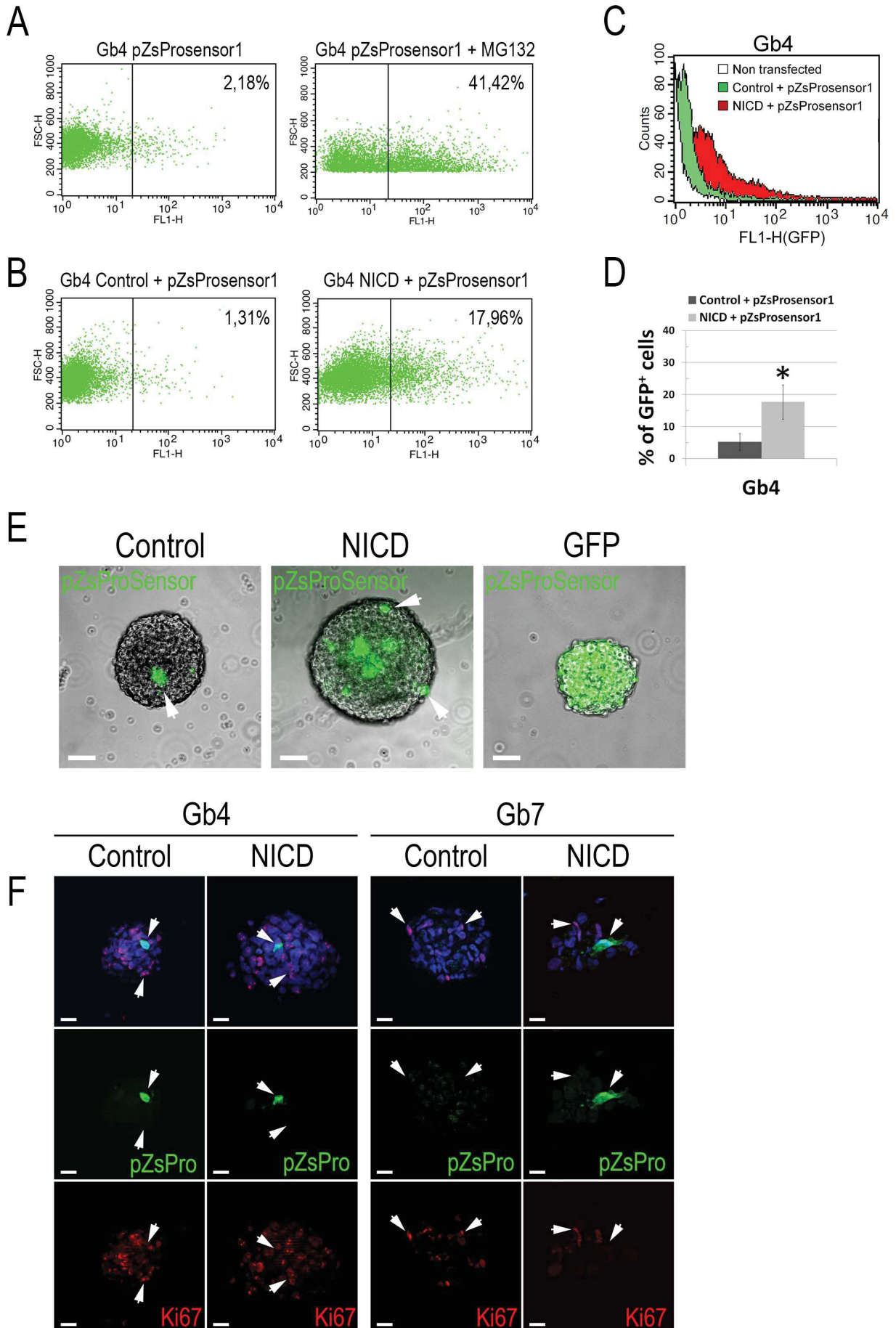
3. Les GSC au protéasome inactif présentent un marquage Ki67 diminué

La dégradation des protéines intracellulaires est intimement liée à la prolifération des cellules. En effet, le système UPS module activement la dynamique d'expression d'effecteurs requis pour la progression du cycle cellulaire ; comme les protéines des « checkpoints » ou les cyclines (Enenkel 2014). L'activation de Notch1 dans les GSC induit une forte diminution de leur croissance en culture, et une diminution de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 (**Résultats, Partie I**). Notch1 induisant également l'inhibition de l'activité du protéasome dans les GSC, nous avons examiné la possibilité d'un lien entre inhibition du protéasome et diminution de la prolifération dans les GSC. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé l'expression du marqueur Ki67 dans les GSC pZsGreen⁺ après l'activation de Notch1. Après analyse par IF, nous observons que les cellules pZsGreen⁺ n'expriment plus Ki67, que ce soit dans les conditions contrôle ou avec NICD (**Figure 15F**). Cette analyse préliminaire suggère qu'une activité du protéasome diminuée est corrélée à un arrêt de la prolifération des GSC.

Légende Figure 15 : L'activation de Notch1 induit une diminution de l'activité du protéasome

(A)(B)(C)(D) Analyse par FACS de la population ZsGreen⁺ (mesurée en GFP) 72h après co-transfection des plasmides pCDNA3.1Contrôle/NICD avec le plasmide rapporteur de l'activité du protéasome (pZSProsensor-1, Clontech), dans Gb4. **(A)** Dot plots représentant la population ZsGreen⁺ en conditions natives, puis après traitement des cellules au MG132 (2μM sur 24h), qui inhibe l'activité du protéasome. Ce traitement induit une forte augmentation de la population ZsGreen⁺, et constitue un contrôle positif de transfection et de l'activité rapporteur du plasmide transfecté. **(B)** Dot plots représentant l'effet de l'activation de Notch1 sur la population ZsGreen⁺ dans Gb4 : celle-ci est augmentée 10 fois par rapport à la condition contrôle. **(C)** Diagramme en histogramme représentant le décalage de la population ZsGreen⁺ (mesurée en GFP) après transfection de NICD, en comparaison de la transfection contrôle, et de cellules non transfectées. **(D)** Quantification en % de l'induction de la population GFP⁺ (ZsGreen⁺), les données ont été combinées entre 4 expériences indépendantes effectuées sur Gb4, et la significativité a été évaluée par un test t de student : ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p \leq 0,05$. Cette expérience a également été effectuée sur Gb7 et montre la même tendance. **(E)** Photos de sphères Gb4 en contraste de phase et fluorescence représentatives de l'effet de Notch sur l'expression de la ZsGreen. La GFP a été transfectée comme contrôle positif de la fluorescence et montre une efficacité de transfection élevée. Echelles 100μm. **(F)** Analyse en IF de l'expression de Ki67 dans les cellules pZsGreen⁺ après activation transitoire de Notch1 dans Gb4 et Gb7. Les flèches indiquent le phénotype de cellules pZsPro⁺ et pZSPro⁻. Echelles 20μm.

Figure 15



Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous montrons à l'aide d'un rapporteur fluorescent que l'activation de la signalisation Notch1 influe sur la machinerie du protéasome dans les cultures de GSC. Ces données sont significatives dans mon travail de thèse : j'ai pu établir un lien entre une voie de signalisation majeure, la voie Notch, et un mécanisme clé de la dégradation des protéines dans les GSC. En effet, les régulations moléculaires du protéasome sont encore peu étudiées dans les cultures primaires de GSC et ces résultats originaux ouvrent la voie à un axe de recherche prometteur. Du fait de résultats encore préliminaires, il s'avère nécessaire de confirmer et approfondir certaines hypothèses. Ces observations amènent notamment aux questions suivantes:

- **Comment expliquer l'activité élevée du protéasome dans les GSC natives ?**

La première observation notable est l'activité élevée du protéasome dans les cultures de GSC natives *in vitro*. De nombreuses études ont démontré la contribution du système UPS à la malignité des cellules tumorales. En effet, une dérégulation de l'activité de ce complexe serait nécessaire pour favoriser l'expression d'oncogènes, et réduire la quantité de protéines suppresseurs de tumeurs (Mani and Gelmann 2005). Ceci se traduit généralement par la modulation de l'expression des ubiquitines ligases (Ub-ligases), enzymes qui catalysent l'ubiquitination et permettent l'adressage de leurs cibles spécifiques au protéasome. Dans le contexte tumoral, les composants du protéasome 26S sont quant à eux fréquemment surexprimés pour répondre à la forte demande des Ub-ligases (Grigoreva et al. 2015). De nombreuses études se sont focalisées sur le protéasome comme cible thérapeutique des cellules cancéreuses. Le bortezomib, un inhibiteur du protéasome déjà utilisé chez les patients atteints de leucémies, permet notamment de cibler spécifiquement les GSC en synergie avec d'autres thérapies (Asklund et al. 2012).

Le haut niveau d'activité du protéasome dans nos GSC s'inscrit donc dans la logique de ces données bibliographiques, et corrèlerait aux besoins d'une synthèse protéique dynamique associée à la malignité des cellules. Nos observations ont été faites à partir des cultures Gb4 et Gb7 ; mais étant donné l'hétérogénéité des cultures de GSC, il sera intéressant d'analyser *in vitro* dans d'autres lignées si ce haut niveau d'activité protéasomique est retrouvé.

- **Par quels mécanismes Notch1 inhibe le protéasome dans les GSC ?**

Nous montrons que l'activation de Notch1 induit une diminution de l'activité du protéasome par l'augmentation de la population pZsGreen⁺. La question des mécanismes moléculaires sous-jacents se pose alors de manière logique. En effet, l'utilisation du rapporteur pZsProsensin-1 permet une observation directe de l'activité du protéasome mais ne donne pas d'indications sur les altérations moléculaires de la machinerie. Néanmoins, le motif MODC adresse la ZsGreen directement au protéasome 26S de manière Ub-indépendante, ce qui suggère que Notch1 affecte directement le complexe 26S et sa capacité de dégradation. Pour analyser en détail ces effets, il sera nécessaire d'effectuer des analyses biochimiques approfondies. Par exemple, pour analyser les répercussions sur la sous-unité catalytique 20S, nous pourrions envisager des tests d'activité Sur Gel (In Gel Activity Functional Assay) qui permettent d'analyser des potentielles modifications structurales (Elsasser, Schmidt, and Finley 2005). Les deux sous-unités régulatrices 19S pourraient également être affectées par NICD, et cette possibilité doit être analysée dans de futures expériences. Le protéasome est un complexe hautement dynamique qui peut transiter entre la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire selon les besoins cellulaires (Chowdhury and Enekel 2015). Nous pourrions donc analyser ce paramètre dans les GSC après activation Notch1, et examiner si le protéasome subit une relocalisation particulière pouvant expliquer une altération de sa fonction. Pour se faire, nous envisageons l'utilisation de sondes fluorescentes marquant le protéasome et permettant une observation directe de ces phénomènes (MV151 Proteasome Probe, Activity-based Probes) (Carmony and Kim 2013; de Jong et al. 2012).

L'assemblage du protéasome fait intervenir des mécanismes extrêmement complexes ; et sa biogénèse est régulée par l'action transcriptionnelle de facteurs spécifiques. Précisément, les facteurs de transcription Nrf1 et Nrf2 sont induits en réponse à son inhibition, puis activent la transcription des gènes nécessaires à la biogénèse du protéasome (Livneh et al. 2016). Il sera donc intéressant d'examiner le profil d'expression de ces régulateurs dans les GSC ; à la fois en situation où le protéasome est altéré (activation de Notch1), et également en situation où le protéasome est très actif (GSC natives).

Enfin, il a été démontré qu'après activation de la signalisation Notch puis effet transcriptionnel avec le complexe MAML/RBPJ- κ , NICD est rapidement dégradé par le protéasome afin de moduler finement le niveau de signalisation (Kopan 1999). Dans un scénario particulier dans les GSC, il se pourrait que l'activation forte de Notch1 empêche sa propre dégradation par une inhibition directe ou indirecte de l'activité du protéasome : cette boucle d'auto-régulation positive permettrait de maintenir Notch actif et d'engendrer les effets phénotypiques que nous avons observé, notamment l'induction des gènes Hey1 et

Hey2. Néanmoins, pour tester cette hypothèse, il faut au préalable comprendre les mécanismes moléculaires d'inhibition du protéasome par Notch1.

- **Que représente la sous-population minoritaire pZsGreen⁺ au sein des GSC ?**

Nous avons observé de manière très intéressante l'existence d'une sous-population minoritaire de cellules pZsGreen⁺ au sein des GSC. Il se pose alors la question de la fonction de ces cellules ayant une activité du protéasome réduite. Nous avons aussi mis en évidence, de manière préliminaire, que ces cellules présentent un marquage Ki67 diminué. Ceci suggère un lien entre l'activité du protéasome et les capacités prolifératives de cette sous-population de cellules *in vitro*. Il faudra néanmoins approfondir ces résultats par des études complémentaires : nous pourrions notamment effectuer des analyses de cycle cellulaire par cytométrie dans la fraction pZsGreen⁺.

Une hypothèse séduisante découlant de ces observations serait que cette fraction de cellules représente des GSC en quiescence ou dormance, et donc arrêtées dans leur progression du cycle cellulaire. Cette idée est en accord avec l'effet anti-prolifératif de la transduction de NICD dans les GSC, et l'effet inhibiteur de NICD sur le protéasome. Chez la levure, le protéasome subit des relocalisations intracellulaires en fonction des phases de croissance ou quiescence (Chowdhury and Enenkel 2015). L'utilisation des sondes fluorescentes marquant le protéasome se révélerait à nouveau utile pour examiner d'éventuelles différences entre les cellules pZsGreen⁺ et les cellules pZsGreen⁻ ; et analyser la dynamique de régulation intracellulaire du protéasome dans les GSC.

Une étude récente a utilisé une approche semblable à la notre par utilisation de rapporteurs dans des cultures tumorales mammaires. Les auteurs observent également une sous-population minoritaire de cellules ayant une faible activité du protéasome ; et ils démontrent que cette fraction de cellules est enrichie en caractéristiques de cellules souches cancéreuses. En effet, ces cellules au protéasome inhibé se diviseraient de manière asymétrique pour donner naissance à la fois à des cellules au protéasome inactif, et à des cellules au protéasome actif. Elles présenteraient également des caractéristiques de CSC *in vitro*. Enfin, ils montrent aussi que ces cellules ont une capacité tumorigène et métastatique augmentée après xénogreffes. En perspectives de leur étude, ils valident aussi leurs outils rapporteurs du protéasome sur des cultures primaires de GSC et montrent une capacité tumorigène augmentée *in vivo* pour la fraction au protéasome inactif (Stacer et al. 2015). Nos résultats *in vitro* corroborent à ces observations : les GSC au protéasome inactif pourraient constituer une fraction quiescente, et pourraient représenter les véritables GSC à l'origine de progéniteurs prolifératifs qui sont majoritaires dans les cultures. Nos données apportent aussi des précisions moléculaires sur ces processus, en plaçant le programme Notch au

centre de ces régulations. Enfin, l'activité du protéasome pourrait constituer un bon marqueur d'enrichissement des cultures de GSC.

- **Quel est le lien entre l'activité du protéasome et le phénotype « péricyte-like » des cellules ?**

L'inhibition du protéasome par Notch1 dans les GSC est à relier au phénotype GSC « péricyte-like » également induit par Notch1. Le fait que le protéasome soit inhibé par Notch1 pourrait favoriser directement ou indirectement l'expression des gènes indispensables à la transition neurovasculaire des GSC, en empêchant leur dégradation. Pour tester cette hypothèse, il faudrait inhiber la machinerie du protéasome dans les GSC natives au moyen d'inhibiteurs chimiques tels que le MG132 ; et observer l'expression des protéines « signature » du phénotype « péricyte-like ». Précisément, nous pourrions envisager que SLUG et TAL1 soient exprimés grâce à cette inhibition du protéasome. L'induction forte de Hey1 et Hey2 après NICD pourrait également être liée à cette altération du protéasome. En effet, il a été montré par les travaux du groupe de R Kageyama que les protéines Hes/Hey sont régulées de manière très dynamique, notamment par une expression oscillatoire médiée par le système UPS (Kageyama, Shimojo, and Imayoshi 2015). Par une boucle d'auto-régulation positive, l'activation de Notch1 induirait le maintien de ces protéines, par l'intermédiaire du protéasome.

En retour, il sera également judicieux d'analyser l'impact de la surexpression de ces différentes protéines sur l'activité du protéasome. Pour SLUG et TAL1, l'utilisation des constructions lentivirales GFP validées pourra permettre d'examiner cette hypothèse. Concernant les gènes Hey, la mise au point de tels outils de surexpression s'avère nécessaire. En effet, nous avons eu des difficultés à surexprimer ces protéines de manière transitoire : la mise au point de constructions plus stables pourrait permettre de contourner ce problème. Il faudra notamment coupler cette surexpression à l'inhibition du protéasome, afin de valider ou invalider l'hypothèse d'une dégradation constitutive de ces protéines par les GSC.

La modulation de l'activité du protéasome pourrait également être liée aux propriétés fonctionnelles des GSC « péricyte-like » : nous pourrions alors envisager que les cellules au protéasome inactif interagissent étroitement avec les cellules endothéliales au sein des niches périvasculaires. En effet, le fait que les cellules pZsGreen⁺ puissent représenter une population quiescente de cellules corrèle avec l'idée du maintien de ce phénotype par les cellules endothéliales. Cette induction d'un phénotype quiescent par les cellules endothéliales a été observée lors de notre étude par les co-cultures, et a été montrée dans d'autres études (Ottone et al. 2014). Le contact avec les cellules endothéliales pourrait ainsi

favoriser l'inhibition du protéasome dans les GSC. En retour, la population pZsGreen⁺ pourrait impacter sur le comportement des cellules endothéliales et promouvoir la néovascularisation. Une étude publiée en 2013 appuie ces hypothèses. En effet, après inhibition du protéasome dans des GSC par traitement au bortezomib, les auteurs démontrent que cet inhibiteur induit bien leur apoptose, mais également que les GSC résistantes stimulent l'angiogénèse des cellules endothéliales par l'induction de la signalisation HIF-1 α et sécrétion de VEGF. Ces cellules résistantes pourraient correspondre aux cellules pZsGreen⁺ qui favoriseraient la neovascularisation *in vivo* (Bota et al. 2013). Afin de tester toutes ces hypothèses, il sera donc relevant d'effectuer des co-cultures entre des GSC transfectées avec le rapporteur pZsProSensor-1 et des cellules endothéliales. Nous pourrions d'abord tester ceci dans un système simple en adhérence, puis dans un système plus fonctionnel en matrice de matrigel ou bien en trois dimensions en matrice de collagène.

Enfin, une analyse *in vivo* après transplantations chez la souris nude s'avère nécessaire pour répondre à l'ensemble de ces questions. Pour cela, il nous faut tout d'abord établir des lignées stables rapporteur de l'activité du protéasome. Au cours de notre étude, nous avons tenté cette approche par transfection puis sélection antibiotique des cultures. Malheureusement, ce système ne s'est pas révélé efficace, les cultures n'étant plus enrichies en cellules transfectées par la construction. Nous avons également mis au point un système de surexpression stable de la GFP au moyen de constructions Piggybac. Ce système utilise la technologie des transposons pour assurer une intégration stable dans le génôme. Nous avons notamment utilisé ce système afin de tester la tumorigénicité de la lignée Gb21 caractérisée au cours de ces travaux. Après analyse préliminaire des xéno greffes, il semblerait que ce système soit efficace et durable *in vivo* après transplantation. Nous envisageons donc son utilisation pour greffer en intracranien des GSC rapporteur de l'activité du protéasome. L'analyse de ces xéno greffes apportera des informations de premier plan sur la contribution du protéasome au phénotype GSC « péricyte-like » *in vivo*.

CONCLUSION GENERALE

Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs cérébrales primaires les plus agressives et sont caractérisées par une vascularisation très active en réponse à l'hypoxie et à la nécrose. Il est désormais reconnu qu'il existe au sein des tumeurs des sous-populations de cellules multipotentes aux propriétés tumorigènes. Ces cellules souches de glioblastomes (GSC) assurent le maintien de la tumeur et favoriseraient la résistance aux agents thérapeutiques. Les régulations complexes de leur phénotype impliquent l'activation intrinsèque de réseaux de gènes oncogéniques ; et l'inhibition de programmes suppresseurs de tumeurs. Ces gènes sont activement régulés par des signalisations développementales qui, dans la plupart du temps sont fortement suractivées dans le contexte tumoral. Parmi celles-ci, la signalisation Notch apparaît cruciale au maintien du réservoir de GSC et à la progression des GBM. Néanmoins, des résultats divergents ont été observés selon les études et le mode d'action moléculaire de Notch dans les GSC reste encore à être élucidé.

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier les régulations de la voie Notch1 dans des cultures primaires de GSC isolées et caractérisées au sein du laboratoire. Une analyse préliminaire du statut d'activation des composants de l'axe Notch1 a tout d'abord permis d'observer une faible expression des gènes canoniques Hes/Hey dans les GSC. Nous avons ensuite examiné les conséquences de l'activation constitutive de cette signalisation, par transduction lentivirale du domaine NICD dans les GSC. Cette première étude a révélé une fonction inattendue de Notch1 sur le phénotype des GSC. En effet, nous montrons que Notch1 induit une différenciation vasculaire des GSC en cellules « péricyte-like ». *In vitro*, ceci se traduit par une forte diminution de la capacité proliférative des cellules, une diminution de leur migration, ainsi que la diminution de l'expression de facteurs de transcription nécessaires à leur auto-renouvellement (Olig2, Sox2, Ascl1). Les GSC activées par NICD expriment notamment des marqueurs caractéristiques de cellules péricyaires (α SMA, PDGFR β , et NG2) ; des molécules d'adhérence typiques des cellules vasculaires (ICAM1, VCAM1) ; et sécrètent des médiateurs angiogéniques majeurs (MMP9, IL8). *In vivo* après xénogreffes orthotopiques chez la souris nude, les GSC transduites par NICD augmentent la vascularisation des tumeurs, expriment des marqueurs périvasculaires ; et enfin stabilisent le réseau vasculaire par une interaction étroite avec les cellules endothéliales murines.

Cette première étude place donc le programme Notch1 au centre de la transition neurovasculaire des GSC : ces données favorisent l'idée d'une plasticité vers une identité péricytaire et confirment certaines observations faites par d'autres groupes (Cheng et al. 2013; Scully et al. 2012). L'analyse transcriptomique des GSC activées par Notch1 a révélé une signature moléculaire complexe et plusieurs gènes candidats intéressants ont ainsi été sélectionnés afin d'examiner les modalités moléculaires de cette transition neurovasculaire.

Le second objectif de ce travail a donc été d'étudier les mécanismes transcriptionnels sous-jacents à l'activation de Notch1 dans les GSC. A partir de nos données transcriptomiques, nous nous sommes orientés vers les facteurs de transcription SLUG et TAL1. Par trois approches complémentaires, nous avons analysé leur contribution au phénotype « péricyte-like » des GSC. Dans un premier temps, nous montrons que SLUG et TAL1-PP22 sont exprimés suite à l'activation de Notch1 dans les GSC *in vitro*, et *in vivo* dans des cellules périvasculaires type « péricyte-like » après xéno greffes sous-cutanées. Nous avons ensuite analysé les conséquences du gain/perte de fonction de SLUG et TAL1-PP22 dans les GSC. Nous montrons notamment que la surexpression de TAL1-PP22 et SLUG diminue significativement la croissance des GSC *in vitro*. Nous montrons aussi que TAL1-PP22 inhibe ID4 en aval de Notch1, expliquant en partie la diminution de la croissance des GSC. De plus, TAL1-PP22 active MMP9 ainsi que des gènes caractéristiques d'une identité mésenchymateuse/vasculaire (POSTN, ITGA8 et IL-33). Ces observations positionnent TAL1 au centre de la transition vasculaire des GSC, notamment par régulation du « switch » angiogénique des MMP observé lors de notre première étude. En aval de NICD, nous montrons que SLUG inhibe CD31, et favoriserait le phénotype « péricyte-like » des GSC en réprimant un programme endothélial ce qui pourrait expliquer la diminution de la croissance observée. A partir d'un système de co-cultures entre GSC et CE, nous montrons aussi que l'expression de SLUG peut être induite physiologiquement par le contact avec les CE. Ce contact favorise le phénotype « péricyte-like » des GSC, et induit l'expression de gènes impliqués dans les signalisations Notch, TGF β et BMP. Directement à partir d'échantillons humains de GBM, nous identifions des sous-populations vasculaires distinctes de cellules TAL1⁺ et SLUG⁺. Les cellules TAL1⁺ présentent des caractéristiques endothéliales alors que les cellules SLUG⁺ présentent des caractéristiques péricytaire. Enfin, une sous-population de cellules SLUG⁺ présente une amplification du locus EGFR, démontrant leur origine tumorale. SLUG est donc associé *in vivo* à une petite proportion de cellules issues d'une transdifférenciation vasculaire.

Ces résultats démontrent pour la première fois l'implication de SLUG et TAL1 dans la régulation phénotypique des GSC *in vitro* et dans la vascularisation des GBM *in vivo*. Précisément, ces données suggèrent fortement qu'ils seraient au centre de la plasticité neurovasculaire des GSC en aval de Notch1 par le contrôle de l'expression de gènes mésenchymateux et/ou répression de gènes endothéliaux. Ces travaux apportent un nouvel éclairage concernant les modalités transcriptionnelles sous-jacentes à la transdifférenciation vasculaire des GSC.

Enfin, toujours dans l'optique d'une compréhension moléculaire des effets de Notch1 sur les GSC, nous montrons de manière inattendue que cette signalisation influe sur la machinerie du protéasome. Par une approche utilisant un rapporteur de l'activité du protéasome, nous avons tout d'abord observé une activité très élevée du protéasome dans les GSC natives. Puis, après transfection de Notch1 dans les GSC, nous montrons que cette activité est diminuée, et pourrait être liée à une diminution de la prolifération des cellules.

Ces résultats montrent pour la première fois dans les GSC *in vitro* que la signalisation Notch régule la machinerie du protéasome. Cette étude amène à de nombreuses perspectives intéressantes à développer dans les mois prochains. De manière plus générale, un approfondissement des connaissances sur le fonctionnement du protéasome dans les GSC ouvre des perspectives thérapeutiques particulièrement intéressantes dans les GBM.

L'ensemble de ces travaux apporte des précisions de premier plan concernant les régulations moléculaires de la signalisation Notch dans les GSC ; et les modalités transcriptionnelles du contrôle de la plasticité neurovasculaire des GSC. En effet, les études ayant démontré la transdifférenciation endothéliale ou péricytaire des GSC ne se sont pas ou peu focalisées sur l'étude de facteurs de transcription, et nos résultats apportent des preuves de l'implication de SLUG et TAL1 dans ces processus. A terme, une meilleure compréhension fondamentale de cette plasticité pourrait contribuer à l'élaboration de thérapies efficaces au ciblage de la néovascularisation dans les GBM.

De nombreuses perspectives sont à envisager à la suite de ces travaux, en particulier des études mécanistiques *in vivo* après xéno greffes intracrâniennes de nos cultures de GSC. L'hétérogénéité de ces cellules complique la reproductibilité de nos résultats mécanistiques. Nos cultures Gb4, Gb7 et Gb21 ont été caractérisées en détail et leurs propriétés de CSC ont été validées. Néanmoins, il s'avère nécessaire d'intégrer de manière comparative leurs caractéristiques moléculaires, transcriptomiques et phénotypiques ; afin de déterminer leur profil selon la classification moléculaire de Verhaak. Ce travail est actuellement en cours au sein de l'équipe et permettra d'apporter de la clarté à nos observations.

Un approfondissement des résultats sur les échantillons humains de GBM est également nécessaire. Il sera notamment important de corréliser nos observations sur les coupes à différents sous-types de GBM selon les classifications moléculaires disponibles. Une étude comparative entre des GBM naïfs de traitements et des GBM récidivants après différentes thérapies sera aussi intéressante à la compréhension des mécanismes observés.

BIBLIOGRAPHIE

- Ables, J. L., J. J. Breunig, A. J. Eisch, and P. Rakic. 2011. 'Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain', *Nat Rev Neurosci*, 12: 269-83.
- Adams, J. 2003. 'The proteasome: structure, function, and role in the cell', *Cancer Treat Rev*, 29 Suppl 1: 3-9.
- Aguirre, A., M. E. Rubio, and V. Gallo. 2010. 'Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal', *Nature*, 467: 323-7.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke. 2003. 'Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 3983-8.
- Alcantara Llaguno, S., J. Chen, C. H. Kwon, E. L. Jackson, Y. Li, D. K. Burns, A. Alvarez-Buylla, and L. F. Parada. 2009. 'Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model', *Cancer Cell*, 15: 45-56.
- Alcantara Llaguno, S. R., Z. Wang, D. Sun, J. Chen, J. Xu, E. Kim, K. J. Hatanpaa, J. M. Raisanen, D. K. Burns, J. E. Johnson, and L. F. Parada. 2015. 'Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes', *Cancer Cell*, 28: 429-40.
- Allen, N. J., and B. A. Barres. 2009. 'Neuroscience: Glia - more than just brain glue', *Nature*, 457: 675-7.
- Altman, J., and G. D. Das. 1965. 'Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats', *J Comp Neurol*, 124: 319-35.
- Alvero, A. B., H. H. Fu, J. Holmberg, I. Visintin, L. Mor, C. C. Marquina, J. Oidtman, D. A. Silasi, and G. Mor. 2009. 'Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors', *Stem Cells*, 27: 2405-13.
- Armulik, A., G. Genove, and C. Betsholtz. 2011. 'Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises', *Dev Cell*, 21: 193-215.
- Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M. H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B. R. Johansson, and C. Betsholtz. 2010. 'Pericytes regulate the blood-brain barrier', *Nature*, 468: 557-61.
- Arnett, H. A., S. P. Fancy, J. A. Alberta, C. Zhao, S. R. Plant, S. Kaing, C. S. Raine, D. H. Rowitch, R. J. Franklin, and C. D. Stiles. 2004. 'bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS', *Science*, 306: 2111-5.
- Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, and M. E. Fortini. 1995. 'Notch signaling', *Science*, 268: 225-32.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, and J. M. Isner. 1997. 'Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis', *Science*, 275: 964-7.
- Ashraf, S. I., X. Hu, J. Roote, and Y. T. Ip. 1999. 'The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control Drosophila neurogenesis', *Embo j*, 18: 6426-38.
- Asklund, T., S. Kvarnbrink, C. Holmlund, C. Wibom, T. Bergenheim, R. Henriksson, and H. Hedman. 2012. 'Synergistic killing of glioblastoma stem-like cells by bortezomib and HDAC inhibitors', *Anticancer Res*, 32: 2407-13.
- Atkins, G. B., M. K. Jain, and A. Hamik. 2011. 'Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31: 1476-84.
- Bailey, Percival, and Harvey Cushing. 1926. 'A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis', *Philadelphia, J.B. Lippincott Company*.
- Balabanov, R., R. Washington, J. Wagnerova, and P. Dore-Duffy. 1996. 'CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2', *Microvasc Res*, 52: 127-42.
- Baldi, I., A. Huchet, L. Bauchet, and H. Loiseau. 2010. '[Epidemiology of glioblastoma]', *Neurochirurgie*, 56: 433-40.
- Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, and J. N. Rich. 2006. 'Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response', *Nature*, 444: 756-60.

- Bao, S., Q. Wu, S. Sathornsumetee, Y. Hao, Z. Li, A. B. Hjelmeland, Q. Shi, R. E. McLendon, D. D. Bigner, and J. N. Rich. 2006. 'Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor', *Cancer Res*, 66: 7843-8.
- Bar, E. E., A. Lin, V. Mahairaki, W. Matsui, and C. G. Eberhart. 2010. 'Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres', *Am J Pathol*, 177: 1491-502.
- Barnabe-Heider, F., J. A. Wasylnka, K. J. Fernandes, C. Porsche, M. Sendtner, D. R. Kaplan, and F. D. Miller. 2005. 'Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1', *Neuron*, 48: 253-65.
- Bartolini, G., G. Ciceri, and O. Marin. 2013. 'Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults', *Neuron*, 79: 849-64.
- Bautch, Victoria L. 2011. 'Stem cells and the vasculature', *Nat Med*, 17: 1437-43.
- Bellen, Hugo J., and Shinya Yamamoto. 2014. "Notch signaling methods and protocols." In *Methods in molecular biology*, 1 online resource (xi, 351 pages). New York: Humana Press,.
- Benedito, R., C. Roca, I. Sorensen, S. Adams, A. Gossler, M. Fruttiger, and R. H. Adams. 2009. 'The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis', *Cell*, 137: 1124-35.
- Benouaich-Amiel, A., J. M. Simon, and J. Y. Delattre. 2005. '[Concomitant radiotherapy with chemotherapy in patients with glioblastoma]', *Bull Cancer*, 92: 1065-72.
- Bernard, O., O. Azogui, N. Lecointe, F. Mugneret, R. Berger, C. J. Larsen, and D. Mathieu-Mahul. 1992. 'A third tal-1 promoter is specifically used in human T cell leukemias', *J Exp Med*, 176: 919-25.
- Beroukhi, R., G. Getz, L. Nghiemphu, J. Barretina, T. Hsueh, D. Linhart, I. Vivanco, J. C. Lee, J. H. Huang, S. Alexander, J. Du, T. Kau, R. K. Thomas, K. Shah, H. Soto, S. Perner, J. Prensner, R. M. DeBiasi, F. Demichelis, C. Hatton, M. A. Rubin, L. A. Garraway, S. F. Nelson, L. Liao, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, M. Meyerson, T. A. Golub, E. S. Lander, I. K. Mellinghoff, and W. R. Sellers. 2007. 'Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 20007-12.
- Bertrand, J. Y., N. C. Chi, B. Santoso, S. Teng, D. Y. Stainier, and D. Traver. 2010. 'Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development', *Nature*, 464: 108-11.
- Bertrand, N., D. S. Castro, and F. Guillemot. 2002. 'Proneural genes and the specification of neural cell types', *Nat Rev Neurosci*, 3: 517-30.
- Bjornsson, C. S., M. Apostolopoulou, Y. Tian, and S. Temple. 2015. 'It takes a village: constructing the neurogenic niche', *Dev Cell*, 32: 435-46.
- Bonaguidi, Michael A, Michael A Wheeler, Jason S Shapiro, Ryan P Stadel, Gerald J Sun, Guo-li Ming, and Hongjun Song. 2011. 'In Vivo Clonal Analysis Reveals Self-Renewing and Multipotent Adult Neural Stem Cell Characteristics', *Cell*, 145: 1142-55.
- Bond, A. M., G. L. Ming, and H. Song. 2015. 'Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later', *Cell Stem Cell*, 17: 385-95.
- Bonnet, D., and J. E. Dick. 1997. 'Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell', *Nat Med*, 3: 730-7.
- Borggrefe, T., M. Lauth, A. Zwijsen, D. Huylebroeck, F. Oswald, and B. D. Giaimo. 2016. 'The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGFbeta/BMP and hypoxia pathways', *Biochim Biophys Acta*, 1863: 303-13.
- Bota, D. A., D. Alexandru, S. T. Keir, D. Bigner, J. Vredenburgh, and H. S. Friedman. 2013. 'Proteasome inhibition with bortezomib induces cell death in GBM stem-like cells and temozolomide-resistant glioma cell lines, but stimulates GBM stem-like cells' VEGF production and angiogenesis', *J Neurosurg*, 119: 1415-23.
- Bray, S. J. 2016. 'Notch signalling in context', *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Bredel, M., D. M. Scholtens, A. K. Yadav, A. A. Alvarez, J. J. Renfrow, J. P. Chandler, I. L. Yu, M. S. Carro, F. Dai, M. J. Tagge, R. Ferrarese, C. Bredel, H. S. Phillips, P. J. Lukac, P. A. Robe, A. Weyerbrock, H. Vogel, S. Dubner, B. Mobley, X. He, A. C. Scheck, B. I. Sikic, K. D. Aldape, A.

- Chakravarti, and G. R. th Harsh. 2011. 'NFKBIA deletion in glioblastomas', *N Engl J Med*, 364: 627-37.
- Brem, S. 1976. 'The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors', *Clin Neurosurg*, 23: 440-53.
- Brem, S., R. Cotran, and J. Folkman. 1972. 'Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading', *J Natl Cancer Inst*, 48: 347-56.
- Brennan, C. W., R. G. Verhaak, A. McKenna, B. Campos, H. Nounshmehr, S. R. Salama, S. Zheng, D. Chakravarty, J. Z. Sanborn, S. H. Berman, R. Beroukhim, B. Bernard, C. J. Wu, G. Genovese, I. Shmulevich, J. Barnholtz-Sloan, L. Zou, R. Vegesna, S. A. Shukla, G. Ciriello, W. K. Yung, W. Zhang, C. Sougnez, T. Mikkelsen, K. Aldape, D. D. Bigner, E. G. Van Meir, M. Prados, A. Sloan, K. L. Black, J. Eschbacher, G. Finocchiaro, W. Friedman, D. W. Andrews, A. Guha, M. Iacocca, B. P. O'Neill, G. Foltz, J. Myers, D. J. Weisenberger, R. Penny, R. Kucherlapati, C. M. Perou, D. N. Hayes, R. Gibbs, M. Marra, G. B. Mills, E. Lander, P. Spellman, R. Wilson, C. Sander, J. Weinstein, M. Meyerson, S. Gabriel, P. W. Laird, D. Haussler, G. Getz, and L. Chin. 2013. 'The somatic genomic landscape of glioblastoma', *Cell*, 155: 462-77.
- Burger, P. C., T. Shibata, and P. Kleihues. 1986. 'The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology', *Am J Surg Pathol*, 10: 611-7.
- Burgett, M. E., J. D. Lathia, P. Roth, A. S. Nowacki, D. S. Galileo, E. Pugacheva, P. Huang, A. Vasanji, M. Li, T. Byzova, T. Mikkelsen, S. Bao, J. N. Rich, M. Weller, and C. L. Gladson. 2016. 'Direct contact with perivascular tumor cells enhances integrin alphavbeta3 signaling and migration of endothelial cells', *Oncotarget*.
- Bussolati, B., C. Grange, A. Sapino, and G. Camussi. 2009. 'Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells', *J Cell Mol Med*, 13: 309-19.
- Calabrese, C., H. Poppleton, M. Kocak, T. L. Hogg, C. Fuller, B. Hamner, E. Y. Oh, M. W. Gaber, D. Finklestein, M. Allen, A. Frank, I. T. Bayazitov, S. S. Zakharenko, A. Gajjar, A. Davidoff, and R. J. Gilbertson. 2007. 'A perivascular niche for brain tumor stem cells', *Cancer Cell*, 11: 69-82.
- Calkhoven, C. F., C. Muller, R. Martin, G. Krosch, H. Pietsch, T. Hoang, and A. Leutz. 2003. 'Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice', *Genes Dev*, 17: 959-64.
- Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, L. Moons, F. Brevario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oosthuysen, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M. C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J. M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana. 1999. 'Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis', *Cell*, 98: 147-57.
- Carmony, Kimberly Cornish, and Kyung Bo Kim. 2013. 'Activity-Based Imaging Probes of the Proteasome', *Cell biochemistry and biophysics*, 67: 91-101.
- Caspani, E. M., P. H. Crossley, C. Redondo-Garcia, and S. Martinez. 2014. 'Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes', *PLoS One*, 9: e101402.
- Castro, D. S., B. Martynoga, C. Parras, V. Ramesh, E. Pacary, C. Johnston, D. Drechsel, M. Lebel-Potter, L. G. Garcia, C. Hunt, D. Dolle, A. Bithell, L. Ettwiller, N. Buckley, and F. Guillemot. 2011. 'A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets', *Genes Dev*, 25: 930-45.
- Castro, D. S., D. Skowronska-Krawczyk, O. Armant, I. J. Donaldson, C. Parras, C. Hunt, J. A. Critchley, L. Nguyen, A. Gossler, B. Gottgens, J. M. Matter, and F. Guillemot. 2006. 'Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif', *Dev Cell*, 11: 831-44.
- Cau, E., S. Casarosa, and F. Guillemot. 2002. 'Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage', *Development*, 129: 1871-80.
- Chandran, U. R., S. Luthra, L. Santana-Santos, P. Mao, S. H. Kim, M. Minata, J. Li, P. V. Benos, M. DeWang, B. Hu, S. Y. Cheng, I. Nakano, and R. W. Sobol. 2015. 'Gene expression profiling distinguishes proneural glioma stem cells from mesenchymal glioma stem cells', *Genom Data*, 5: 333-36.

- Chang, L., F. Wong, K. Niessen, and A. Karsan. 2013. 'Notch activation promotes endothelial survival through a PI3K-Slug axis', *Microvasc Res*, 89: 80-5.
- Chen, H. F., C. H. Huang, C. J. Liu, J. J. Hung, C. C. Hsu, S. C. Teng, and K. J. Wu. 2014. 'Twist1 induces endothelial differentiation of tumour cells through the Jagged1-KLF4 axis', *Nat Commun*, 5: 4697.
- Chen, J., R. M. McKay, and L. F. Parada. 2012. 'Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells', *Cell*, 149: 36-47.
- Cheng, L., Z. Huang, W. Zhou, Q. Wu, S. Donnola, J. K. Liu, X. Fang, A. E. Sloan, Y. Mao, J. D. Lathia, W. Min, R. E. McLendon, J. N. Rich, and S. Bao. 2013. 'Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth', *Cell*, 153: 139-52.
- Cheng, W. Y., J. J. Kandel, D. J. Yamashiro, P. Canoll, and D. Anastassiou. 2012. 'A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma', *PLoS One*, 7: e34705.
- Cheng, W., C. Zhang, X. Ren, Y. Jiang, S. Han, Y. Liu, J. Cai, M. Li, K. Wang, Y. Liu, H. Hu, Q. Li, P. Yang, Z. Bao, and A. Wu. 2016. 'Bioinformatic analyses reveal a distinct Notch activation induced by STAT3 phosphorylation in the mesenchymal subtype of glioblastoma', *J Neurosurg*: 1-11.
- Chetty, R., M. A. Dada, C. H. Boshoff, M. A. Comley, S. C. Biddolph, J. W. Schneider, D. Y. Mason, K. A. Pulford, and K. C. Gatter. 1997. 'TAL-1 protein expression in vascular lesions', *J Pathol*, 181: 311-5.
- Chowdhury, M., and C. Enekel. 2015. 'Intracellular Dynamics of the Ubiquitin-Proteasome-System', *F1000Res*, 4: 367.
- Cobaleda, C., M. Perez-Caro, C. Vicente-Duenas, and I. Sanchez-Garcia. 2007. 'Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development', *Annu Rev Genet*, 41: 41-61.
- Cobbs, C. S., L. Harkins, M. Samanta, G. Y. Gillespie, S. Bharara, P. H. King, L. B. Nabors, C. G. Cobbs, and W. J. Britt. 2002. 'Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma', *Cancer Res*, 62: 3347-50.
- Cobbs, C. S., L. Soroceanu, S. Denham, W. Zhang, and M. H. Kraus. 2008. 'Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity', *Cancer Res*, 68: 724-30.
- Coll-Bonfill, N., V. I. Peinado, M. V. Pisano, M. Parrizas, I. Blanco, M. Evers, J. C. Engelmann, J. Garcia-Lucio, O. Tura-Ceide, G. Meister, J. A. Barbera, and M. M. Musri. 2016. 'Slug Is Increased in Vascular Remodeling and Induces a Smooth Muscle Cell Proliferative Phenotype', *PLoS One*, 11: e0159460.
- Corada, M., M. F. Morini, and E. Dejana. 2014. 'Signaling pathways in the specification of arteries and veins', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 2372-7.
- Correia, N. C., M. L. Arcangeli, F. Pflumio, and J. T. Barata. 2016. 'Stem Cell Leukemia: how a TALented actor can go awry on the hematopoietic stage', *Leukemia*.
- D'Souza, S. L., A. G. Elefanty, and G. Keller. 2005. 'SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development', *Blood*, 105: 3862-70.
- D'Souza, Brendan, Laurence Meloty-Kapella, and Gerry Weinmaster. 2010. 'Canonical and Non-Canonical Notch Ligands', 92: 73-129.
- Dai, C., J. C. Celestino, Y. Okada, D. N. Louis, G. N. Fuller, and E. C. Holland. 2001. 'PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo', *Genes Dev*, 15: 1913-25.
- Daneman, R., L. Zhou, D. Agalliu, J. D. Cahoy, A. Kaushal, and B. A. Barres. 2010. 'The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells', *PLoS One*, 5: e13741.
- Daneman, R., L. Zhou, A. A. Kebede, and B. A. Barres. 2010. 'Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis', *Nature*, 468: 562-6.

- Dang, L., D. W. White, S. Gross, B. D. Bennett, M. A. Bittinger, E. M. Driggers, V. R. Fantin, H. G. Jang, S. Jin, M. C. Keenan, K. M. Marks, R. M. Prins, P. S. Ward, K. E. Yen, L. M. Liao, J. D. Rabinowitz, L. C. Cantley, C. B. Thompson, M. G. Vander Heiden, and S. M. Su. 2010. 'Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate', *Nature*, 465: 966.
- Daumas-Duport, C., M. L. Tucker, H. Kolles, P. Cervera, F. Beuvon, P. Varlet, N. Udo, M. Koziak, and J. P. Chodkiewicz. 1997. 'Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria', *J Neurooncol*, 34: 61-78.
- Daumas-Duport, C., P. Varlet, M. L. Tucker, F. Beuvon, P. Cervera, and J. P. Chodkiewicz. 1997. 'Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases', *J Neurooncol*, 34: 37-59.
- De Bock, K., F. De Smet, R. Leite De Oliveira, K. Anthonis, and P. Carmeliet. 2009. 'Endothelial oxygen sensors regulate tumor vessel abnormalization by instructing phalanx endothelial cells', *J Mol Med (Berl)*, 87: 561-9.
- de Jong, A., K. G. Schuurman, B. Rodenko, H. Ova, and C. R. Berkers. 2012. 'Fluorescence-based proteasome activity profiling', *Methods Mol Biol*, 803: 183-204.
- De Strooper, B., and W. Annaert. 2010. 'Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26: 235-60.
- De Val, S., and B. L. Black. 2009. 'Transcriptional control of endothelial cell development', *Dev Cell*, 16: 180-95.
- Deleuze, V., E. Chalhoub, R. El-Hajj, C. Dohet, M. Le Clech, P. O. Couraud, P. Huber, and D. Mathieu. 2007. 'TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells', *Mol Cell Biol*, 27: 2687-97.
- Deleuze, V., R. El-Hajj, E. Chalhoub, C. Dohet, V. Pinet, P. Couttet, and D. Mathieu. 2012. 'Angiopoietin-2 is a direct transcriptional target of TAL1, LYL1 and LMO2 in endothelial cells', *PLoS One*, 7: e40484.
- Deleyrolle, L. P., and B. A. Reynolds. 2009. 'Isolation, expansion, and differentiation of adult Mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay', *Methods Mol Biol*, 549: 91-101.
- Dell'albani, P., M. Rodolico, R. Pellitteri, E. Tricarichi, S. A. Torrisi, S. D'Antoni, M. Zappia, V. Albanese, R. Caltabiano, N. Platania, E. Aronica, and M. V. Catania. 2014. 'Differential patterns of NOTCH1-4 receptor expression are markers of glioma cell differentiation', *Neuro Oncol*, 16: 204-16.
- Deneen, B., R. Ho, A. Lukaszewicz, C. J. Hochstim, R. M. Gronostajski, and D. J. Anderson. 2006. 'The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord', *Neuron*, 52: 953-68.
- Dexter, J. S. 1914. 'The analysis of a case of continuous variation in *Drosophila* by a study of its linkage relations', *American Naturalist*, 48: 712-58.
- Dhanesh, S. B., C. Subashini, and J. James. 2016. 'Hes1: the maestro in neurogenesis', *Cell Mol Life Sci*.
- Diaz-Flores, L., R. Gutierrez, J. F. Madrid, H. Varela, F. Valladares, E. Acosta, P. Martin-Vasallo, and L. Diaz-Flores, Jr. 2009. 'Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche', *Histol Histopathol*, 24: 909-69.
- Ditadi, A., C. M. Sturgeon, J. Tober, G. Awong, M. Kennedy, A. D. Yzaguirre, L. Azzola, E. S. Ng, E. G. Stanley, D. L. French, X. Cheng, P. Gadue, N. A. Speck, A. G. Elefanty, and G. Keller. 2015. 'Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages', *Nat Cell Biol*, 17: 580-91.
- Doetsch, F. 2003. 'The glial identity of neural stem cells', *Nat Neurosci*, 6: 1127-34.
- Dong, J., Y. Zhao, Q. Huang, X. Fei, Y. Diao, Y. Shen, H. Xiao, T. Zhang, Q. Lan, and X. Gu. 2011. 'Glioma stem/progenitor cells contribute to neovascularization via transdifferentiation', *Stem Cell Rev*, 7: 141-52.

- Dore-Duffy, P., A. Katychhev, X. Wang, and E. Van Buren. 2006. 'CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity', *J Cereb Blood Flow Metab*, 26: 613-24.
- Doudna, J. A., and E. Charpentier. 2014. 'Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', *Science*, 346: 1258096.
- Drake, C. J., J. E. Hungerford, and C. D. Little. 1998. 'Morphogenesis of the first blood vessels', *Ann N Y Acad Sci*, 857: 155-79.
- Eichmann, A., and J. L. Thomas. 2013. 'Molecular parallels between neural and vascular development', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3: a006551.
- El Hallani, S., B. Boisselier, F. Peglion, A. Rousseau, C. Colin, A. Idbah, Y. Marie, K. Mokhtari, J. L. Thomas, A. Eichmann, J. Y. Delattre, A. J. Maniotis, and M. Sanson. 2010. 'A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry', *Brain*, 133: 973-82.
- El Hallani, S., C. Colin, Y. El Houfi, and A. Idbah. 2014. 'Tumor and endothelial cell hybrids participate in glioblastoma vasculature', 2014: 827327.
- Elcheva, I., V. Brok-Volchanskaya, A. Kumar, P. Liu, J. H. Lee, L. Tong, M. Vodyanik, S. Swanson, R. Stewart, M. Kyba, E. Yakubov, J. Cooke, J. A. Thomson, and I. Slukvin. 2014. 'Direct induction of haematoendothelial programs in human pluripotent stem cells by transcriptional regulators', *Nat Commun*, 5: 4372.
- Elefanty, A. G., C. G. Begley, L. Hartley, B. Papaevangelou, and L. Robb. 1999. 'SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues', *Blood*, 94: 3754-63.
- Ellisen, L. W., J. Bird, D. C. West, A. L. Soreng, T. C. Reynolds, S. D. Smith, and J. Sklar. 1991. 'TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms', *Cell*, 66: 649-61.
- Elsasser, S., M. Schmidt, and D. Finley. 2005. 'Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis', *Methods Enzymol*, 398: 353-63.
- Ema, M., P. Faloon, W. J. Zhang, M. Hirashima, T. Reid, W. L. Stanford, S. Orkin, K. Choi, and J. Rossant. 2003. 'Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse', *Genes Dev*, 17: 380-93.
- Endo, Y., K. Deonauth, P. Prahalad, B. Hoxter, Y. Zhu, and S. W. Byers. 2008. 'Role of Sox-9, ER81 and VE-cadherin in retinoic acid-mediated trans-differentiation of breast cancer cells', *PLoS One*, 3: e2714.
- Enenkel, C. 2014. 'Proteasome dynamics', *Biochim Biophys Acta*, 1843: 39-46.
- Engelhardt, B., and S. Liebner. 2014. 'Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier', *Cell Tissue Res*, 355: 687-99.
- Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S. N. Goodman, O. F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S. B. Baylin, and J. G. Herman. 2000. 'Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents', *N Engl J Med*, 343: 1350-4.
- Etchevers, H. C., C. Vincent, N. M. Le Douarin, and G. F. Couly. 2001. 'The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain', *Development*, 128: 1059-68.
- Fagerholm, U. 2007. 'The highly permeable blood-brain barrier: an evaluation of current opinions about brain uptake capacity', *Drug Discov Today*, 12: 1076-82.
- Fan, X., L. Khaki, T. S. Zhu, M. E. Soules, C. E. Talsma, N. Gul, C. Koh, J. Zhang, Y. M. Li, J. Maciaczyk, G. Nikkhah, F. Dimeco, S. Piccirillo, A. L. Vescovi, and C. G. Eberhart. 2010. 'NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts', *Stem Cells*, 28: 5-16.
- Ferrando, A. A., D. S. Neuberg, J. Staunton, M. L. Loh, C. Huard, S. C. Raimondi, F. G. Behm, C. H. Pui, J. R. Downing, D. G. Gilliland, E. S. Lander, T. R. Golub, and A. T. Look. 2002. 'Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia', *Cancer Cell*, 1: 75-87.

- Figarella-Branger, D., and C. Bouvier. 2005. '[Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]', *Bull Cancer*, 92: 301-9.
- Figarella-Branger, D., F. Labrousse, and K. Mohktari. 2012. '[Guidelines for adult diffuse gliomas WHO grade II, III and IV: pathology and biology. Societe franc aise de neuropathologie . Reseau de neuro-oncologie pathologique]', *Ann Pathol*, 32: 318-27.
- Filatova, A., T. Acker, and B. K. Garvalov. 2013. 'The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment', *Biochim Biophys Acta*, 1830: 2496-508.
- Fish, Jason E., and Joshua D. Wythe. 2015. 'The molecular regulation of arteriovenous specification and maintenance', *Developmental Dynamics*, 244: 391-409.
- Fleskens, V., M. Mokry, A. M. van der Leun, S. Huppelschoten, C. E. Pals, J. Peeters, S. Coenen, B. A. Cardoso, J. T. Barata, J. van Loosdregt, and P. J. Coffey. 2016. 'FOXP3 can modulate TAL1 transcriptional activity through interaction with LMO2', *Oncogene*, 35: 4141-8.
- Fode, C., G. Gradwohl, X. Morin, A. Dierich, M. LeMeur, C. Goridis, and F. Guillemot. 1998. 'The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons', *Neuron*, 20: 483-94.
- Folkens, C., Y. Shaked, S. Man, T. Tang, C. R. Lee, Z. Zhu, R. M. Hoffman, and R. S. Kerbel. 2009. 'Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1', *Cancer Res*, 69: 7243-51.
- Freije, W. A., F. E. Castro-Vargas, Z. Fang, S. Horvath, T. Cloughesy, L. M. Liau, P. S. Mischel, and S. F. Nelson. 2004. 'Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival', *Cancer Res*, 64: 6503-10.
- Furnari, F. B., T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, W. C. Hahn, K. L. Ligon, D. N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R. A. DePinho, and W. K. Cavenee. 2007. 'Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment', *Genes Dev*, 21: 2683-710.
- Furusho, M., K. Ono, H. Takebayashi, N. Masahira, T. Kagawa, K. Ikeda, and K. Ikenaka. 2006. 'Involvement of the Olig2 transcription factor in cholinergic neuron development of the basal forebrain', *Dev Biol*, 293: 348-57.
- Gaetani, P., E. Hulleman, D. Levi, M. Quarto, M. Scorsetti, K. Helins, M. Simonelli, P. Colombo, and R. Baena y Rodriguez. 2010. 'Expression of the transcription factor HEY1 in glioblastoma: a preliminary clinical study', *Tumori*, 96: 97-102.
- Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco, and A. Vescovi. 2004. 'Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma', *Cancer Res*, 64: 7011-21.
- Gallo, V., and B. Deneen. 2014. 'Glial development: the crossroads of regeneration and repair in the CNS', *Neuron*, 83: 283-308.
- Garcia-Bellido, A. 1979. 'Genetic Analysis of the Achaete-Scute System of DROSOPHILA MELANOGASTER', *Genetics*, 91: 491-520.
- Garlanda, C., and E. Dejana. 1997. 'Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 1193-202.
- Ge, W., K. Martinowich, X. Wu, F. He, A. Miyamoto, G. Fan, G. Weinmaster, and Y. E. Sun. 2002. 'Notch signaling promotes astroglialogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation', *J Neurosci Res*, 69: 848-60.
- Gerhardt, H., H. Wolburg, and C. Redies. 2000. 'N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken', *Dev Dyn*, 218: 472-9.
- Ghanekar, A., S. Ahmed, K. Chen, and O. Adeyi. 2013. 'Endothelial cells do not arise from tumor-initiating cells in human hepatocellular carcinoma', *BMC Cancer*, 13: 485.
- Giachino, C., J. L. Boulay, R. Ivanek, A. Alvarado, C. Tostado, S. Lugert, J. Tchorz, M. Coban, L. Mariani, B. Bettler, J. Lathia, S. Frank, S. Pfister, M. Kool, and V. Taylor. 2015. 'A Tumor Suppressor Function for Notch Signaling in Forebrain Tumor Subtypes', *Cancer Cell*, 28: 730-42.

- Giachino, C., and V. Taylor. 2014. 'Notching up neural stem cell homogeneity in homeostasis and disease', *Front Neurosci*, 8: 32.
- Gilbert, C. A., M. C. Daou, R. P. Moser, and A. H. Ross. 2010. 'Gamma-secretase inhibitors enhance temozolomide treatment of human gliomas by inhibiting neurosphere repopulation and xenograft recurrence', *Cancer Res*, 70: 6870-9.
- Ginhoux, F., S. Lim, G. Hoeffel, D. Low, and T. Huber. 2013. 'Origin and differentiation of microglia', *Front Cell Neurosci*, 7: 45.
- Glasker, S., J. Li, J. B. Xia, H. Okamoto, W. Zeng, R. R. Lonser, Z. Zhuang, E. H. Oldfield, and A. O. Vortmeyer. 2006. 'Hemangioblastomas share protein expression with embryonal hemangioblast progenitor cell', *Cancer Res*, 66: 4167-72.
- Goldman, S. A., and F. Nottebohm. 1983. 'Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80: 2390-4.
- Goodwin, J. T., and D. E. Clark. 2005. 'In silico predictions of blood-brain barrier penetration: considerations to "keep in mind"', *J Pharmacol Exp Ther*, 315: 477-83.
- Gotze, S., M. Wolter, G. Reifenberger, O. Muller, and S. Sievers. 2010. 'Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas', *Int J Cancer*, 126: 2584-93.
- Gravendeel, L. A., M. C. Kouwenhoven, O. Gevaert, J. J. de Rooi, A. P. Stubbs, J. E. Duijm, A. Daemen, F. E. Bleeker, L. B. Bralten, N. K. Kloosterhof, B. De Moor, P. H. Eilers, P. J. van der Spek, J. M. Kros, P. A. Sillevius Smitt, M. J. van den Bent, and P. J. French. 2009. 'Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology', *Cancer Res*, 69: 9065-72.
- Green, A. R., T. Lints, J. Visvader, R. Harvey, and C. G. Begley. 1992. 'SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain', *Oncogene*, 7: 653-60.
- Gridley, T. 2010. 'Notch signaling in the vasculature', *Curr Top Dev Biol*, 92: 277-309.
- Grigoreva, T. A., V. G. Tribulovich, A. V. Garabadzhiu, G. Melino, and N. A. Barlev. 2015. 'The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies', *Oncotarget*, 6: 24733-49.
- Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann, and K. Rajewsky. 1994. 'Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting', *Science*, 265: 103-6.
- Guelfi, S., H. Duffau, L. Bauchet, B. Rothhut, and J. P. Hugnot. 2016. 'Vascular Transdifferentiation in the CNS: A Focus on Neural and Glioblastoma Stem-Like Cells', *Stem Cells Int*, 2016: 2759403.
- Guichet, P. O., I. Bieche, M. Teigell, C. Serguera, B. Rothhut, V. Rigau, F. Scamps, C. Ripoll, S. Vacher, S. Taviaux, H. Chevassus, H. Duffau, J. Mallet, A. Susini, D. Joubert, L. Bauchet, and J. P. Hugnot. 2013. 'Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors', *Glia*, 61: 225-39.
- Guichet, P. O., S. Guelfi, C. Ripoll, M. Teigell, J. C. Sabourin, L. Bauchet, V. Rigau, B. Rothhut, and J. P. Hugnot. 2016. 'Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells', *PLoS One*, 11: e0151274.
- Guichet, P. O., S. Guelfi, M. Teigell, L. Hoppe, N. Bakalara, L. Bauchet, H. Duffau, K. Lamszus, B. Rothhut, and J. P. Hugnot. 2015. 'Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells', *Stem Cells*, 33: 21-34.
- Gunther, H. S., N. O. Schmidt, H. S. Phillips, D. Kemming, S. Kharbanda, R. Soriano, Z. Modrusan, H. Meissner, M. Westphal, and K. Lamszus. 2008. 'Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria', *Oncogene*, 27: 2897-909.
- Hajra, K. M., D. Y. Chen, and E. R. Fearon. 2002. 'The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer', *Cancer Res*, 62: 1613-8.
- Hambardzumyan, D., and G. Bergers. 2015. 'Glioblastoma: Defining Tumor Niches', *Trends Cancer*, 1: 252-65.
- Hamilton, A. 1901. 'The division of differentiated cells in the central nervous system of the white rat', *Journal of Comparative Neurology*, 11: 23.

- Han, J. K., S. H. Chang, H. J. Cho, S. B. Choi, H. S. Ahn, J. Lee, H. Jeong, S. W. Youn, H. J. Lee, Y. W. Kwon, H. J. Cho, B. H. Oh, P. Oettgen, Y. B. Park, and H. S. Kim. 2014. 'Direct conversion of adult skin fibroblasts to endothelial cells by defined factors', *Circulation*, 130: 1168-78.
- Hardee, M. E., and D. Zagzag. 2012. 'Mechanisms of glioma-associated neovascularization', *Am J Pathol*, 181: 1126-41.
- Havrda, M. C., M. J. Johnson, C. F. O'Neill, and L. Liaw. 2006. 'A novel mechanism of transcriptional repression of p27kip1 through Notch/HRT2 signaling in vascular smooth muscle cells', *Thromb Haemost*, 96: 361-70.
- Havrda, M. C., B. R. Paoella, C. Ran, K. S. Jering, C. M. Wray, J. M. Sullivan, A. Nailor, Y. Hitoshi, and M. A. Israel. 2014. 'Id2 mediates oligodendrocyte precursor cell maturation arrest and is tumorigenic in a PDGF-rich microenvironment', *Cancer Res*, 74: 1822-32.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer, and R. Stupp. 2005. 'MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma', *N Engl J Med*, 352: 997-1003.
- Hellstrom, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt, and C. Betsholtz. 2007. 'Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis', *Nature*, 445: 776-80.
- Herberth, B., K. Minko, A. Csillag, T. Jaffredo, and E. Madarasz. 2005. 'SCL, GATA-2 and Lmo2 expression in neurogenesis', *Int J Dev Neurosci*, 23: 449-63.
- Hirabayashi, Y., N. Suzuki, M. Tsuboi, T. A. Endo, T. Toyoda, J. Shinga, H. Koseki, M. Vidal, and Y. Gotoh. 2009. 'Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition', *Neuron*, 63: 600-13.
- Hoang, T., J. A. Lambert, and R. Martin. 2016. 'SCL/TAL1 in Hematopoiesis and Cellular Reprogramming', *Curr Top Dev Biol*, 118: 163-204.
- Holash, J., P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos, and S. J. Wiegand. 1999. 'Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF', *Science*, 284: 1994-8.
- Hu, Y. Y., L. A. Fu, S. Z. Li, Y. Chen, J. C. Li, J. Han, L. Liang, L. Li, C. C. Ji, M. H. Zheng, and H. Han. 2014. 'Hif-1alpha and Hif-2alpha differentially regulate Notch signaling through competitive interaction with the intracellular domain of Notch receptors in glioma stem cells', *Cancer Lett*, 349: 67-76.
- Huang, C., J. A. Chan, and C. Schuurmans. 2014. 'Proneural bHLH genes in development and disease', *Curr Top Dev Biol*, 110: 75-127.
- Hulleman, E., M. Quarto, R. Vernell, G. Masserdotti, E. Colli, J. M. Kros, D. Levi, P. Gaetani, P. Tunicci, G. Finocchiaro, R. R. Baena, M. Capra, and K. Helin. 2009. 'A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma', *J Cell Mol Med*, 13: 136-46.
- Ignatova, T. N., V. G. Kukekov, E. D. Laywell, O. N. Suslov, F. D. Vrionis, and D. A. Steindler. 2002. 'Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro', *Glia*, 39: 193-206.
- Imayoshi, I., A. Isomura, Y. Harima, K. Kawaguchi, H. Kori, H. Miyachi, T. Fujiwara, F. Ishidate, and R. Kageyama. 2013. 'Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors', *Science*, 342: 1203-8.
- Imayoshi, I., and R. Kageyama. 2011. 'The role of Notch signaling in adult neurogenesis', *Mol Neurobiol*, 44: 7-12.
- Imayoshi, Itaru, and Ryoichiro Kageyama. 2014. 'bHLH Factors in Self-Renewal, Multipotency, and Fate Choice of Neural Progenitor Cells', *Neuron*, 82: 9-23.
- Infanger, D. W., Y. Cho, B. S. Lopez, S. Mohanan, S. C. Liu, D. Gursel, J. A. Boockvar, and C. Fischbach. 2013. 'Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche', *Cancer Res*, 73: 7079-89.

- Inukai, T., A. Inoue, H. Kurosawa, K. Goi, T. Shinjyo, K. Ozawa, M. Mao, T. Inaba, and A. T. Look. 1999. 'SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein', *Mol Cell*, 4: 343-52.
- Jacques, T. S., A. Swales, M. J. Brzozowski, N. V. Henriquez, J. M. Linehan, Z. Mirzadeh, O' Malley C, H. Naumann, A. Alvarez-Buylla, and S. Brandner. 2010. 'Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes', *Embo j*, 29: 222-35.
- Jain, R. K. 2005. 'Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy', *Science*, 307: 58-62.
- Jeon, H. M., X. Jin, J. S. Lee, S. Y. Oh, Y. W. Sohn, H. J. Park, K. M. Joo, W. Y. Park, D. H. Nam, R. A. DePinho, L. Chin, and H. Kim. 2008. 'Inhibitor of differentiation 4 drives brain tumor-initiating cell genesis through cyclin E and notch signaling', *Genes Dev*, 22: 2028-33.
- Jeon, H. M., S. H. Kim, X. Jin, J. B. Park, S. H. Kim, K. Joshi, I. Nakano, and H. Kim. 2014. 'Crosstalk between glioma-initiating cells and endothelial cells drives tumor progression', *Cancer Res*, 74: 4482-92.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science*, 337: 816.
- Joshi, K., S. Lee, B. Lee, J. W. Lee, and S. K. Lee. 2009. 'LMO4 controls the balance between excitatory and inhibitory spinal V2 interneurons', *Neuron*, 61: 839-51.
- Kageyama, R., H. Shimojo, and I. Imayoshi. 2015. 'Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development', *Cell Tissue Res*, 359: 125-33.
- Kamakura, S., K. Oishi, T. Yoshimatsu, M. Nakafuku, N. Masuyama, and Y. Gotoh. 2004. 'Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling', *Nat Cell Biol*, 6: 547-54.
- Karow, M., R. Sanchez, C. Schichor, G. Masserdotti, F. Ortega, C. Heinrich, S. Gascon, M. A. Khan, D. C. Lie, A. Dellavalle, G. Cossu, R. Goldbrunner, M. Gotz, and B. Berninger. 2012. 'Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells', *Cell Stem Cell*, 11: 471-6.
- Kernohan, J. W., R. F. Mabon, and et al. 1949. 'A simplified classification of the gliomas', *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 24: 71-5.
- Kerr, B. A., X. Z. West, Y. W. Kim, Y. Zhao, M. Tischenko, R. M. Cull, T. W. Phares, X. D. Peng, J. Bernier-Latmani, T. V. Petrova, R. H. Adams, N. Hay, S. V. Naga Prasad, and T. V. Byzova. 2016. 'Stability and function of adult vasculature is sustained by Akt/Jagged1 signalling axis in endothelium', *Nat Commun*, 7: 10960.
- Kim, P. G., C. E. Albacker, Y. F. Lu, I. H. Jang, Y. Lim, G. C. Heffner, N. Arora, T. V. Bowman, M. I. Lin, M. W. Lensch, A. De Los Angeles, L. I. Zon, S. Loewer, and G. Q. Daley. 2013. 'Signaling axis involving Hedgehog, Notch, and Scl promotes the embryonic endothelial-to-hematopoietic transition', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E141-50.
- Kim, S. H., E. J. Kim, M. Hitomi, S. Y. Oh, X. Jin, H. M. Jeon, S. Beck, X. Jin, J. K. Kim, C. G. Park, S. Y. Chang, J. Yin, T. Kim, Y. J. Jeon, J. Song, Y. C. Lim, J. D. Lathia, I. Nakano, and H. Kim. 2015. 'The LIM-only transcription factor LMO2 determines tumorigenic and angiogenic traits in glioma stem cells', *Cell Death Differ*, 22: 1517-25.
- Kinsella, M. G., and T. P. Fitzharris. 1980. 'Origin of cushion tissue in the developing chick heart: cinematographic recordings of in situ formation', *Science*, 207: 1359-60.
- Kissa, K., and P. Herbomel. 2010. 'Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition', *Nature*, 464: 112-5.
- Kofler, N. M., H. Cuervo, M. K. Uh, A. Murtomaki, and J. Kitajewski. 2015. 'Combined deficiency of Notch1 and Notch3 causes pericyte dysfunction, models CADASIL, and results in arteriovenous malformations', *Sci Rep*, 5: 16449.

- Kokovay, E., S. Goderie, Y. Wang, S. Lotz, G. Lin, Y. Sun, B. Roysam, Q. Shen, and S. Temple. 2010. 'Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling', *Cell Stem Cell*, 7: 163-73.
- Kolodziej, S., O. N. Kuvardina, T. Oellerich, J. Herglotz, I. Backert, N. Kohrs, El Buscato, S. K. Wittmann, G. Salinas-Riester, H. Bonig, M. Karas, H. Serve, E. Proschak, and J. Lausen. 2014. 'PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation', *Nat Commun*, 5: 3995.
- Kopan, R. 1999. 'All good things must come to an end: how is Notch signaling turned off?', *Sci STKE*, 1999: Pe1.
- Kopan, R., and M. X. Ilagan. 2009. 'The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism', *Cell*, 137: 216-33.
- Koyano-Nakagawa, N., J. Kweon, M. Iacovino, X. Shi, T. L. Rasmussen, L. Borges, K. M. Zirbes, T. Li, R. C. Perlingeiro, M. Kyba, and D. J. Garry. 2012. 'Etv2 is expressed in the yolk sac hematopoietic and endothelial progenitors and regulates Lmo2 gene expression', *Stem Cells*, 30: 1611-23.
- Kriegstein, A., and A. Alvarez-Buylla. 2009. 'The glial nature of embryonic and adult neural stem cells', *Annu Rev Neurosci*, 32: 149-84.
- Krueger, M., and I. Bechmann. 2010. 'CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out', *Glia*, 58: 1-10.
- Krusche, B., C. Ottone, M. P. Clements, E. R. Johnstone, K. Goetsch, H. Lieven, S. G. Mota, P. Singh, S. Khadayate, A. Ashraf, T. Davies, S. M. Pollard, V. De Paola, F. Roncaroli, J. Martinez-Torrecuadrada, P. Bertone, and S. Parrinello. 2016. 'EphrinB2 drives perivascular invasion and proliferation of glioblastoma stem-like cells', *Elife*, 5.
- Kume, T. 2012. 'Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation', *Adv Exp Med Biol*, 727: 210-22.
- Kuspert, M., A. Hammer, M. R. Bosl, and M. Wegner. 2011. 'Olig2 regulates Sox10 expression in oligodendrocyte precursors through an evolutionary conserved distal enhancer', *Nucleic Acids Res*, 39: 1280-93.
- Kuzontkoski, P. M., M. J. Mulligan-Kehoe, B. T. Harris, and M. A. Israel. 2010. 'Inhibitor of DNA binding-4 promotes angiogenesis and growth of glioblastoma multiforme by elevating matrix GLA levels', *Oncogene*, 29: 3793-802.
- Lahti, L., M. Haugas, L. Tikker, M. Airavaara, M. H. Voutilainen, J. Anttila, S. Kumar, C. Inkinen, M. Salminen, and J. Partanen. 2016. 'Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei', *Development*, 143: 516-29.
- Lakka, S. S., C. S. Gondi, and J. S. Rao. 2005. 'Proteases and glioma angiogenesis', *Brain Pathol*, 15: 327-41.
- Lange, C., W. B. Huttner, and F. Calegari. 2009. 'Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors', *Cell Stem Cell*, 5: 320-31.
- Lathia, J. D., S. C. Mack, E. E. Mulkearns-Hubert, C. L. Valentim, and J. N. Rich. 2015. 'Cancer stem cells in glioblastoma', *Genes Dev*, 29: 1203-17.
- Lawson, L. J., V. H. Perry, and S. Gordon. 1992. 'Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain', *Neuroscience*, 48: 405-15.
- Lawson, N. D., N. Scheer, V. N. Pham, C. H. Kim, A. B. Chitnis, J. A. Campos-Ortega, and B. M. Weinstein. 2001. 'Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development', *Development*, 128: 3675-83.
- Lazrak, M., V. Deleuze, D. Noel, D. Haouzi, E. Chalhoub, C. Dohet, I. Robbins, and D. Mathieu. 2004. 'The bHLH TAL-1/SCL regulates endothelial cell migration and morphogenesis', *J Cell Sci*, 117: 1161-71.
- Lecuyer, E., and T. Hoang. 2004. 'SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia', *Exp Hematol*, 32: 11-24.

- Lee, J., S. Kotliarova, Y. Kotliarov, A. Li, Q. Su, N. M. Donin, S. Pastorino, B. W. Purow, N. Christopher, W. Zhang, J. K. Park, and H. A. Fine. 2006. 'Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines', *Cancer Cell*, 9: 391-403.
- Li, A., J. Walling, S. Ahn, Y. Kotliarov, Q. Su, M. Quezado, J. C. Oberholtzer, J. Park, J. C. Zenklusen, and H. A. Fine. 2009. 'Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes', *Cancer Res*, 69: 2091-9.
- Li, H., J. P. de Faria, P. Andrew, J. Nitarska, and W. D. Richardson. 2011. 'Phosphorylation regulates OLIG2 cofactor choice and the motor neuron-oligodendrocyte fate switch', *Neuron*, 69: 918-29.
- Li, J., Y. Cui, G. Gao, Z. Zhao, H. Zhang, and X. Wang. 2011. 'Notch1 is an independent prognostic factor for patients with glioma', *J Surg Oncol*, 103: 813-7.
- Li, J. L., R. C. Sainson, C. E. Oon, H. Turley, R. Leek, H. Sheldon, E. Bridges, W. Shi, C. Snell, E. T. Bowden, H. Wu, P. S. Chowdhury, A. J. Russell, C. P. Montgomery, R. Poulsom, and A. L. Harris. 2011. 'DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo', *Cancer Res*, 71: 6073-83.
- Li, J. L., R. C. Sainson, W. Shi, R. Leek, L. S. Harrington, M. Preusser, S. Biswas, H. Turley, E. Heikamp, J. A. Hainfellner, and A. L. Harris. 2007. 'Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo', *Cancer Res*, 67: 11244-53.
- Li, Y., F. Guessous, Y. Zhang, C. Dipierro, B. Kefas, E. Johnson, L. Marcinkiewicz, J. Jiang, Y. Yang, T. D. Schmittgen, B. Lopes, D. Schiff, B. Purow, and R. Abounader. 2009. 'MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes', *Cancer Res*, 69: 7569-76.
- Liao, H., Y. Bai, S. Qiu, L. Zheng, L. Huang, T. Liu, X. Wang, Y. Liu, N. Xu, X. Yan, and H. Guo. 2015. 'MiR-203 downregulation is responsible for chemoresistance in human glioblastoma by promoting epithelial-mesenchymal transition via SNAI2', *Oncotarget*, 6: 8914-28.
- Liew, F. Y., J. P. Girard, and H. R. Turnquist. 2016. 'Interleukin-33 in health and disease', *Nat Rev Immunol*.
- Lim, K. J., W. D. Brandt, J. A. Heth, K. M. Muraszko, X. Fan, E. E. Bar, and C. G. Eberhart. 2015. 'Lateral inhibition of Notch signaling in neoplastic cells', *Oncotarget*, 6: 1666-77.
- Lin, Ching-Shwun, and Tom F. Lue. 2013. 'Defining Vascular Stem Cells', *Stem Cells and Development*, 22: 1018-26.
- Lin, F., N. Wang, and T. C. Zhang. 2012. 'The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process', *IUBMB Life*, 64: 717-23.
- Lindahl, P., B. R. Johansson, P. Leveen, and C. Betsholtz. 1997. 'Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice', *Science*, 277: 242-5.
- Lino, M. M., A. Merlo, and J. L. Boulay. 2010. 'Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target?', *BMC Med*, 8: 72.
- Liu, C., J. C. Sage, M. R. Miller, R. G. Verhaak, S. Hippenmeyer, H. Vogel, O. Foreman, R. T. Bronson, A. Nishiyama, L. Luo, and H. Zong. 2011. 'Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma', *Cell*, 146: 209-21.
- Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black, and J. S. Yu. 2006. 'Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma', *Mol Cancer*, 5: 67.
- Liu, H., S. Kennard, and B. Lilly. 2009. 'NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1', *Circ Res*, 104: 466-75.
- Livneh, I., V. Cohen-Kaplan, C. Cohen-Rosenzweig, N. Avni, and A. Ciechanover. 2016. 'The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death', *Cell Res*, 26: 869-85.
- Lojewski, X., S. Srimasorn, J. Rauh, S. Francke, M. Wobus, V. Taylor, M. J. Arauzo-Bravo, S. Hallmeyer-Elgner, M. Kirsch, S. Schwarz, J. Schwarz, A. Storch, and A. Hermann. 2015. 'Perivascular

- Mesenchymal Stem Cells From the Adult Human Brain Harbor No Intrinsic Neuroectodermal but High Mesodermal Differentiation Potential', *Stem Cells Transl Med*, 4: 1223-33.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvot, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues. 2007. 'The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system', *Acta Neuropathol*, 114: 97-109.
- Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues, and D. W. Ellison. 2016. 'The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary', *Acta Neuropathol*, 131: 803-20.
- Lu, Q. R., T. Sun, Z. Zhu, N. Ma, M. Garcia, C. D. Stiles, and D. H. Rowitch. 2002. 'Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection', *Cell*, 109: 75-86.
- Lyden, D., K. Hattori, S. Dias, C. Costa, P. Blaikie, L. Butros, A. Chadburn, B. Heissig, W. Marks, L. Witte, Y. Wu, D. Hicklin, Z. Zhu, N. R. Hackett, R. G. Crystal, M. A. Moore, K. A. Hajjar, K. Manova, R. Benezra, and S. Rafii. 2001. 'Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth', *Nat Med*, 7: 1194-201.
- Ma, Q., C. Fode, F. Guillemot, and D. J. Anderson. 1999. 'Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia', *Genes Dev*, 13: 1717-28.
- Machein, M. R., S. Renninger, E. de Lima-Hahn, and K. H. Plate. 2003. 'Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas', *Brain Pathol*, 13: 582-97.
- Maddaluno, L., N. Rudini, R. Cattano, L. Bravi, C. Giampietro, M. Corada, L. Ferrarini, F. Orsenigo, E. Papa, G. Boulday, E. Tournier-Lasserre, F. Chapon, C. Richichi, S. F. Retta, M. G. Lampugnani, and E. Dejana. 2013. 'EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations', *Nature*, 498: 492-6.
- Majesky, M. W., X. R. Dong, J. N. Regan, and V. J. Hoglund. 2011. 'Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels', *Circ Res*, 108: 365-77.
- Mamaeva, D., C. Ripoll, C. Bony, M. Teigell, F. E. Perrin, B. Rothhut, I. Bieche, R. Lidereau, A. Privat, V. Rigau, H. Guillon, F. Vachier-Lahaye, D. Noel, L. Bauchet, and J. P. Hugnot. 2011. 'Isolation of mineralizing Nestin+ Nkx6.1+ vascular muscular cells from the adult human spinal cord', *BMC Neurosci*, 12: 99.
- Mandarino, L. J., N. Sundarraj, J. Finlayson, and H. R. Hassell. 1993. 'Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro', *Exp Eye Res*, 57: 609-21.
- Mani, A., and E. P. Gelmann. 2005. 'The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer', *J Clin Oncol*, 23: 4776-89.
- Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R. A. Weinberg. 2008. 'The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells', *Cell*, 133: 704-15.
- Marcelo, K. L., L. C. Goldie, and K. K. Hirschi. 2013. 'Regulation of endothelial cell differentiation and specification', *Circ Res*, 112: 1272-87.
- Marfels, C., M. Hoehn, E. Wagner, and M. Gunther. 2013. 'Characterization of in vivo chemoresistant human hepatocellular carcinoma cells with transendothelial differentiation capacities', *BMC Cancer*, 13: 176.
- Marin, F., and M. A. Nieto. 2004. 'Expression of chicken slug and snail in mesenchymal components of the developing central nervous system', *Dev Dyn*, 230: 144-8.
- Mathieu, D. 2009. '[The bHLH TAL1 protein: a key molecule in the hematopoietic and endothelial systems]', *J Soc Biol*, 203: 143-53.

- Mathiisen, T. M., K. P. Lehre, N. C. Danbolt, and O. P. Ottersen. 2010. 'The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction', *Glia*, 58: 1094-103.
- Mattar, P., L. M. Langevin, K. Markham, N. Klenin, S. Shivji, D. Zinyk, and C. Schuurmans. 2008. 'Basic helix-loop-helix transcription factors cooperate to specify a cortical projection neuron identity', *Mol Cell Biol*, 28: 1456-69.
- Medici, D., and R. Kalluri. 2012. 'Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype', *Semin Cancer Biol*, 22: 379-84.
- Molofsky, A. V., and B. Deneen. 2015. 'Astrocyte development: A Guide for the Perplexed', *Glia*, 63: 1320-9.
- Monteiro, R., P. Pinheiro, N. Joseph, T. Peterkin, J. Koth, E. Repapi, F. Bonkhofer, A. Kirmizitas, and R. Patient. 2016. 'Transforming Growth Factor beta Drives Hemogenic Endothelium Programming and the Transition to Hematopoietic Stem Cells', *Dev Cell*, 38: 358-70.
- Montel-Hagen, A., B. Van Handel, and H. Mikkola. 2013. '[An unexpected repressive role for Scl in the embryonic endothelium]', *Med Sci (Paris)*, 29: 257-9.
- Moreau, T., A. L. Evans, L. Vasquez, M. R. Tijssen, Y. Yan, M. W. Trotter, D. Howard, M. Colzani, M. Arumugam, W. H. Wu, A. Dalby, R. Lampela, G. Bouet, C. M. Hobbs, D. C. Pask, H. Payne, T. Ponomaryov, A. Brill, N. Soranzo, W. H. Ouwehand, R. A. Pedersen, and C. Ghevaert. 2016. 'Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming', *Nat Commun*, 7: 11208.
- Morita, R., M. Suzuki, H. Kasahara, N. Shimizu, T. Shichita, T. Sekiya, A. Kimura, K. Sasaki, H. Yasukawa, and A. Yoshimura. 2015. 'ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 160-5.
- Moutal, A., J. Honnorat, P. Massoma, P. Desormeaux, C. Bertrand, C. Malleval, C. Watrin, N. Chounlamountri, M. E. Mayeur, R. Besancon, N. Naudet, L. Magadoux, R. Khanna, F. Ducray, D. Meyronet, and N. Thomasset. 2015. 'CRMP5 Controls Glioblastoma Cell Proliferation and Survival through Notch-Dependent Signaling', *Cancer Res*, 75: 3519-28.
- Muroyama, Y., Y. Fujiwara, S. H. Orkin, and D. H. Rowitch. 2005. 'Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube', *Nature*, 438: 360-3.
- Murre, C., P. S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Y. Jan, Y. N. Jan, C. V. Cabrera, J. N. Buskin, S. D. Hauschka, A. B. Lassar, and et al. 1989. 'Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence', *Cell*, 58: 537-44.
- Nakagomi, T., S. Kubo, A. Nakano-Doi, R. Sakuma, S. Lu, A. Narita, M. Kawahara, A. Taguchi, and T. Matsuyama. 2015. 'Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells', *Stem Cells*, 33: 1962-74.
- Nakagomi, T., A. Nakano-Doi, M. Kawamura, and T. Matsuyama. 2015. 'Do Vascular Pericytes Contribute to Neurovasculogenesis in the Central Nervous System as Multipotent Vascular Stem Cells?', *Stem Cells Dev*, 24: 1730-9.
- Nakano, I. 2015. 'Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target', *J Neurosurg*, 122: 324-30.
- Nakashima, K., M. Yanagisawa, H. Arakawa, N. Kimura, T. Hisatsune, M. Kawabata, K. Miyazono, and T. Taga. 1999. 'Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300', *Science*, 284: 479-82.
- Nam, S. C., Y. Kim, D. Dryanovski, A. Walker, G. Goings, K. Woolfrey, S. S. Kang, C. Chu, A. Chenn, F. Erdelyi, G. Szabo, P. Hockberger, and F. G. Szele. 2007. 'Dynamic features of postnatal subventricular zone cell motility: a two-photon time-lapse study', *J Comp Neurol*, 505: 190-208.
- Namihira, M., J. Kohyama, K. Semi, T. Sanosaka, B. Deneen, T. Taga, and K. Nakashima. 2009. 'Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells', *Dev Cell*, 16: 245-55.

- Newman, P. J., M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White, 2nd, S. Lyman, C. Paddock, and W. A. Muller. 1990. 'PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily', *Science*, 247: 1219-22.
- Nicolay, D. J., J. R. Doucette, and A. J. Nazarali. 2007. 'Transcriptional control of oligodendrogenesis', *Glia*, 55: 1287-99.
- Niessen, K., Y. Fu, L. Chang, P. A. Hoodless, D. McFadden, and A. Karsan. 2008. 'Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization', *J Cell Biol*, 182: 315-25.
- Nieto, M. A. 2002. 'The snail superfamily of zinc-finger transcription factors', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 155-66.
- Nieto, M. A., R. Y. Huang, R. A. Jackson, and J. P. Thiery. 2016. 'Emt: 2016', *Cell*, 166: 21-45.
- Nieto, M. A., M. G. Sargent, D. G. Wilkinson, and J. Cooke. 1994. 'Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene', *Science*, 264: 835-9.
- Nishiyama, A., R. Suzuki, and X. Zhu. 2014. 'NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair', *Front Neurosci*, 8: 133.
- Noushmehr, H., D. J. Weisenberger, K. Diefes, H. S. Phillips, K. Pujara, B. P. Berman, F. Pan, C. E. Pelloso, E. P. Sulman, K. P. Bhat, R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, D. N. Hayes, C. M. Perou, H. K. Schmidt, L. Ding, R. K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L. M. Cope, J. Buckley, J. G. Herman, S. B. Baylin, P. W. Laird, and K. Aldape. 2010. 'Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma', *Cancer Cell*, 17: 510-22.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. 2005. 'Epidemiology and etiology of gliomas', *Acta Neuropathol*, 109: 93-108.
- Ohgaki, Hiroko, and Paul Kleihues. 2013. 'The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma', *Clinical Cancer Research*, 19: 764.
- Oishi, K., A. Kobayashi, K. Fujii, D. Kanehira, Y. Ito, and M. K. Uchida. 2004. 'Angiogenesis in vitro: vascular tube formation from the differentiation of neural stem cells', *J Pharmacol Sci*, 96: 208-18.
- Oishi, K., Y. Ogawa, S. Gamoh, and M. K. Uchida. 2002. 'Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells', *J Physiol*, 540: 139-52.
- Oldrini, B., A. J. Schuhmacher, and M. Squatrito. 2015. 'Take It Down a NOTCH in Forebrain Tumors', *Cancer Cell*, 28: 681-2.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, L. Stetson, S. M. Virk, and J. S. Barnholtz-Sloan. 2015. 'Epidemiology of gliomas', *Cancer Treat Res*, 163: 1-14.
- Ottone, C., B. Krusche, A. Whitby, M. Clements, G. Quadrato, M. E. Pitulescu, R. H. Adams, and S. Parrinello. 2014. 'Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells', *Nat Cell Biol*, 16: 1045-56.
- Paez-Gonzalez, P., B. Asrican, E. Rodriguez, and C. T. Kuo. 2014. 'Identification of distinct ChAT(+) neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis', *Nat Neurosci*, 17: 934-42.
- Palii, C. G., B. Vulesevic, S. Fraineau, E. Pranckeviciene, A. J. Griffith, A. Chu, H. Faralli, Y. Li, B. McNeill, J. Sun, T. J. Perkins, F. J. Dilworth, C. Perez-Iratxeta, E. J. Suuronen, D. S. Allan, and M. Brand. 2014. 'Trichostatin A enhances vascular repair by injected human endothelial progenitors through increasing the expression of TAL1-dependent genes', *Cell Stem Cell*, 14: 644-57.
- Parati, E. A., A. Bez, D. Ponti, U. de Grazia, E. Corsini, L. Cova, S. Sala, A. Colombo, G. Alessandri, and S. F. Pagano. 2002. 'Human neural stem cells express extra-neural markers', *Brain Res*, 925: 213-21.
- Parent, A. E., C. Choi, K. Caudy, T. Gridley, and D. F. Kusewitt. 2004. 'The developmental transcription factor slug is widely expressed in tissues of adult mice', *J Histochem Cytochem*, 52: 959-65.
- Paridaen, J. T., and W. B. Huttner. 2014. 'Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system', *EMBO Rep*, 15: 351-64.

- Park, H. C., and B. Appel. 2003. 'Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification', *Development*, 130: 3747-55.
- Park, S. Y., Y. Piao, K. J. Jeong, J. Dong, and J. F. de Groot. 2016. 'Periostin (POSTN) Regulates Tumor Resistance to Antiangiogenic Therapy in Glioma Models', *Mol Cancer Ther*, 15: 2187-97.
- Parliament, M. B., M. J. Allalunis-Turner, A. J. Franko, P. L. Olive, R. Mandyam, C. Santos, and B. Wolokoff. 2000. 'Vascular endothelial growth factor expression is independent of hypoxia in human malignant glioma spheroids and tumours', *Br J Cancer*, 82: 635-41.
- Parras, C. M., R. Galli, O. Britz, S. Soares, C. Galichet, J. Battiste, J. E. Johnson, M. Nakafuku, A. Vescovi, and F. Guillemot. 2004. 'Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain', *Embo j*, 23: 4495-505.
- Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, and K. W. Kinzler. 2008. 'An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme', *Science*, 321: 1807-12.
- Paul, G., I. Ozen, N. S. Christophersen, T. Reinbothe, J. Bengzon, E. Visse, K. Jansson, K. Dannaeus, C. Henriques-Oliveira, L. Roybon, S. V. Anisimov, E. Renstrom, M. Svensson, A. Haegerstrand, and P. Brundin. 2012. 'The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells', *PLoS One*, 7: e35577.
- Peng, C. Y., H. Yajima, C. E. Burns, L. I. Zon, S. S. Sisodia, S. L. Pfaff, and K. Sharma. 2007. 'Notch and MAML signaling drives Scl-dependent interneuron diversity in the spinal cord', *Neuron*, 53: 813-27.
- Peppiatt, C. M., C. Howarth, P. Mobbs, and D. Attwell. 2006. 'Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes', *Nature*, 443: 700-4.
- Pezzolo, A., F. Parodi, M. V. Corrias, R. Cinti, C. Gambini, and V. Pistoia. 2007. 'Tumor origin of endothelial cells in human neuroblastoma', *J Clin Oncol*, 25: 376-83.
- Phillips, H. S., S. Kharbanda, R. Chen, W. F. Forrester, R. H. Soriano, T. D. Wu, A. Misra, J. M. Nigro, H. Colman, L. Soroceanu, P. M. Williams, Z. Modrusan, B. G. Feuerstein, and K. Aldape. 2006. 'Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis', *Cancer Cell*, 9: 157-73.
- Phillips, S., and C. Kuperwasser. 2014. 'SLUG: Critical regulator of epithelial cell identity in breast development and cancer', *Cell Adh Migr*, 8: 578-87.
- Phng, L. K., and H. Gerhardt. 2009. 'Angiogenesis: a team effort coordinated by notch', *Dev Cell*, 16: 196-208.
- Pierfelice, T., L. Alberi, and N. Gaiano. 2011. 'Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks', *Neuron*, 69: 840-55.
- Pisacane, A. M., F. Picciotto, and M. Risio. 2007. 'CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma', *Cell Oncol*, 29: 59-66.
- Plate, K. H., G. Breier, H. A. Weich, and W. Risau. 1992. 'Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo', *Nature*, 359: 845-8.
- Politis, P. K., G. Makri, D. Thomaidou, M. Geissen, H. Rohrer, and R. Matsas. 2007. 'BM88/CEND1 coordinates cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 17861-6.
- Pollard, S. M., K. Yoshikawa, I. D. Clarke, D. Danovi, S. Stricker, R. Russell, J. Bayani, R. Head, M. Lee, M. Bernstein, J. A. Squire, A. Smith, and P. Dirks. 2009. 'Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens', *Cell Stem Cell*, 4: 568-80.
- Pomero, A., R. Garcia-Lopez, and S. Martinez. 2016. 'Brain mesenchymal stem cells: physiology and pathological implications', *Dev Growth Differ*, 58: 469-80.

- Poulson, D. F. 1937. 'Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 23: 133-7.
- Pulford, K., N. Lecointe, K. Leroy-Viard, M. Jones, D. Mathieu-Mahul, and D. Y. Mason. 1995. 'Expression of TAL-1 proteins in human tissues', *Blood*, 85: 675-84.
- Purow, B. W., R. M. Haque, M. W. Noel, Q. Su, M. J. Burdick, J. Lee, T. Sundaresan, S. Pastorino, J. K. Park, I. Mikolaenko, D. Maric, C. G. Eberhart, and H. A. Fine. 2005. 'Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation', *Cancer Res*, 65: 2353-63.
- Purow, B. W., T. K. Sundaresan, M. J. Burdick, B. A. Kefas, L. D. Comeau, M. P. Hawkinson, Q. Su, Y. Kotliarov, J. Lee, W. Zhang, and H. A. Fine. 2008. 'Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor receptor through p53', *Carcinogenesis*, 29: 918-25.
- Qian, F., F. Zhen, J. Xu, M. Huang, W. Li, and Z. Wen. 2007. 'Distinct functions for different scl isoforms in zebrafish primitive and definitive hematopoiesis', *PLoS Biol*, 5: e132.
- Qiang, L., T. Wu, H. W. Zhang, N. Lu, R. Hu, Y. J. Wang, L. Zhao, F. H. Chen, X. T. Wang, Q. D. You, and Q. L. Guo. 2012. 'HIF-1alpha is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway', *Cell Death Differ*, 19: 284-94.
- Quaegebeur, A., C. Lange, and P. Carmeliet. 2011. 'The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications', *Neuron*, 71: 406-24.
- Rajasekhar, V. K., A. Viale, N. D. Socci, M. Wiedmann, X. Hu, and E. C. Holland. 2003. 'Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes', *Mol Cell*, 12: 889-901.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang. 2013. 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nat Protoc*, 8: 2281-308.
- Reiss, Y., M. R. Machein, and K. H. Plate. 2005. 'The role of angiopoietins during angiogenesis in gliomas', *Brain Pathol*, 15: 311-7.
- Reitman, Z. J., D. W. Parsons, and H. Yan. 2010. 'IDH1 and IDH2: not your typical oncogenes', *Cancer Cell*, 17: 215-6.
- Rennert, Robert C., Achal S. Achrol, Michael Januszzyk, Suzana A. Kahn, Tiffany T. Liu, Yi Liu, Debashis Sahoo, Melanie Rodrigues, Zeshaan N. Maan, Victor W. Wong, Samuel H. Cheshier, Steven D. Chang, Gary K. Steinberg, Griffith R. Harsh, and Geoffrey C. Gurtner. 2016. 'Multiple subsets of brain tumor initiating cells co-exist in glioblastoma', *Stem Cells*: n/a-n/a.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman. 2001. 'Stem cells, cancer, and cancer stem cells', *Nature*, 414: 105-11.
- Reyahi, A., A. M. Nik, M. Ghiami, A. Gritli-Linde, F. Ponten, B. R. Johansson, and P. Carlsson. 2015. 'Foxf2 Is Required for Brain Pericyte Differentiation and Development and Maintenance of the Blood-Brain Barrier', *Dev Cell*, 34: 19-32.
- Reynolds, B. A., and S. Weiss. 1992. 'Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system', *Science*, 255: 1707-10.
- Ribatti, D. 2007. 'The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review', *Leuk Res*, 31: 439-44.
- Ricci-Vitiani, L., R. Pallini, M. Biffoni, M. Todaro, G. Invernici, T. Cenci, G. Maira, E. A. Parati, G. Stassi, L. M. Larocca, and R. De Maria. 2010. 'Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells', *Nature*, 468: 824-8.
- Ricci-Vitiani, L., R. Pallini, L. M. Larocca, D. G. Lombardi, M. Signore, F. Pierconti, G. Petrucci, N. Montano, G. Maira, and R. De Maria. 2008. 'Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells', *Cell Death Differ*, 15: 1491-8.
- Rich, J. N. 2007. 'Cancer stem cells in radiation resistance', *Cancer Res*, 67: 8980-4.
- Romero-Grimaldi, C., B. Moreno-Lopez, and C. Estrada. 2008. 'Age-dependent effect of nitric oxide on subventricular zone and olfactory bulb neural precursor proliferation', *J Comp Neurol*, 506: 339-46.

- Rouget, Charles. 1873. 'Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologique des capillaires sanguins et lymphatiques', *Arch Physiol Norm Path*, 5: 603-63.
- . 1874. 'Note sur le développement de la tunique contractile des vaisseaux', *Compt Rend Acad Sci Paris*, 59: 559-62.
- . 1879. 'Sur la contractilité des capillaires sanguins', *Compt Rend Acad Sci Paris*, 88: 916-18.
- Sadler, J. Evan. 1998. 'BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF VON WILLEBRAND FACTOR', *Annual Review of Biochemistry*, 67: 395-424.
- Saito, N., J. Fu, S. Zheng, J. Yao, S. Wang, D. D. Liu, Y. Yuan, E. P. Sulman, F. F. Lang, H. Colman, R. G. Verhaak, W. K. Yung, and D. Koul. 2014. 'A high Notch pathway activation predicts response to gamma secretase inhibitors in proneural subtype of glioma tumor-initiating cells', *Stem Cells*, 32: 301-12.
- Sanalkumar, Rajendran, Sivadasan Bindu Dhanesh, and Jackson James. 2010. 'Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 2957-68.
- Sanda, T., L. N. Lawton, M. I. Barrasa, Z. P. Fan, H. Kohlhammer, A. Gutierrez, W. Ma, J. Tatarek, Y. Ahn, M. A. Kelliher, C. H. Jamieson, L. M. Staudt, R. A. Young, and A. T. Look. 2012. 'Core transcriptional regulatory circuit controlled by the TAL1 complex in human T cell acute lymphoblastic leukemia', *Cancer Cell*, 22: 209-21.
- Sanson, M., Y. Marie, S. Paris, A. Idbaih, J. Laffaire, F. Ducray, S. El Hallani, B. Boisselier, K. Mokhtari, K. Hoang-Xuan, and J. Y. Delattre. 2009. 'Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas', *J Clin Oncol*, 27: 4150-4.
- Saunders, N. R., S. A. Liddelow, and K. M. Dziegielewska. 2012. 'Barrier mechanisms in the developing brain', *Front Pharmacol*, 3: 46.
- Sawamiphak, S., S. Seidel, C. L. Essmann, G. A. Wilkinson, M. E. Pitulescu, T. Acker, and A. Acker-Palmer. 2010. 'Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis', *Nature*, 465: 487-91.
- Schmidt, A., K. Brixius, and W. Bloch. 2007. 'Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis', *Circ Res*, 101: 125-36.
- Schmidt, M., and D. Finley. 2014. 'Regulation of proteasome activity in health and disease', *Biochim Biophys Acta*, 1843: 13-25.
- Schnapp, L. M., J. M. Breuss, D. M. Ramos, D. Sheppard, and R. Pytela. 1995. 'Sequence and tissue distribution of the human integrin alpha 8 subunit: a beta 1-associated alpha subunit expressed in smooth muscle cells', *J Cell Sci*, 108 (Pt 2): 537-44.
- Schreck, K. C., P. Taylor, L. Marchionni, V. Gopalakrishnan, E. E. Bar, N. Gaiano, and C. G. Eberhart. 2010. 'The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance', *Clin Cancer Res*, 16: 6060-70.
- Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger, and R. Kopan. 1998. 'Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain', *Nature*, 393: 382-6.
- Scully, S., R. Francescone, M. Faibish, B. Bentley, S. L. Taylor, D. Oh, R. Schapiro, L. Moral, W. Yan, and R. Shao. 2012. 'Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas', *J Neurosci*, 32: 12950-60.
- Shen, Q., S. K. Goderie, L. Jin, N. Karanth, Y. Sun, N. Abramova, P. Vincent, K. Pumiglia, and S. Temple. 2004. 'Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells', *Science*, 304: 1338-40.
- Shen, Q., Y. Wang, E. Kokovay, G. Lin, S. M. Chuang, S. K. Goderie, B. Roysam, and S. Temple. 2008. 'Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions', *Cell Stem Cell*, 3: 289-300.
- Siebzehnrbul, F. A., B. A. Reynolds, A. Vescovi, D. A. Steindler, and L. P. Deleyrolle. 2011. 'The origins of glioma: E Pluribus Unum?', *Glia*, 59: 1135-47.
- Sims, D. E. 1986. 'The pericyte--a review', *Tissue Cell*, 18: 153-74.

- Singh, S. K., I. D. Clarke, T. Hide, and P. B. Dirks. 2004. 'Cancer stem cells in nervous system tumors', *Oncogene*, 23: 7267-73.
- Sivasankaran, B., M. Degen, A. Ghaffari, M. E. Hegi, M. F. Hamou, M. C. Ionescu, C. Zweifel, M. Tolnay, M. Wasner, S. Mergenthaler, A. R. Miserez, R. Kiss, M. M. Lino, A. Merlo, R. Chiquet-Ehrismann, and J. L. Boulay. 2009. 'Tenascin-C is a novel RBPJkappa-induced target gene for Notch signaling in gliomas', *Cancer Res*, 69: 458-65.
- Slukvin, I., and M. Vodyanik. 2011. 'Endothelial origin of mesenchymal stem cells', *Cell Cycle*, 10: 1370-3.
- Smith, E., M. Hargrave, T. Yamada, C. G. Begley, and M. H. Little. 2002. 'Coexpression of SCL and GATA3 in the V2 interneurons of the developing mouse spinal cord', *Dev Dyn*, 224: 231-7.
- Soda, Y., T. Marumoto, D. Friedmann-Morvinski, M. Soda, F. Liu, H. Michiue, S. Pastorino, M. Yang, R. M. Hoffman, S. Kesari, and I. M. Verma. 2011. 'Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 4274-80.
- Somasundaram, K., S. P. Reddy, K. Vinnakota, R. Britto, M. Subbarayan, S. Nambiar, A. Hebbar, C. Samuel, M. Shetty, H. K. Sreepathi, V. Santosh, A. S. Hegde, S. Hegde, P. Kondaiah, and M. R. Rao. 2005. 'Upregulation of ASCL1 and inhibition of Notch signaling pathway characterize progressive astrocytoma', *Oncogene*, 24: 7073-83.
- Song, Y., N. Mehta, B. Sheh, F. Saljoogue, H. S. U, and M. Rajasekaran. 2009. 'Transdifferentiation of rat fetal brain stem cells into penile smooth muscle cells', *BJU Int*, 104: 257-62.
- Soroceanu, L., L. Matlaf, S. Khan, A. Akhavan, E. Singer, V. Bezrookove, S. Decker, S. Ghanny, P. Hadaczek, H. Bengtsson, J. Ohlfest, M. G. Luciani-Torres, L. Harkins, A. Perry, H. Guo, P. Soteropoulos, and C. S. Cobbs. 2015. 'Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins Promote Stemness Properties in Glioblastoma', *Cancer Res*, 75: 3065-76.
- Stacer, A. C., H. Wang, J. Fenner, J. S. Dosch, A. Salomonsson, K. E. Luker, G. D. Luker, A. Rehemtulla, and B. D. Ross. 2015. 'Imaging Reporters for Proteasome Activity Identify Tumor- and Metastasis-Initiating Cells', *Mol Imaging*, 14: 414-28.
- Stojkovic, S., C. Kaun, J. Babilio, S. Rauscher, L. Hell, K. A. Krychtiuk, C. Bonstingl, R. de Martin, M. Groger, C. Ay, W. Holnthoner, W. Eppel, C. Neumayer, I. Huk, K. Huber, S. Demyanets, and J. Wojta. 2016. 'Tissue factor is induced by interleukin-33 in human endothelial cells: a new link between coagulation and inflammation', *Sci Rep*, 6: 25171.
- Stolt, C. C., P. Lommes, E. Sock, M. C. Chaboissier, A. Schedl, and M. Wegner. 2003. 'The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord', *Genes Dev*, 17: 1677-89.
- Stratman, A. N., K. M. Malotte, R. D. Mahan, M. J. Davis, and G. E. Davis. 2009. 'Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation', *Blood*, 114: 5091-101.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R. O. Mirimanoff. 2005. 'Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma', *N Engl J Med*, 352: 987-96.
- Sugimori, M., M. Nagao, C. M. Parras, H. Nakatani, M. Lebel, F. Guillemot, and M. Nakafuku. 2008. 'Ascl1 is required for oligodendrocyte development in the spinal cord', *Development*, 135: 1271-81.
- Sun, Y., D. H. Meijer, J. A. Alberta, S. Mehta, M. F. Kane, A. C. Tien, H. Fu, M. A. Petryniak, G. B. Potter, Z. Liu, J. F. Powers, I. S. Runquist, D. H. Rowitch, and C. D. Stiles. 2011. 'Phosphorylation state of Olig2 regulates proliferation of neural progenitors', *Neuron*, 69: 906-17.
- Svensson, A., I. Ozen, G. Genove, G. Paul, and J. Bengzon. 2015. 'Endogenous brain pericytes are widely activated and contribute to mouse glioma microvasculature', *PLoS One*, 10: e0123553.
- Sweeney, M. D., S. Ayyadurai, and B. V. Zlokovic. 2016. 'Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways', *Nat Neurosci*, 19: 771-83.

- Swerdlow, Anthony J., Maria Feychting, Adele C. Green, Leeka Kheifets, and David A. Savitz. 2011. 'Mobile Phones, Brain Tumors, and the Interphone Study: Where Are We Now?', *Environmental Health Perspectives*, 119: 1534-38.
- Taillibert, S., M. Pedretti, and M. Sanson. 2004. '[Therapeutic strategies and prospects of gliomas]', *Presse Med*, 33: 1278-83.
- Tang, T., Y. Shi, S. R. Opalenik, D. M. Brantley-Sieders, J. Chen, J. M. Davidson, and S. J. Brandt. 2006. 'Expression of the TAL1/SCL transcription factor in physiological and pathological vascular processes', *J Pathol*, 210: 121-9.
- Tang, Y., S. Urs, and L. Liaw. 2008. 'Hairy-related transcription factors inhibit Notch-induced smooth muscle alpha-actin expression by interfering with Notch intracellular domain/CBF-1 complex interaction with the CBF-1-binding site', *Circ Res*, 102: 661-8.
- Tanigaki, K., F. Nogaki, J. Takahashi, K. Tashiro, H. Kurooka, and T. Honjo. 2001. 'Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate', *Neuron*, 29: 45-55.
- Tatarek, J., K. Cullion, T. Ashworth, R. Gerstein, J. C. Aster, and M. A. Kelliher. 2011. 'Notch1 inhibition targets the leukemia-initiating cells in a Tal1/Lmo2 mouse model of T-ALL', *Blood*, 118: 1579-90.
- Tavazoie, M., L. Van der Veken, V. Silva-Vargas, M. Louissaint, L. Colonna, B. Zaidi, J. M. Garcia-Verdugo, and F. Doetsch. 2008. 'A specialized vascular niche for adult neural stem cells', *Cell Stem Cell*, 3: 279-88.
- TCGA, Cancer Genome Atlas Research Network. 2008. 'Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways', *Nature*, 455: 1061-8.
- Teodorczyk, M., and M. H. Schmidt. 2014. 'Notching on Cancer's Door: Notch Signaling in Brain Tumors', *Front Oncol*, 4: 341.
- Thomas, J. L., K. Baker, J. Han, C. Calvo, H. Nurmi, A. C. Eichmann, and K. Alitalo. 2013. 'Interactions between VEGFR and Notch signaling pathways in endothelial and neural cells', *Cell Mol Life Sci*, 70: 1779-92.
- Thurston, G., C. Suri, K. Smith, J. McClain, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos, and D. M. McDonald. 1999. 'Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1', *Science*, 286: 2511-4.
- Tong, C. K., J. Chen, A. Cebrian-Silla, Z. Mirzadeh, K. Obernier, C. D. Guinto, L. H. Tecott, J. M. Garcia-Verdugo, A. Kriegstein, and A. Alvarez-Buylla. 2014. 'Axonal control of the adult neural stem cell niche', *Cell Stem Cell*, 14: 500-11.
- Traiffort, E., and J. Ferent. 2015. '[Neural stem cells and Notch signalling]', *Med Sci (Paris)*, 31: 1115-25.
- Transomic-Technologies. 2015. 'CRISPR/Cas9 for Genome Editing', *Transomic.com (online review)*.
- Tsai, R. Y., and R. D. McKay. 2000. 'Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells', *J Neurosci*, 20: 3725-35.
- Tso, C. L., W. A. Freije, A. Day, Z. Chen, B. Merriman, A. Perlina, Y. Lee, E. Q. Dia, K. Yoshimoto, P. S. Mischel, L. M. Liau, T. F. Cloughesy, and S. F. Nelson. 2006. 'Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups', *Cancer Res*, 66: 159-67.
- Tso, C. L., P. Shintaku, J. Chen, Q. Liu, J. Liu, Z. Chen, K. Yoshimoto, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, L. M. Liau, and S. F. Nelson. 2006. 'Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties', *Mol Cancer Res*, 4: 607-19.
- Turchi, L., D. N. Debruyne, F. Almairac, V. Virolle, M. Fareh, Y. Neirijnck, F. Burel-Vandenbos, P. Paquis, M. P. Junier, E. Van Obberghen-Schilling, H. Chneiweiss, and T. Virolle. 2013. 'Tumorigenic potential of miR-18A* in glioma initiating cells requires NOTCH-1 signaling', *Stem Cells*, 31: 1252-65.
- Turpin, A., A. Sharif, L. Stoven, S. Blond, C. A. Maurage, and E. Le Rhun. 2015. '[The stem cell niche in glioblastoma: from fundamental aspects to targeted therapies]', *Bull Cancer*, 102: 24-33.

- Uhrbom, L., C. Dai, J. C. Celestino, M. K. Rosenblum, G. N. Fuller, and E. C. Holland. 2002. 'Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt', *Cancer Res*, 62: 5551-8.
- Uhrbom, L., M. Kastemar, F. K. Johansson, B. Westermark, and E. C. Holland. 2005. 'Cell type-specific tumor suppression by Ink4a and Arf in Kras-induced mouse gliomagenesis', *Cancer Res*, 65: 2065-9.
- Valentijn, K. M., J. E. Sadler, J. A. Valentijn, J. Voorberg, and J. Eikenboom. 2011. 'Functional architecture of Weibel-Palade bodies', *Blood*, 117: 5033-43.
- van Eekelen, J. A. M., C. K. Bradley, J. R. Göthert, L. Robb, A. G. Elefanty, C. G. Begley, and A. R. Harvey. 2003. 'Expression pattern of the stem cell leukaemia gene in the CNS of the embryonic and adult mouse', *Neuroscience*, 122: 421-36.
- Van Meir, E. G., C. G. Hadjipanayis, A. D. Norden, H. K. Shu, P. Y. Wen, and J. J. Olson. 2010. 'Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma', *CA Cancer J Clin*, 60: 166-93.
- Vasudevan, A., J. E. Long, J. E. Crandall, J. L. Rubenstein, and P. G. Bhide. 2008. 'Compartment-specific transcription factors orchestrate angiogenesis gradients in the embryonic brain', *Nat Neurosci*, 11: 429-39.
- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, D. N. Hayes, and Network Cancer Genome Atlas Research. 2010. 'Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1', *Cancer Cell*, 17: 98-110.
- Vescovi, A. L., R. Galli, and B. A. Reynolds. 2006. 'Brain tumour stem cells', *Nat Rev Cancer*, 6: 425-36.
- Videla Richardson, G. A., C. P. Garcia, A. Roisman, I. Slavutsky, D. D. Fernandez Espinosa, L. Romorini, S. G. Miriuka, N. Arakaki, H. Martinetto, M. E. Scassa, and G. E. Sevlever. 2015. 'Specific Preferences in Lineage Choice and Phenotypic Plasticity of Glioma Stem Cells Under BMP4 and Noggin Influence', *Brain Pathol*.
- Vitucci, M., D. N. Hayes, and C. R. Miller. 2011. 'Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy', *Br J Cancer*, 104: 545-53.
- Vlachostergios, P. J., I. A. Voutsadakis, and C. N. Papandreou. 2013. 'The role of ubiquitin-proteasome system in glioma survival and growth', *Growth Factors*, 31: 106-13.
- Vodyanik, M. A., J. Yu, X. Zhang, S. Tian, R. Stewart, J. A. Thomson, and Slukvin, II. 2010. 'A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells', *Cell Stem Cell*, 7: 718-29.
- Walchli, T., A. Wacker, K. Frei, L. Regli, M. E. Schwab, S. P. Hoerstrup, H. Gerhardt, and B. Engelhardt. 2015. 'Wiring the Vascular Network with Neural Cues: A CNS Perspective', *Neuron*, 87: 271-96.
- Wälchli, Thomas, Vincent Pernet, Oliver Weinmann, Jau-Ye Shiu, Anna Guzik-Kornacka, Guillaume Decrey, Deniz Yüksel, Hannah Schneider, Johannes Vogel, Donald E. Ingber, Viola Vogel, Karl Frei, and Martin E. Schwab. 2013. 'Nogo-A is a negative regulator of CNS angiogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: E1943-E52.
- Wang, H., T. Sun, J. Hu, R. Zhang, Y. Rao, S. Wang, R. Chen, R. E. McLendon, A. H. Friedman, S. T. Keir, D. D. Bigner, Q. J. Li, H. Wang, and X. F. Wang. 2014. 'miR-33a promotes glioma-initiating cell self-renewal via PKA and NOTCH pathways', *J Clin Invest*, 124: 4489-502.
- Wang, R., K. Chadalavada, J. Wilshire, U. Kowalik, K. E. Hovinga, A. Geber, B. Fligelman, M. Leversha, C. Brennan, and V. Tabar. 2010. 'Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium', *Nature*, 468: 829-33.
- Wang, Y., L. Pan, C. B. Moens, and B. Appel. 2014. 'Notch3 establishes brain vascular integrity by regulating pericyte number', *Development*, 141: 307-17.

- Wehrspaun, C. C., W. Haerty, and C. P. Ponting. 2015. 'Microglia recapitulate a hematopoietic master regulator network in the aging human frontal cortex', *Neurobiol Aging*, 36: 2443.e9-43.e20.
- Welch-Reardon, K. M., S. M. Ehsan, K. Wang, N. Wu, A. C. Newman, M. Romero-Lopez, A. H. Fong, S. C. George, R. A. Edwards, and C. C. Hughes. 2014. 'Angiogenic sprouting is regulated by endothelial cell expression of Slug', *J Cell Sci*, 127: 2017-28.
- Welch-Reardon, K. M., N. Wu, and C. C. Hughes. 2015. 'A role for partial endothelial-mesenchymal transitions in angiogenesis?', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35: 303-8.
- Williams, R. W., and K. Herrup. 1988. 'The Control of Neuron Number', *Annual Review of Neuroscience*, 11: 423-53.
- Winkler, E. A., R. D. Bell, and B. V. Zlokovic. 2011. 'Central nervous system pericytes in health and disease', *Nat Neurosci*, 14: 1398-405.
- Wiranowska, M.; Vronis FD. 2013. 'Gliomas: Symptoms, Diagnosis and Treatment Options', *Nova Science Publishers, Inc.*
- Won, C., Z. Lin, T. P. Kumar, S. Li, L. Ding, A. Elkhali, G. Szabo, and A. Vasudevan. 2013. 'Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain', *Nat Commun*, 4: 2149.
- Wright, A. V., J. K. Nunez, and J. A. Doudna. 2016. 'Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering', *Cell*, 164: 29-44.
- Wu, H. C., Y. C. Lin, C. H. Liu, H. C. Chung, Y. T. Wang, Y. W. Lin, H. I. Ma, P. H. Tu, S. E. Lawler, and R. H. Chen. 2014. 'USP11 regulates PML stability to control Notch-induced malignancy in brain tumours', *Nat Commun*, 5: 3214.
- Wurmser, A. E., K. Nakashima, R. G. Summers, N. Toni, K. A. D'Amour, D. C. Lie, and F. H. Gage. 2004. 'Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage', *Nature*, 430: 350-6.
- Xia, H., W. K. Cheung, S. S. Ng, X. Jiang, S. Jiang, J. Sze, G. K. Leung, G. Lu, D. T. Chan, X. W. Bian, H. F. Kung, W. S. Poon, and M. C. Lin. 2012. 'Loss of brain-enriched miR-124 microRNA enhances stem-like traits and invasiveness of glioma cells', *J Biol Chem*, 287: 9962-71.
- Xie, Q., Q. Wu, L. Kim, T. E. Miller, B. B. Liau, S. C. Mack, K. Yang, D. C. Factor, X. Fang, Z. Huang, W. Zhou, K. Alazem, X. Wang, B. E. Bernstein, S. Bao, and J. N. Rich. 2016. 'RBPJ maintains brain tumor-initiating cells through CDK9-mediated transcriptional elongation', *J Clin Invest*, 126: 2757-72.
- Xie, Y. K., S. F. Huo, G. Zhang, F. Zhang, Z. P. Lian, X. L. Tang, and C. Jin. 2012. 'CDA-2 induces cell differentiation through suppressing Twist/SLUG signaling via miR-124 in glioma', *J Neurooncol*, 110: 179-86.
- Xu, P., S. Yu, R. Jiang, C. Kang, G. Wang, H. Jiang, and P. Pu. 2009. 'Differential expression of Notch family members in astrocytomas and medulloblastomas', *Pathol Oncol Res*, 15: 703-10.
- Xu, P., A. Zhang, R. Jiang, M. Qiu, C. Kang, Z. Jia, G. Wang, L. Han, X. Fan, and P. Pu. 2013. 'The different role of Notch1 and Notch2 in astrocytic gliomas', *PLoS One*, 8: e53654.
- Xu, W., H. Yang, Y. Liu, Y. Yang, P. Wang, S. H. Kim, S. Ito, C. Yang, P. Wang, M. T. Xiao, L. X. Liu, W. Q. Jiang, J. Liu, J. Y. Zhang, B. Wang, S. Frye, Y. Zhang, Y. H. Xu, Q. Y. Lei, K. L. Guan, S. M. Zhao, and Y. Xiong. 2011. 'Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases', *Cancer Cell*, 19: 17-30.
- Yamamoto, S., K. L. Schulze, and H. J. Bellen. 2014. 'Introduction to Notch signaling', *Methods Mol Biol*, 1187: 1-14.
- Yan, H., D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G. J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, B. Vogelstein, and D. D. Bigner. 2009. 'IDH1 and IDH2 mutations in gliomas', *N Engl J Med*, 360: 765-73.
- Yang, H. W., L. G. Menon, P. M. Black, R. S. Carroll, and M. D. Johnson. 2010. 'SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas', *BMC Cancer*, 10: 301.

- Yavropoulou, M. P., A. Maladaki, and J. G. Yovos. 2015. 'The role of Notch and Hedgehog signaling pathways in pituitary development and pathogenesis of pituitary adenomas', *Hormones (Athens)*, 14: 5-18.
- Yin, J., G. Park, J. E. Lee, J. Y. Park, T. H. Kim, Y. J. Kim, S. H. Lee, H. Yoo, J. H. Kim, and J. B. Park. 2014. 'CPEB1 modulates differentiation of glioma stem cells via downregulation of HES1 and SIRT1 expression', *Oncotarget*, 5: 6756-69.
- Zachariah, M. A., and J. G. Cyster. 2010. 'Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction', *Science*, 328: 1129-35.
- Zagzag, D., R. Amirnovin, M. A. Greco, H. Yee, J. Holash, S. J. Wiegand, S. Zabski, G. D. Yancopoulos, and M. Grumet. 2000. 'Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis', *Lab Invest*, 80: 837-49.
- Zagzag, D., Y. Lukyanov, L. Lan, M. A. Ali, M. Esencay, O. Mendez, H. Yee, E. B. Voura, and E. W. Newcomb. 2006. 'Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion', *Lab Invest*, 86: 1221-32.
- Zeisberg, E. M., S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg, and R. Kalluri. 2007. 'Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts', *Cancer Res*, 67: 10123-8.
- Zhang, X. P., G. Zheng, L. Zou, H. L. Liu, L. H. Hou, P. Zhou, D. D. Yin, Q. J. Zheng, L. Liang, S. Z. Zhang, L. Feng, L. B. Yao, A. G. Yang, H. Han, and J. Y. Chen. 2008. 'Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells', *Mol Cell Biochem*, 307: 101-8.
- Zhang, Y., K. Chen, S. A. Sloan, M. L. Bennett, A. R. Scholze, S. O'Keefe, H. P. Phatnani, P. Guarnieri, C. Caneda, N. Ruderisch, S. Deng, S. A. Liddelow, C. Zhang, R. Daneman, T. Maniatis, B. A. Barres, and J. Q. Wu. 2014. 'An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex', *J Neurosci*, 34: 11929-47.
- Zhao, S., Y. Lin, W. Xu, W. Jiang, Z. Zha, P. Wang, W. Yu, Z. Li, L. Gong, Y. Peng, J. Ding, Q. Lei, K. L. Guan, and Y. Xiong. 2009. 'Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha', *Science*, 324: 261-5.
- Zhao, Y., J. Dong, Q. Huang, M. Lou, A. Wang, and Q. Lan. 2010. 'Endothelial cell transdifferentiation of human glioma stem progenitor cells in vitro', *Brain Res Bull*, 82: 308-12.
- Zhen, F., Y. Lan, B. Yan, W. Zhang, and Z. Wen. 2013. 'Hemogenic endothelium specification and hematopoietic stem cell maintenance employ distinct Scl isoforms', *Development*, 140: 3977-85.
- Zheng, P. P., M. van der Weiden, P. J. van der Spek, A. J. Vincent, and J. M. Kros. 2013. 'Intratumoral, not circulating, endothelial progenitor cells share genetic aberrations with glial tumor cells', *J Cell Physiol*, 228: 1383-90.
- Zhou, Q., and D. J. Anderson. 2002. 'The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification', *Cell*, 109: 61-73.
- Zhou, Q., G. Choi, and D. J. Anderson. 2001. 'The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2', *Neuron*, 31: 791-807.
- Zhou, W., S. Q. Ke, Z. Huang, W. Flavahan, X. Fang, J. Paul, L. Wu, A. E. Sloan, R. E. McLendon, X. Li, J. N. Rich, and S. Bao. 2015. 'Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth', *Nat Cell Biol*, 17: 170-82.
- Zhu, T. S., M. A. Costello, C. E. Talsma, C. G. Flack, J. G. Crowley, L. L. Hamm, X. He, S. L. Hervey-Jumper, J. A. Heth, K. M. Muraszko, F. DiMeco, A. L. Vescovi, and X. Fan. 2011. 'Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells', *Cancer Res*, 71: 6061-72.
- Zimmermann, KW. 1923. 'Der feinere Bau der Blutkapillaren', *Z Anat Entwicklungsgesch*, 68: 29-109
- Zippo, A., A. De Robertis, M. Bardelli, F. Galvagni, and S. Oliviero. 2004. 'Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro', *Blood*, 103: 4536-44.

Zuchero, J. B., and B. A. Barres. 2013. 'Intrinsic and extrinsic control of oligodendrocyte development', *Curr Opin Neurobiol*, 23: 914-20.

ANNEXES

Publication 2

Vascular transdifferentiation in the CNS: a focus on neural and glioblastoma stem-like cells

Sophie Guelfi, Hugues Duffau, Luc Bauchet, Bernard Rothhut, and Jean-Philippe Hugnot

Publié dans *Stem Cells International* en Septembre 2016

(Reproduction selon l'accord de Licence Creative Commons CC-BY conclu avec l'éditeur Hindawi)
(Publication en open access)

Review Article

Vascular Transdifferentiation in the CNS: A Focus on Neural and Glioblastoma Stem-Like Cells

Sophie Guelfi,^{1,2} Hugues Duffau,^{1,3} Luc Bauchet,^{1,3}
Bernard Rothhut,¹ and Jean-Philippe Hugnot^{1,2}

¹INSERM U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, Hôpital St Eloi, 80 Avenue Augustin Fliche, 34091 Montpellier Cedex 05, France

²Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

³CHU Montpellier, Hôpital Gui de Chauliac, 80 Avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier, France

Correspondence should be addressed to Sophie Guelfi; sophie.guelfi@inserm.fr

Received 25 March 2016; Accepted 5 September 2016

Academic Editor: Giorgio Stassi

Copyright © 2016 Sophie Guelfi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Glioblastomas are devastating and extensively vascularized brain tumors from which glioblastoma stem-like cells (GSCs) have been isolated by many groups. These cells have a high tumorigenic potential and the capacity to generate heterogeneous phenotypes. There is growing evidence to support the possibility that these cells are derived from the accumulation of mutations in adult neural stem cells (NSCs) as well as in oligodendrocyte progenitors. It was recently reported that GSCs could transdifferentiate into endothelial-like and pericyte-like cells both *in vitro* and *in vivo*, notably under the influence of Notch and TGF β signaling pathways. Vascular cells derived from GBM cells were also observed directly in patient samples. These results could lead to new directions for designing original therapeutic approaches against GBM neovascularization but this specific reprogramming requires further molecular investigations. Transdifferentiation of nontumoral neural stem cells into vascular cells has also been described and conversely vascular cells may generate neural stem cells. In this review, we present and discuss these recent data. As some of them appear controversial, further validation will be needed using new technical approaches such as high throughput profiling and functional analyses to avoid experimental pitfalls and misinterpretations.

1. Introduction

The central nervous system vasculature is singular because of the highly specialized scaffolding of the Blood Brain Barrier (BBB). Precisely, a well-organized structure called the Neurovascular Unit (NVU) participates actively in BBB integrity. It involves a close interaction between endothelial cells, mural cells, astrocyte endfeet, microglia, and neurons. Therefore, this vascular network is highly specific in its structure and components [1].

Endothelial cells (ECs) are the foundation of vessel walls. They produce the basement membrane [2], are in contact with blood flow, and closely interact with mural cells [3]. The identification of ECs relies mostly on marker expression such as CD31, CD144 (VE-Cadherin), and CD34 as well as their *in vitro* capacity to form tubular networks [4]. Considered as nonfenestrated [5], the brain endothelium is composed

of three compartments that will differ in surrounding mural cells, which mainly include pericytes and vascular smooth muscle cells (vSMCs) [3, 6, 7]. The term “pericyte” was proposed by Zimmermann in 1923 to precisely define contractile cells closely surrounding microvessels but this denomination is sometimes used freely in the literature [8]. According to this definition, they must share the basement membrane with ECs [2] and physically interact with ECs at discrete membrane points [9]. Therefore, it requires a combination of histological and electron microscopy analyses, ruling out of ECs, and expression of two or more accepted “pericyte” markers to properly identify them. Contrary to those principles, many studies identify pericytes solely on the basis of markers, which are nonexclusive and overlap in expression with other perivascular cell types. These markers include PDGFR β , NG2, α SMA, desmin, and RGS5 [3, 8]. Pericytes are major regulators of vascular remodeling and tissue homeostasis.

Specifically in the brain, where vascular coverage is the highest among organs, they were shown to be key players in BBB maturation and maintenance [10, 11]. Given their contractile properties, they may also regulate blood flow in response to vasoactive substances and neurotransmitters [12, 13]. Thus, ECs and pericytes are active contributors of the NVU integrity.

It has also been recently recognized that vascular cells participate in the maintenance and proliferation of neural stem cells (NSCs) within their specific neurovascular niches [14] and they can exert plasticity towards neural lineages *in vitro* [15]. In return, NSCs appear also to have vascular cell differentiation capacities [16].

Under pathological conditions, the vasculature can be acutely remodeled and expanded [6]. In this context, EC progenitors and “activated” pericytes serve as potential vascular stem cell reservoirs and intimately cooperate to ensure vascular integrity [6, 17].

Such pathological conditions include tumoral growth, where active vascularization is required to sustain malignancy of cancer cells. Glioblastoma multiforme (GBM) is highly malignant and vascularized brain tumors for which current therapeutic options are inefficient. These tumors contain subsets of radio- and chemoresistant glioblastoma stem-like cells (GSCs) that possibly originate from NSCs, thus share cardinal NSC properties, and are highly tumorigenic upon intracranial xenografts. GSCs strongly interact with vascular cells within the tumoral perivascular niche [18] and are crucial in glioblastoma-associated neovascularization mechanisms. Recently, several groups including ours have highlighted GSC plasticity towards endothelial or pericyte lineages both *in vitro* and *in vivo*.

The aim of this review is to compile recent evidences of NSC and GSC transdifferentiation towards endothelial and/or pericyte lineages, results which are actively debated in the field (Figure 1). We will discuss the intimate plasticity between vascular cells and NSCs in the physiological neurovascular niche. Then, we wish to focus on what is currently debated in the context of perivascular niches in glioblastoma.

2. Vascular Integrity in the CNS

Vascular wiring is one of the earliest events observed during development. The primary vascular plexus derived from the mesoderm determines arterial, venous, hemogenic, and lymphatic fates via the primordial ECs or angioblast state: a process that involves FGF2, BMP4, Indian Hedgehog (IHH), and Etv2 as molecular triggers [19–21]. The primary vascular plexus is then remodeled through a balance of VEGF signaling (VEGFR2 (Flk-1)) and TGF β signaling [21].

Specifically in the brain, the perineural vascular plexus surrounds the neural tube through active vasculogenesis that consequently patterns major cerebral arteries and veins. Precise vascularization within the intraneural vascular plexus is further established by angiogenic sprouting, the formation of new vessels from preexisting ones. This process includes loss of tight junction between ECs, basement membrane degradation, and migration of tip cells in association with proliferative stalk cells. Molecularly, this complex mechanism

was shown to be mainly regulated by VEGF-Nrp-1, Dll4-Notch, Angiopoietins-Tie, TGF β , and Wnt signaling. Much less is known about angiogenic sprouting during postnatal stages. Altogether, sprouting of tip cells and anastomosis allow endothelial tube formation, later stabilized by NVU key players to form the BBB [1].

Mural cell specification is still unclear, due to speculations on a common mural precursor of mesenchymal origin for vSMCs, pericytes, and other perivascular cells [6, 7]. Most studies were performed in pathological conditions and perhaps do not reflect physiological ontogeny of mural cells. However, it is known that mural cells from coelomic structures originate from the mesothelium, whereas, in the CNS, they are in majority derived from neural crest cells [22]. Nonetheless, a common process of specification involves an epithelial-mesenchymal transition (EMT), followed by migration and colonization of mesenchymal precursors in cooperation with sprouting angiogenic ECs [8]. Signaling pathways regulating pericyte and EC crosstalk include PDGF-B/PDGFR β ; TGF β ; Notch1-Dll4; Angiopoietins-Tie; EphB2; and SDF1/CXCR4 signaling pathways [3, 8, 23, 24].

3. Adult Neural Stem Cells in the Neurovascular Niche

One of the most fascinating advances over the last three decades is represented by the discovery of immature multipotent cells in the adult brain and spinal cord of mammals. Dating back to the initial observation by Hamilton in 1901 of proliferating differentiated cells [25], the pioneer work performed by Altman and Nottebohm in the seventies [26, 27] culminated in the identification and isolation of neural stem cells (NSCs) able to produce neuronal and glial cells *in vitro* and *in vivo* [28]. The neurosphere assay [29] was instrumental in their discovery, as this assay is particularly suited to demonstrate, at the clonal level, the cardinal properties of stem cells, that is, multipotentiality, self-renewal, and extended proliferation capabilities. These multipotent cells can be divided into two classes [30]: (1) *bona fide* neural stem cells able to self-renew extensively and located in the subventricular zone and the subgranular hippocampus niches and (2) progenitors which are more proliferation/differentiation restricted cells and which are also present in the niches as well as throughout the white and gray matter. Stem and progenitor cells have also been identified in the peripheral nervous system, that is, in the carotid body, the enteric nervous system, and the adult dorsal root ganglia [31–33].

The adult brain neural stem cell niches are highly specialized structures that act as a nest and a barrier to protect, nourish, and regulate the fate of stem cells. They do so by providing cellular and molecular cues suitable for the strict control of stem cell properties (e.g., self-renewal, differentiation, and quiescence). Typically, these niches contain a high level of canonical developmental signaling pathways, notably, BMP, SHH, Wnt, and Notch. These signaling pathways precisely regulate the proliferation/quiescence, differentiation/self-renewal, and migratory/stationary balances of the stem cell pool. In addition, their particular architecture favors interactions between stem cells and specific cells, such as

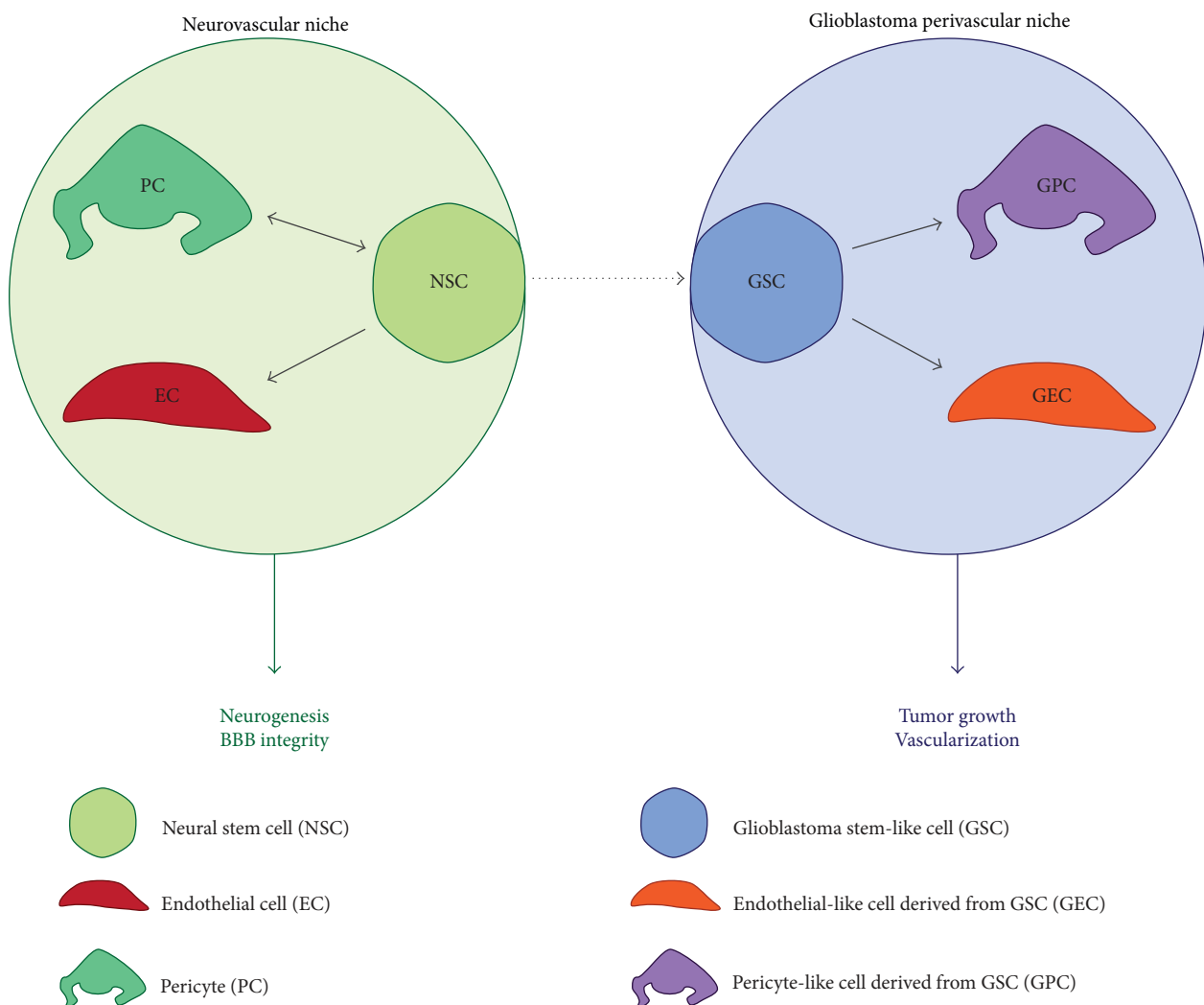


FIGURE 1: Schematic representation of the close interplay between neural stem cells (NSCs) and glioblastoma stem-like cells (GSCs) within their respective niches. NSCs are proposed to be at the origin of GSCs. Both NSCs and GSCs show transdifferentiation capacities towards the vascular lineage, that is, pericytes and endothelial cells. In both systems, this plasticity has consequences on the niche homeostasis: it influences either neurogenesis and the blood brain barrier integrity in the physiological neurovascular niche or tumoral growth and associated vascularization in the glioblastoma context.

vascular cells, to form the so-called neurovascular niche. Actually, the state of quiescence and activation of adult stem cells is closely regulated by endothelial cells through Jagged/Dll4/Notch1, VEGFR3/VEGFC, and EphrinB2 proteins [34–36]. As regards adult brain progenitors, these cells appear to be mainly represented by oligodendrocyte precursor cells (OPCs) which could be identified by the expression of A2B5, PDGFR α , and NG2 [37]. These cells also called polydendrocytes, synantocytes, or NG2⁺ cells are proliferating and are involved in adult myelination.

4. Vascular Plasticity of Neural Stem Cells and Vice-Versa

The possibility that NSCs can transdifferentiate into endothelial and pericytes/smooth muscle cells was first explored in

the nontumoral context. Indeed, in 2004, Wurmser et al. [16] reported that adult neural stem cell cultures cocultured with human endothelial cells expressed CD146/MCAM, a marker considered specific for endothelial cells at the time. After purification and expansion of CD146⁺ cells, Wurmser et al. then showed that these cells can express endothelial cell markers such as CD31 and CDH5, had Weibel-Palade bodies (granules found in endothelial cells), and can also generate vessel-like structures in matrix gel. They were also able to generate endothelial-like cells upon grafting in embryos. The expression of endothelial cell markers, such as CD31, as well as formation of vessels *in vitro* was observed in NSC cultures isolated from human and mouse embryos [38, 39]. Previous work also showed the remarkable capacity of NSCs to differentiate into large, flat SM-like cells that express phenotypic characteristics of SMCs [40, 41]. In addition,

Oishi et al. showed that SMCs differentiated from rat CNS stem cells had the physiological characteristics of contractile smooth muscle cells [42]. However these experiments were mainly based on the expression of few markers considered to be specific for a given cell type. For instance, CD146 thought to be specific for endothelial cells in [16] is also expressed by pericytes/smooth muscle cells [43] and recent high throughput sequencing also indicated that CD146 is found in oligodendrocytes [44]. Moreover, in these studies, the authors used heterogeneous cultures derived from the whole adult brain and no or few clonal experiments were carried out. As a result, it is unclear whether these studies were based on *bona fide* NSCs derived from the VZ/SVZ or alternatively if they contained less lineage-restricted cells, possibly arising from the meninges [45] or the vessels. It remains to be confirmed whether the transdifferentiation into SMCs and endothelial cells is a general property of NSCs or if this is restricted to specific subtypes of cells.

The differentiation of neural multipotent cells into vascular cells appears not to be a one-way process as three articles reported that brain pericytes, including cells isolated from the human brain, can generate neuron-like and astrocyte-like cells by manipulating growth conditions *in vitro* [46–48]. However, this was not confirmed by two groups [49, 50]. Actually these studies mostly rely on marker expression detected by immunofluorescence, for instance, Tubb3 and Map2 for neurons and GFAP for astrocytes. However, these proteins can also be expressed by nonneural cells such as liver oval cells for GFAP quiescent hepatic stellate cells [51] and Tubb3 is a marker for lymphatic and venous valves [52]. In addition the neuronal markers Tubb3 and Map2 can also be found in glial cells [53, 54] adding further confusion to the field. As a result, it remains to be fully demonstrated that the cells which are generated are *bona fide* neurons/glial cells and not culture artefacts. It should be demonstrated that these neuronal-marker expressing cells are able to generate action potentials, make synapses, and integrate into neuronal networks. Actually, the formation of fully differentiated neurons from pericytes might require additional genetic engineering as demonstrated by Karow et al. in 2012 [15]. Indeed, this team showed that overexpression of Sox2 and Ascl1 in human and mice pericytes led to the formation of neurons able to fire action potentials and to be contacted by other neurons. This indicates that pericytes remain competent to respond to neural transcription factors to redirect their fate into neuronal cells. Specific transcriptional networks and epigenetic marks, still largely unknown, may underlie this plastic behaviour of pericytes. The multipotent properties of pericytes might also be linked to their embryonic origin. As mentioned before, brain pericytes are mainly derived from neural crest stem cells in contrast to brain neurons and glial cells which are generated from the ventricular zone. During development and *in vitro*, neural crest stem cells can generate peripheral neurons and glial cells but also smooth muscle cells. One could consider the hypothesis that brain pericytes maintain neural crest stem cell properties or even represent a pool of dormant multipotent neural crest stem cells residing in the adult brain.

5. Glioblastoma and Glioblastoma Stem-Like Cells

Gliomas are the most common primary brain tumors and have histologic features similar to normal glial cells, that is, astrocytes and oligodendrocytes. The precise cellular origin of gliomas remains unclear. Although traditional sources favored an origin from normal glial cells, recent data point to neural stem cells (NSCs), or NSC-derived astrocytes or oligodendrocyte precursor cells (OPCs) [55]. The current WHO classification distinguishes four grades of malignancy and glioblastoma multiforme (GBM, grade IV) is the most life-threatening, malignant, and aggressive primary neoplasm (median survival time around 15 months) which accounts for more than half of all gliomas. GBM shows histological evidence of high malignancy including nuclear atypia and high mitotic activity, along with microvascular proliferation and necrosis. Although they are histologically indistinguishable, GBM have been classified into four molecular subgroups, that is, classical, mesenchymal, proneural, and neural tumors, according to differing patterns of gene expression [56]. The classical subtype is characterized by amplification of EGFR. Although loss of the tumor suppressor PTEN and gene deletion targeting CDKN2A are frequently found, it lacks TP53 mutation. Notch and Sonic Hedgehog pathways activation are also frequent in this subtype. The mesenchymal GBM predominantly harbors loss/mutations in the *NF1* tumor suppressor gene coding for neurofibromin 1 and shows TNF family and NFkB pathways activation and expression of mesenchymal markers such as CHI3L1, CD44, and VEGF. The proneural group harbors high oligodendrocytic marker expression (OLIG2, TCF3, and NKX2-2). It is characterized by TP53 loss/mutations, IDH1 (isocitrate dehydrogenase 1) mutations, PDGFR α amplification, and CpG island methylator phenotype (CIMP) expression. Most known secondary GBM, which derive from lower grade gliomas, is classified into this molecular subtype. Finally, the neural subtype typically expresses neuronal markers. Chromosome 7 copy amplification together with chromosome 10 copy loss is prevalent in the neural subtype. GBM are radio- and chemotherapy resistant and are also characterized by an abundant and abnormal vasculature. As for other cancer types, it has been recognized that GBM consist of a heterogeneous cell population, both neoplastic and nonneoplastic allowing a subset of these cells to become refractory to chemo- and radiotherapy [57–59]. In a subset of GBM, several teams including ours were able to isolate neurosphere-forming cells displaying multipotential and self-renewal properties *in vitro*. These cells express markers of OPCs and NSCs such as A2B5, Olig2, and Sox2. In orthotopic graft experiments, they have a high tumorigenic potential and are able to generate several tumoral cell types. These cells termed “glioblastoma stem-like cells” (GSCs) [60, 61] appear to be slow-growing or quiescent and reside in particular tumor niches. Recent studies also highlight the heterogeneity and dynamics of GSCs according to subtype classifications of the original tumor. Indeed, GSCs were shown to be able to transition from a proneural to a mesenchymal phenotype

[62]. Moreover, another group recently proposed coexistence of multiple GSC subpopulations in tumors [63].

6. A Crosstalk between GSCs and Vascular Cells within the Perivascular Niche

Extensive neovascularization is considered a major pathological hallmark of GBM. Indeed, GBM is ranked among the most vascularized solid tumors [64]. In addition to specific targeting of GSCs, targeting glioma-associated vessels represents a major therapeutic challenge.

Precisely, distinct but overlapping vascularization mechanisms have been described in the context of glioma [65]. In a brief summary, vascular cooption is considered a preliminary step towards vascularization, where invading cancer cells regroup around normal microvessels [66, 67]. Consequently, this process results in tumor growth-induced necrosis and hypoxia, which in turn trigger sprouting angiogenesis [68]. Both mechanisms employ common molecular effectors involved during physiological sprouting angiogenesis (Section 2), such as Angiopoietins/Tie2 [67, 69, 70]; VEGF [71]; Ephrins [72]; Dll4-Notch1 [73]; PDGF-B/PDGFR β [74]; and SDF1-CXCR4 signaling pathways [75, 76]. Angiogenesis in gliomas has also been shown to be either hypoxia dependent [70] or hypoxia independent [70, 77–79]. Vasculogenesis, which involves recruitment and differentiation of circulating bone marrow-derived cells or endothelial progenitor cells (EPCs) [80], has also been demonstrated in glioma [81] but is currently disputed and controversial, mainly because of the debate on EPC identification markers. On a molecular level, vasculogenesis share common signaling cues with angiogenesis [65]. Furthermore, vascular mimicry (VM) represents an alternative mechanism whereby vessel-like networks are formed by tumor cells at the expense of ECs. Indeed, this process has been described in human glioblastoma tissues [82, 83] and human glioma cell line xenografts [84, 85]. Altogether, these processes lead to structurally and functionally abnormal vessels, characterized by a chaotic, poorly organized vasculature with tortuous, irregularly shaped, leaky, and dysfunctional endothelial cell layer [86, 87]. In this context, endothelial cells are often loosely connected with each other and are covered by fewer and abnormal mural pericytes [87–89].

The latest mechanism of glioma neovascularization describes the capacity of glioma cells to constitute their own vasculature [65] and directly implicates the GSC subset as being able to transdifferentiate into endothelial cells (ECs) [90, 91]. We already pointed out the close interplay between NSCs and vascular cells in the physiological neurovascular niche [92]. In a comparable manner, GSCs were proposed to reside within specific tumoral perivascular niches that provide a particular microenvironment required for their maintenance and self-renewal [18, 93, 94]. This GSC niche, similarly to the NSC niche, is composed of many different key players that include not only vascular cells but also tumoral, stromal, glial, neuronal, microglial, and immune cells, as well as surrounding hypoxic and necrotic conditions [94–97].

In this context, brain ECs were shown to participate in GSC stemness through major signaling pathways that include

Notch [96], Sonic Hedgehog (SHH) [98], endothelial nitric oxide eNOS [99], and HIF cascades [94]. In return, GSCs were demonstrated as active players in glioma-associated neovascularization processes [65]. Precisely, GSCs are able to secrete VEGF and SDF-1 cytokines and thus promote angiogenesis and vasculogenesis in xenograft models [100, 101]. Moreover, CD133⁺ gliospheres derived from tumors analyzed for vascular mimicry (VM) and histologically considered as VM⁺ were able to generate vascular tubule networks *in vitro*, supporting a contribution of GSCs to vascular mimicry in glioma [83]. More recently, cytokines [102] and extracellular matrix proteins [103–105] were proved to be major regulators of GSC perivascular niche integrity.

Therefore, the perivascular niche sets up unique conditions that promote both GSC survival and tumoral vascular growth (Figure 2). This aspect should be taken into account when studying the phenotypic plasticity of GSCs during transdifferentiation. Lastly, what could be considered a new mechanism of glioma neovascularization was very recently described and furthermore proved that GSCs exert peculiar plasticity. Indeed, GSCs were demonstrated as being capable of differentiating into what was defined as either mural, G-pericyte, or pericyte-like cells, complicating the picture even more. The next sections will go further into the experimental approaches and accumulating evidences for either EC transdifferentiation or pericyte-like transdifferentiation of GSCs. We will also try to point out discrepancies and what needs to be investigated in future directions.

7. Glioblastoma Stem-Like Cells Transdifferentiate into Endothelial Cells

First evidences of endothelial transdifferentiation of cancer cells came from melanoma and neuroblastoma studies based on clinical phenotypic analyses of patient samples [106, 107].

In the context of neuroblastoma (NB), Pezzolo et al. combined immunofluorescence of EC markers CD31 and CD105 with fluorescent *in situ* hybridization (IF-FISH) of the MYCN locus, which is commonly amplified in NB. They first observed on sections MYCN amplified ECs, in proportions that correlated with tumor grade, and ruled out pericytes as being tumor-derived. Then, they also confirmed that tumoral vasculature could be provided by cancer cells upon human NB cell line xenografts [106]. The implication of the cancer stem-like population in EC transdifferentiation was later proposed in breast cancer [108] and in a VEGF-independent fashion in ovarian cancer [109].

In GBM, GSCs were shown to be able to transdifferentiate into *bona fide* ECs in two articles that were both published in the same issue of Nature in 2010 [90, 91]. Using IF-FISH on patient sections, both studies observed ECs harboring typical GBM genetic aberrations. Both also demonstrated an *in vitro* EC differentiation capacity of GSCs isolated from freshly dissociated GBM specimens and a mainly human origin of generated vasculature upon xenografts of GSCs. In addition, Wang et al. proposed that purified CD133⁺/VE-Cadherin⁻ account for multipotent progenitors that give rise to endothelium, possibly via an EPC intermediate [90]. *In vivo*, Ricci-Vitiani et al. selectively targeted ECs derived from

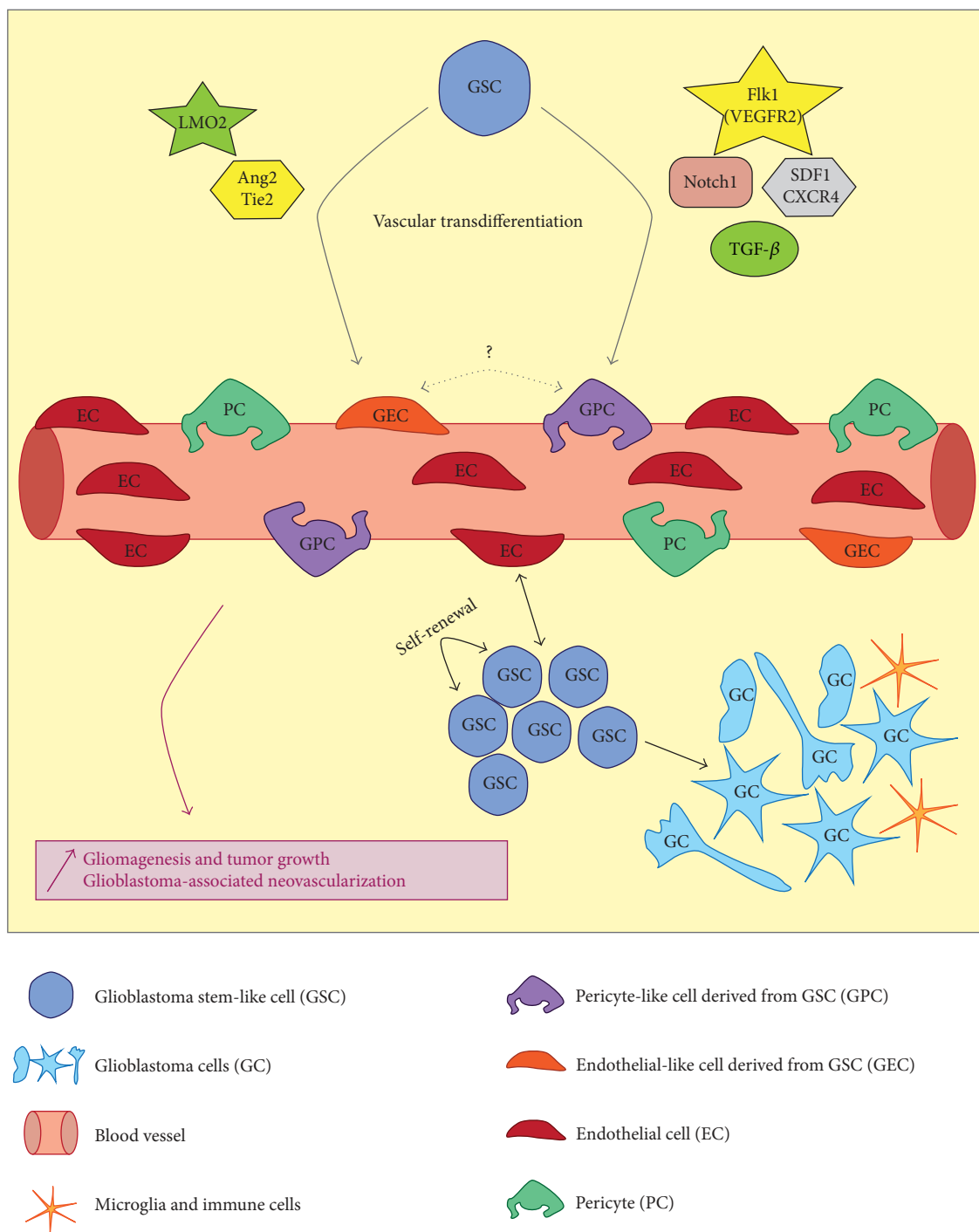


FIGURE 2: Schematic representation of the glioblastoma perivascular niche and the currently known mechanisms of GSC vascular transdifferentiation. GSCs closely interact with blood vessels in a complex perivascular niche. A close interaction with endothelial cells favors GSC self-renewal and maintenance; and in return GSCs promote neovascularization via several processes. GSCs also constitute the source of proliferating glioblastoma cells which show phenotypical heterogeneity. The tumor is also in close contact with local immune cells (microglia). Vascular transdifferentiation of GSCs into endothelial-like cells is induced via transcriptional regulation of LMO2 and also activation of Tie2 receptor. Transdifferentiation in pericyte-like cells is controlled by Notch1, TGFβ, Flk-1, and SDF1-CXCR4 pathways. Consequently, these tightly controlled mechanisms ensure glioblastoma growth as well as tumor-associated neovascularization.

GSCs (Tie2-tk system) and observed tumor reduction and degeneration, confirming a central function of EC transdifferentiation in tumoral progression [91]. Interestingly, some of this work is currently being reproduced as part of “The Reproducibility Project: Cancer Biology,” which “seeks to address growing concerns about reproducibility in scientific research by conducting replications of 50 papers in the field of cancer biology published between 2010 and 2012” [110].

Also, one should note that an *in vitro* study published a few months before showed an EC phenotype induction of GSCs when cultured under endothelial and hypoxic conditions. Matrigel cultures in hypoxic conditions induced tubular-like structures characteristic of typical EC networks upon electron microscopy [111]. The same *in vitro* approach was used by Dong et al. to report an EC phenotype conversion of GSCs, based on CD31, CD34, and vWF induction. In this study, xenografts experiments confirmed human origin of vessels via HLA+ staining. Moreover, in patient sample analyses, CD34⁺/nestin⁺ tumor vascular cells were found, suggesting a transitory phenotype during the transdifferentiation process [112].

Compelling *in vivo* results came from Soda et al. in 2011, who showed in a GBM mouse model that GFP⁺ tumor cells incorporated within the vasculature as tumor-derived endothelial cells (TDECs). Cell-to-cell fusion and EC progenitor contamination were ruled out to conclude that TDECs came from tumor-initiating cells. They also demonstrated that TDEC formation involved a VEGF-independent mechanism and pointed out increased treatment resistance of TDEC [113]. This correlation between EC transdifferentiation and chemoresistance was also recently shown in the context of hepatocellular carcinoma [114].

In 2013, another group found that local EPCs within patient samples could harbor glioma-associated genetic aberrations, using CD34 or VEGFR2 immunostaining combined with EGFR or PTEN FISH analyses. However, they also mentioned a blood origin of part of intratumoral EPCs, using a blood specific CD133 splice variant [115]. Also, transplantation of exogenous EPCs in a C6 glioma rat model within tumors was proposed as a potential drug delivery vehicle to target EC transdifferentiation. No impact on transdifferentiation was observed but EPC transplantation proved to be an efficient technical approach to better understand glioma vascularization [116].

Contrary to previous studies, endothelial transdifferentiation was also ruled out by others. Particularly, it was shown using fluorescent cell tracking that ECs and GSCs could form cell hybrids, pointing out potential experimental bias of previous work [117]. It was also shown in hepatocellular carcinoma that tumoral vascular networks do not arise from tumor-initiating cells, as opposed to what was proved in other works [114, 118].

On a molecular level, very few data is available concerning the transcriptional reprogramming occurring during EC transdifferentiation of GSCs. Recently, the transcription factor LMO2, which is central in hematopoietic and endothelial lineages [19, 119], was demonstrated as a potential inductor of vascular endothelial phenotype of GSCs through the direct regulation of VE-Cadherin expression. Moreover, LMO2 was

shown to be expressed in GBM patient samples, but no correlation with tumoral origin of cells was made [120]. In human head and neck cancer cell lines (HNC), the Twist1-Jagged1/KLF4 transcriptional axis was proven to be essential in both EC transdifferentiation and chemoresistance [121]. In mammary tumors, the retinoic acid (RA) pathway activates a SOX9-ER81 transcriptional complex to directly induce VE-Cadherin expression and promote a vascular endothelial phenotype of cancer cell lines [122].

Whether endothelial cell transdifferentiation of GSCs can occur remains disputed and needs supplementary validation (Figure 2). In order to unravel this reprogramming, one should parallel what is currently known in physiological endothelial lineage specification to the context of tumoral transdifferentiation.

8. Glioblastoma Cancer Stem Cells Transdifferentiate into Mural Cells

We have already mentioned the plasticity of NSCs, that is, the capacity for these cells to differentiate into hematopoietic, muscle, and endothelial cells [16, 123, 124]. In addition, it was also shown that glioblastoma cell lines are capable of differentiating into mesenchymal lineage cell types [125] and that a subset of GSCs exhibit chondroosteogenic differentiation in response to environmental stimuli [126]. Finally since pericytes are similar to mesenchymal stem cells [127], it was worthwhile addressing the possibility that GSCs can give rise to pericytes (Figure 2).

Indeed, El Hallani et al. found in 2010 that a fraction of CD133⁺ GSCs were able to transdifferentiate into smooth muscle-like cells *in vitro* to develop vascular mimicry of the tubular type [83]. What are the cellular and molecular mechanisms underlying this pathogenesis of VM in glioblastomas? Scully et al. (2012) found that GSCs primarily transdifferentiate into vascular mural-like cells, to develop VM, a process dependent on the expression and activity of VEGF receptor 2 (Flk-1) [128]. Most recently, another important study demonstrated that GSCs are recruited towards endothelial cells by SDF-1/CXCR4 and generate pericytes mainly by TGFβ activation. Selective elimination of GSC-derived pericytes, named G-pericytes, disrupts the neovasculature and potentially inhibits tumor growth *in vivo*. G-pericytes were also identified directly in patient samples using IF-FISH combining EGFR amplification or PTEN deletion detection with αSMA expression [129].

Another important player in the pericyte transdifferentiation program is the Notch pathway. Our group found that overexpression of Notch1 induced a vascularization switch which was accompanied by a reduction in the growth and migration of GSCs that express several pericyte cell markers. In graft experiments, Notch1 overexpression stimulated G-pericytes association with endothelial cells [130].

Also recently, Videla Richardson et al. studied the effect of bone morphogenic protein-4 on GSC differentiation. Indeed they found that the effect was dose-dependent. At low doses, some GSC-enriched cell lines differentiated into astrocytes and neurons, whereas, at higher concentrations (10 ng/mL), they adopted a smooth muscle-like phenotype [131]. In

NSCs, Rajan et al. found that at least two distinct signaling pathways are triggered by BMP4 involving the SMAD and STAT proteins. Interestingly, in cultured cells, BMP4 induced smooth muscle cell differentiation by activating SMAD1/5/8 at low basal levels of activated STAT, whereas, at higher basal levels, SMAD4 generated glia [132]. Whether these pathways are also operating in GSCs needs further investigations.

However transdifferentiation has not been confirmed by other groups. Indeed, in a recent publication, Svensson et al. using an orthotopically grafted GL261 mouse glioma model found that mice host pericytes are recruited into the tumor and that more than half of all PDGFR β ⁺ pericytes within the tumor are host brain-derived and do not originate from the tumor itself. However they do not rule out the possibility that the discrepancy may reside in a differential capacity of GBM plasticity and differentiation potential between different models of gliomas [133].

Another interesting crosstalk between GBM tumor cells and pericytes came from a publication by Caspani et al. providing evidence for GBM cell/pericyte fusion-hybrids formation [134], as previously described in EC transdifferentiation [117].

Does this transdifferentiation mechanism also exist in other tumors?

In infantile hemangioma (IH), it was shown that IH-derived stem cells (HemSCs) can differentiate into pericytes *in vitro* and *in vivo*, a process that is dependent on cell contact with endothelial cells [135]. In addition they show that Jagged1 is directly involved in the HemSC-to-pericyte differentiation, suggesting an important role for the Notch pathway in the formation of pathological blood vessels.

In conclusion, transdifferentiation of GSCs into pericytes is emerging as an important process in tumor angiogenesis and has to be taken into account in order to develop new therapies against glioblastoma.

9. Concluding Remarks and Future Directions

Here we compiled recent data supporting the transdifferentiation of normal and tumoral neural stem cells into pericytes and ECs and *vice-versa*. Whereas there is compelling evidence to support these notions, these results need to be confirmed using new techniques. In fact, most studies rely on the assessment of the expression of few genes to define pericytes, endothelial cells, neurons, astrocytes, and normal/tumoral neural stem cells. For instance, pericytes are often identified using NG2, PDGFR β , and α SMA markers which represent only a very small fraction of the genes. By measuring the expression of 3 genes among 25000 in the human genome, in fact we only assess 0.01% of all genes which could cause misinterpretations. Equally, α SMA is also expressed in non-smooth muscle cells such as dormant adult neural stem cells [130, 136] and also by astrocytes [137]. α SMA expression is also considered a molecular hallmark of epithelial-mesenchymal transition [138] and can also be induced by TGF β signaling in smooth muscle cells and non-smooth muscle cells [139], which could also lead to further confusion. This weak characterization of cell types produced *in vitro* and *in vivo* may lead to unreliable conclusions.

In contrast to the assessment of few markers, single cell transcriptomics analyses could be used to characterize a cell phenotype and status of differentiation in much more details. Transcriptomics profiles for a given cell type are generated through the determination not only of expression of all genes but also of noncoding RNA such as miRNA and lncRNA. As transcriptomics profiles of brain cell types are becoming available [44], this will render comparable and measurable any resemblance/or divergence in cell identity. The use of these emerging single cell techniques to explore neural stem cell \leftrightarrow pericyte transdifferentiation, in the normal or tumoral context, will certainly shed additional light on this phenomenon. This will also provide new insights into the molecular mechanisms and genes underlying this remarkable cellular plasticity. In addition to high throughput genetic profiling, electron microscopy and functional analysis would add further confirmation that endothelial cells and pericytes are obtained through transdifferentiation of GSCs.

Many questions remain unanswered regarding the transdifferentiation of GSCs into vascular cells. Does endothelial and/or pericyte transdifferentiation also occur in diffuse low grade gliomas knowing the major differences in the vasculature compared to GBM? Equally, it would be important to explore whether different molecularly defined subgroups of GBM are able to produce vascular cells or alternatively if it is restricted to GBM with particular mutations. This issue is particularly important as glioma stem cell cultures held by different labs might have different capabilities to transdifferentiate into ECs or into pericyte-like cells, which could explain the divergent results reported. One could also consider the hypothesis that GSCs could transdifferentiate through a bipotent endothelial-mesenchymal intermediate expressing both EC and smooth muscle cell markers [140], thus reconciling both models of GSCs vascular transdifferentiation.

The transdifferentiation of GBM cells into vascular cells may have implications for the appropriateness of antiangiogenic therapies as these could not only reduce the formation of vessels but also target the pool of glioma cells-derived pericytes and ECs. Finally, targeting G-pericytes could lead to a new therapeutic option to reduce tumor progression. However it has to be taken into account that only the transdifferentiated cells have to be targeted, leaving the normal pericyte population intact. Hence, it would be of great interest to find markers that could discriminate between normal and tumoral G-pericytes.

Disclosure

Bernard Rothhut and Jean-Philippe Hugnot are co-last authors.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

Sophie Guelfi, Hugues Duffau, Luc Bauchet, Bernard Rothhut, and Jean-Philippe Hugnot participated in conception

and design; Sophie Guelfi, Bernard Rothhut, and Jean-Philippe Hugnot participated in writing of the article.

Acknowledgments

This work was supported by the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (ARC, France), the “Association pour la Recherche contre les Tumeurs Cérébrales” (ARTC Sud, France), “l’Institut National pour la Recherche sur le Cancer” (INCA, France), “La Ligue Contre le Cancer” Association (France), the “Fondation Grace de Monaco” (France), and the “Cancéropole Grand Sud Ouest” (Cancéropole-GSO, France).

References

- [1] T. Wälchli, A. Wacker, K. Frei et al., “Wiring the Vascular network with neural cues: a CNS perspective,” *Neuron*, vol. 87, no. 2, pp. 271–296, 2015.
- [2] A. N. Stratman, K. M. Malotte, R. D. Mahan, M. J. Davis, and G. E. Davis, “Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation,” *Blood*, vol. 114, no. 24, pp. 5091–5101, 2009.
- [3] M. Krueger and I. Bechmann, “CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out,” *Glia*, vol. 58, no. 1, pp. 1–10, 2010.
- [4] C. Garlanda and E. Dejana, “Heterogeneity of endothelial cells: specific markers,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 17, no. 7, pp. 1193–1202, 1997.
- [5] G. B. Atkins, M. K. Jain, and A. Hamik, “Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, no. 7, pp. 1476–1484, 2011.
- [6] V. L. Bautch, “Stem cells and the vasculature,” *Nature Medicine*, vol. 17, no. 11, pp. 1437–1443, 2011.
- [7] C.-S. Lin and T. F. Lue, “Defining vascular stem cells,” *Stem Cells and Development*, vol. 22, no. 7, pp. 1018–1026, 2013.
- [8] A. Armulik, G. Genové, and C. Betsholtz, “Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises,” *Developmental Cell*, vol. 21, no. 2, pp. 193–215, 2011.
- [9] H. Gerhardt and C. Betsholtz, “Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis,” *Cell and Tissue Research*, vol. 314, no. 1, pp. 15–23, 2003.
- [10] A. Armulik, G. Genové, M. Mäe et al., “Pericytes regulate the blood-brain barrier,” *Nature*, vol. 468, no. 7323, pp. 557–561, 2010.
- [11] R. Daneman, L. Zhou, A. A. Kebede, and B. A. Barres, “Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis,” *Nature*, vol. 468, no. 7323, pp. 562–566, 2010.
- [12] C. M. Peppiatt, C. Howarth, P. Mobbs, and D. Attwell, “Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes,” *Nature*, vol. 443, no. 7112, pp. 700–704, 2006.
- [13] D. Attwell, A. M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B. A. MacVicar, and E. A. Newman, “Glial and neuronal control of brain blood flow,” *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 232–243, 2010.
- [14] C. S. Bjornsson, M. Apostolopoulou, Y. Tian, and S. Temple, “It takes a village: constructing the neurogenic niche,” *Developmental Cell*, vol. 32, no. 4, pp. 435–446, 2015.
- [15] M. Karow, R. Sánchez, C. Schichor et al., “Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells,” *Cell Stem Cell*, vol. 11, no. 4, pp. 471–476, 2012.
- [16] A. E. Wurmser, K. Nakashima, R. G. Summers et al., “Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage,” *Nature*, vol. 430, no. 6997, pp. 350–356, 2004.
- [17] T. Nakagomi, A. Nakano-Doi, M. Kawamura, and T. Matsuyama, “Do vascular pericytes contribute to neurovasculogenesis in the central nervous system as multipotent vascular stem cells?” *Stem Cells and Development*, vol. 24, no. 15, pp. 1730–1739, 2015.
- [18] C. Calabrese, H. Poppleton, M. Kocak et al., “A perivascular niche for brain tumor stem cells,” *Cancer Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 69–82, 2007.
- [19] N. Koyano-Nakagawa, J. Kweon, M. Iacovino et al., “Etv2 is expressed in the yolk sac hematopoietic and endothelial progenitors and regulates Lmo2 gene expression,” *Stem Cells*, vol. 30, no. 8, pp. 1611–1623, 2012.
- [20] R. Morita, M. Suzuki, H. Kasahara et al., “ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, no. 1, pp. 160–165, 2015.
- [21] K. L. Marcelo, L. C. Goldie, and K. K. Hirschi, “Regulation of endothelial cell differentiation and specification,” *Circulation Research*, vol. 112, no. 9, pp. 1272–1287, 2013.
- [22] H. C. Etchevers, C. Vincent, N. M. Le Douarin, and G. F. Couly, “The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain,” *Development*, vol. 128, no. 7, pp. 1059–1068, 2001.
- [23] E. A. Winkler, R. D. Bell, and B. V. Zlokovic, “Central nervous system pericytes in health and disease,” *Nature Neuroscience*, vol. 14, no. 11, pp. 1398–1405, 2011.
- [24] A. N. Stratman, M. J. Davis, and G. E. Davis, “VEGF and FGF prime vascular tube morphogenesis and sprouting directed by hematopoietic stem cell cytokines,” *Blood*, vol. 117, no. 14, pp. 3709–3719, 2011.
- [25] A. Hamilton, “The division of differentiated cells in the central nervous system of the white rat,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 11, no. 4, pp. 297–320, 1901.
- [26] S. A. Goldman and F. Nottebohm, “Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, no. 8, pp. 2390–2394, 1983.
- [27] J. Altman and G. D. Das, “Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 124, no. 3, pp. 319–335, 1965.
- [28] B. A. Reynolds and S. Weiss, “Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system,” *Science*, vol. 255, no. 5052, pp. 1707–1710, 1992.
- [29] L. P. Deleyrolle and B. A. Reynolds, “Isolation, expansion, and differentiation of adult mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 549, pp. 91–101, 2009.
- [30] A. M. Bond, G.-L. Ming, and H. Song, “Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later,” *Cell Stem Cell*, vol. 17, no. 4, pp. 385–395, 2015.
- [31] R. P. Singh, Y.-H. Cheng, P. Nelson, and F. C. Zhou, “Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells,” *Cell Transplantation*, vol. 18, no. 1, pp. 55–68, 2009.
- [32] K.-H. Schäfer, C. Van Ginneken, and S. Copray, “Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system,” *Anatomical Record*, vol. 292, no. 12, pp. 1940–1952, 2009.

- [33] R. Pardal, P. Ortega-Sáenz, R. Durán, and J. López-Barneo, "Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body," *Cell*, vol. 131, no. 2, pp. 364–377, 2007.
- [34] C. Ottone, B. Krusche, A. Whitby et al., "Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells," *Nature Cell Biology*, vol. 16, no. 11, pp. 1045–1056, 2014.
- [35] A. Eichmann and J.-L. Thomas, "Molecular parallels between neural and vascular development," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 3, no. 1, Article ID a006551, 2013.
- [36] J.-L. Thomas, K. Baker, J. Han et al., "Interactions between VEGFR and Notch signaling pathways in endothelial and neural cells," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 70, no. 10, pp. 1779–1792, 2013.
- [37] A. Nishiyama, R. Suzuki, and X. Zhu, "NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair," *Frontiers in Neuroscience*, no. 8, article 133, 2014.
- [38] K. Oishi, A. Kobayashi, K. Fujii, D. Kanehira, Y. Ito, and M. K. Uchida, "Angiogenesis in vitro: vascular tube formation from the differentiation of neural stem cells," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 96, no. 2, pp. 208–218, 2004.
- [39] E. A. Parati, A. Bez, D. Ponti et al., "Human neural stem cells express extra-neural markers," *Brain Research*, vol. 925, no. 2, pp. 213–221, 2002.
- [40] R. Y. L. Tsai and R. D. G. McKay, "Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells," *Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 10, pp. 3725–3735, 2000.
- [41] Y. Song, N. Mehta, B. Sheh, F. Saljooque, H. U. Sang, and M. Rajasekaran, "Transdifferentiation of rat fetal brain stem cells into penile smooth muscle cells," *BJU International*, vol. 104, no. 2, pp. 257–262, 2009.
- [42] K. Oishi, Y. Ogawa, S. Gamoh, and M. K. Uchida, "Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells," *Journal of Physiology*, vol. 540, no. 1, pp. 139–152, 2002.
- [43] U. Tigges, J. V. Welser-Alves, A. Boroujerdi, and R. Milner, "A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain," *Microvascular Research*, vol. 84, no. 1, pp. 74–80, 2012.
- [44] Y. Zhang, K. Chen, S. A. Sloan et al., "An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex," *The Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 36, pp. 11929–11947, 2014.
- [45] I. Decimo, G. Fumagalli, V. Berton, M. Krampera, and F. Bifari, "Meninges: from protective membrane to stem cell niche," *American Journal of Stem Cells*, vol. 1, no. 2, pp. 92–105, 2012.
- [46] G. Paul, I. Özen, N. S. Christophersen et al., "The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, article e35577, 2012.
- [47] T. Nakagomi, S. Kubo, A. Nakano-Doi et al., "Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells," *STEM CELLS*, vol. 33, no. 6, pp. 1962–1974, 2015.
- [48] P. Dore-Duffy, A. Katychew, X. Wang, and E. Van Buren, "CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 26, no. 5, pp. 613–624, 2006.
- [49] T. I.-H. Park, H. Monzo, E. W. Mee et al., "Adult human brain neural progenitor cells (NPCs) and fibroblast-like cells have similar properties in vitro but only NPCs differentiate into neurons," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Article ID e37742, 2012.
- [50] X. Lojewski, S. Srimasorn, J. Rauh et al., "Perivascular mesenchymal stem cells from the adult human brain harbor no intrinsic neuroectodermal but high mesodermal differentiation potential," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 4, no. 10, pp. 1223–1233, 2015.
- [51] L. Yang, Y. Jung, A. Omenetti et al., "Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers," *Stem Cells*, vol. 26, no. 8, pp. 2104–2113, 2008.
- [52] J. Kang and I. Lee, "TuJ1 (class III β -tubulin) as phenotypic marker of lymphatic and venous valves," *Cardiovascular Pathology*, vol. 15, no. 4, pp. 218–221, 2006.
- [53] D. A. Vouyiouklis and P. J. Brophy, "Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: transient expression of a MAP2c isoform in oligodendrocyte precursors," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 42, no. 6, pp. 803–817, 1995.
- [54] E. D. Laywell, S. M. Kearns, T. Zheng et al., "Neuron-to-astrocyte transition: phenotypic fluidity and the formation of hybrid asters in differentiating neurospheres," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 493, no. 3, pp. 321–333, 2005.
- [55] C. Liu, J. C. Sage, M. R. Miller et al., "Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma," *Cell*, vol. 146, no. 2, pp. 209–221, 2011.
- [56] R. G. W. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom et al., "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 98–110, 2010.
- [57] G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng et al., "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma," *Molecular Cancer*, vol. 5, article 67, 2006.
- [58] A. Eramo, L. Ricci-Vitiani, A. Zeuner et al., "Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells," *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, no. 7, pp. 1238–1241, 2006.
- [59] S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon et al., "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response," *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 756–760, 2006.
- [60] S. K. Singh, I. D. Clarke, T. Hide, and P. B. Dirks, "Cancer stem cells in nervous system tumors," *Oncogene*, vol. 23, no. 43, pp. 7267–7273, 2004.
- [61] R. Galli, E. Binda, U. Orfanelli et al., "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma," *Cancer Research*, vol. 64, no. 19, pp. 7011–7021, 2004.
- [62] S.-H. Kim, R. Ezhilarasan, E. Phillips et al., "Serine/threonine kinase MLK4 determines mesenchymal identity in glioma stem cells in an NF- κ B-dependent manner," *Cancer Cell*, vol. 29, no. 2, pp. 201–213, 2016.
- [63] R. C. Rennert, A. S. Achrol, M. Januszczk et al., "Multiple subsets of brain tumor initiating cells coexist in glioblastoma," *STEM CELLS*, vol. 34, no. 6, pp. 1702–1707, 2016.
- [64] S. Brem, R. Cotran, and J. Folkman, "Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 48, no. 2, pp. 347–356, 1972.
- [65] M. E. Hardee and D. Zagzag, "Mechanisms of glioma-associated neovascularization," *The American Journal of Pathology*, vol. 181, no. 4, pp. 1126–1141, 2012.
- [66] D. Zagzag, R. Amirnovin, M. A. Greco et al., "Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis," *Laboratory Investigation*, vol. 80, no. 6, pp. 837–849, 2000.

- [67] J. Holash, P. C. Maisonpierre, D. Compton et al., "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF," *Science*, vol. 284, no. 5422, pp. 1994–1998, 1999.
- [68] S. Brem, "The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors," *Clinical Neurosurgery*, vol. 23, pp. 440–453, 1976.
- [69] Y. Reiss, M. R. Machein, and K. H. Plate, "The role of angiopoietins during angiogenesis in gliomas," *Brain Pathology*, vol. 15, no. 4, pp. 311–317, 2005.
- [70] D. Zagzag, H. Zhong, J. M. Scalzitti, E. Laughner, J. W. Simons, and G. L. Semenza, "Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression," *Cancer*, vol. 88, no. 11, pp. 2606–2618, 2000.
- [71] K. H. Plate, G. Breier, H. A. Weich, and W. Risau, "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo," *Nature*, vol. 359, no. 6398, pp. 845–848, 1992.
- [72] S. Sawamiphak, S. Seidel, C. L. Essmann et al., "Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis," *Nature*, vol. 465, no. 7297, pp. 487–491, 2010.
- [73] M. Hellström, L.-K. Phng, J. J. Hofmann et al., "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis," *Nature*, vol. 445, no. 7129, pp. 776–780, 2007.
- [74] P. Lindahl, B. R. Johansson, P. Leveen, and C. Betsholtz, "Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice," *Science*, vol. 277, no. 5323, pp. 242–245, 1997.
- [75] D. Zagzag, Y. Lukyanov, L. Lan et al., "Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion," *Laboratory Investigation*, vol. 86, no. 12, pp. 1221–1232, 2006.
- [76] S.-X. Yang, J.-H. Chen, X.-F. Jiang et al., "Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 335, no. 2, pp. 523–528, 2005.
- [77] M. B. Parliament, M. J. Allalunis-Turner, A. J. Franko et al., "Vascular endothelial growth factor expression is independent of hypoxia in human malignant glioma spheroids and tumours," *British Journal of Cancer*, vol. 82, no. 3, pp. 635–641, 2000.
- [78] B. Kaur, C. Tan, D. J. Brat, and E. G. Van Meir, "Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 70, no. 2, pp. 229–243, 2004.
- [79] H. Ohgaki, P. Dessen, B. Jourde et al., "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study," *Cancer Research*, vol. 64, no. 19, pp. 6892–6899, 2004.
- [80] D. Lyden, K. Hattori, S. Dias et al., "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 11, pp. 1194–1201, 2001.
- [81] M. R. Machein, S. Renninger, E. De Lima-Hahn, and K. H. Plate, "Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas," *Brain Pathology*, vol. 13, no. 4, pp. 582–597, 2003.
- [82] W.-Y. Yue and Z.-P. Chen, "Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma?" *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 53, no. 8, pp. 997–1002, 2005.
- [83] S. El Hallani, B. Boisselier, F. Peglion et al., "A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry," *Brain*, vol. 133, no. 4, pp. 973–982, 2010.
- [84] S. P. Niclou, C. Danzeisen, H. P. Eikesdal et al., "A novel eGFP-expressing immunodeficient mouse model to study tumor-host interactions," *The FASEB Journal*, vol. 22, no. 9, pp. 3120–3128, 2008.
- [85] C. A. Shaifer, J. Huang, and P. C. Lin, "Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance," *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 9, pp. 2063–2075, 2010.
- [86] K. De Bock, F. De Smet, R. L. De Oliveira, K. Anthonis, and P. Carmeliet, "Endothelial oxygen sensors regulate tumor vessel abnormalization by instructing phalanx endothelial cells," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 87, no. 6, pp. 561–569, 2009.
- [87] R. K. Jain, "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy," *Science*, vol. 307, no. 5706, pp. 58–62, 2005.
- [88] R. K. Jain, "Determinants of tumor blood flow: a review," *Cancer Research*, vol. 48, no. 10, pp. 2641–2658, 1988.
- [89] M. Mazzone, D. Dettori, R. Leite de Oliveira et al., "Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization," *Cell*, vol. 136, no. 5, pp. 839–851, 2009.
- [90] R. Wang, K. Chadalavada, J. Wilshire et al., "Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium," *Nature*, vol. 468, no. 7325, pp. 829–835, 2010.
- [91] L. Ricci-Vitiani, R. Pallini, M. Biffoni et al., "Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells," *Nature*, vol. 468, no. 7325, pp. 824–830, 2010.
- [92] Q. Shen, S. K. Goderie, L. Jin et al., "Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells," *Science*, vol. 304, no. 5675, pp. 1338–1340, 2004.
- [93] A. B. Hjelmeland, J. D. Lathia, S. Sathornsumetee, and J. N. Rich, "Twisted tango: brain tumor neurovascular interactions," *Nature Neuroscience*, vol. 14, no. 11, pp. 1375–1381, 2011.
- [94] A. Filatova, T. Acker, and B. K. Garvalov, "The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects*, vol. 1830, no. 2, pp. 2496–2508, 2013.
- [95] A. Turpin, A. Sharif, L. Stoven, S. Blond, C.-A. Maurage, and É. Le Rhun, "The stem cell niche in glioblastoma: from fundamental aspects to targeted therapies," *Bulletin du Cancer*, vol. 102, no. 1, pp. 24–33, 2015.
- [96] T. S. Zhu, M. A. Costello, C. E. Talsma et al., "Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells," *Cancer Research*, vol. 71, no. 18, pp. 6061–6072, 2011.
- [97] H.-M. Jeon, S.-H. Kim, X. Jin et al., "Crosstalk between glioma-initiating cells and endothelial cells drives tumor progression," *Cancer Research*, vol. 74, no. 16, pp. 4482–4492, 2014.
- [98] O. J. Becher, D. Hambardzumyan, E. I. Fomchenko et al., "Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas," *Cancer Research*, vol. 68, no. 7, pp. 2241–2249, 2008.
- [99] N. Charles, T. Ozawa, M. Squatrito et al., "Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells," *Cell Stem Cell*, vol. 6, no. 2, pp. 141–152, 2010.
- [100] C. Folkens, Y. Shaked, S. Man et al., "Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1," *Cancer Research*, vol. 69, no. 18, pp. 7243–7251, 2009.
- [101] S. Bao, Q. Wu, S. Sathornsumetee et al., "Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor," *Cancer Research*, vol. 66, no. 16, pp. 7843–7848, 2006.

- [102] D. W. Infanger, Y. Cho, B. S. Lopez et al., "Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche," *Cancer Research*, vol. 73, no. 23, pp. 7079–7089, 2013.
- [103] J. D. Lathia, J. Gallagher, J. M. Heddleston et al., "Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells," *Cell Stem Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 421–432, 2010.
- [104] J. Lathia, M. Li, M. Sinyuk et al., "High-throughput flow cytometry screening reveals a role for junctional adhesion molecule a as a cancer stem cell maintenance factor," *Cell Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 117–129, 2014.
- [105] R. Shao, S. L. Taylor, D. S. Oh, and L. M. Schwartz, "Vascular heterogeneity and targeting: the role of YKL-40 in glioblastoma vascularization," *Oncotarget*, vol. 6, no. 38, pp. 40507–40518, 2015.
- [106] A. Pezzolo, F. Parodi, M. V. Corrias, R. Cinti, C. Gambini, and V. Pistoia, "Tumor origin of endothelial cells in human neuroblastoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, no. 4, pp. 376–383, 2007.
- [107] A. M. Pisacane, F. Picciotto, and M. Risio, "CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma," *Cellular Oncology*, vol. 29, no. 1, pp. 59–66, 2007.
- [108] B. Bussolati, C. Grange, A. Sapino, and G. Camussi, "Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 309–319, 2009.
- [109] A. B. Alvero, H.-H. Fu, J. Holmberg et al., "Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors," *STEM CELLS*, vol. 27, no. 10, pp. 2405–2413, 2009.
- [110] D. Chroscinski, D. Sampey, N. Maherali et al., "Registered report: tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells," *eLife*, vol. 4, article e04363, 2015.
- [111] Y. Zhao, J. Dong, Q. Huang, M. Lou, A. Wang, and Q. Lan, "Endothelial cell transdifferentiation of human glioma stem progenitor cells in vitro," *Brain Research Bulletin*, vol. 82, no. 5-6, pp. 308–312, 2010.
- [112] J. Dong, Y. Zhao, Q. Huang et al., "Glioma stem/progenitor cells contribute to neovascularization via transdifferentiation," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 141–152, 2011.
- [113] Y. Soda, T. Marumoto, D. Friedmann-Morvinski et al., "Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 11, pp. 4274–4280, 2011.
- [114] C. Marfels, M. Hoehn, E. Wagner, and M. Günther, "Characterization of in vivo chemoresistant human hepatocellular carcinoma cells with transendothelial differentiation capacities," *BMC Cancer*, vol. 13, article 176, 2013.
- [115] P.-P. Zheng, M. van der Weiden, P. J. van der Spek, A. J. P. E. Vincent, and J. M. Kros, "Intratymoral, not circulating, endothelial progenitor cells share genetic aberrations with glial tumor cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 228, no. 7, pp. 1383–1390, 2013.
- [116] X. Chen, J. Fang, S. Wang et al., "A new mosaic pattern in glioma vascularization: exogenous endothelial progenitor cells integrating into the vessels containing tumor-derived endothelial cells," *Oncotarget*, vol. 5, no. 7, pp. 1955–1968, 2014.
- [117] S. El Hallani, C. Colin, Y. El Houfi et al., "Tumor and endothelial cell hybrids participate in glioblastoma vasculature," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 827327, 9 pages, 2014.
- [118] A. Ghanekar, S. Ahmed, K. Chen et al., "Endothelial cells do not arise from tumor-initiating cells in human hepatocellular carcinoma," *BMC Cancer*, vol. 13, article 485, 2013.
- [119] S. Coma, M. Allard-Ratick, T. Akino, L. A. Van Meeteren, A. Mammoto, and M. Klagsbrun, "GATA2 and Lmo2 control angiogenesis and lymphangiogenesis via direct transcriptional regulation of neuropilin-2," *Angiogenesis*, vol. 16, no. 4, pp. 939–952, 2013.
- [120] S.-H. Kim, E.-J. Kim, M. Hitomi et al., "The LIM-only transcription factor LMO2 determines tumorigenic and angiogenic traits in glioma stem cells," *Cell Death and Differentiation*, vol. 22, no. 9, pp. 1517–1525, 2015.
- [121] H.-F. Chen, C.-H. Huang, C.-J. Liu et al., "Twist1 induces endothelial differentiation of tumour cells through the Jagged1-KLF4 axis," *Nature Communications*, vol. 5, article 4697, 2014.
- [122] Y. Endo, K. Deonauth, P. Prahallad, B. Hoxter, Y. Zhu, and S. W. Byers, "Role of Sox-9, ER81 and VE-Cadherin in retinoic acid-mediated trans-differentiation of breast cancer cells," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 7, Article ID e2714, 2008.
- [123] R. Galli, U. Borello, A. Gritti et al., "Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells," *Nature Neuroscience*, vol. 3, no. 10, pp. 986–991, 2000.
- [124] C. R. R. Bjornson, R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli, and A. L. Vescovi, "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo," *Science*, vol. 283, no. 5401, pp. 534–537, 1999.
- [125] C.-L. Tso, P. Shintaku, J. Chen et al., "Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties," *Molecular Cancer Research*, vol. 4, no. 9, pp. 607–619, 2006.
- [126] L. Ricci-Vitiani, R. Pallini, L. M. Larocca et al., "Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells," *Cell Death and Differentiation*, vol. 15, no. 9, pp. 1491–1498, 2008.
- [127] M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla et al., "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 3, pp. 301–313, 2008.
- [128] S. Scully, R. Francescone, M. Faibish et al., "Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas," *The Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 37, pp. 12950–12960, 2012.
- [129] L. Cheng, Z. Huang, W. Zhou et al., "Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth," *Cell*, vol. 153, no. 1, pp. 139–152, 2013.
- [130] P.-O. Guichet, S. Guelfi, M. Teigell et al., "Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells," *STEM CELLS*, vol. 33, no. 1, pp. 21–34, 2015.
- [131] G. A. Videla Richardson, C. P. Garcia, A. Roisman et al., "Specific preferences in lineage choice and phenotypic plasticity of glioma stem cells under BMP4 and noggin influence," *Brain Pathology*, vol. 26, no. 1, pp. 43–61, 2016.
- [132] P. Rajan, D. M. Panchision, L. F. Newell, and R. D. G. McKay, "BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP-STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells," *Journal of Cell Biology*, vol. 161, no. 5, pp. 911–921, 2003.
- [133] A. Svensson, I. Özen, G. Genové, G. Paul, and J. Bengzon, "Endogenous brain pericytes are widely activated and contribute to mouse glioma microvasculature," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 4, Article ID e0123553, 2015.
- [134] E. M. Caspani, P. H. Crossley, C. Redondo-Garcia, and S. Martinez, "Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 7, Article ID e101402, 2014.

- [135] E. Boscolo, C. L. Stewart, S. Greenberger et al., "JAGGED1 signaling regulates hemangioma stem cell-to-pericyte/vascular smooth muscle cell differentiation," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, no. 10, pp. 2181–2192, 2011.
- [136] R. Beckervordersandforth, P. Tripathi, J. Ninkovic et al., "In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells," *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 744–758, 2010.
- [137] E. Lecain, F. Alliot, M. C. Laine, B. Calas, and B. Pessac, "Alpha isoform of smooth muscle actin is expressed in astrocytes in vitro and in vivo," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 28, no. 4, pp. 601–606, 1991.
- [138] A. Masszi and A. Kapus, "Smad3 in epithelial-myofibroblast transition," *Cells Tissues Organs*, vol. 193, no. 1-2, pp. 41–52, 2010.
- [139] M. B. Hautmann, P. J. Adam, and G. K. Owens, "Similarities and differences in smooth muscle α -actin induction by TGF- β in smooth muscle versus non-smooth muscle cells," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 19, no. 9, pp. 2049–2058, 1999.
- [140] M. A. Vodyanik, J. Yu, X. Zhang et al., "A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells," *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 718–729, 2010.

Publication 3

Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells

Pierre-Olivier Guichet, [Sophie Guelfi](#), Chantal Ripoll, Marisa Teigell, Jean-Charles Sabourin, Luc Bauchet, Valérie Rigau, Bernard Rothhut, Jean-Philippe Hugnot

Publié dans *Plos One* en Mars 2016

(Reproduction selon l'accord de Licence Creative Commons CC-BY conclu avec l'éditeur Plos One)
(Publication en open access)

RESEARCH ARTICLE

Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells

Pierre-Olivier Guichet¹, Sophie Guelfi¹, Chantal Ripoll¹, Marisa Teigell¹, Jean-Charles Sabourin¹, Luc Bauchet², Valérie Rigau², Bernard Rothhut¹, Jean-Philippe Hugnot^{1,3*}

1 INSERM U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, Hôpital St Eloi, 80 avenue Augustin Fliche, 34091 Montpellier Cedex 05, France, **2** CHU Montpellier, Hôpital Gui de Chaulliac, 80, avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier, France, **3** Université Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

* hugnot@univ-montp2.fr; pierre-olivier.guichet@inserm.fr



OPEN ACCESS

Citation: Guichet P-O, Guelfi S, Ripoll C, Teigell M, Sabourin J-C, Bauchet L, et al. (2016) Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells. PLoS ONE 11(3): e0151274. doi:10.1371/journal.pone.0151274

Editor: Deric M. Park, National Cancer Institute, UNITED STATES

Received: August 19, 2015

Accepted: February 25, 2016

Published: March 8, 2016

Copyright: © 2016 Guichet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper, Supporting Information files and on Figshare public repository at this link <https://figshare.com/s/b332c725ae0695770c7b>

Funding: This work was supported by the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC, France), the "Association pour la Recherche contre les Tumeurs Cérébrales" (ARTC Sud, France) and "l'Institut National pour la Recherche sur le Cancer" (INCA, France).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Asymmetric division (AD) is a fundamental mechanism whereby unequal inheritance of various cellular compounds during mitosis generates unequal fate in the two daughter cells. Unequal repartitions of transcription factors, receptors as well as mRNA have been abundantly described in AD. In contrast, the involvement of intermediate filaments in this process is still largely unknown. AD occurs in stem cells during development but was also recently observed in cancer stem cells. Here, we demonstrate the asymmetric distribution of the main astrocytic intermediate filament, namely the glial fibrillary acid protein (GFAP), in mitotic glioma multipotent cells isolated from glioblastoma (GBM), the most frequent type of brain tumor. Unequal mitotic repartition of GFAP was also observed in mice non-tumoral neural stem cells indicating that this process occurs across species and is not restricted to cancerous cells. Immunofluorescence and videomicroscopy were used to capture these rare and transient events. Considering the role of intermediate filaments in cytoplasm organization and cell signaling, we propose that asymmetric distribution of GFAP could possibly participate in the regulation of normal and cancerous neural stem cell fate.

Introduction

Asymmetric distribution of molecules during division is a fundamental mechanism which has a major impact on the formation of cell diversity and final size of the organs [1–3]. Unequal repartition of proteins, such as transcription factors and growth factor receptors, but also other cellular constituents such as mRNA or even organelles, will generate unequal cell fates from genetically identical daughter cells [4–7]. In accordance with their central role in development, several proteins involved in the Notch and Wnt pathways have been described to be asymmetrically distributed during division [8, 9].

Close links between asymmetric division and cancer have also been established [10–12]. Particularly in *Drosophila*, mutation of genes involved in asymmetric division can result in uncontrolled proliferation and cancer [13]. In mammals, reduction of asymmetric repartition of the proteoglycan NG2 during division of oligodendrocyte progenitor cells correlates with

formation of brain tumors [14]. Defect in asymmetric division may also contribute to the formation and persistence of cancer stem cells [15]. These cells, which have been described in many types of tumors, are more resistant to conventional treatments and are thought to be at the origin of tumor recurrence [16, 17]. They express specific markers such as CD133 which can be asymmetrically distributed during division [18].

A category of protein which has been given little attention in the asymmetric division process is intermediate filaments. This large family of cytoskeleton proteins perform many cellular functions beyond their well-documented role for the regulation of cell shape and intracellular organization [19, 20]. These are for instance guidance of signalling factors and mitochondria motility [21, 22]. More recently, it was demonstrated that the intermediate filament vimentin mediates the asymmetric partitioning of damaged, misfold and aggregated proteins in JUNQ inclusion bodies in mammalian cells which provide new biological insight into the role of intermediate filaments in cell rejuvenation [23].

In this article, we focused on the GFAP intermediate filament which is expressed in mature astrocytes in the nervous system. However, it is now well established that GFAP can also label immature oligodendroglia as well as adult neural stem cells [24–27]. GFAP is also highly expressed in astrocytoma such as glioblastomas, the most frequent and devastating type of brain tumors [28]. These tumors contain a subpopulation of cancer stem cells which can be propagated as spheres in defined media [29–31]. Here we explored the expression of GFAP in glioma spheres derived from GBM patients. Using immunofluorescence (IF) and videomicroscopy, we demonstrated that GFAP can be asymmetrically distributed during division. Similar observations were made in non tumoral neural stem cell cultures. This unequal repartition of GFAP possibly plays a role in the asymmetric division process and cell fate regulation.

Materials and Methods

Cell culture and Isolation of clonal multipotent cell line mGb4

Isolation of mGb4 clonal cell line was performed by single cell seeding of Gb4 GBM primary culture [32] in 96-well plates with an Aria cytometer (BD). Adult spinal cord neural stem cells were obtained from adult mice (C57BL/6, Charles River, France) and cultured as described in [33, 34]. Medium consisted of DMEM/F12 1:1 (Invitrogen), N2 and B27 supplements (Invitrogen), 2mM glutamine (Invitrogen), 0.6% glucose (Sigma), 20 µg/ml bovine insulin (Sigma) supplemented by 2 µg/ml Heparin (Sigma), 20ng/ml EGF (Peprotech) and 10ng/ml FGF2 (Peprotech). For differentiation and upregulation of GFAP, mGb4 cells were plated adherently for 5 days on poly-D-lysine (25 µg/mL) and laminin (2 µg/cm²)-coated glass coverslips in medium containing 0.5% fetal bovine serum instead of EGF and FGF2 growth factors. Isolation of Gb5 cells were described in [32] and Gb21 cells were isolated using the same procedure. Information for Gb4, Gb5 and Gb21 patients are provided in [S1 Table](#). Intracranial transplantation of mGb4 cells was performed as described in [32]. Mice were handled following the guidelines of the Animal Care and Use Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) who approved this study in accordance with the European Council directive (2010/63/UE) for the protection and use of vertebrate animals (Permit Number: CEEA-LR-11038). All transplantations were performed under isoflurane gas (1.5%) and every effort was made to minimize the number and suffering of animals. Three months after transplantation, mice were euthanized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (100 mg/kg).

Transfection

Human GFAP α cDNA cloned into pEGFP-C2 (hGFAP α -EGFP-C2) or pEGFP-N3 (hGFAP α -EGFP-N3) and human GFAP ϵ cDNA cloned into pEGFP-N3 (hGFAP ϵ -EGFP-N3) were

kindly provided by Dr. D. Pham Dinh (Paris, France). These constructions were transfected in mGb4 cells using an Amaxa apparatus and neural stem cell kit (Lonza). For videomicroscopy, the H2B-mCherry plasmid (Addgene, 20972) was co transfected to visualize the nuclei in the red channel. Transfection with pEGFP-N3 (pCMV-EGFP-N3) plasmid (Clontech) was used as control. For visualization of Golgi apparatus, mGb4 cells were transfected with a pDsRed-Monomer-Golgi (Clontech). After 48h, cells were processed for time-lapse confocal microscopy or fixed with 4% paraformaldehyde 20 min RT, for IF.

Immunofluorescence and imaging

IF was performed as previously described in [32]. Briefly, cells were fixed with 4% PFA for 20 min at room temperature, washed twice with PBS and permeabilized with a blocking solution containing 5% donkey serum 0.01% triton X-100 diluted in PBS. Then, cells were incubated overnight with the appropriate primary antibody (S2 Table). Immunoreactivity was visualized using Alexa-488 or Alexa-594 donkey anti-mouse, anti-rabbit or anti-chicken secondary antibodies at a dilution 1:1000 (Jackson ImmunoResearch). Nuclei were counterstained with Hoechst 33242 (blue on images). Glass coverslips were mounted using fluorescence Mounting Medium (Dako, S3023). Images were captured with an AxioImager Z1/Apoptome microscope (Zeiss).

Flow cytometry

FACS was performed on mGb4 and Gb21 living cells stained directly by PE-conjugated CD44 (5 µg/ml) or indirectly by CD133 (5 µg/ml) or CD15 (5 µg/ml) followed by anti-mouse Alexa A488 (Jackson Lab) diluted in PBS 0.5% BSA 2 mM EDTA 0.1% Azide. Control cells were incubated with control isotype antibodies in the same buffer. Cells were analyzed on a Galios flow cytometer (Beckman Coulter) and analysis was performed on Kaluza (Beckman Coulter).

Time-lapse confocal microscopy

mGb4 cells were grown in 35 mm glass dish coated with poly-D-lysine/laminin and imaged on LSM5 live duo inverted Microscope (Zeiss) equipped for time-lapse microscopy with CCD camera, temperature controller (37°C) and CO₂ (5%) incubation chamber. Cell divisions were imaged as stack images at 0.5–1 µm z-spacing with an objective EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27 (Zeiss). After acquisition, images were analysed using LSM5 images browser (Zeiss). For best viewing of proteins distribution, all z-planes were merged in one single plane projection. Raw data have been deposited on the public repository Figshare and are available at this link <https://figshare.com/s/b332c725ae0695770cfb>.

Statistical analysis of asymmetry

GFAP asymmetric repartition events were scored in mitotic cells engaged in the late mitosis steps i.e. in anaphase or telophase with two separate chromatid sets but still sharing a common cytoplasm. Z acquisitions were systemically performed to ascertain that GFAP asymmetry was present in all or most cell planes to avoid artefact with cells displaying a 3D peculiar shape. To quantify the asymmetry in IF and videomicroscopy experiments, we determined the percent (%) deviation previously described in [18] using this formula: $(F1-F2) / (F1+F2) \times 100$ where F1 and F2 represent the fluorescence of each cells (using CTCF, i.e. integrated density–(area of selected cell X mean fluorescence of background readings) obtained with imageJ software). Fluorescence of β-tubulin (which is equally expressed in both daughter cells) was used to determine the asymmetry cell division cutoff. The % of deviation for β-tubulin (quantified for 20

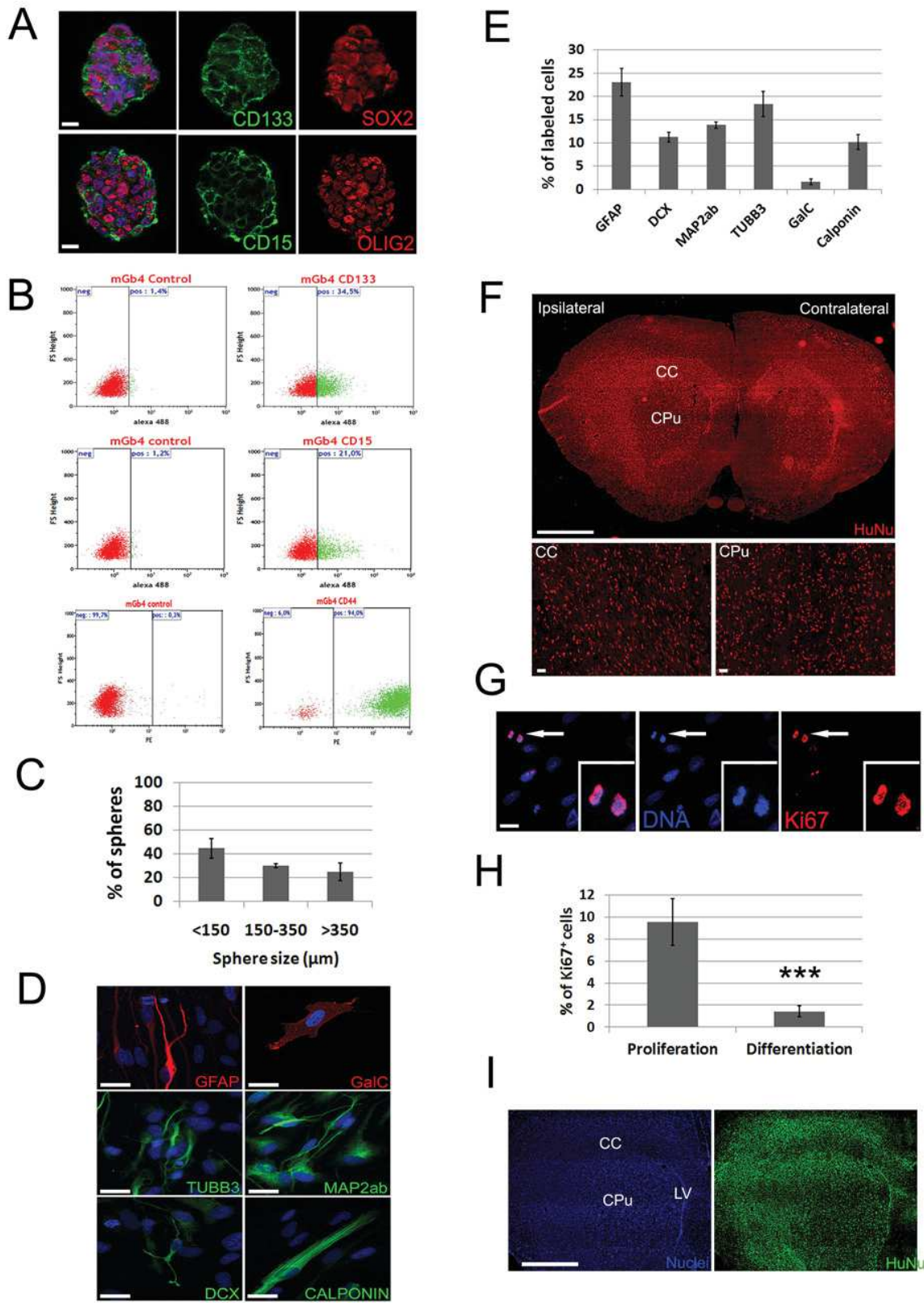


Fig 1. Characterization of mGb4 clonal cell line. (A) IF for the indicated markers performed on mGb4 neurospheres. These cultures express CD133, CD15, OLIG2 and SOX2. (B) FACS analysis for CD133, CD15 and CD44 expression in mGb4 cells. (C) Quantification of clonal neurosphere formation in 96 well plate one month after seeding as a function of their size at three different passages. (D) mGb4 cell multipotency analysis. Examples of cells stained for the indicated markers, observed 5 days after differentiation. (E) Quantification of experiment presented in (D). (F) Detection of mGb4 transplanted cells (red dots) by IF for Human Nuclei antigen (HuNu) 3 months after transplantation. Note the profuse invasion of the ipsilateral hemisphere (right-hand hemisphere), corpus callosum (CC), caudate putamen (CPU) and contralateral hemisphere (left-hand hemisphere). Insets show high density of HuNu⁺ cells in the corpus callosum and caudate-putamen regions (G) Dividing mGb4 cells (arrow) grown in differentiating condition can be observed by Ki67 staining (right-hand image) and highly-condensed chromatin visualized with Hoechst staining (middle image). Inset shows high magnification of a Ki67 staining associated with chromosomes in mGb4 mitotic cell. (H) Quantification of Ki67^{high} mitotic mGb4 cells in proliferating or after 5 days of differentiation (n = 7 fields, Mann-Whitney rank sum test, *** (p<0.001)). (I) Examples of tumoral cells (visualized by HuNu staining, green) detected in the CC and CPU of a mice transplanted with 100 000 mGb4 cells which had been differentiated for 5 days. Scale bar = 10 μm (A, D, G), = 2.5 mm (F, upper image; I), = 20 μm (F, lower images).

doi:10.1371/journal.pone.0151274.g001

dividing cells) was 5.834% and the deviation standard was 4.358. We set the cutoff to be greater than the 99% confidence interval of β-tubulin. For a bell-shaped distribution, this calculates to the mean difference +/- 2.845 x standard deviation (t-test table) which is 18.23% for the upper limit. This led us to set the asymmetry cutoff to be greater than a 20% difference between sibling cells.

Results

Isolation of a clonal multipotent GBM cell line

We previously isolated and characterized several cultures derived from GBM patients [32]. These cells grow as neurospheres in defined media and meet criteria for classifying them as multipotent glioma cells. These cultures are however heterogeneous and contains a mixture of cells carrying various mutations, different proliferation rates and differentiation potentials. In order to restrict our study to clonally-expanded, highly-proliferative and multipotent GBM cells, we isolated a cell line by single-cell seeding in 96 wells plate. Characterization of the resulting cell line (mGb4) by IF and FACS revealed that cells express CD15, CD133, CD44 stem cell markers together with SOX2 and OLIG2, two transcription factors associated with the maintenance of multipotency and proliferation of glioma multipotent cells (Fig 1A and 1B). Clonogenicity analysis performed at three different passages in 96 wells plate indicated that approximately 20% of mGb4 cells were able to form new large (>350 μm) and passageable neurospheres (Fig 1C). Multipotentiality of mGb4 cells was tested by plating them on adherent substrate without growth factors. In this condition, mGb4 cells generated neuronal (DCX⁺, MAP2ab⁺, TUBB3⁺), glial (GFAP⁺, GalC⁺) and mesenchymal-like (Calponin⁺) cells (Fig 1D and 1E). Finally, intracranial transplantation of mGb4 cells in nude mice generated infiltrative tumors (10/10 transplanted mice) after 3 months, thus confirming the tumoral properties of these cells (Fig 1F). Taken together, these results validate the use of mGb4 clonal cells as a cellular model for GBM multipotent cells.

Interestingly, we noted that after growth factors removal (i.e. differentiation condition), mGb4 cells still proliferate, albeit at a lower rate, as evidenced by the presence of Ki67⁺ cells and mitotic cells (Fig 1G and 1H). Moreover, these cells also generate tumors after intracranial transplantation (Fig 1I) suggesting that they have not reached terminal differentiation but rather remain immature and blocked in their final differentiation process probably as the result of mutations interfering with the cell cycle exist [35].

Asymmetric distribution of GFAP during mitosis in GBM and mNSC cultures

In differentiation condition, we observed that mitotic mGb4 cells frequently expressed the GFAP intermediate filament. Unexpectedly, we made the observation that in paraformaldehyde-fixed cells, GFAP was asymmetrically distributed in approximately 7% of mitotic cells

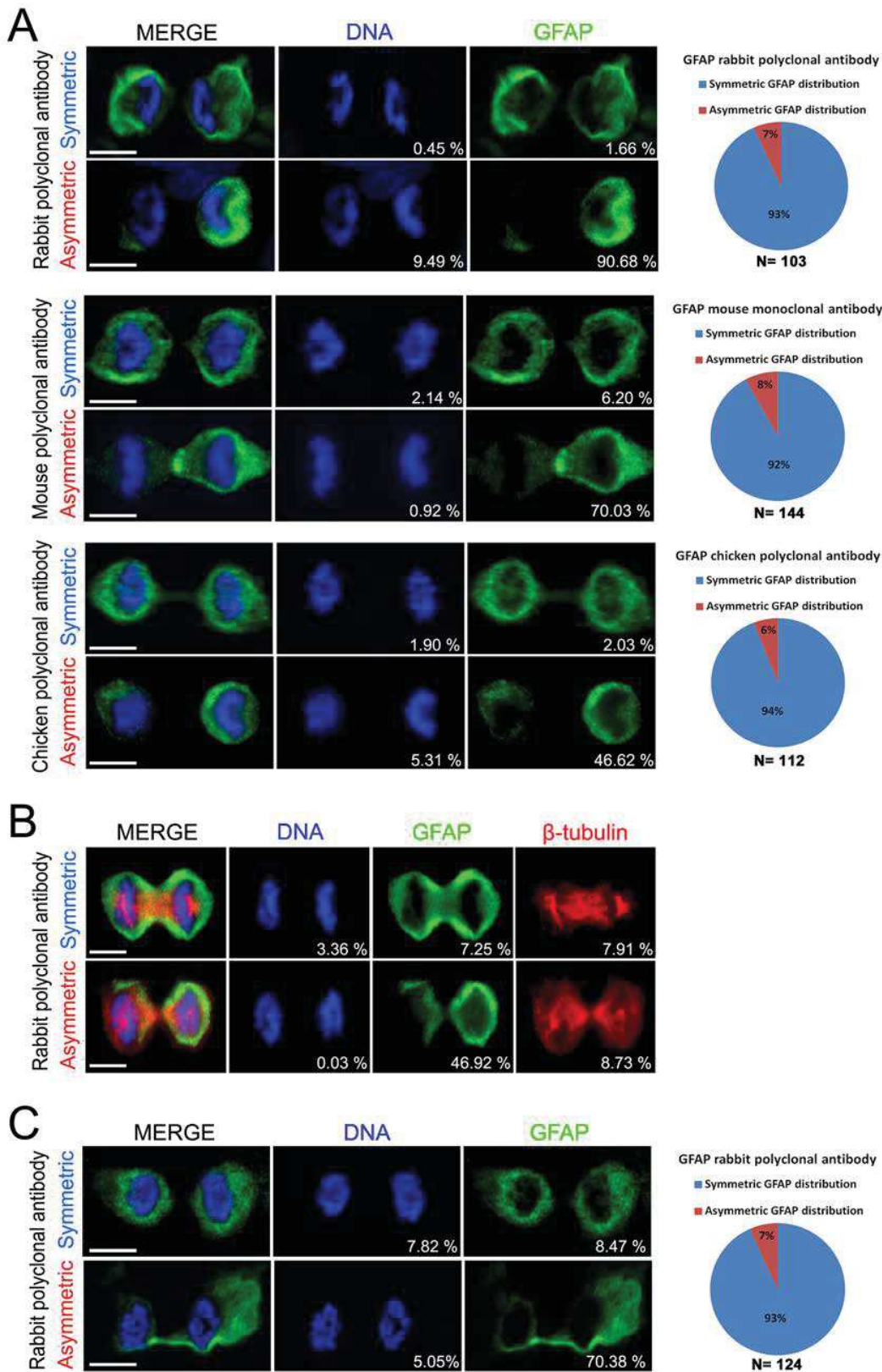


Fig 2. Symmetric and Asymmetric distribution of GFAP in mGb4 and mNSC observed by IF. (A) Examples of symmetric and asymmetric distribution of GFAP during mitosis in mGb4 cells detected using a rabbit polyclonal antibody (Z0034, upper panel), mouse monoclonal antibody (G3893, middle panel) or chicken polyclonal antibody (AB4674, lower panel). (B) Examples of asymmetric and symmetric distribution of GFAP in mitotic cells stained for spindle apparatus (β -tubulin in red). (C) Examples of symmetric and asymmetric distribution of GFAP in mitotic spinal cord neural stem cells. Quantifications are presented on right-hand panels. n = number of observed mitotic cells (late anaphase or telophase) of at least three independent experiments. The Percent deviation in staining between two sibling cells is displayed in the bottom right corner of images. Scale bars = 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0151274.g002

during the anaphase or telophase (Fig 2A). Co-staining for a spindle apparatus marker (β -tubulin) confirmed that these cells were undergoing mitosis and that the GFAP asymmetry is not simply a doublet of unrelated and attached cells (Fig 2B). The possibility existed that while GFAP filaments were present at the same level in the two daughter cells, epitopes recognized by GFAP antibodies were masked in one cell as a result of GFAP phosphorylation or because of GFAP interactions with a specific pattern in only one cell. To rule out this possibility of an IF artifact, we used two other antibodies against GFAP and this confirmed the asymmetric distribution of this intermediate filament in a small fraction of mitotic cells (Fig 2A).

As GBM are highly heterogeneous tumors composed of different cell types and to exclude that GFAP could be segregated asymmetrically specifically in mGb4, we extended our observations to GBM multipotent cells derived from two other patients. We used the Gb5 culture which was previously characterized [32] and we also derived a new glioma sphere culture from a newly diagnosed GBM patient (Gb21). Gb21 cells express the typical markers for GBM multipotent cells such as CD15, CD133, Olig2 and Sox2 (S1 File). IF performed on differentiated Gb5 and Gb21 cells revealed clear events of unequal repartition of GFAP during mitosis which demonstrates the occurrence of asymmetric distribution of GFAP in independent GBM multipotent cells (S2 File).

Finally, to show that asymmetric distribution of GFAP is not restricted to human GBM cultures, we explored whether this phenomenon could also occur in non tumoral cells. For this, we used neural stem cell cultures derived from the mouse adult spinal cord [33]. These cells are cultured in the same media as glioma spheres, are highly proliferative and differentiate into astrocytes, neurons and oligodendrocytes upon growth factor removal (S3 File). Differentiation induces an increase in the level of GFAP expression concomitantly with a reduction of division rate [34]. In this condition, using IF, we observed the asymmetric repartition of GFAP in a small fraction of mitotic cells (approximately 7%) (Fig 2C). The asymmetric distribution of GFAP in multipotent cells thus appears as an evolutionary-conserved phenomenon which is not restricted to the tumoral context.

Asymmetric distribution of GFAP-EGFP fusion protein during mitosis in mGb4 culture

To validate further this observation using a completely independent technique, we transfected mGb4 cells with a plasmid coding for GFAP fused to EGFP. For these experiments, we used three types of constructs: the isoform alpha (GFAP α) which is the most frequent form found in the central nervous system [36, 37] and the isoform epsilon (GFAP ϵ , also known as GFAP δ [38]) known to be preferentially expressed in astrocytes in neurogenic regions [39, 40]. For GFAP α we tested two constructs where EGFP was either fused to the N- or C-terminal of GFAP especially as it was reported that the subcellular location of fusion proteins could be influenced by the presence of EGFP [41]. After transfection of these three constructs and fixation, examination of mitotic cells confirmed an asymmetric repartition of EGFP in approximately 3–7% of the cells whatever the constructs (Fig 3A). This indicates that both isoforms of GFAP could undergo asymmetric repartition in mGb4 cells.

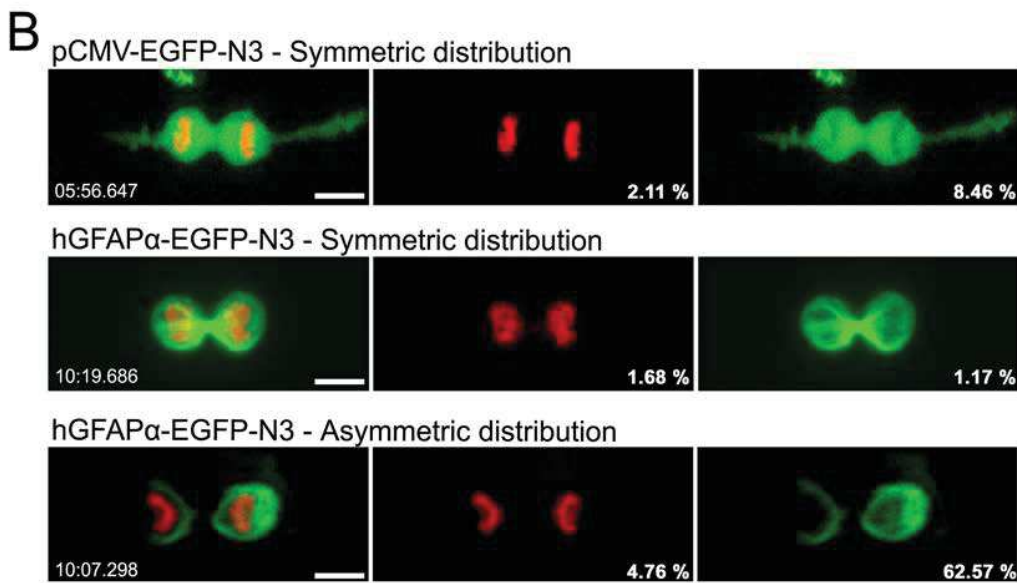
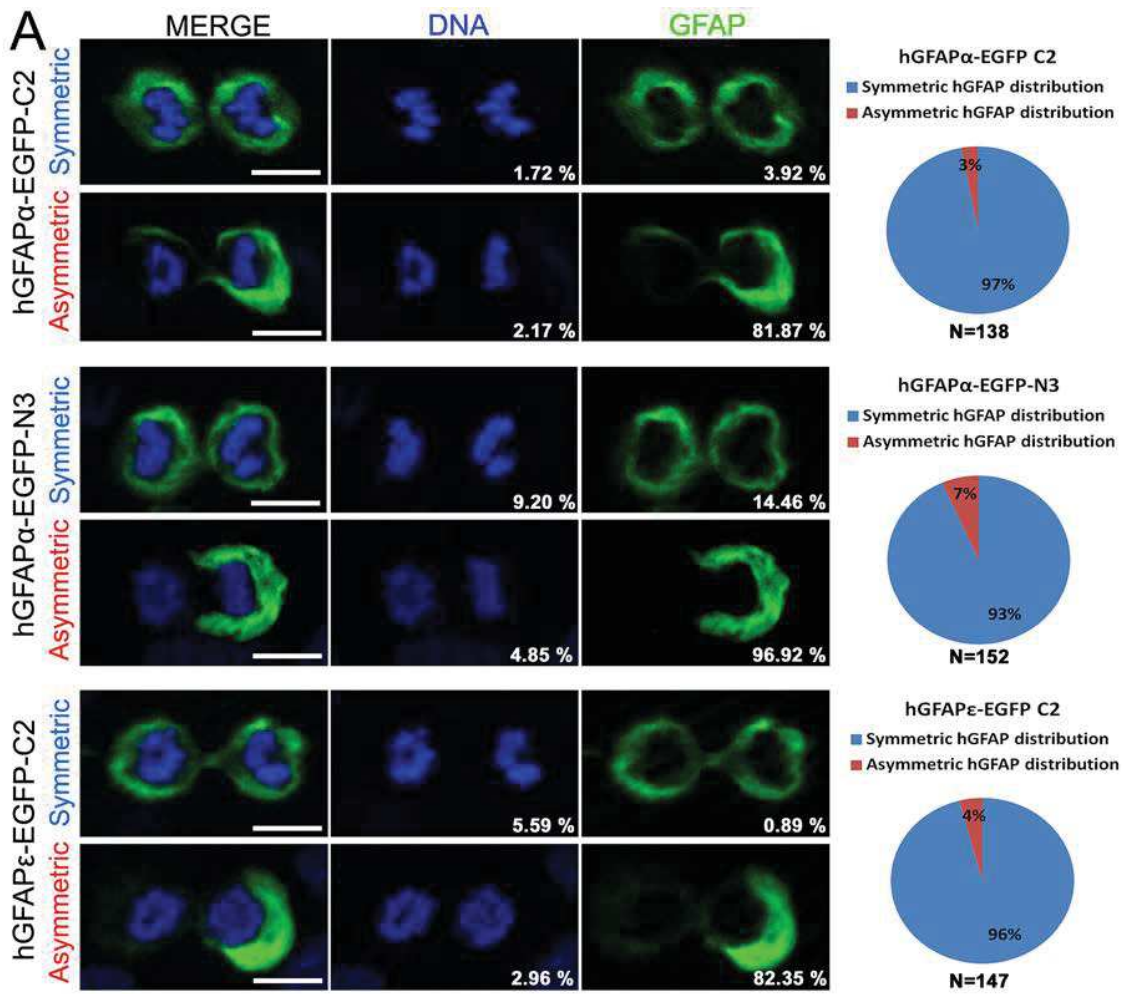


Fig 3. Symmetric and Asymmetric distribution of GFAP-EGFP during mitosis. (A) Examples of symmetric and asymmetric distribution of GFAP α -EGFP and GFAP ϵ -EGFP in mitotic paraformaldehyde-fixed cells. For GFAP α , 2 different constructs were used in which EGFP was either fused to the C-terminal (hGFAP α -EGFP-C2) or to the N-terminal (hGFAP α -EGFP-N3). No prominent difference was observed between these 2 constructs. Quantifications are presented on the right-hand panels. n = number of observed mitotic cells (late anaphase or telophase) in three independent experiments. (B) Images of time-lapse confocal microscopy of mGb4 cells cotransfected with the indicated GFP constructs and H2B-mCherry (red nuclei). The pCMV-EGFP construction used as control showed only symmetric distribution of EGFP (upper panel). In contrast, cells transfected with the hGFAP α -EGFP-N3 construct showed symmetric (middle panel) or asymmetric distribution of GFAP-EGFP protein (lower panel) during mitosis. The Percent deviation in staining between two cibling cells is displayed in the bottom right corner of images. Scale bars = 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0151274.g003

Finally, as an ultimate demonstration of asymmetric repartition of GFAP in GBM cells, we used confocal-videomicroscopy to directly capture the phenomenon. Fig 3B and S4, S5 and S6 Files show three examples of clear asymmetric distribution of GFAP recorded in two daughter cells undergoing cytokinesis (n = 50 observed mitosis). These films also revealed that GFAP was asymmetrically distributed in the cell several minutes before cytokinesis occurred. This indicates that the AD process leading to GFAP accumulation in one part of the cell is not concomitant to cytoplasm separation but started well ahead. As a comparison, Fig 3B and S7 File show a symmetric repartition of GFAP in the two daughter cells. We never observed asymmetric segregation of the control unfused EGFP protein (20 cells observed) (Fig 3B and S8 File) which confirms the specificity of the unequal segregation of GFAP-EGFP in a fraction of mGb4 cells.

Discussion

Here we demonstrate that the intermediate filament GFAP can segregate asymmetrically in multipotent GBM and non tumoral neural cell division. This was also reported recently by another team [42]. The rarity (less than 10% of division) and rapidity of this event may explain why it has been unnoticed before. The low frequency of GFAP asymmetric repartition in GBM cells might have resulted from a cellular heterogeneity in the culture with cells undergoing very frequent asymmetric divisions intermingled with cells unable to do so. This possibility is however unlikely as in this study we derived and used a clonal GBM-derived cell culture. It is more probable that the observed low rate of GFAP asymmetric distribution reflects a stochastic and rare event. Alternatively, this rate could be determined by unknown complex cellular interactions favoring GFAP unequal repartition and occurring at a low frequency in the cell culture.

The function, if any, as well as the molecular machinery underlying this unequal distribution of GFAP remains to be fully addressed. The implication of a similar intermediate filament, vimentin, in the control of Golgi apparatus position, motility of mitochondria within the cell and distribution of endosomal and lysosomal protein has been reported [43]. Along this line, we hypothesized that unequal distribution of GFAP could induce asymmetric segregation of organelles in mGb4 cells. We explored this possibility by conducting double labelling for GFAP and proteins specific for the Golgi apparatus (GM130) [44], the endoplasmic reticulum (FTCD) [45] and the lysosomal compartment (AP3) [46] on mGb4 cells but no convincing co-asymmetric distributions were obtained (S9 File). A same conclusion was obtained using videomicroscopy for GFAP-GFP and a red fluorescent protein targeting the Golgi apparatus (S10 and S11 Files).

In conclusion, there are growing evidence indicating that cytoskeleton proteins are actively participating in the regulation of cell fate and asymmetric division. In fact, GFAP $^{-/-}$ Vim $^{-/-}$ astrocytes showed reduced endocytosis of the Notch ligand Jagged1 and displayed a reduced Notch signaling [47]. This indicates that intermediate filaments might participate in the regulation of stem cell fate by controlling major cell decision pathways such as Notch. We thus speculate that the observed asymmetric distribution of GFAP in GBM multipotent cells and neural stem cells could possibly play a role in the regulation of cell fate.

Supporting Information

S1 File. Phenotypic characterization of Gb21 GBM cells by IF and FACS. Scale bars = 10 μm .
(TIF)

S2 File. Asymmetric distribution of GFAP in Gb5 and Gb21 cells. The Percent deviation in staining between the two cibling cells is displayed in the bottom right corner of images. Scale bars = 10 μm .
(TIF)

S3 File. Differentiation of adult spinal cord neurospheres. Positive cells (arrows) for GFAP, Dcx and O4 markers are shown. Scale bars = 10 μm .
(TIF)

S4 File. Videos of asymmetric distribution of GFAP-EGFP during mitosis of mGb4 cells. Scale bar = 10 μm .
(MP4)

S5 File. Videos of asymmetric distribution of GFAP-EGFP during mitosis of mGb4 cells. Scale bar = 10 μm .
(MP4)

S6 File. Videos of asymmetric distribution of GFAP-EGFP during mitosis of mGb4 cells. Scale bar = 10 μm .
(MP4)

S7 File. Video of symmetric distribution of GFAP-EGFP during mitosis of mGb4 cells. Scale bar = 10 μm .
(MP4)

S8 File. Video of symmetric distribution of EGFP during mitosis of mGb4 cells. Scale bar = 10 μm .
(MP4)

S9 File. (A) Examples of GM130 stainings (red dots) in mitotic cells with asymmetric GFAP distribution. **(B)** Examples of symmetric and asymmetric distribution of GFAP-GFP and Golgi-DsRed protein. No association between Golgi apparatus and GFAP was observed. The Percent deviation in staining between the two cibling cells is displayed in the bottom right corner of images. Scale bars = 10 μm .
(TIF)

S10 File. Video of symmetric distribution of GFAP-EGFP and Golgi-DsRed during mitosis of mGb4 cells. Scale bar = 10 μm .
(MP4)

S11 File. Video of asymmetric distribution of GFAP-EGFP and Golgi-DsRed during mitosis of mGb4 cells. Scale bar = 10 μm .
(MP4)

S12 File. Values for statistical analysis of asymmetry, histograms and graphs.
(XLSX)

S1 Table. Patient annotations.
(DOCX)

S2 Table. Antibody list.
(DOCX)**Acknowledgments**

This work was supported by the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (ARC, France), the “Association pour la Recherche contre les Tumeurs Cérébrales” (ARTC Sud, France) and “l’Institut National pour la Recherche sur le Cancer” (INCA, France). We thank Dr. D. Pham Dinh (Paris, France) for kindly providing all hGFAP-EGFP constructions. RIO and RHEM Montpellier facilities were used for this work. This work has benefited from the facilities and expertise of the CCBH-M Collection (glioma collection) of the University Hospital of Montpellier–France (www.chu-montpellier.fr)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: POG JPH MT LB. Performed the experiments: POG SG MT JCS CR VR. Analyzed the data: POG JPH BR LB. Contributed reagents/materials/analysis tools: LB. Wrote the paper: POG JPH.

References

1. Sun T, Hevner RF. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat Rev Neurosci*. 2014; 15(4):217–32. doi: [10.1038/nrn3707](https://doi.org/10.1038/nrn3707) PMID: [24646670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24646670/); PubMed Central PMCID: PMC4107216.
2. Gonczy P. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(5):355–66. doi: [10.1038/nrm2388](https://doi.org/10.1038/nrm2388) PMID: [18431399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18431399/).
3. Li R. The art of choreographing asymmetric cell division. *Dev Cell*. 2013; 25(5):439–50. doi: [10.1016/j.devcel.2013.05.003](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.003) PMID: [23763946](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23763946/).
4. Buchman JJ, Tsai LH. Spindle regulation in neural precursors of flies and mammals. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(2):89–100. Epub 2007/01/18. doi: [10.1038/nrn2058](https://doi.org/10.1038/nrn2058) PMID: [17228329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17228329/).
5. Knoblich JA. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(12):849–60. doi: [10.1038/nrm3010](https://doi.org/10.1038/nrm3010) PMID: [21102610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21102610/); PubMed Central PMCID: PMC3941022.
6. Hirata J, Nakagoshi H, Nabeshima Y, Matsuzaki F. Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature*. 1995; 377(6550):627–30. doi: [10.1038/377627a0](https://doi.org/10.1038/377627a0) PMID: [7566173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7566173/).
7. Ouellet J, Barral Y. Organelle segregation during mitosis: lessons from asymmetrically dividing cells. *J Cell Biol*. 2012; 196(3):305–13. doi: [10.1083/jcb.201102078](https://doi.org/10.1083/jcb.201102078) PMID: [22312002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22312002/); PubMed Central PMCID: PMC3275374.
8. Lu B, Jan LY, Jan YN. Asymmetric cell division: lessons from flies and worms. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8(4):392–9. PMID: [9729713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9729713/).
9. Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric cell division during animal development. *Curr Opin Cell Biol*. 1997; 9(6):833–41. PMID: [9425348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9425348/).
10. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006; 441(7097):1068–74. Epub 2006/07/01. doi: [10.1038/nature04956](https://doi.org/10.1038/nature04956) PMID: [16810241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16810241/).
11. Gonzalez C. Spindle orientation, asymmetric division and tumour suppression in *Drosophila* stem cells. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(6):462–72. Epub 2007/05/19. doi: [10.1038/nrg2103](https://doi.org/10.1038/nrg2103) PMID: [17510666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17510666/).
12. Noatynska A, Gotta M, Meraldi P. Mitotic spindle (DIS) orientation and DISease: cause or consequence? *J Cell Biol*. 2012; 199(7):1025–35. doi: [10.1083/jcb.201209015](https://doi.org/10.1083/jcb.201209015) PMID: [23266953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23266953/); PubMed Central PMCID: PMC3529530.
13. Homem CC, Knoblich JA. *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development*. 2012; 139(23):4297–310. doi: [10.1242/dev.080515](https://doi.org/10.1242/dev.080515) PMID: [23132240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23132240/).
14. Sugiarto S, Persson AI, Munoz EG, Waldhuber M, Lamagna C, Andor N, et al. Asymmetry-defective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors. *Cancer Cell*. 2011; 20(3):328–40. PMID: [21907924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21907924/). doi: [10.1016/j.ccr.2011.08.011](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.011)

15. Bu P, Chen KY, Chen JH, Wang L, Walters J, Shin YJ, et al. A microRNA miR-34a-regulated bimodal switch targets Notch in colon cancer stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013; 12(5):602–15. doi: [10.1016/j.stem.2013.03.002](https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.002) PMID: [23642368](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23642368/); PubMed Central PMCID: PMC3646336.
16. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(6):717–28. doi: [10.1016/j.stem.2012.05.007](https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007) PMID: [22704512](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22704512/).
17. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008; 359(5):492–507. Epub 2008/08/02. doi: [10.1056/NEJMra0708126](https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126) PMID: [18669428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18669428/).
18. Lathia JD, Hitomi M, Gallagher J, Gadani SP, Adkins J, VasANJI A, et al. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis*. 2011; 2:e200. PMID: [21881602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21881602/). doi: [10.1038/cddis.2011.80](https://doi.org/10.1038/cddis.2011.80)
19. Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(7):562–73. PMID: [17551517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17551517/).
20. Goldman RD, Grin B, Mendez MG, Kuczmarski ER. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol*. 2008; 20(1):28–34. PMID: [18178072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18178072/). doi: [10.1016/j.ceb.2007.11.003](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.11.003)
21. Kim S, Coulombe PA. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev*. 2007; 21(13):1581–97. doi: [10.1101/gad.1552107](https://doi.org/10.1101/gad.1552107) PMID: [17606637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17606637/).
22. Nekrasova OE, Mendez MG, Chernouvanenko IS, Tyurin-Kuzmin PA, Kuczmarski ER, Gelfand VI, et al. Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell*. 2011; 22(13):2282–9. doi: [10.1091/mbc.E10-09-0766](https://doi.org/10.1091/mbc.E10-09-0766) PMID: [21562225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21562225/); PubMed Central PMCID: PMC3128530.
23. Ogrodnik M, Salmonowicz H, Brown R, Turkowska J, Sredniawa W, Pattabiraman S, et al. Dynamic JUNQ inclusion bodies are asymmetrically inherited in mammalian cell lines through the asymmetric partitioning of vimentin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(22):8049–54. Epub 2014/05/21. doi: [10.1073/pnas.1324035111](https://doi.org/10.1073/pnas.1324035111) PMID: [24843142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24843142/); PubMed Central PMCID: PMC4050583.
24. Jagadha V, Halliday WC, Becker LE. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in oligodendrogliomas: a reflection of transient GFAP expression by immature oligodendroglia. *Can J Neurol Sci*. 1986; 13(4):307–11. PMID: [3536047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3536047/).
25. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011; 93(3):421–43. PMID: [21219963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21219963/). doi: [10.1016/j.pneurobio.2011.01.005](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005)
26. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2003; 6(11):1127–34. doi: [10.1038/nn1144](https://doi.org/10.1038/nn1144) PMID: [14583753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14583753/).
27. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009; 32:149–84. doi: [10.1146/annurev.neuro.051508.135600](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600) PMID: [19555289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19555289/); PubMed Central PMCID: PMC3086722.
28. Reifenberger G, Szymas J, Wechsler W. Differential expression of glial- and neuronal-associated antigens in human tumors of the central and peripheral nervous system. *Acta Neuropathol*. 1987; 74(2):105–23. PMID: [3314309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3314309/).
29. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003; 63(18):5821–8. Epub 2003/10/03. PMID: [14522905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14522905/).
30. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(6):425–36. Epub 2006/05/26. doi: [10.1038/nrc1889](https://doi.org/10.1038/nrc1889) PMID: [16723989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16723989/).
31. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(5):440–52. Epub 2009/05/12. doi: [10.1016/j.stem.2009.03.003](https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.003) PMID: [19427293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19427293/).
32. Guichet PO, Bieche I, Teiggell M, Serguera C, Rothhut B, Rigau V, et al. Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia*. 2013; 61(2):225–39. PMID: [23047160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23047160/). doi: [10.1002/glia.22429](https://doi.org/10.1002/glia.22429)
33. Sabourin JC, Ackema KB, Ohayon D, Guichet PO, Perrin FE, Garces A, et al. A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord. *Stem Cells*. 2009; 27(11):2722–33. PMID: [19785035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19785035/). doi: [10.1002/stem.226](https://doi.org/10.1002/stem.226)
34. Deleyrolle L, Marchal-Victorien S, Dromard C, Fritz V, Saunier M, Sabourin JC, et al. Exogenous and fibroblast growth factor 2/epidermal growth factor-regulated endogenous cytokines regulate neural precursor cell growth and differentiation. *Stem Cells*. 2006; 24(3):748–62. doi: [10.1634/stemcells.2005-0138](https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0138) PMID: [16166253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16166253/).
35. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev*. 2012; 26(8):756–84. doi: [10.1101/gad.187922.112](https://doi.org/10.1101/gad.187922.112) PMID: [22508724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22508724/); PubMed Central PMCID: PMC3337451.

36. Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(13):5178–82. PMID: [2740350](#).
37. Bongcam-Rudloff E, Nister M, Betsholtz C, Wang JL, Stenman G, Huebner K, et al. Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer Res*. 1991; 51(5):1553–60. PMID: [1847665](#).
38. Sawaishi Y. Review of Alexander disease: beyond the classical concept of leukodystrophy. *Brain Dev*. 2009; 31(7):493–8. Epub 2009/04/24. doi: [10.1016/j.braindev.2009.03.006](#) PMID: [19386454](#).
39. van den Berge SA, Middeldorp J, Zhang CE, Curtis MA, Leonard BW, Mastroeni D, et al. Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP-delta. *Aging Cell*. 2010; 9(3):313–26. Epub 2010/02/04. doi: [10.1111/j.1474-9726.2010.00556.x](#) PMID: [20121722](#).
40. Roelofs RF, Fischer DF, Houtman SH, Sluijs JA, Van Haren W, Van Leeuwen FW, et al. Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton. *Glia*. 2005; 52(4):289–300. Epub 2005/07/08. doi: [10.1002/glia.20243](#) PMID: [16001427](#).
41. Palmer E, Freeman T. Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comp Funct Genomics*. 2004; 5(4):342–53. Epub 2008/07/17. doi: [10.1002/cfg.405](#) PMID: [18629169](#); PubMed Central PMCID: PMC2447460.
42. Cusulin C, Chesnelong C, Bose P, Bilenky M, Kopciuk K, Chan JA, et al. Precursor States of Brain Tumor Initiating Cell Lines Are Predictive of Survival in Xenografts and Associated with Glioblastoma Subtypes. *Stem cell reports*. 2015; 5(1):1–9. Epub 2015/06/23. doi: [10.1016/j.stemcr.2015.05.010](#) PMID: [26095605](#); PubMed Central PMCID: PMC4618251.
43. Minin AA, Moldaver MV. Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73(13):1453–66. Epub 2009/02/17. PMID: [19216711](#).
44. Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, et al. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol*. 1995; 131(6 Pt 2):1715–26. PMID: [8557739](#); PubMed Central PMCID: PMC2120691.
45. Gao YS, Alvarez C, Nelson DS, Sztul E. Molecular cloning, characterization, and dynamics of rat formiminotransferase cyclodeaminase, a Golgi-associated 58-kDa protein. *J Biol Chem*. 1998; 273(50):33825–34. PMID: [9837973](#).
46. Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10(9):623–35. doi: [10.1038/nrm2745](#) PMID: [19672277](#).
47. Wilhelmsson U, Faiz M, de Pablo Y, Sjoqvist M, Andersson D, Widestrand A, et al. Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway. *Stem Cells*. 2012; 30(10):2320–9. Epub 2012/08/14. doi: [10.1002/stem.1196](#) PMID: [22887872](#).

Supporting Information

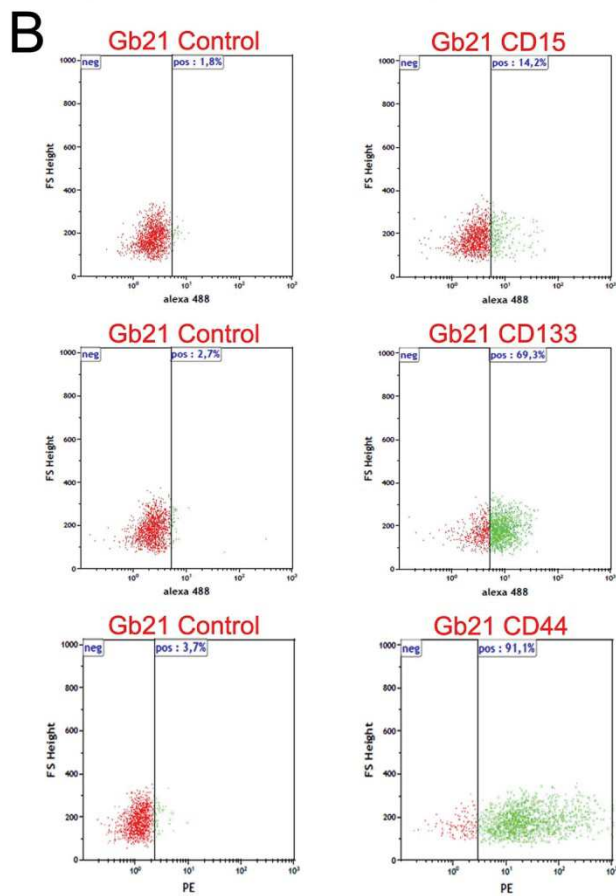
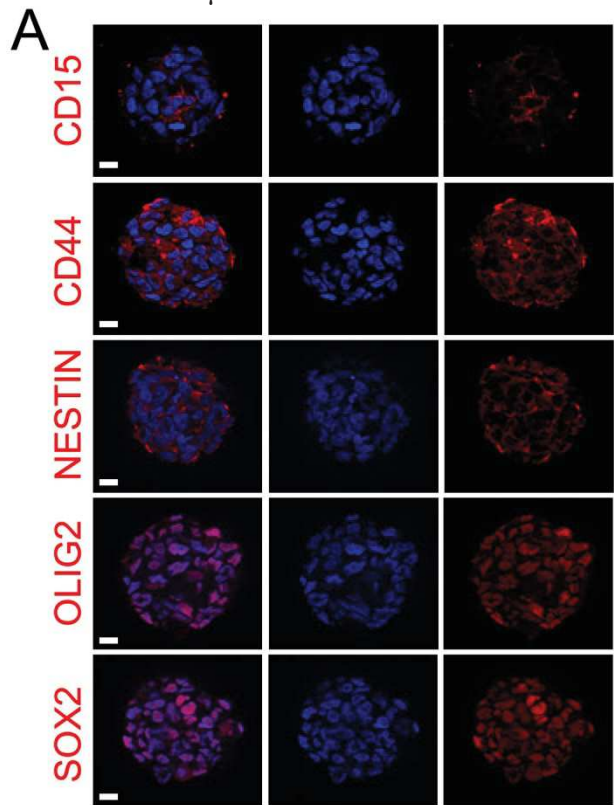
Supporting Information Table 1. Patient annotations

Tumor	Age (years)	Sex	Topography	% Ki67+ cells	WHO grade	Survival (months)
Gb 4	53	Male	Left temporal	70	IV	21
Gb 5	64	Male	Left temporal	30	IV	15
Gb 21	62	Female	Right Fronto-Insular	35	IV	Alive

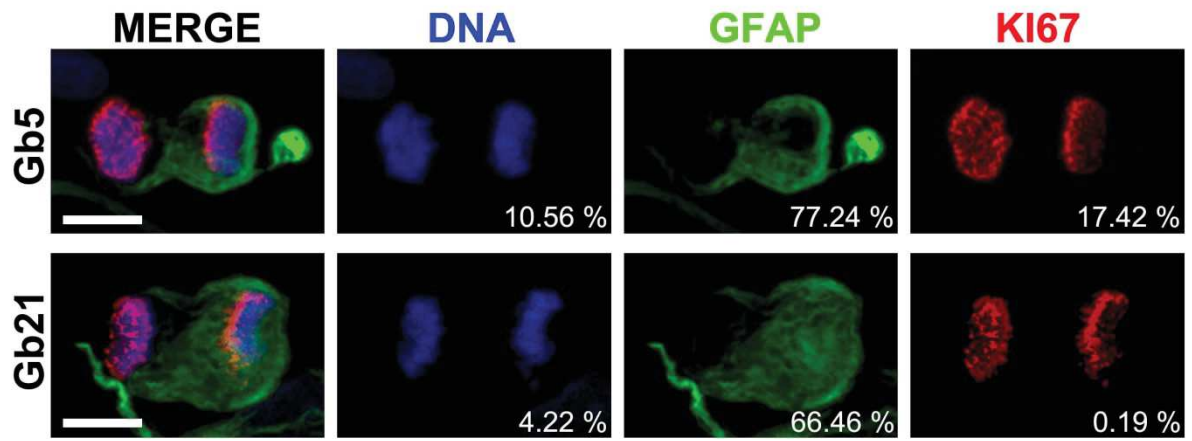
Supplemental Table 2. Antibody list.

Name	Species	References	Distributors	Dilution
CALPONIN	Rabbit	Ab46794	Abcam	1:250
CD15	Mouse	559045	BD Biosciences	1:200
CD44-PE	Rat	12-0441	Affymetrix ebiosciences	1:200
CD133	Mouse	130-090-422	Miltenyi Biotec	1:5
DCX	Rabbit	Ab18723	Abcam	1:5000
GalC	Mouse	MAB342	Millipore	1:200
GFAP	Rabbit	z0334	Dako	1:5000
GFAP	Mouse	G3893	Sigma	1:500
GFAP	Chicken	Ab4674	Abcam	1:2000
HuNu	Mouse	MAB1281	Millipore	1 :500
Ki67	Mouse	5560003	BD Pharmingen	1 :500
MAP2ab	Mouse	M4403	Sigma	1:500
OLIG2	Rabbit	18953	IBL	1:500
SOX2	Goat	Sc-17320	Santa cruz	1:200
TUBB3	Mouse	T8660	Sigma	1:500

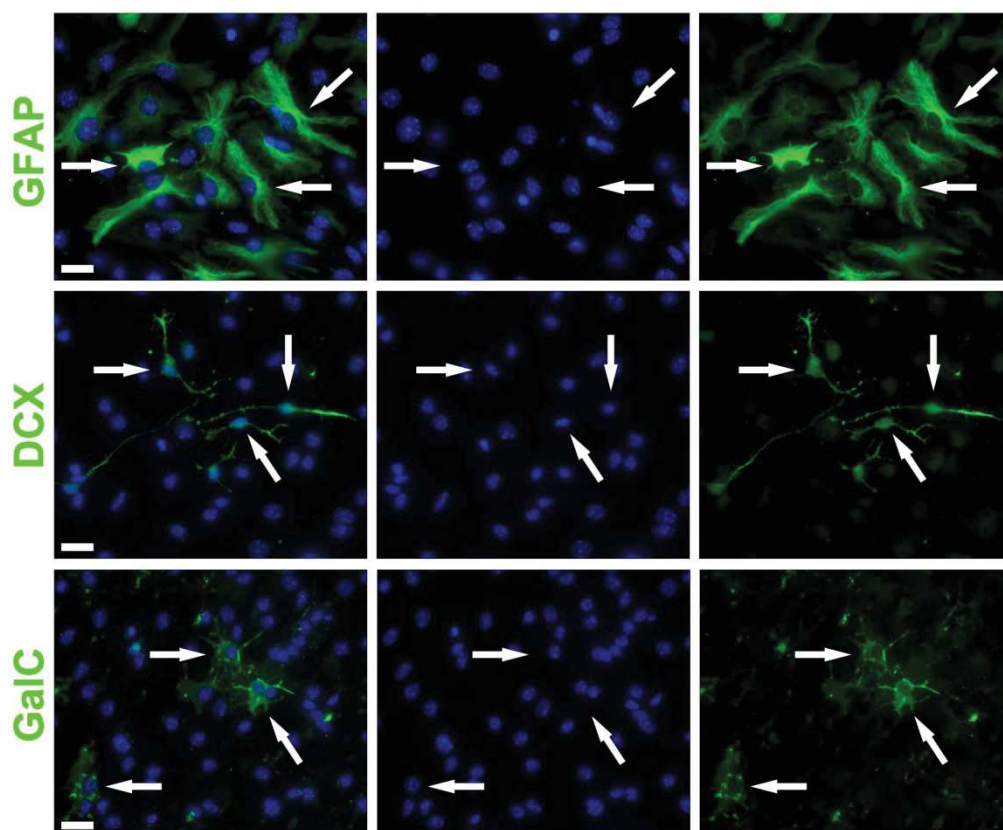
S1 File. Phenotypic characterization of Gb21 GBM cells by IF and FACS.
Scale bars = 10 μ m.



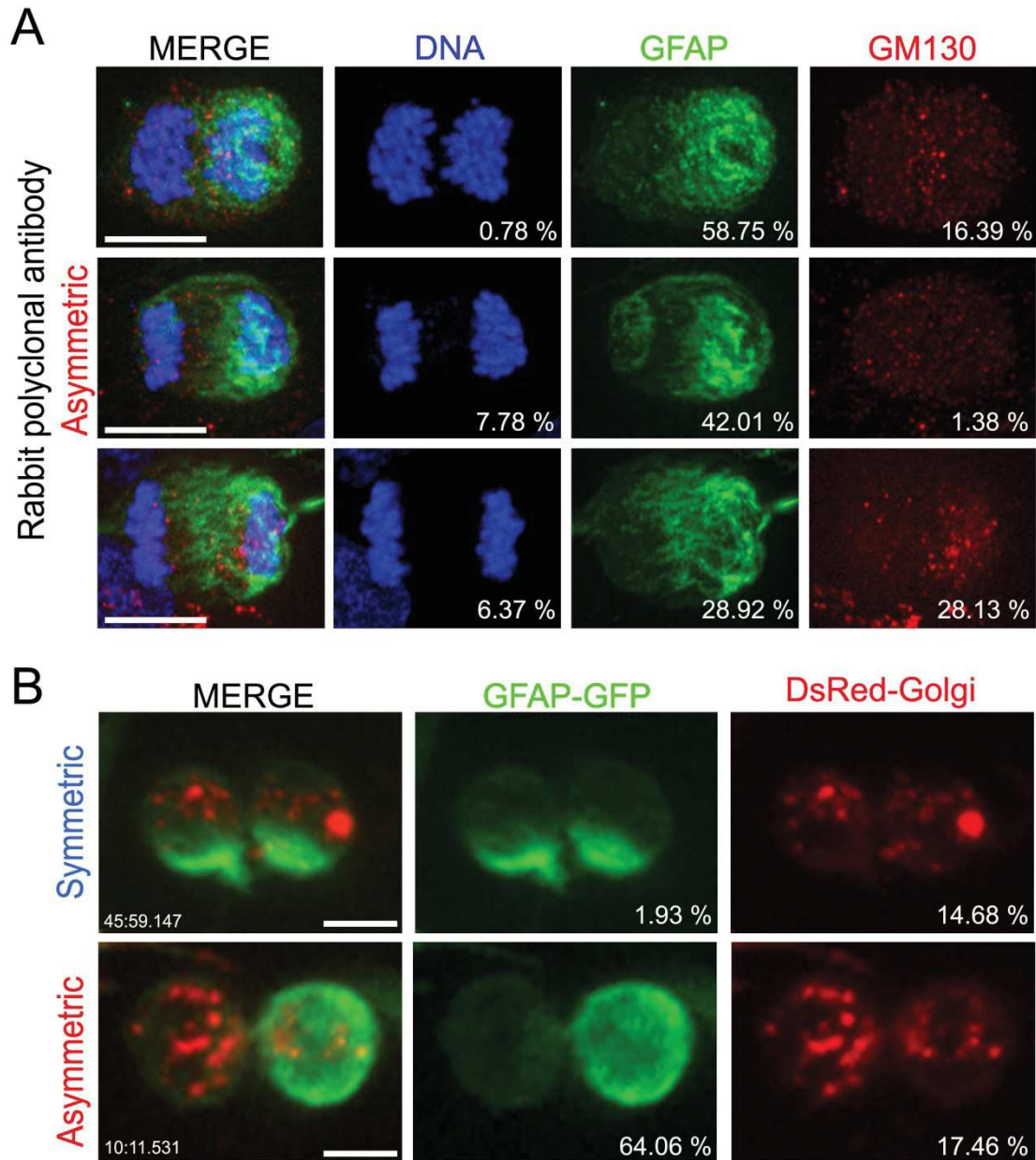
S2 File. Asymmetric distribution of GFAP in Gb5 and Gb21 cells. The Percent deviation in staining between the two cibling cells is displayed in the bottom right corner of images. Scale bars = 10 μ m.



S3 File. Differentiation of adult spinal cord neurospheres. Positive cells (arrows) for GFAP, Dcx and O4 markers are shown. Scale bars = 10 μ m.



S9 File. (A) Examples of GM130 stainings (red dots) in mitotic cells with asymmetric GFAP distribution. (B) Examples of symmetric and asymmetric distribution of GFAP-GFP and Golgi-DsRed protein. No association between Golgi apparatus and GFAP was observed. The Percent deviation in staining between the two sibling cells is displayed in the bottom right corner of images. Scale bars = 10 μ m.



Communication scientifique sur le projet

Communications orales

- Journée de l'école doctorale CBS2, Mai 2014, Montpellier, France: premier prix des présentations orales.
- Premier meeting du réseau Sud Cancer Stem Cells (SUNRISE) en Novembre 2015 à Marseille.

Communications affichées

- Congrès Autour de la Cellules Souche, Février 2013, Bordeaux, France.
- Ecole d'été sur les cellules souches HYDRA IX, Septembre 2013, Hydra, Grèce.
- 1^{er} symposium SIRIC OncoLille sur la dormance tumorale, Juin 2014, Lille, France.
- 12^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Mai 2015, Montpellier, France.
- Journée de l'école doctorale CBS2, Mai 2015, Montpellier, France: premier prix des posters.
- Congrès EuroGlia XIII, Juillet 2015, Bilbao, Espagne.
- 2^{ème} Symposium International du CRCL, Septembre 2015, Lyon, France.
- Conférence Stem Cell Niche in Development and Disease, Mai 2016, Copenhague, Danemark.

Mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité neurovasculaire des cellules souches de glioblastome

Les glioblastomes (GBM, grade IV selon l'OMS) sont les tumeurs cérébrales primaires les plus agressives et sont caractérisées par une néovascularisation importante associée à l'hypoxie et à la nécrose. L'origine cellulaire des GBM est controversée, mais des sous-populations de cellules multipotentes ont été identifiées au sein des tumeurs, et seraient responsables de la radio/chimiorésistance des GBM. Ces cellules souches de glioblastome (GSC) contrôlent activement la vascularisation tumorale par leur interaction étroite avec les cellules vasculaires composant les niches tumorales. La voie Notch est une signalisation canonique essentielle au développement et à l'homéostasie du système nerveux central et son réseau vasculaire associé. Dans le contexte des GBM, cette cascade serait nécessaire à la gliomagenèse, par le maintien du réservoir de GSC au sein de la niche périvasculaire. Cependant, le mode d'action moléculaire de Notch dans les GBM reste encore à démontrer, du fait de résultats divergents observés dans plusieurs études. Dans la première partie de mon travail de thèse, j'ai contribué à l'exploration de la signalisation Notch1 dans des cultures de GSC établies et caractérisées au sein du laboratoire. Le niveau basal d'activation de Notch1 étant faible dans nos GSC, l'approche a été d'activer constitutivement cet axe par transduction lentivirale. Suite à cette activation forcée, les GSC subissent un changement phénotypique majeur et se différencient en cellules périvasculaires ou cellules « péricyte-like ». Cette transition neurovasculaire des GSC promeut la vascularisation active des tumeurs par la normalisation du réseau vasculaire *in vivo*. Par la suite, j'ai posé la question des mécanismes moléculaires en aval de Notch1 ; par l'étude des facteurs de transcription TAL1 et SLUG, deux candidats potentiels au contrôle de cette plasticité neurovasculaire. Dans ce but, j'ai examiné leur contribution au phénotype vasculaire des GSC dans un modèle *in vitro* de la niche périvasculaire ; et *in vivo* par l'analyse d'échantillons humains de GBM. Enfin, j'ai également observé que l'activation de Notch1 module l'activité de la machinerie du protéasome, ce qui pourrait contribuer activement à la transition moléculaire observée dans les GSC. Ces travaux mettent en avant la plasticité phénotypique des GSC: une meilleure compréhension de ces processus pourrait mener à la conception de thérapies ciblant efficacement les GSC et leur vascularisation associée.

Mots Clé : Glioblastome, cellule souche de glioblastome, vascularisation, signalisation Notch, plasticité neurovasculaire, facteurs de transcription

Molecular mechanisms involved in glioblastoma stem cell neurovascular plasticity

Glioblastomas (GBM, WHO grade IV) are highly aggressive brain tumors in which extensive vascularization is associated with hypoxia and necrosis. GBM cell of origin is controversial; however multipotent stem-like subpopulations have been identified within tumors, and could account for GBM radio/chemoresistance. These glioblastoma stem-like cells (GSC) actively promote tumoral vascularization processes by closely interacting with vascular cells composing tumoral niches. The Notch cascade is a canonical signaling pathway required during developmental stages and adult homeostasis of the central nervous system and the associated vascular network. In the context of GBM, this molecular axis could induce gliomagenesis by promoting GSC maintenance in the perivascular niche. However, Notch-induced molecular mechanisms controlling GBM progression still remain elusive, due to divergent results observed in numerous reports. During the first part of my thesis work, I contributed to the assessment of Notch1 functions in GSC cultures isolated and characterized in our lab. Given a low Notch1 basal activation status in our GSCs, our approach was to constitutively activate this axis via lentiviral transduction. Following this forced activation, GSCs undergo drastic phenotypic changes and differentiate into perivascular-like or "pericyte-like" cells. This neurovascular transition of GSCs induces active tumoral vascularization by promoting normalization of the vascular network *in vivo*. Consequently, I questioned the molecular mechanisms downstream of Notch1 by focusing on TAL1 and SLUG transcription factors, two potential candidates controlling this neurovascular plasticity. For this purpose, I examined their contribution to the GSC vascular-like phenotype in an *in vitro* model of the perivascular niche; and *in vivo* by analyzing human GBM samples. Finally, I also observed that Notch1 activation modulates the activity of the proteasomal machinery, which could actively contribute to the molecular transition occurring in GSCs. This work highlights GSC phenotypic plasticity: a better understanding of these processes could lead to the design of therapies efficiently targeting GSCs and their associated vasculature.

Key words : Glioblastoma, glioblastoma stem cell, vascularization, Notch signaling, neurovascular plasticity, transcription factors
