

Plasticité des cellules tumorales de glioblastomes : inter-conversion d'un phénotype différencié et souche en fonction du microenvironnement

Fabien Almairac

► To cite this version:

Fabien Almairac. Plasticité des cellules tumorales de glioblastomes : inter-conversion d'un phénotype différencié et souche en fonction du microenvironnement. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2016. Français. NNT : 2016NICE4045 . tel-01832315

HAL Id: tel-01832315 https://theses.hal.science/tel-01832315

Submitted on 7 Jul 2018 $\,$

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.







UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour l'obtention du titre de

Docteur en Sciences

De l'Université de Nice-Sophia Antipolis Spécialité « Recherche Clinique et Thérapeutique »

Présentée et soutenue publiquement par

Fabien ALMAIRAC

Plasticité des cellules tumorales de glioblastomes : inter-conversion d'un phénotype différencié et souche en fonction du microenvironnement

Dirigée par le Dr. Thierry VIROLLE

Le 15 juillet 2016 dans la salle de conférences du Centre de Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Nice-Sophia Antipolis.

Devant le Jury composé de :

Pr. Philippe PAQUIS Pr. Hugues DUFFAU Pr. Luc TAILLANDIER Pr. Michel WAGER Pr. Denys FONTAINE Dr. Thierry VIROLLE Président du Jury Rapporteur Rapporteur Examinateur Directeur de Thèse

Résumé

Introduction : Les récidives systématiques des glioblastomes malgré les traitements oncologiques peuvent être expliquées par la survie des cellules souches tumorales ou cellules initiatrices de gliomes (CIG). Ces cellules ont pour propriétés l'auto-renouvellement et la pluripotence, et sont hautement tumorigéniques. Cependant, l'origine et les mécanismes biologiques des CIG sont sujets à débat. Récemment, nous avons identifié un cluster de micro-ARN surexprimé dans les cellules différenciées de glioblastomes, le cluster de miR-302-367. Une expression stable de ce micro-ARN dans les CIG (CIG-miR) force les cellules à perdre leurs caractères souches et tumorigéniques.

L'objectif de ce travail de thèse était de démontrer que les cellules de glioblastomes sont capables de se différencier (perte des caractères souches) et de se dédifférencier (ré-acquisition de ces caractères) en fonction de leur environnement, d'explorer les mécanismes biologiques qui sous-tendent ces transitions, et d'évaluer *in vivo* les capacités de différenciation à distance des CIG par les CIG-miR via la sécrétion de microvésicules.

Matériels et méthodes : A partir de plusieurs glioblastomes fraichement réséqués, nous avons dissocié les cellules tumorales. Le milieu de différenciation des cellules était du sérum de veau fœtal à 1%, et celui de culture souche du milieu défini enrichi en EGF (Epidermal Growth Factor). Les cellules ont été caractérisées par immunofluorescence et par cytométrie de flux pour les marqueurs souches et d'autorenouvellement (CD133, Sox2, Oct4, Nanog), et de différenciation (GFAP). Sur le plan fonctionnel, des tests de prolifération clonale, de xénotransplantations sur souris immunodéprimées et de sensibilité *in vitro* au témozolomide ont été effectués. Nous avons extraits et analysés les microvésicules des milieux de culture de 2 lignées de CIG-miR. Selon les principes de la thérapie cellulaire, des co-injections de CIG + CIG-miR ont été réalisées dans le cerveau des souris. La croissance tumorale était suivie en imagerie.

Résultats : La majorité des cellules de glioblastomes fraichement dissociées avaient un phénotype différencié. Sur le plan fonctionnel, elles n'étaient pas clonales, sensibles au témozolomide (20% de survie moyenne), et non tumorigéniques *in vivo*. Après 48 heures de culture en milieu EGF, elles acquéraient les propriétés souches phénotypiques et fonctionnelles. La xénotransplantation orthotopique d'un faible nombre de ces cellules dédifférenciées suffisait à initier le développement de tumeurs. Elles devenaient plus résistantes au témozolomide (60% de survie moyenne). Ce processus de dédifférenciation était réversible en 4 jours de culture en milieu sérum. Il était également inhibé par l'adjonction dans le milieu EGF d'un anti-EGFR (cétuximab), suggérant un rôle primordial de la voie EGF/EGFR/ERK. Il y avait une forte activation de cette voie lors du processus de dédifférenciation. Nous avons identifié une concentration importante du cluster de miR-302-367 dans les microvésicules sécrétées par les CIG-miR. Ces microvésicules étaient internalisées dans les CIG en co-culture, et induisaient une sortie de leur état souche. *In vivo*, cet effet paracrine se traduisait par une baisse significative de la tumorigénicité des CIG, et une augmentation de la survie des souris.

Conclusions et perspectives thérapeutiques : Le concept de plasticité cellulaire remet en cause les dogmes établis sur la hiérarchie tumorale unidirectionnelle. Il apporte un niveau de compréhension supplémentaire sur l'origine des CIG, l'hétérogénéité tumorale et les mécanismes de résistance des tumeurs face aux stress environnementaux qu'elle subit (hypoxie, génotoxicité). La déplétion tumorale en CIG en les forçant à se différencier est une stratégie thérapeutique innovante, qui peut s'envisager par une approche de thérapie cellulaire.

Mots-clés : Glioblastome, Cellules Souches Cancéreuses, Plasticité, micro-ARN, Exosomes.

Abstract

Introduction: Glioblastomas are the most devastating adult brain neoplasms. Recurrences are ineluctable, and presumed to be due to the glioma-initiating cells (GiCs). These cells are naturally resistant to chemo- and radiotherapy regimens, and are highly tumorigenic *in vivo*. GiCs exhibit stemcells properties such as self-renewal and pluripotency. However, little is known about the GiCs' origins and biological mechanisms. Recently, we have shown that the stable expression of the miR-302-367 cluster in GiCs (GiCs-miR) induces their loss of stem-like properties *in vitro* and decreases their tumorigenicity *in vivo*.

Our objectives were to demonstrate that glioblastoma cells are able to interconvert from a differentiated state to a stem-like state and conversely depending on their environment, to explore the underlying biological mechanisms, and to evaluate *in vivo* the differentiation abilities of GiCs-miR cells on GiCs through the secretion of exosomes.

Methods: Tumor cells were dissociated from freshly resected human glioblastomas. They were characterized for the stem-like markers (CD133, Sox2, Oct4, Nanog) as well as for the differentiation markers (GFAP) by immunostaining and flow cytometry methods. Functionally, cells were assessed for their clonal properties *in vitro*, temozolomide sensitivity *in vitro*, and tumorigenicity *in vivo* using orthotopical xenotransplantations on NOD/SCID mice. The GiC-miR medium exosomes were extracted and analyzed. We realized *in vivo* co-transplantations of GiCs and GiCs-miR in brain mice and followed the tumor growth by bioluminescence imaging.

Results: Spontaneously, most of the cells harbored differentiated properties. Functionally, these cells did not have clonogenic properties, were sensitive to temozolomide (mean surviving cells = 20%), and were not able to form a tumor in brain mice. After 48 hours of culture in an EGF enriched medium, the differentiated cells acquired stem-like properties. They expressed Sox2/Oct4/Nanog, displayed long term self-renewal in a clonogenic single-cell assay, and became more resistant to temozolomide (mean surviving cells = 60%). The xenotransplantation of few of these cells led to the development of large tumors after 3 months. Interestingly, this de-differentiated that the de-differentiation process was inhibited by the adjunction of an anti-EGFR antibody (cetuximab) in the EGF medium, suggesting a pivotal role of the EGF/EGFR/ERK pathway. This pathway was strongly activated during the dedifferentiation process.

A high level of the miR-302-367 cluster was measured into the exosomes extracted from the GiCs-miR culture medium. These exosomes were found to be internalized by the GiCs when co-cultivated with the GiCs-miR *in vitro*, leading to their differentiation. This paracrine effect was also observed *in vivo*. Co-injections of GiCs with GiCs-miR in brain mice led to a significant decrease of the tumor growth and a better survival compared to control groups.

Conclusion: The cellular plasticity concept contrasts with the unidirectional commitment originally described in the cancer stem cell model. It supplies a new comprehensive level on the CiGs' origins, on their resistance mechanisms to genotoxic stresses, and on the tumor heterogeneity. These results emphasize the importance of targeting specifically the stem-like properties of the tumor cells, not only the GiCs, to prevent further tumor enrichment in GiCs. We also provide a promising therapy using a cellular approach through the secretion of differentiating exosomes.

Key-words: Glioblastoma, Cancer Stem-Cell, Plasticity, micro-RNA, Exosomes.

A ma famille, pour son amour, son soutien Source indicible de bonheur, Muriel, Clémence, Gautier Papa, Maman, Morgane Papi Claude, Mamie Za

A tous les êtres chers qui m'habitent, Papi Jean-Pierre, Julie, Parrain, Mamie Jo

REMERCIEMENTS

Aux Membres du Jury

A Monsieur le Professeur Philippe Paquis,

vous me faites l'honneur de présider ce Jury de thèse et de juger ce travail. Je vous suis sincèrement reconnaissant pour votre confiance, votre soutien et votre encadrement au quotidien.

A Monsieur le Professeur Hugues Duffau,

vous me faites l'honneur de siéger dans ce Jury de thèse et de juger ce travail. J'ai eu la chance inestimable de croiser votre route et d'être emprunt de votre philosophie. Je m'efforce d'appliquer vos préceptes au quotidien.

A Monsieur le Professeur Luc Taillandier,

tu me fais l'honneur de siéger dans ce Jury de thèse et de juger ce travail. Ton expertise en Neuro-oncologie, ta pertinence et ton humanisme sont un exemple pour moi.

A Monsieur le Professeur Michel Wager,

vous me faites l'honneur de siéger dans ce Jury de thèse et de juger ce travail. Votre indépendance et votre sagacité sont un modèle pour moi.

A Monsieur le Professeur Denys Fontaine,

tu me fais l'honneur de siéger dans ce Jury de thèse et de juger ce travail. Tu es le responsable de ma vocation pour la Neurochirurgie. Notre relation est une source d'épanouissement personnel et professionnel pour moi.

A Monsieur le Docteur Thierry Virolle,

tu me fais l'honneur de diriger ce travail de thèse et de siéger dans ce Jury. Je te suis sincèrement reconnaissant pour l'accueil dans ton équipe et ton encadrement à mon égard. Je suis également admiratif de ta liberté d'esprit et de l'impulsion que tu donnes à chacun de tes projets.

Aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail

et tout particulièrement à Laurent Turchi « Lolo », Fanny Burel-Vandenbos, Mohamed Fareh « Momoup », David Debruyne « Davoup »

A mes amis et mes compagnons de tous les instants

Aux malades

TABLE DES MATIERES

r	Définition
T.	Enidémiologie
II. III	Histoire naturelle
V	Facteurs de risque
V	Diagnostic
••	1 Clinique
	2. Imagerie
	3. Anatomopathologie et biologie moléculaire
	a. Classification OMS 2007
	b. Nouvelle classification OMS 2016
	c. Méthylation du promoteur de MGMT
VI.	Traitements
	1. Chirurgie
	a. Principes
	b. Biopsie
	c. Résection chirurgicale
	i. Etendue de l'exérèse et survie
	ii. Aides techniques
	iii. Complications péri-opératoires
	d. Administration locale de traitements
	i. Chimiothérapie in situ
	ii. Convection-enhanced delivery
	2. Médicaux
	a. Traitements symptomatiques
	b. Radiothérapie
	c. Chimiothérapies anticancéreuses
	d. Thérapies ciblées
	e. Immunothérapie
	f. Brachythérapie
	g. Autres traitements
VII.	Particularités du sujet âgé (>70 ans)
VIII.	Soins de support
Х.	
Χ.	Récidive
	1. Généralités
	2. Diagnostics différentiels
VI	3. Prise en charge de la recidive
XI.	La reunion de concertation pluridisciplinaire (RCP), le dispositif d'annonce,
VII	et le parcours de soins en cancerologie (DAPS)
XII VII	. Consultation d'oncogenetique
ΛП	1. Conclusion
	1. Synunese
	2. Analyse recursive par repartmon (KPA) des gnoblastomes
	J. rarucularities des longs survivants

Glio et m	blastomes : Alterations cytogenetiques, oncogenese icroenvironnement	52
I.	Voies de progression des gliomes	52
II.	Altérations cytogénétiques dans les gliomes	56
III.	Dérégulation du cycle cellulaire	56
	1. Les points de contrôle du cycle cellulaire	57
	2. Altérations de la voie $p53/p21/MDM2/p14^{arf}$	58
	3. Altérations de la voie p16 ^{ink4a} /CDK4/RB1	60
IV.	Altérations des voies des récepteurs à activité tyrosine kinase	61
	1. Altérations des récepteurs tyrosine kinase	62
	2. Altérations de la voie RTK/PI3K/AKT/PTEN	64
	3. Altérations de la voie RAS/RAF/MAPK/NF1	65
V.	Mutations d' <i>IDH1</i> et d' <i>IDH2</i>	65
VI.	Maintenance des télomères	67
VII.	Synthèse des altérations cytogénétiques importantes des glioblastomes	69
VIII.	Les sous-types moléculaires des gliomes	69
	1. La classification de Verhaak	69
	2. Le sous-groupe des gliomes au phénotype « méthylateur »	71
IX.	Vascularisation des gliomes, invasion et microenvironnement tumoral	72
	1. Néovascularisation	72
	 Invasion et microenvironnement tumoral 	74
Glia	alastomes · Cellules Souches Cancéreuses	76
I	Introduction	76
п	Cellules souches neurales adultes et cellules progénitrices	70 77
11.	1 Définitions	יי רד
	Propriétés	יי רד
	2. Marqueurs des CSN et des progéniteurs	78
	A Régions cérébrales germinales et « flux migratoire rostral »	/0
	des CSN et progéniteurs	70
	5 Fonctions des CSN chez l'adulte	87
	6 CSN et gliomes	02
	a Théorie des CSN à l'origine des gliomes	03 83
	a. Theorie des CSIV à l'origine des gnomes	0.5
ш	Les cellules initiatrices de gliomes (CIG)	04 86
	1 Définitions	86
	1. Definitions 2. Propriétés	86
	2. Froprietes	00
	S. Les différents modeles de croissance tumorale	00
	4. Origine des CIO	00
	5. Marqueurs membraneires	07
	a. Marqueurs introcellulaires	02
	6 Microanvironnement péritumoral ou nichea périvesculaires	92 02
	7 Págulation des CIG	93
	Voice de signalisation	94
	a. voies de signansation	94
	0. Facteurs epigenetiques et micro-AKN (microKNA ou miK)	95
	Glioł et m I. II. III. VV. VI. VII. VII. VII. IX. Glioł I. II.	Glioblastomes : Altérations cytogénétiques, oncogenèse et microenvironnement I. Voies de progression des gliomes II. Altérations cytogénétiques dans les gliomes II. Dérégulation du cycle cellulaire 2. Altérations de la voie p53/p21/MDM2/p14 ^{uf} 3. Altérations de la voie p16 ^{iiikh} /CDK4/RB1 IV. Altérations des voies des récepteurs à activité tyrosine kinase 2. Altérations de la voie RAS/RAF/MAPK/NF1 3. Altérations de la voie RAS/RAF/MAPK/NF1 V. Mutations d'IDH1 et d'IDH2 VI. Maintenance des télomères VII. Synthèse des altérations cytogénétiques importantes des glioblastomes VIII. Synthèse des altérations cytogénétiques importantes des glioblastomes VIII. Le sous-types moléculaires des gliomes au phénotype « méthylateur » 1. La classification de Verhaak 2. Le sous-types moléculaires des gliomes 1. Névascularisation 2. Invasion et microenvironnement tumoral II. Névascularisation 2. Invasion et microenvironnement tumoral I. Introduction II. C

	b	. Rôles des micro-ARN des VE dans la modulation	
		du microenvironnement des glioblastomes	101
	c	. Les micro-ARN des VE comme biomarqueurs des glioblastomes_	101
	d	. Les micro-ARN des VE comme traitement des glioblastomes	102
ç). Hét	érogénéité des glioblastomes	103
	a	. Définitions	103
	b	. Hétérogénéité inter- et intratumorale	104
	c	. Causes de l'hétérogénéité des glioblastomes	105
1	10. Plas	sticité des CSC	109
	a	. Définitions et modèles d'étude	109
	b	. Plasticité des CSC de tumeurs non gliales	111
	c	. Plasticité des CIG	112
	d	. Implications thérapeutiques	113
Partie II : Of	oiectifs	de la thèse	117
Partie III : R	ésultat	s	121
Article nº1 "E	GF/EGF	R nathway is sufficient to induce aggressiveness and expression of	121
nlı	uripoten	icy markers of nationts-derived glioblastoma cells"	123
Article n°2 "C	ell-base	d therapy using miR-302-367 expressing cells represses	123
of the second se	lioblaste	a development"	137
Partie IV · D	iscussi	on et Perspectives	137 143
	l Cib	ler les propriétés souches des cellules de glighlastome	145 145
د م	1. Clu	théranice giblent les CIG	145 146
2	2. Les	Stratégies ciblent le microenvironnement tumorel	140 146
	a b	Stratégies ciblant les marqueurs de surface	140 147
	0	Stratégies ciblent les voies de signalisation	147 149
	d.	Stratégies de modulation de la plasticité des CIG	140 1/0
	u 2 Log	méthodos d'administration du alustar da mi P 202 267	149 151
-	J. Les	Chieter de miR 202 267 et thérenie génique	131 151
	a h	Choster de miR-302-367 et thérapie gellique	151
	D	Cluster de miR-302-367 et menoportiquies	132 154
,	1 C.	. Cluster de la production en de cinc du cluster de miD 202 267	134
2	+. Stin	nulation de la production endogene du cluster de miR-302-367	155
	par	les cellules tumorales	155
Partie V : Co	onclusio)n	159
Partie VI : A	nnexes		163
Article n°3 "T	umorige	inc potential of mir-18a* in glioma initiating cells requires	1.65
No	otch-1 si		165
Article n°4 "C	ells with	i intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio are	
sp	ecific fo	r infiltrative glioma: a useful marker in neuropathological practice"	167
Article n°5 "A	positive	e feed-forward loop associating EGR1 and PDGFA promotes	1.00
pro	oliferati	on and self-renewal in glioblastoma cells"	169
Article n ^o 6 "T	he miR-	302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration	
pro	operties	of glioma-initiating cells through cxcr4 repression and consequent	1 – 1
dis	sruption	of the Shh-Gli-Nanog network	171
Article n°7 "A	dock4/l	beta-catenin/micro-RNA-302-367 regulatory circuitry drives	170
gli	ioblasto	ma intratumor neterogeneity by promoting cell differentiation"	1/3
Partie VII : H	keferen	ices	175

LISTE DES ABREVIATIONS

18FDG	18-FluoroDesoxy Glucose
18F-DOPA	18-Fluoro DOPA
192-Ir	Iridium-192
5-ALA	5-AminoLevulinic Acid
ADC	Apparent Diffusion Coefficient
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANOCEF	Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ARNm	ARN messager
ATRX	Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked
BMP	Bone Morphogenic Protein
BTCG	Brain Tumor Cooperative Group
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CD	Cluster de Différenciation ou Cellule Dendritique
CDK	Cyclin Dependant-Kinase
CED	Convection-Enhanced Delivery
CGARN	Cancer Genome Atlas Research Network
CGH array	Comparative Genomic Hybridization
CIG	Cellule Initiatrice de Gliomes
CIMP	CpG Island Methylation Phenotype
CMV	Cytomégalovirus
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CSG	Cellule Souche de Gliome
CSM	Cellule Souche Mésenchymateuse
CSN	Cellule Souche Neurale
CTLA-4	Antigène-4 cytotoxique des lymphocytes T
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DAPS	Dispositif d'Annonce et Parcours de Soins en cancérologie
EANO	European Association of Neuro-Oncology
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF/R	Endothelial Growth Factor/Receptor
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FLAIR	Fluid Attenuation Inversion Recovery
GBM	Glioblastome Mutliforme
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein

GLI1	Glioma-associated oncogene homolog 1
GOS	Glasgow Outcome Score
GTR	Gross Total Resection
Gy	Gray
HDR-BT	High-Dose Rate BrachyTherapy
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HIF-1a	Hypoxia-inducible factor α
HRM	High Resolution Melting
HTIC	Hyper Tension Intra-Crânienne
I-125	Iode-125
IDH1/2	Isocitrate DeHydrogénase 1/2
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
KPS	Karnofsky Performans Score
LAG-3	Lymphocyte-Activation Gene 3
LCS	Liquide Cerebro-Spinal
LDR-BT	Low-Dose Rate BrachyTherapy
LOH	Loss of Heterozygotie
MDM2	Murine Double Minute 2
MGMT	O6-Methyl Guanine-DNA Methyl Transferase
miR	Micro-ARN
MMS	Mini Mental Status
MoCA	Montreal Cognitive Assessment
mRS	Modified Rankin Scale
NF-1	Neurofibromin-1
Ngn2	Neurogenin 2
NOD-SCID	Non Obese Diabetic – Severe Combined ImmunoDeficiency
NOS	Not Otherwise Specified
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPC	Oligodrenglial Progeny Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1/PD-L1	Programmed Cell Death-1/ Programmed Cell Death Ligand-1
PDGF/PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor/Receptor
PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinases
PS	Performans Status
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RANO	Response Assessment in Neuro-Oncology
RB1	Retinoblastoma-1
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RECIST	Responses Evaluation Criteria in Solid Tumor
RPA	Recursive Partition Analysis
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SED	Stimulation Electrique Directe

Zone Sous-Granulaire
Sonic Hedgehog
Small Hairpin ARN
Système Nerveux Central
Sex determining region Y-box 1
Sub-Total Resection
Zone Sous-Ventriculaire
Tumor Associated Macrophages
Tomographie par Emission de Positons
TElomerase Reverse Transcriptase
T-cell Immunoglobulin and Mucin domain containing protein-3
Tyrosine Kinase Inhibitor
Tumor Proteine p53
Tumor Treating Fields
Vésicules Extracellulaires
Vascular Endothelial Growth Factor/Receptor

LISTE DES TABLEAUX et FIGURES

- Tableau 1. Score fonctionnel de Karnofsky.
- Tableau 2. Classification simplifiée des gliomes selon l'OMS.
- Tableau 3. Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes et correspondance avec les grades de malignité.
- Tableau 4. Critères RANO clinico-radiologiques de réponse au traitement.
- Tableau 5. Analyse récursive par répartition de l'EORTC.
- Tableau 6. Synthèse des altérations cytogénétiques utilisées en pratique courante dans la prise en charge des glioblastomes.
- Tableau 7. Liste non exhaustive des micro-ARN (miRNA ou miR) dérégulés identifiés dans le glioblastome.
- Figure 1. IRM cérébrale multimodalités pour un glioblastome fronto-calleux gauche.
- Figure 2. Principales catégories histo-moléculaires des gliomes diffus de l'adulte.
- Figure 3. Rôle de MGMT dans les mécanismes de chimiorésistance.
- Figure 4. Glioblastome récidivant multi-opéré.
- Figure 5. Voies génétiques et moléculaires de progression des gliomes.
- Figure 6. Principales altérations moléculaires et présentations cliniques correspondantes.
- Figure 7. Voies de contrôle du cycle cellulaire impliquées dans l'oncogénèse des gliomes.
- Figure 8. Voies de signalisation des récepteurs tyrosine kinase.
- Figure 9. Régions cérébrales germinales.
- Figure 10. Neurogénèse dans la zone sous-ventriculaire (SVZ).
- Figure 11. Cellules d'origine des gliomes.
- Figure 12. Les différents modèles tumoraux.
- Figure 13. Origine des CIG à partir de la dédifférenciation d'astrocytes et de neurones.
- Figure 14. Les 3 types de CIG en fonction de l'expression de CD133.
- Figure 15. Niches périvasculaires d'un glioblastome.
- Figure 16. Résumé des différentes fonctions identifiées des micro-ARN contenus dans les vésicules extracellulaires (exosomes et microvésicules) dans le glioblastome.
- Figure 17. Reconstitution de la progression d'un glioblastome dans le temps et l'espace.
- Figure 18. Les différents modèles de croissance tumorale.
- Figure 19. Différents modèles d'organisation hiérarchique entre les cellules tumorigéniques et non tumorigéniques.
- Figure 20. Les modèles d'évolution clonale et de mutations stochastiques ne sont pas exclusifs l'un de l'autre.
- Figure 21. Test de lignage cellulaire in vivo.
- Figure 22. Approches thérapeutiques dans le modèle classique des CSC et dans le modèle plasticité des CSC.
- Figure 23. Implication des CSC dans la récidive tumorale et perspectives de traitement ciblant les CSC.
- Figure 24. Effets de l'expression du facteur de transcription Ngn2 dans les CIG.

Plasticité des cellules tumorales de glioblastomes : interconversion d'un phénotype différencié et souche en fonction du microenvironnement

PARTIE I : INTRODUCTION

A. GLIOBLASTOMES : GENERALITES

I. DEFINITION

Les glioblastomes sont les tumeurs primitives malignes du système nerveux central (SNC) les plus fréquentes et les plus agressives. Elles font parties des gliomes, tumeurs développées au dépend du tissu de soutien neuroépithélial (glie). Pour la plupart, les gliomes sont des tumeurs qui infiltrent le parenchyme sain de proche en proche, sans délimitation nette. Les gliomes sont classés en fonction du type cytologique majoritaire (astrocyte ou oligodendrocyte), de critères histologiques de malignité (densité cellulaire, atypies nucléaires, mitoses, prolifération vasculaire, nécrose), et d'altérations moléculaires (mutation *IDH*, codélétion 1p19q). Quatre grades de malignité sont décrits, depuis le gliome « bénin » de grade I (astrocytome pilocytique) jusqu'aux gliomes les plus agressifs de grade IV (glioblastomes). Initialement qualifiées de multiforme, les glioblastomes (GBM) constituent un groupe de tumeurs hétérogènes en raison de leur importante variabilité morphologique, cytologique et moléculaire.

De par leur fréquence et leur gravité, les glioblastomes constituent un enjeu thérapeutique majeur pour le neurochirurgien, le neuro-oncologue, et le radiothérapeute. Du fait de l'absence de thérapeutique efficace, les glioblastomes représentent également un challenge dans le domaine de la recherche fondamentale.

II. EPIDEMIOLOGIE

L'incidence globale des tumeurs primitives du SNC varie d'une étude à l'autre, en fonction des classifications histologiques utilisées et des modalités pratiques du recensement

des cas. Une harmonisation récente des registres européens (Wohrer et al., 2009; Zouaoui et al., 2012) et américains (Ostrom et al., 2013) a permis d'évaluer l'incidence dans les pays occidentaux à environ 18/100 000 hab/an. La proportion de gliomes est de 42,4% des tumeurs primitives du SNC pour le registre français (Zouaoui et al., 2012) dont environ la moitié de glioblastomes, ce qui représente une incidence d'environ 4 glioblastome pour 100 000 hab/an en France. Ces données sont comparables à celles obtenues aux USA par le CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States).

Il est important de souligner que l'incidence des glioblastomes a augmenté d'environ 1%/an (0,5 à 2,88%) entre les années 1970 et 1990, dans la plupart des pays occidentaux (Deltour et al., 2009; Johannesen et al., 2004; McKinley et al., 2000). Cette augmentation peut s'expliquer par (i) le vieillissement de la population avec un accroissement du nombre de cas, plus particulièrement, au-delà de 70 ans ; (ii) l'amélioration de l'accès à l'imagerie avec l'avènement du scanner puis de l'IRM ; (iii) l'adaptation de la neurochirurgie au vieillissement de la population ; (iv) les modifications des classifications histologiques.

L'âge moyen au moment du diagnostic histologique d'un glioblastome est de 61,9 ans, avec une médiane de 63 ans (Zouaoui et al., 2012). Les glioblastomes prédominent chez l'homme dans un rapport de 1,5 à 1,8/1 selon les études (Baldi et al., 2010).

III. HISTOIRE NATURELLE

L'évolution des glioblastomes est péjorative et la récidive tumorale est la règle. En l'absence de traitement, la médiane de survie des patients n'excède pas quelques mois (Ampil et al., 1998). Avec un traitement dit « maximaliste » (exérèse, chimiothérapie et radiothérapie), la médiane de survie des patients est de 14,6 mois (Stupp et al., 2005). La récidive survient en moyenne 7 mois après la chirurgie. Deux notions peuvent expliquer - au moins en partie - le caractère inéluctable de la récidive tumorale (i) la présence de cellules

tumorales à distance du foyer tumoral. Plusieurs études histologiques réalisées à partir de prélèvements biopsiques étagés ou en post-mortem ont démontré que des cellules tumorales étaient présentes au moins jusqu'à 2 cm en périphérie des anomalies IRM, voire plus à distance le long des faisceaux d'association de substance blanche (Hochberg and Pruitt, 1980; Kelly et al., 1987; Matsukado et al., 1961); (ii) la théorie des cellules initiatrices de gliomes (CIG) (ou cellules souches cancéreuses (CSC) de glioblastome). Ce sont des cellules dotées d'un potentiel proliférateur infini (auto-renouvèlement), de pluripotence, et de mécanismes moléculaires leurs permettant de résister aux agents thérapeutiques génotoxiques. Une faible quantité de ces cellules est capable de former une tumeur, contrairement à un grand nombre de cellules tumorales différenciées (Singh et al., 2004). Bien qu'en faible proportion au sein d'une tumeur, les CIG seraient responsables de l'initiation de la tumeur et de la récidive après traitement (voir chapitre *Cellules initiatrices de gliomes*).

IV. FACTEURS DE RISQUE

Les facteurs de risque sont divisés en facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Les facteurs **intrinsèques** qui augmenteraient le risque de survenue d'un glioblastome sont : l'origine ethnique (caucasiens>africains) (Brown et al., 2009), le sexe (homme>femme), certaines maladies génétiques (neurofibromatose de type 1, syndrome de Li-Fraumeni, la sclérose tubéreuse de Bourneville, et le syndrome de Turcot), des antécédents familiaux de gliome (Almairac et al., 2010). D'autres facteurs tels qu'un terrain atopique ou une maladie auto-immune, seraient protecteurs (Linos et al., 2007).

Les facteurs **extrinsèques** qui augmentent le risque de survenue d'un glioblastome sont la radiothérapie cérébrale et peut être une exposition intense et prolongée aux pesticides (agriculteurs) (Ruder et al., 2009). A l'inverse, la consommation d'antioxydants, certaines infections virales (varicelle-zona virus, herpès virus, etc.), la prise régulière d'anti-

inflammatoires ou le traitement hormonal substitutif, réduiraient ce risque. L'exposition aux champs électromagnétiques est encore débattue, une publication récente (étude cas-témoins, niveau de preuve grade C) retrouvait une association significative entre l'utilisation intensive du téléphone portable et la survenue d'un gliome (Coureau et al., 2014).

V. DIAGNOSTIC

1. Clinique

Il existe une grande diversité de symptômes neurologiques, en fonction des zones cérébrales concernées par la tumeur et de son volume. Toutefois il est possible de distinguer 3 grands cadres syndromiques :

- déficit neurologique moteur, sensitif, visuel, trouble des fonctions supérieures, cognitives, langagières.

 syndrome d'hypertension intracrânienne (HTIC) : lié à la croissance tumorale, et/ou à une réaction œdémateuse péritumorale importante, ou à un blocage des voies d'écoulement du LCS (liquide cérébro-spinal) entrainant une hydrocéphalie obstructive.

- épilepsie: partielle, secondairement généralisée (valeur « localisatrice » du signal symptôme), ou généralisée d'emblée, elle concerne 20 à 25% des patients avec glioblastome.

Pour être complet, l'examen clinique doit s'attarder à rechercher les éléments suivants : latéralité, niveau d'étude, profession, état neurologique général avec cotation du Performans Status (PS) de l'OMS et/ou de l'indice de Karnofsky (KPS) (**Tableau 1**), poids, taille. Les troubles cognitifs peuvent être quantifiés grossièrement par le test Mini Mental Status (MMS) ou, plus récemment, par le Montreal Cognitive Assessment (MoCA). Il est recommandé d'obtenir une évaluation neuropsychologique et langagière avant tout traitement afin de guider la rééducation et d'évaluer l'impact de chaque thérapeutique (Johnson et al., 2012). Les facteurs cliniques de bon pronostic sont : l'âge (<60 ans), un KPS > 70, l'absence de déficit neurologique et cognitif (MMS ≥ 27), la localisation frontale du glioblastome (Fontaine and Paquis, 2010). Les 2 facteurs cliniques les plus reconnus sont l'âge et l'état général à la présentation. Le KPS est l'échelle la plus généralisée. Elle semble équivalente ou supérieure à d'autres échelles d'évaluation comme l'échelle de Rankin Modifiée (mRS), le Glasgow Outcome Score (GOS), le Medical Research Council Index, ou le Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), pour prédire le devenir des patients suivis pour un glioblastome (Stark et al., 2010). Cependant, les troubles neurologiques présentés par les patients à la présentation et qui peuvent être imputés à la présence de la tumeur (effet de masse, œdème, crises d'épilepsie), sont susceptibles d'être améliorés par le traitement et en particulier par la chirurgie. Une amélioration du KPS en postopératoire semble être un facteur indépendant d'amélioration de la survie globale, et le KPS postopératoire semble avoir une valeur prédictive supérieure au KPS préopératoire (Chambless et al., 2015).

indice	description
100	Normal ; aucune plainte, aucun signe de maladie.
90	En mesure de poursuivre une activité normale ; signes ou symptômes mineurs de maladie.
80	Activité normale, avec un effort ; quelques signes ou symptômes de maladie.
70	Autonome ; incapable de poursuivre une activité normale ou de travailler de façon active.
60	Nécessité occasionnelle d'assistance mais capacité de pourvoir à ses besoins essentiels.
50	Nécessité d'aide considérable à la personne, soins médicaux fréquents.
40	Invalide ; nécessité de soins et d'assistance spécifiques.
30	Complètement invalide ; indication d'hospitalisation, pas de risque imminent de décès.
20	Très malade ; hospitalisation nécessaire, traitement actif ou de support nécessaire.
10	Moribond ; issue fatale proche.
0	Décédé.

Tableau 1. Score fonctionnel de Karnofsky

2. Imagerie

En cas de suspicion de glioblastome, un scanner sans et avec injection de produit de contraste et surtout une IRM cérébrale « multimodalités » en séquences T1, T1 injectée, T2, FLAIR, diffusion, perfusion et spectroscopie doit être réalisée (**figure 1**). Ces examens vont permettre de :

- localiser la tumeur et préciser ses rapports avec les structures anatomiques ;

- évaluer son étendue : unique, multifocal (au moins 2 foyers prenant le contraste indépendants, séparés d'au moins 1 cm), diffus avec envahissement d'au moins 3 lobes cérébraux contigus (gliomatose) ;

- préciser ses caractéristiques. Classiquement, un glioblastome possède les caractéristiques suivantes : hypo-iso signal T1, hypersignal T2/FLAIR, prise de contraste périphérique et hétérogène, nécrose centrale, éventuelles portions kystiques, œdème périlésionnel. Les séquences de diffusion apportent un argument supplémentaire à l'encontre d'un abcès, avec une diminution de l'ADC (coefficient apparent de diffusion) car la nécrose centrale est pauci-cellulaire. La perfusion objective des foyers de néo-angiogénèse, le seuil du rCBV (volume sanguin cérébral relatif) retenu est > 2. La spectroscopie ciblée sur la prise de contraste objective un pic de choline (renouvellement membranaire), un pic de lactates et de lipides (nécrose) et une diminution du N-Acétyl Aspartate (témoin de l'intégrité neuronale) par rapport au pic de créatine (pic de référence stable);

- apporter des arguments pour le diagnostic différentiel de toute lésion qui se rehausse après injection de produit de contraste : métastase, abcès, lymphome cérébral, radionécrose, lésion inflammatoire du SNC, foyers de contusion, ischémie ;

- faire le bilan d'éventuelles complications : hémorragie intratumorale, engagement cérébral, hydrocéphalie, méningite tumorale.

8



Figure 1. IRM cérébrale multimodalités pour un glioblastome fronto-calleux gauche.
A. Séquence T1 sans injection de produit de contraste (PDC). Lésion frontale gauche en hyposignal, hétérogène, avec effet de masse. B. Séquence T1 avec injection de PDC. Rehaussement périphérique hétérogène avec nécrose centrale. C. Séquence FLAIR. Lésion globalement en hypersignal hétérogène, hypersignal intraparenchymateux périlésionnel lié à l'œdème. D. Séquence T2. Lésion hétérogène avec une périphérie en isosignal et un centre en hypersignal évocateur de nécrose kystique. Œdème périlésionnel en hypersignal. E. Séquence de diffusion. Augmentation du coefficient apparent de diffusion au centre de la tumeur en faveur d'une nécrose kystique pauci-cellulaire. F. Cartographie de perfusion. Augmentation périphérique du volume sanguin cérébral relatif (>2,9) correspondant à la zone tumorale rehaussée par l'injection de produit de contraste, et donc à la néo-angiogénèse. G.
Spectroscopie réalisée dans la zone périphérique de la tumeur. Augmentation de la choline (Cho), abaissement du N-Acétyl Aspartate (NAA), et augmentation des lipides (Lip).

La tomographie par émission de positons (TEP) avec des traceurs radioactifs (18Ffluorodeoxyglucose, 18F-fluoro-dopa, 18F-fluoroethylthyrosine, ou 11C-methionine) est surtout intéressante et encore en cours d'évaluation dans les situations de récidive tumorale, afin de la différencier d'une radionécrose. Ces techniques ne sont actuellement pas utilisées en routine (Ricard et al., 2012).

3. Anatomopathologie et biologie moléculaire

La neuro-imagerie ne permettant pas d'être assez spécifique sur le diagnostic de glioblastome, il est nécessaire de réaliser une analyse histologique de la tumeur (Young, 2007). Celle-ci peut être faite à partir d'un échantillon tumoral (biopsie) ou sur la pièce opératoire issue de l'exérèse tumorale.

a. Classification OMS 2007

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dont la dernière version a été éditée en 2007 (Louis et al. 2007), est basée sur des critères purement histologiques et en particulier, sur le **type cytologique prédominant**. Cela signifie que la tumeur est classée en fonction de la ressemblance des cellules tumorales avec un type de cellule gliale normale, c'est-à-dire, l'astrocyte ou l'oligodendrocyte. Ainsi, l'OMS définit des astrocytomes, des oligodendrogliomes et des oligo-astrocytome en cas d'association des deux types cellulaires (**Tableau 2**).

Classification OMS simplifiée des gliomes			
Astrocytomes			
Astrocytome pilocytique	grade I		
Astrocytome pilomyxoïde	grade II		
Xanthoastrocytome pléomorphe	grade II		
Astrocytome diffus	grade II		
Fibrillaire			
Gémistocytique			
Protoplasmique			
Astrocytome anaplasique	grade III		
Glioblastome	grade IV		
Oligodendrogliomes			
Oligodendrogliome	grade II		
Oligodendrogliome anaplasique	grade III		
Oligoastrocytomes			
Oligoastrocytome	grade II		
Oligoastrocytome anaplasique	grade III		

Tableau 2. Classification simplifiée des gliomes selon l'OMS. Dans le groupe des astrocytomes, seuls les astrocytomes diffus, les astrocytomes anaplasiques et les glioblastomes sont des gliomes infiltrants. Les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes sont tous des gliomes infiltrants.

Une fois le type histologique défini, **le grade de malignité** est établi à partir de 5 critères : la densité cellulaire, les atypies nucléaires, l'activité mitotique, la prolifération endothéliocapillaire et la nécrose. De manière générale, les gliomes infitrants de bas grade présentent une densité cellulaire faible à modérée et des atypies nucléaires occasionnelles. Les mitoses sont généralement absentes bien que la présence d'une seule mitose soit tolérée. En revanche, la présence d'une prolifération endothéliocapillaire et/ou de nécrose excluent le diagnostic de gliome infiltrant de bas grade et font porter un diagnostic de gliome de haut grade.

Le glioblastome est la tumeur astrocytaire la plus maligne. A l'examen microscopique, le glioblastome correspond à une prolifération constituée d'astrocytes néoplasiques peu différenciés, aux atypies cytonucléaires marquées et à l'activité mitotique élevée. La différenciation astrocytaire se traduit par des cellules au cytoplasme éosinophile abondant, rappelant les astrocytes. La morphologie cellulaire peut alors être de type gémistocytique, fusiforme ou stellaire. Une prolifération endothéliocapillaire et/ou des territoires de nécrose sont nécessaires au diagnostic de glioblastome. La prolifération endothéliocapillaire se présente comme des massifs creusés de lumières vasculaires d'allure glomérulaire, bordées de plusieurs couches de cellules endothéliales turgescentes mitotiquement actives. Les foyers de nécrose sont de deux types : vastes plages de nécrose ischémique ou foyers de nécrose de petite taille, en bande ou serpigineux, et entourés d'une couronne dense de petites cellules gliomateuses, d'aspect pseudo-palissadique, caractéristique des glioblastomes. D'une tumeur à l'autre ou au sein d'une même tumeur, les glioblastomes montrent classiquement une morphologie très hétérogène, avec une alternance de territoires astrocytaires bien différenciés, et de territoires composés de petites cellules rondes ou de cellules géantes multinucléées, de cellules spumeuses ou lipidisées dont la nature astrocytaire peut être plus difficile à affirmer.

Certains glioblastome peuvent présenter des **aspects histologiques inhabituels**. Parmi les présentations histologiques inhabituelles, la version OMS 2007 distingue les glioblastomes à petites cellules, les glioblastomes à cellules lipidisées et les glioblastomes avec contingent oligodendroglial. Ces aspects ne sont pas corrélés avec une modification de comportement biologique, ni de présentation clinique, mais sont à connaître car ils peuvent être source d'erreur diagnostique.

La classification de l'OMS définit deux variantes de glioblastome : le glioblastome à cellules géantes et le gliosarcome, qui outre des aspects histologiques particuliers, présentent des différences de présentation et de pronostic avec le glioblastome classique.

- *le glioblastome à cellules géantes* : est une tumeur de localisation corticale, survenant chez des sujets plus jeunes que le glioblastome classique. Il se caractérise histologiquement par une prédominance de grandes cellules pléomorphes, souvent multinuclées, aux noyaux atypiques et par une trame réticulinique souvent infiltrée de lymphocytes. La trame réticulinique est le témoin d'une infiltration méningée. Ses aspects histologiques et la présentation clinicoradiologique peuvent faire discuter un diagnostic de tumeur bénigne, le xantho-astrocytome pléomorphe. Le glioblastome à cellules géantes se distingue par un meilleur pronostic que le glioblastome classique, probablement lié à une meilleure résecabilité (localisation superficielle et infiltration moindre).

- *le gliosarcome* : correspond à un gliome biphasique, associant des territoires à différenciation astrocytaire, faits de cellules globuleuses éosinophiles et des territoires mésenchymateux constitués de cellules fusiformes. C'est surtout dans cette variante qu'on observe de possibles contingents hétérologues (épithéliaux ou sarcomateux) témoignant d'une différenciation aberrante. Cette forme serait de meilleur pronostic que le glioblastome classique mais cette donnée n'est pas retrouvée dans de larges études, ce qui remet en cause la distinction du gliosarcome en tant que variante.

Selon la classification OMS 2007, seules les tumeurs astrocytaires et les tumeurs mixtes oligo-astrocytaires peuvent générer des glioblastomes. Depuis la révision de la classification OMS en 2007, la présence de remaniements nécrotiques dans un oligo-astrocytome de grade III doit faire reclasser la lésion en glioblastome avec contingent oligodendroglial (Louis et al., 2007) car leur pronostic se rapprocherait plus de celui d'un glioblastome que d'un gliome anaplasique.

Les aspects histologiques ne permettent pas de différencier les glioblastomes primaires des glioblastomes secondaires.
Toutefois, cette classification histologique a des limites. Les critères étant subjectifs, elle manque de reproductibilité, avec un taux de discordance intra- et inter-observateur pouvant être important (Cairncross et al., 2006; Prayson et al., 2000). Egalement, elle manque de précision pronostique en raison de l'existence de plusieurs sous-types moléculaires au sein d'un même sous-type histologique. C'est la raison pour laquelle les biomarqueurs prennent une place grandissante dans le diagnostic des glioblastomes, en complément de l'analyse histologique, puisqu'ils semblent avoir une valeur pronostique et prédictive supérieure à la classification morphologique seule (pour revue (Wick et al., 2014)).

b. Nouvelle classification OMS 2016

La mise à jour de la 4^{ème} édition de la classification OMS des tumeurs du système nerveux central vient de paraître (Louis et al., 2016). Certaines altérations moléculaires seront désormais indispensables pour rendre le diagnostic dit « intégré » proposé par cette classification, en particulier pour les gliomes (**Tableau 3** et **figure 2**) et les tumeurs embryonnaires.

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	11
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV
Glioblastoma, IDH-mutant	IV
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and	П
1p/19q-codeleted	111
Other astrocytic tumours	
Pilocytic astrocytoma	1
Subependymal giant cell astrocytoma	1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	11
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III

Tableau 3. Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes et correspondance avec les gradesde malignité (Louis et al., 2016).

Les changements majeurs apportés par cette nouvelle classification sont les suivants :

- contrairement à la classification de l'OMS 2007 qui classait les gliomes selon le type cellulaire prédominant (astrocytaire, oligodendroglial et mixte), la classification révisée oppose distinctement les gliomes diffus des autres. Ainsi, trois grandes catégories sont proposées : les gliomes infiltrants diffus de type astrocytaire ou oligodendroglial, les autres gliomes astrocytaires (astrocytome pilocytique, astrocytome à cellules géantes sous épendymaire et les xanthoastrocytomes pléïomorphes) et les autres gliomes (gliome chordoïde du troisième ventricule, gliome angiocentrique et astroblastome).

- les gliomes infiltrants de l'adulte sont classés selon deux altérations moléculaires princeps: les mutations d'*IDH1/2* (isocitrate dehydrogenase) et la codélétion 1p19q.

- la notion de NOS « *Not Otherwise Specified* » est introduite. Elle indique au sens large que les informations sont insuffisantes pour permettre un diagnostic plus précis : soit que les tests génétiques n'ont pas été faits ou qu'ils ont été faits de façon incomplète (exemple: une absence d'expression avec l'anticorps anti-IDH1R132H en immunohistochimie sans recherche de mutation ponctuelle dans les gènes *IDH1/2* ne permet pas de préciser le statut IDH), ou encore que les résultats ne montrent pas les altérations génétiques attendues.

- le groupe des gliomes mixtes (oligoastrocytome et glioblastome à composante oligodendrogliale) disparaît pratiquement et il est fortement recommandé de ne plus faire ce diagnostic. Si cette terminologie est utilisée, ce sera uniquement avec NOS. En effet, des travaux récents (Sahm et al., 2014) ont montré que les gliomes mixtes présentaient soit un profil de type astrocytaire (*IDH* muté et 1p19q non codélété) ou de type oligodendroglial (*IDH* muté et 1p19p codélété). Si le profil moléculaire est discordant ou si ces altérations n'ont pas été recherchées, il s'agira d'un gliome mixte NOS.

- dans le cas des astrocytomes diffus *IDH* muté et 1p19q non codélété, un nombre de mitoses total sur l'ensemble de la pièce opératoire (biopsie ou pièce d'exérèse) < 2 le classe

en grade II, et en grade III anaplasique si le nombre de mitoses ≥ 2 . La présence d'une prolifération endothélio-capillaire suffit désormais à le classer en glioblastome *IDH* muté (et plus seulement la présence de nécrose).

dans le cas des oligodendrogliomes *IDH* muté et 1p19q codélété, la présence de nécrose ou un nombre de mitose > 6 pour 10 champs à fort grossissement le classe en grade III anaplasique.

- une nouvelle entité est reconnue : le gliome diffus de la ligne médiane muté H3K27M et un nouveau variant pour les glioblastomes *IDH* non-muté : le glioblastome épithélioïde (pour rappel les deux autres variants sont les glioblastomes à cellules géantes et le gliosarcome)

- la gliomatose cérébri est supprimée car il s'agit d'une présentation clinicoradiologique particulière mais non associée avec un type histo-moléculaire précis.

- il est introduit la notion de glioblastome moléculaire définit ainsi : tout gliome IDH non muté qui présente un gain du 7 et une perte du 10.



Figure 2. Principales catégories histo-moléculaires des gliomes diffus de l'adulte.

Cette nouvelle classification a des conséquences immédiates pour le diagnostic des gliomes diffus de l'adulte:

- elle impose de réaliser en routine les marquages immunohistochimiques de la mutation R132H de *IDH1*, de la mutation de *ATRX* (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked), en plus des marquages habituels (GFAP, Olig2). Une collaboration avec les plateformes de biologie moléculaire est nécessaire pour rechercher les délétions de 1p19q (CGH array, FISH), et éventuellement les mutations minoritaires d'*IDH1/2*, les mutations du promoteur de *TERT* (telomerase reverse transcriptase), le gain du 7p et la perte du 10q (CGH array, FISH).

- elle peut surestimer le grade de malignité des tumeurs astrocytaires (ou sous-estimer celui des tumeurs oligodendrogliales). A titre d'exemple, un gliome qui aurait été classé morphologiquement en gliome mixte de grade III sera classé en astrocytome anaplasique *IDH* muté (de grade III) s'il n'y a pas de prolifération endothélio-capillaire mais en glioblastome *IDH* muté si elle est présente. Un autre gliome mixte présentant quatre mitoses pour 10 champs mais pas de prolifération endothélio-capillaire et qui est *IDH* muté sera classé en astrocytome anaplasique *IDH* muté s'il n'y a pas de codélétion 1p/19q (de grade III) mais en oligodendrogliome *IDH* muté 1p/19q codélété (de grade II) si elle est présente. On voit maintenant l'importance de re-évaluer les critères du grading qui avaient été proposés avant les données moléculaires pour savoir s'ils restent encore pertinents. Des publications récentes ont montré qu'il n'y avait pas de différence de survie globale entre les astrocytomes *IDH* mutés grade II et les grades III (Olar et al., 2015; Reuss et al., 2015; Suzuki et al., 2015) ni entre les oligodendrogliomes *IDH* mutés 1p/19q codélétés de grade II ou III (Suzuki et al., 2015).

c. Méthylation du promoteur de MGMT

Le gène *O6-methyl guanine-DNA methyl transferase* (*MGMT*), localisé en 10q26, code pour une enzyme clé dans les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN (Esteller and Herman, 2004). La protéine MGMT répare les lésions causées par les agents alkylants dans les cellules tumorales, favorise la survie de ces cellules, et confère à la tumeur une chimiorésistance. Une inhibition de *MGMT*, le plus souvent par méthylation de son promoteur, empêche cette réparation et rend la tumeur plus chimiosensible (**figure 3**).



Figure 3. Rôle de MGMT dans les mécanismes de chimiorésistance. (a) Le témozolomide
(TMZ) induit une conversion de la guanine en une forme méthylée O6-meG cytotoxique, que la protéine MGMT corrige lorsqu'elle est active (non méthylée). (b) Si la MGMT n'est pas active, il peut y avoir mise en route du système mismatch repair (protéines MSH2, MSH6, MLH1, PMS2) pour réparer l'ADN pendant la phase de réplication. L'échec de ces 2 mécanismes conduit à l'apoptose cellulaire (Wick et al., 2014).

De nombreuses études ont clairement démontré cette relation entre le statut de MGMT et la chimiosensibilité aux alkylants (pour revue (Wick et al., 2014)). Dans une étude randomisée comparant radiothérapie + témozolomide à la radiothérapie seule (Hegi et al., 2005; Stupp et al., 2005), le délai sans progression et la survie étaient significativement supérieurs dans le groupe traité par témozolomide (respectivement 10,3 vs. 5,3 mois et 21,7 vs. 12,7 mois). Par contre, MGMT ne constitue pas un facteur pronostic indépendant, seulement lorsqu'il est associé à une mutation d'*IDH1* (Wick et al., 2014). La technique utilisée pour détecter la méthylation de *MGMT* n'est pas encore standardisée, chacune ayant des avantages et des limites. Pour ne citer que les plus courantes : immunohistochimie (manque de reproductibilité et variabilité inter-observateur), par PCR quantitative (MSP ou Methylation-specific PCR), par MethyLight, par High Resolution Melting (HRM), ou par pyroséquençage. Cependant, le pyroséquençage semble avoir la meilleure valeur prédictive positive et de sensibilité. De plus, cette technique serait reproductible et utilisable également sur des échantillons inclus en paraffine, donc plus facilement généralisable (Quillien et al., 2012).

VI. TRAITEMENTS

1. Chirurgie

a. Principes

La chirurgie est l'élément clé de la prise en charge, que ce soit dans le cadre d'une exérèse ou d'une biopsie (recommandations EANO (Weller et al., 2014)). L'intérêt de la résection chirurgicale d'un glioblastome a longtemps été débattu en l'absence d'étude prospective randomisée (niveau de preuve grade A), difficiles à concevoir pour des raisons éthiques évidentes. Cependant, dans une étude randomisée Finlandaise avec de petits effectifs (Vuorinen et al., 2003), comparant la biopsie à l'exérèse chirurgicale chez des patients de plus de 65 ans, la médiane de survie était de 171 jours dans le groupe résection, contre 85 dans le groupe biopsie (p=0,035). Ces résultats sont concordants avec 2 autres études randomisées dont ce n'était pas l'objectif principal (Stummer et al., 2008; Stupp et al., 2005) et de nombreuses autres non randomisées (pour revue (Sanai and Berger, 2008)).

b. Biopsie

La biopsie ne doit être pratiquée qu'en cas de non-opérabilité : état général et/ou comorbidités contre-indiquant une exérèse, doute avec une tumeur « non chirurgicale » (lymphome, lésion inflammatoire), tumeur non réséquable en raison de son caractère trop diffus (bi-hémisphérique, gliomatose), de l'atteinte des noyaux gris centraux, du tronc cérébral, de l'espace perforé antérieur...

Elle doit répondre à certaines règles : tissu analysable (non altéré), en quantité suffisante (nombreuses analyses effectuées), et suffisamment représentatif de la tumeur (prise de contraste). Différentes techniques peuvent être utilisées, en fonction des habitudes de l'opérateur, du matériel disponible, de la localisation tumorale (superficielle vs. profonde). On distingue les biopsies à ciel ouvert, et les biopsies stéréotaxiques avec ou sans cadre. Plusieurs études rétrospectives ont démontré que le taux de complications était de 8 à 12%, avec 2 à 6% de déficit neurologique permanent, et 1 à 4% d'hémorragie symptomatique, et un taux de mortalité global de 1%. Le diagnostic est obtenu dans 80 à 99% des cas, quelle que soit la technique utilisée (Dammers et al., 2008; Fontaine et al., 2000; Menei and Metellus, 2010; Shooman et al., 2010; Woodworth et al., 2006).

c. Résection chirurgicale

i. Etendue de l'exérèse et survie

L'intérêt de l'exérèse chirurgicale pour diminuer l'effet de masse et donc améliorer l'état neurologique est reconnu. Par contre, l'intérêt oncologique d'une exérèse complète est encore débattu. L'exérèse « complète » (ou « *gross total resection* » dans la littérature anglosaxonne) d'un glioblastome est actuellement définie par l'absence de prise de contraste résiduelle sur l'IRM post-opératoire immédiate qui doit être réalisée dans les 48 à 72h après la chirurgie. L'impression subjective du chirurgien n'est pas assez fiable (Menei et al., 2005; Nazzaro and Neuwelt, 1990). De plus, l'infiltration tumorale s'étend au-delà de la prise de contraste et même au-delà de l'hypersignal T2/FLAIR à l'IRM (voir chapitre Imagerie). Il est donc illusoire de réséquer l'intégralité des cellules tumorales. Dans la littérature, ce terme est opposé à celui d'exérèse « subtotale » (98% de la prise de contraste) et « partielle » (< 98% de la prise de contraste réséquée). Une autre difficulté vient de la méthode d'évaluation du résidu qui est utilisée dans la plupart des études, basée sur les critères de la RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology) qui extrapolent un volume (en 3 dimensions) à partir d'une mesure dans 2 plans de l'espace (Wen et al., 2010). Or, la mesure directe du volume avec les outils informatiques usuels a démontré sa supériorité en termes de reproductibilité et de précision (Pallud et al., 2012). Le « seuil » d'étendue de résection à partir duquel il existe un bénéfice oncologique (survie médiane et survie sans progression) n'est donc pas clairement établi, par exemple il est de 98% pour Lacroix et al. (Lacroix et al., 2001), 78% pour Sanai et al. (Sanai et al., 2011b), 90% pour Orringer et al. (Orringer et al., 2012), 95% pour Chaichana et al. (Chaichana et al., 2014).

La seule étude qui démontre l'intérêt sur la survie globale de la qualité d'exérèse avec un niveau de preuve de grade B (Stummer et al., 2008) est issue des données de l'essai randomisé de Stummer et al. (Stummer et al., 2006). Le groupe « exérèse complète » avait une médiane de survie de 16,9 mois vs. 11,8 mois pour le groupe « exérèse incomplète ».

ii. Aides techniques

Concernant les aides techniques à la résection, on peut citer celles qui permettent d'apprécier les « limites » tumorales : neuronavigation, échographie peropératoire, IRM peropératoire, chirurgie en fluorescence avec l'acide 5-aminolevulinique (5-ALA) ; et celle

21

qui permet d'identifier les structures fonctionnelles : la cartographie peropératoire corticale et sous-corticale, en conditions éveillée ou endormie.

- la neuronavigation : le principe est de se servir de l'imagerie préopératoire du patient (IRM 3DT1 injectée le plus souvent) et de l'intégrer dans une station de travail présente lors de l'intervention pour se guider « en temps réel » à l'aide d'un stylet. La limite majeure de cette technique est liée au shift cérébral, conséquence de l'ouverture durale et de la résection parenchymateuse. Dans la seule étude randomisée comparant l'apport de la neuronavigation dans la qualité de l'exérèse chirurgicale, il n'y avait pas de différence significative entre le groupe avec neuronavigation et le groupe sans (Willems et al., 2006). Cependant, cette technique est utile essentiellement pour l'abord chirurgical (centrage de la craniotomie), et pour localiser les tumeurs profondes qui n'affleurent pas au cortex.

- **l'échographie peropératoire** : n'est pas soumise au shift cérébral et est d'une définition au moins aussi bonne que l'IRM (Unsgaard et al., 2002). Elle est facile d'utilisation et son coût est faible, permettant d'équiper tous les blocs opératoires (appareil mobile standard). Cependant, elle n'a d'intérêt qu'une fois la surface corticale atteinte, est opérateur dépendant, et est difficilement interprétable au terme de l'exérèse (artefacts). Elle est un excellent outil d'accompagnement de la cartographie cérébrale (Duffau et al., 2008).

- **l'IRM peropératoire** : elle permet de s'affranchir des limites de la neuronavigation. Une étude randomisée monocentrique a démontré un taux plus important d'exérèse complète dans le groupe « IRM peropératoire » (96%) que dans le groupe « contrôle » (68%, p=0,023), sans résultat significatif sur la survie sans progression (226 vs. 154 jours, p=0,083) (Senft et al., 2011). La résection a été poursuivie chez 1/3 des patients du groupe « IRM peropératoire ». Cet outil semble intéressant essentiellement dans les cas où le chirurgien a un doute sur un éventuel reliquat en fin d'exérèse, lorsque celle-ci n'est pas conduite selon des limites

22

fonctionnelles. Cependant, le coût élevé de l'appareil et l'organisation structurelle nécessaire à son utilisation rendent cet outil difficilement accessible à tous les centres.

- **l'exérèse guidée par fluorescence** : le 5-ALA est un précurseur de l'hémoglobine qui permet la synthèse et l'accumulation de porphyrines fluorescentes dans de nombreuses tumeurs, dont les gliomes malins. Après administration orale 3 heures avant l'intervention, la fluorescence est visualisée en peropératoire à l'aide d'un microscope modifié (lumière et filtre UV). Une étude randomisée multicentrique (270 patients) a démontré un taux plus important d'exérèse complète dans le groupe « 5-ALA » (65%) que dans le groupe contrôle « lumière blanche » (36%, p<0,0001), permettant une augmentation significative de la survie sans progression à 6 mois (41% vs. 21,1%, p=0,0003) (Stummer et al., 2006). La principale limite de cette technique réside dans le fait que la fluorescence semble intéresser également du tissu tumoral au-delà de la prise de contraste en IRM (zone infiltrante), donc potentiellement fonctionnelle (Schucht et al., 2014). Il y aurait un taux supérieur de déficits neurologiques postopératoires lié à l'utilisation du 5-ALA (Barone et al., 2014). Elle serait donc à utiliser préférentiellement en zones dites « non éloquentes ». Pour limiter le risque de déficit neurologique permanent, certains auteurs suggèrent d'associer à la fluorescence les techniques de cartographie cérébrale (Schucht et al., 2012).

- la cartographie corticale et sous-corticale par stimulation électrique directe (SED) : peut être réalisée en conditions endormie pour cartographier l'aire motrice primaire et le faisceau pyramidal (Bello et al., 2014; Szelenyi et al., 2011), ou éveillée pour cartographier les aires et réseaux moteurs modulateurs, sensitifs, sensoriels (voies visuelles), les fonctions « supérieures » comme le langage, la cognition spatiale, la cognition sociale, les fonctions exécutives (Almairac et al., 2014; Gras-Combe et al., 2012; Herbet et al., 2014; Thiebaut de Schotten et al., 2005). Elle a été largement développée dans la chirurgie des gliomes « diffus » de bas grade de malignité (Duffau, 2008; Duffau et al., 2005; Sanai et al., 2008). Le principe

est de réséquer le parenchyme concerné par la tumeur selon des limites fonctionnelles (et pas tumorales). Une méta-analyse portant sur plus de 8000 patients opérés d'un gliome (bas et haut grades de malignité) avec ou sans SED a démontré (De Witt Hamer et al., 2012) (i) une diminution significative du taux de déficits neurologiques définitifs dans le groupe « SED » (3,4% vs. 8,2%) ; (ii) une augmentation significative du taux d'exérèse complète dans le groupe « SED » (75% vs. 58%). Cependant, même si cette technique est le *gold standard* de la chirurgie des gliomes de bas grade (recommandations EANO (Soffietti et al., 2010)), elle est moins facilement réalisable dans la chirurgie des glioblastomes. La population concernée est en moyenne plus âgée, avec des co-morbidités et des troubles neurologiques pouvant empêcher la réalisation des tests peropératoires. De plus la consistance, les adhérences et la vascularisation d'un glioblastome rend la chirurgie en général plus difficile et plus risquée à proximité des zones fonctionnelles que lors de l'exérèse sous piale d'un gliome diffus de bas grade. Toutefois, chez des patients sélectionnés, elle peut permettre de tendre vers une exérèse « supratotale » (au-delà de la prise de contraste en IRM) en limitant au maximum les risques neurologiques (Bello et al., 2007; Carrabba et al., 2007; Sacko et al., 2011).

iii. Complications péri-opératoires

Dans la littérature des 20 dernières années, le taux de mortalité globale après craniotomie pour tumeur cérébrale varie de 1 à 2,7% (Brell et al., 2000; Chang et al., 2003; Sawaya et al., 1998; Vorster and Barnett, 1998). Le taux de morbidité varie de 10,6% dans l'étude de Vorster et al. à 32% pour Sawaya et al. Le taux de déficits neurologiques tardifs liés à la chirurgie, hors chirurgie éveillée (voir chapitre *Résection chirurgicale*), varie de 8,1 à 20% en fonction des séries. Les complications régionales varient de 7 à 16% en fonction des séries : épilepsie postopératoire (3 à 7,5%), hématome du foyer (2%), infection du site (1%), abcès cérébral, méningite, fuite de LCS (2%), pneumencéphalie symptomatique, hydrocéphalie. Les complications systémiques varient de 4,5% à 12,5% en fonction des séries : thrombose veineuse profonde/embolie pulmonaire, pneumopathie infectieuse, infection urinaire.

d. Administration locale de traitements

Plusieurs facteurs rendent peu efficaces les traitements adjuvants à la chirurgie. Parmi eux on peut citer (i) le caractère infiltrant des cellules tumorales dans le parenchyme adjacent, expliquant notamment que les récidives surviennent dans plus de 95% des cas dans les 1-2 cm de la périphérie de la cavité opératoire ; (ii) la barrière hémato-encéphalique, qui rend les traitements systémiques moins efficaces. Elle est en général intacte à la périphérie de la tumeur, et est imperméable aux molécules hydrophobes et plus larges que 200 kilodaltons, c'est-à-dire à la plupart des molécules de chimiothérapie ; (iii) l'hétérogénéité cellulaire et l'instabilité génomique des cellules tumorales, rendant le ciblage de l'ensemble des cellules difficile.

Ces obstacles ont conduit au développement de stratégies d'administration directe de produits thérapeutiques, afin de mieux cibler les cellules tumorales infiltrantes, de s'affranchir de la barrière hémato-encéphaliques, et d'obtenir des taux élevés de produits dans le cerveau envahi en minimisant la toxicité systémique.

i. Chimiothérapie locale in situ

Consiste en l'administration d'implants polymériques de carmustine (Gliadel®), déposés directement dans la cavité de résection. Le produit est relâché pendant toute la durée de dégradation du polymère. Les modèles animaux ont démontré que la carmustine était délivrée à des doses tumoricides pendant 21 jours (Fung et al., 1998). Une autre limitation à ce produit est la distribution, qui est limitée à la zone immédiatement péri-tumorale, car les implants ne peuvent pas être disposés au-delà de la cavité de résection.

En France, le Gliadel® à l'AMM en première intention chez des patients opérés d'un gliome malin de haut grade, et en situation de récidive dans les cas de glioblastome.

Actuellement, il n'existe pas d'essai comparatif randomisé comparant Gliadel® vs. placebo en complément du schéma thérapeutique usuel de radio-chimiothérapie concomitante et adjuvante par témozolomide (Stupp et al., 2005).

Une étude randomisée de phase III comparant Gliadel® vs. placebo en complément d'une radiothérapie standard a démontré une augmentation significative de la survie des patients traités par Gliadel® (13,9 mois vs. 11,6 mois, p=0,03), en intention de traiter (Westphal et al., 2003). Par contre, lorsque l'analyse était restreinte au sous-groupe des glioblastomes confirmé par l'analyse histologique définitive (n=101), cette différence n'était plus significative (13,5 mois vs. 11,4 mois, p=0,10). De plus, il n'y avait pas de différence de la survie sans progression dans les 2 groupes (5,9 mois). Il y avait plus de complications dans le groupe « Gliadel® » que dans le groupe « placebo » : fuite de LCS (5% vs. 0,8%), et hypertension intracrânienne (9,2% vs. 1,7%).

Une récente étude observationnelle multicentrique avec appariement en score de propension sur 262 « paires » de patients (Pallud et al., 2015) opérés d'un glioblastome comparait les résultats oncologiques (survie sans progression et survie globale) d'un groupe ayant reçu du Gliadel® en première ligne de traitement (en plus du traitement standard par radiochimiothérapie par témozolomide) avec un groupe « standard ». La survie sans progression était significativement supérieure dans le groupe Gliadel® (12 mois vs. 10 mois, p=0,008) mais il n'y avait pas de différence significative sur la survie globale (20,4 mois vs. 18 mois, p=0,56).

Dans une autre étude rétrospective multicentrique, sur 163 patients opérés d'un glioblastome (83 nouvellement diagnostiqués, 80 en récidive), la moitié des patients opérés une première fois ont eu l'association Gliadel®, radio-chimiothérapie par témozolomide (Menei et al., 2010). La médiane de survie dans ce groupe était de 17 mois, soit 6 semaines de plus que dans l'étude randomisée de Stupp et al.. Il y avait moins de fuite de LCS (1,8%) que dans l'étude de Westphal et al., plus d'abcès cérébraux (4,2%) et 4% de méningite aseptique. D'autres études rétrospectives avec de plus petits effectifs ne mettaient pas en évidence de gain significatif de la survie des patients (Affronti et al., 2009; McGirt et al., 2009).

Devant le faible niveau de preuve sur l'efficacité du Gliadel® associé au protocole standard de radio-chimiothérapie par témozolomide, et le risque accru de complications potentiellement graves, l'utilisation du Gliadel® est une option thérapeutique à discuter en RCP, en fonction des conditions opératoires (intégrité durale, ouverture large du ventricule), et de l'expérience du chirurgien dans ce traitement.

ii. Convection-enhanced delivery (CED)

La CED consiste en l'administration dans la cavité de résection ou ses parois d'un produit par l'intermédiaire d'un microcathéter relié à une pompe. Elle utilise une source externe pour créer un gradient de pression en plus du principe de gradient de diffusion lié à la concentration de la molécule thérapeutique. La pression constante exercée par la pompe permet de délivrer plus en profondeur le produit (1,5 à 3 cm), et de manière plus homogène que ne le fait une simple administration directe via un cathéter (2 mm) (Bobo et al., 1994). Les principaux inconvénients de cette technique sont (i) la nécessité de remplir régulièrement le réservoir afin d'avoir un volume injecté constant ; (ii) les spécificités du matériels de CED (matériaux, taille de la lumière du cathéter, taux d'infusion, volume injecté) par rapport aux molécules délivrées, qui doivent être systématiquement adaptées au produit (poids moléculaire, demi-vie, caractéristiques de surface), afin d'obtenir une distribution parenchymateuse homogène et reproductible ; (iii) le reflux le long du cathéter qui peut être élevé, jusqu'à 18,5% (Varenika et al., 2008), et possiblement responsable d'une neurotoxicité par diffusion dans les espaces sous-arachnoïdiens.

La CED a été utilisée dans plusieurs études cliniques de phase I ou II pour délivrer des molécules de chimiothérapie ou des immunotoxines (pour revue voir (Chaichana et al.,

2015)). Une seule étude de phase III a été publiée, l'étude PRECISE, dans laquelle 256 patients en situation de récidive d'un glioblastome ont été randomisés dans le bras CED avec infusion d'une toxine IL-13 (produite par un *pseudomonas*) ou dans le bras Gliadel® (Kunwar et al., 2010). Il n'y avait pas de différence significative sur la survie entre les 2 groupes. Cependant, la distribution intraparenchymateuse du produit n'a pu être évaluée en raison de l'absence d'utilisation pendant l'essai d'un co-marquage de la molécule avec un agent visible à l'IRM. A noter que le taux d'embolie pulmonaire était supérieur dans le groupe CED.

2. Médicaux

a. Traitements symptomatiques

- La **corticothérapie** préopératoire permet une amélioration rapide (en quelques jours) de la symptomatologie et du score fonctionnel de Karnofsky. Cependant aucune revue ou méta-analyse n'est disponible concernant les gliomes (Piette et al., 2006). Le choix des glucocorticoïdes, la dose, le mode d'administration et la durée du traitement sont encore empiriques et laissés à l'appréciation du clinicien. Lorsque l'œdème péri-tumoral est symptomatique (déficit neurologique, HTIC), des doses de charge par voie intraveineuse sont couramment utilisées.

- les **anti-épileptiques** ne sont recommandés qu'en cas de crise d'épilepsie. Le traitement prophylactique péri-opératoire n'a pas fait la preuve de son efficacité, ni de son inutilité (Pulman et al., 2013). Il n'est pas indiqué mais de nombreuses équipes le proposent en considérant que la chirurgie parenchymateuse constitue un facteur de risque de survenue d'une crise d'épilepsie, principalement lors de la première semaine postopératoire (15 à 20%). L'utilisation des nouvelles générations d'anti-épileptiques, comme le lévétiracétam, permettent une introduction rapide, sur une courte période, avec peu d'effets secondaires. Il est couramment admis de débuter un traitement prophylactique une semaine avant la chirurgie, et de l'arrêter rapidement progressivement 1 à 4 semaines après en l'absence de

crise. Si un traitement anti-épileptique doit être maintenu, le choix se portera préférentiellement sur des molécules sans activité enzymatique pour ne pas interférer avec le métabolisme des chimiothérapies (Bahr et al., 2012). A noter que le valproate de sodium aurait un effet potentialisateur de la chimiothérapie alkylante et permettrait de prolonger la survie des patients traités par témozolomide (Weller et al., 2011; Yuan et al., 2014). Cependant, une analyse récente portant sur les 1869 patients inclus dans les essais randomisés européens dans les glioblastomes en première ligne ne mettait pas en évidence de bénéfice du valproate de sodium sur la survie sans progression et la survie globale (Happold et al., 2016).

b. Radiothérapie

La radiothérapie seule a longtemps été le traitement standard du glioblastome, avec un effet sur la survie indiscutable (Laperriere et al., 2002). Les protocoles actuels de radiothérapie externe ciblent la prise de contraste des séquences IRM en T1 injecté, avec une marge de sécurité de 2 à 3 cm sur l'hypersignal T2/FLAIR. La dose délivrée standard est de 54-60 Gy en fractions de 1,8-2 Gy (recommandations EANO (Weller et al., 2014)). Elle doit être débutée dans un délai de 4 à 6 semaines après la chirurgie, sous réserve d'une bonne cicatrisation du scalp. Aucune autre modalité d'irradiation, que ce soit les régimes hypo- ou hyperfractionnés, la brachythérapie, la radiochirurgie ou le boost de radiothérapie stéréotaxique, n'a démontré sa supériorité par rapport au fractionnement standard en terme de survie des patients (Laperriere et al., 2002).

Les principales complications de la radiothérapie sont : asthénie, alopécie localisée, troubles cognitifs, radionécrose focale, leucoencéphalopathie.

c. Chimiothérapies anticancéreuses

Une méta-analyse a démontré que l'association de la radiothérapie avec les chimiothérapies à base de nitrosourée permettait d'allonger la survie à 1 an (31% vs. 37%) et à 2 ans (9% à 13%) (Stewart, 2002). C'est l'essai de phase III de l'EORTC comparant la

radiothérapie seule vs. radiothérapie associée au témozolomide avec témozolomide d'entretien pendant 6 mois qui a permis de définir le traitement standard du glioblastome (Stupp et al., 2005). La médiane de survie dans cette étude était significativement prolongée dans le groupe témozolomide (14,6 mois vs. 12,1 mois, p<0,001), ainsi que la survie à 2 ans (26,5% vs. 10,4%). La survie sans progression était également significativement supérieure dans le groupe témozolomide (6,9 mois vs. 5 mois). Le bénéfice du témozolomide est plus important dans le sous-groupe de patients porteurs de la méthylation de MGMT avec une médiane de survie de 21,7 mois (15,3 mois si radiothérapie seule) vs. 12,7 mois (11,8 mois si radiothérapie seule) pour ceux exprimant MGMT (Hegi et al., 2005). Ce standard thérapeutique a ensuite été validé en population par plusieurs autres études (Bauchet et al., 2010; Graus et al., 2013; Johnson and O'Neill, 2012).

Les principaux effets secondaires du témozolomide sont : alopécie, asthénie, nausées/vomissements, anorexie, troubles digestifs, toxicité hématologique (plaquettes et leucocytes essentiellement).

d. Thérapies ciblées

Les chimiothérapies anti-angiogéniques sont utilisées dans de nombreux cancers. Dans le glioblastome, le **bévacizumab** a démontré son efficacité dans des essais de phase II en récidive et en première ligne (Kreisl et al., 2009; Lai et al., 2011; Vredenburgh et al., 2007). Il s'agit d'un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF. Les résultats de 2 essais randomisés de phase III ont été récemment publiés (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). Ils évaluaient l'effet de l'association du bévacizumab au traitement standard en première ligne après exérèse tumorale ou biopsie d'un glioblastome. Les résultats des 2 études sont concordants : pas de différence significative sur la survie entre les 2 groupes, augmentation de la survie sans récidive de 3 à 4 mois, et augmentation des complications dans le groupe bévacizumab. Le bévacizumab n'est donc pas indiqué en première ligne de traitement. Par contre il est

volontiers utilisé en 2^{ème} ligne de traitement (hors AMM), seul ou en association avec une chimiothérapie anticancéreuse (voir chapitre *Prise en charge de la récidive*).

Les principaux effets secondaires du bévacizumab sont : asthénie, hypertension artérielle, thromboses veineuses profondes, perforations digestives, hémorragies massives, déhiscence de cicatrices/retard à la cicatrisation.

D'autres thérapies ciblées ont été testées en première ligne dans des essais de phases II et III :

- Le cilengitide, inhibiteur sélectif des intégrines $\alpha\nu\beta3$ et $\alpha\nu\beta5$, agirait comme antiangiogénique dans les glioblastomes. Il a été évalué dans un essai de phase II en première ligne de traitement pour les glioblastomes MGMT non méthylée dans l'essai CORE (Nabors et al., 2015), et dans un essai de phase III pour les glioblastomes MGMT méthylée dans l'essai CENTRIC (Stupp et al., 2014). Aucun des 2 essais n'a permis de mettre en évidence un bénéfice clinique (survie sans progression et survie globale) de cette molécule ajoutée au traitement standard de radio-chimiothérapie par témozolomide.

- L'**erlotinib**, inhibiteur de tyrosine kinase (TKI) anti-EGFR, a fait l'objet d'un essai de phase II en association au traitement standard de première ligne des glioblastomes (Prados et al., 2009). La médiane de survie pour les 65 patients était de 19,3 mois, soit légèrement mieux que pour les contrôles historiques (médiane de 14,1 mois). Il n'y avait pas de corrélation entre médiane de survie et surexpression de *EGFR*.

- Le **gefitinib**, également inhibiteur des TKI anti-EGFR, a fait l'objet d'un essai phase II nord-américain, sur 96 patients, en adjuvant à la radiothérapie seule (Uhm et al., 2011). Il n'y avait pas d'amélioration clinique par rapport aux cohortes historiques, que ce soit sur la survie sans progression ou la survie globale.

- Le **nimotuzumab**, un anticorps monoclonal anti-EGFR, a fait l'objet d'un essai de phase III en première ligne de traitement dans le glioblastome en association au traitement standard (Westphal et al., 2015). Cent quarante-deux patients ont été évalués. Il n'y avait pas

31

de différence significative sur la survie globale et sur la survie sans récidive. Il n'y avait pas de corrélation entre efficacité clinique et surexpression de EGFR.

- L'association **erlotinib et bevacizumab** en plus du traitement standard radiochimiothérapie par témozolomide a été testée dans un essai de phase II nord-américain (Clarke et al., 2014). Le concept était de bloquer de façon synchrone les 2 voies EGF et VEGF. Cinquante-neuf patients ont été inclus dans cette étude. Il n'y avait pas d'amélioration significative de la survie globale par rapport aux cohortes historiques (19,8 mois vs. 18 mois, p=0,33), mais un discret gain de la survie sans progression (13,5 mois vs. 8,6 mois, p=0,03). La toxicité a été jugée comme acceptable par les auteurs.

- A noter que le **cetuximab**, anticorps monoclonal anti-EGFR ayant l'AMM dans le cancer du colon métastatique avec le gène *K-RAS* sauvage et surexprimant EGFR et dans les carcinomes épidermoides de la tête et du cou en association, a fait l'objet de plusieurs études de phase I/II en récidive du glioblastome sans démontrer d'efficacité clinique (Lv et al., 2012). Un essai de phase I/II visant à évaluer l'efficacité et la tolérance de l'ajout de cetuximab au traitement standard a été initiée en 2006 (Combs et al., 2006), mais les résultats n'ont à ce jour pas été publiés.

e. Immunothérapies

Le succès de l'immunothérapie dans le traitement du mélanome métastatique a conduit au développement de stratégies thérapeutiques similaires dans le glioblastome. Plusieurs approches sont actuellement en cours d'essai dans le glioblastome, en première ligne ou à la récidive. On distingue la vaccination (ou immunothérapie active), l'immunothérapie « adoptive » (ou immunothérapie passive), et les inhibiteurs de checkpoints immunologiques.

- La vaccination thérapeutique contre le cancer consiste à induire et/ou restaurer une réponse immune non productive contre les antigènes tumoraux. Cette immunité peut être générée à partir de lysats tumoraux, de peptides tumoraux ou synthétiques, ou de micro-ARN. Les avantages de cette approche sont la spécificité de la réponse immunitaire vis-à-vis de la tumeur, le ciblage global potentiel de toutes les cellules tumorales quelque soit leur stade différenciation, et le caractère prolongé du fait de la « mémoire immunitaire » induite par ce procédé. Il est nécessaire d'associer à la vaccination antigénique un adjuvant immuno-stimulateur, pour obtenir une activation et une expansion efficace des cellules T réactives.

Plusieurs approches de vaccinations thérapeutiques ont utilisé les néo-antigènes, des antigènes produits au cours de l'évolution tumorale. Un des néo-antigènes les mieux caractérisé est l'EGFRvIII, exprimé dans envrion 30% des glioblastomes.

Le **rindopepimut** est un vaccin conjugué dirigé contre un acide aminé de l'EGFRvIII. Il a fait l'objet d'un essai de phase II multicentrique « ACT III » en première ligne de traitement adjuvant du glioblastome exprimant ce variant en immunohistochimie (n=65) (Schuster et al., 2015). Il était associé au témozolomide adjuvant après exérèse chirurgicale (résidu < 1 cm3) et radiochimiothérapie concomitante. Les résultats cliniques et biologiques étaient encourageants, avec une médiane de survie globale de 21,8 mois, 26% de survie à 36 mois, une immunogénicité de plus de 4 fois la normale chez 85% des patients. La tolérance était jugée bonne par les auteurs. Un essai de phase III « ACT IV » comparant le rindopepimut à une injection contrôle en première ligne est en cours (NCT01480479), ainsi qu'un essai sur le glioblastome en récidive « ReACT » en association au bévacizumab (NCT01498328).

Afin d'éviter les récidives liées à la sélection d'un variant antigénique lors du ciblage d'un peptide unique, une approche alternative consiste en la vaccination contre plusieurs antigènes simultanément. Une des plus prometteuses est la vaccination contre les protéines du stress HSP (Heat Shock Protein), notamment le complexe protéique **HSPPC-96** dérivé d'un

glioblastome réséqué. Dans un essai de phase II, 41 patients ont été vaccinés contre le HSPCC-96 après exérèse complète d'une récidive de glioblastome (Bloch et al., 2014). La médiane de survie globale était de 42,6 semaines, et la survie à 12 mois était d'environ 30% [16,6-45,7 – IC 95%]. Peu d'effets secondaires ont été attribués spécifiquement au vaccin. Une autre approche ciblant plusieurs épitopes simultanément est l'utilisation des **cellules dendritiques** (CD) chargées en lysats tumoraux. Après des essais de phase I/II encourageants (Ardon et al., 2012), Le DCVax®-L est en cours d'évaluation dans un essai de phase III en première ligne de traitement du glioblastome (NCT00045968).

- L'immunothérapie « adoptive ». Le concept est ici d'utiliser des cellules T autologues, de les activer *ex-vivo* contre des antigènes tumoraux de manière spécifique, et ensuite de les infuser par voie veineuse au même patient. Les cellules T peuvent être isolées à partir du sang périphérique, de la pièce opératoire, ou modifiées par transduction avec un vecteur codant pour un récepteur de cellules T ou un récepteur chimérique. Cette technique a démontré son efficacité dans le mélanome (Rosenberg et al., 2011) et dans les leucémies (Maude et al., 2014).

Dans le glioblastome, l'immunothérapie « adoptive » a été utilisée pour cibler les antigènes du **cytomégalovirus** (CMV), exprimés par les cellules tumorales. Une étude de phase I a évalué cette approche sur 11 patients en situation de récidive de glioblastome, en complément d'un traitement par chimiothérapie (témozolomide et/ou bévacizumab et/ou lomustine) (Schuessler et al., 2014). La médiane de survie globale était de 57 semaines [19 – 346], avec peu d'effets indésirables dont seulement un de grade 3 (épilepsie).

Une autre approche d'immunothérapie adoptive utilisant les **récepteurs chimériques ciblant HER-2 ou EGFRvIII** a montré des résultats encourageants en préclinique dans le glioblastome (Ahmed et al., 2010; Johnson et al., 2015). Des essais cliniques de phase I ou II ciblant ces antigènes sont en cours (NCT02209376, NCT01109095, NCT01454596). - Les inhibiteurs de checkpoints immunologiques. Il est maintenant reconnu que les récepteurs inhibiteurs des cellules T jouent un rôle important dans la progression tumorale. Du fait de leur rôle préventif dans l'activation prolongée excessive de la réponse immunitaire, ces récepteurs inhibiteurs ont une fonction de checkpoint immunologique. Les 2 checkpoints inhibés qui ont démontré une efficacité clinique nette dans les traitements oncologiques sont le CTLA-4 (antigène-4 cytotoxique des lymphocytes T) et le PD-1 (Programmed Cell Death-1).

Le **CTLA-4** est surexprimé pendant l'activation des lymphocytes T CD8+ et CD4+ dans le but d'inhiber l'activation et la prolifération des cellules T suivantes. L'**ipilimumab** est un anticorps anti-CTLA-4 approuvé par la FDA en tant qu'inhibiteur de checkpoint immunologique. Dans le traitement du mélanome métastatique, l'ipilimumab a l'AMM. Il permet d'obtenir une réponse complète et durable chez environ 2% des patients (Hodi et al., 2010). Dans le glioblastome, l'ipilimumab a surtout été testé en préclinique avec des résultats prometteurs sur la réponse immunitaire anti-tumorale (Fecci et al., 2007). En clinique, seulement quelques patients en situation de récidive ont été traités, sans résultat significatif.

Le blocage de la voie **PD-1/PD-L1** a fait l'objet de plusieurs essais en cancérologie, en particulier dans le mélanome métastatique. Les lymphocytes tumoraux expriment un taux élevé de PD-1 dans de nombreux cancers, du fait d'une stimulation antigénique chronique par la tumeur. L'interaction PD-1/PD-L1 inhibe la fonction des cellules T (Barber et al., 2006). L'objectif est donc de restaurer la fonction cellulaire T à visée anti-tumorale en inhibant la voie PD-1/PD-L1 des lymphocytes T. Dans le mélanome métastatique, la monothérapie anti-PD-1/PD-L1 a permis d'obtenir un taux de réponse de 15% à 30% avec une réponse complète chez environ 6% des patients traités (Topalian et al., 2012). Dans le glioblastome, 2 essais de phase II évaluant le blocage de la voie PD-1/PD-L1 sont actuellement en cours (NCT02337491, NCT02336165).

Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus en inhibant de **manière combinée le CTLA-4 et le PD-1**. Ces 2 voies inhibitrices de l'activation des cellules T ne sont pas redondantes, expliquant les bons résultats obtenus dans l'essai randomisé sur le mélanome métastatique comparant le nivolumab (anticorps anti-PD-1) associé à l'ipilimumab par rapport à ces 2 molécules en monothérapie (Larkin et al., 2015). Dans le glioblastome, des modèles précliniques ont démontré un bénéfice sur la survie des souris lors du blocage simultané des 2 voies comparativement à l'une ou l'autre en monothérapie (Wainwright et al., 2014). Des essais cliniques (phases I et III) évaluant la bithérapie nivolumab + ipilimumab sont actuellement en cours (NCT02311920, NCT 02017717).

En complément à l'inhibition de ces voies, d'autres inhibiteurs ou activateurs de voies immunologiques telles que les inhibiteurs de LAG-3 ou TIM-3 sont également en cours d'évaluation en phases précliniques ou cliniques précoces (pour revue voir (Binder et al., 2016)).

De nouvelles contraintes d'évaluation de la réponse thérapeutique se posent avec l'émergence de l'immunothérapie dans les tumeurs cérébrales. Sur le plan immunologique, « l'immunomonitoring » consiste à évaluer la qualité de la réponse immunitaire en explorant la prolifération des lymphocytes T, les profils de sécrétions de cytokines, et les titres d'anticorps en cas de vaccination (Lamano et al., 2016). Sur le plan radiologique, il a été observé des pseudoprogressions chez les patients traités par ipilimumab pour des métastases cérébrales de mélanome (Gerber et al., 2015). Le groupe RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology) a établi des critères incluant les immunothérapies, les iRANO, afin d'aider à standardiser l'interprétation des résultats cliniques et radiologiques (Reardon and Okada, 2015).

f. Brachythérapie

La brachythérapie consiste à délivrer des radiations ionisantes directement sur les parois de la cavité de résection par l'intermédiaire d'isotopes radioactifs. Les isotopes utilisés dans les glioblastomes sont l'iode-125 (I-125) et l'iridium-192 (192-Ir). Les techniques utilisées pour les délivrer ont évolué ces 20 dernières années et respectent les mesures de radioprotection. Initialement, cela consistait en l'administration directe dans le tissu par le clinicien (haut risque d'irradiation du personnel), puis se sont développées les techniques d'applicateurs et de cathéters introduits dans le tissu cible qui sont ensuite chargés en isotope. Actuellement, le système le plus couramment utilisé est le GliaSite®, un ballon rempli d'I-125 dans la cavité par l'intermédiaire d'un cathéter, ce qui permet une distribution homogène sur les parois et améliore la sécurité et la facilité d'emploi. Concernant les doses d'irradiation, il est important de considérer non seulement la dose totale délivrée mais aussi le niveau de dose. Deux niveaux de doses sont décrits : le niveau bas (low-dose rate brachytherapy ou LDR-BT), caractérisé par l'administration de moins de 30 cGy/h, le plus souvent avec l'utilisation de l'I-125, et le niveau haut (high-dose rate brachytherapy ou HDR-BT), qui consiste à délivrer au moins 30 cGy/h (I-125 ou 192-Ir) permettant des procédures plus courtes et moins inconfortables pour le patient. On note cependant plus d'effets secondaires sur le tissu cérébral sain pour l'HDR-BT.

La brachythérapie a été utilisée dans de nombreux essais ces 20 dernières années. Deux situations sont à distinguer : en 1^{ère} ligne de traitement, et en situation de récidive du glioblastome. En 1^{ère} ligne de traitement, l'utilisation de la brachythérapie semble actuellement limitée. Cette limitation est liée à plusieurs facteurs dont la complexité des aspects techniques, les effets secondaires, et les résultats inconstants des différentes études. Deux essais randomisés ont défini le rôle de la brachythérapie en 1^{ère} ligne de traitement du glioblastome. L'essai de Laperriere et al. a inclus 140 patients randomisés après résection

(dans >85% des cas), ou après biopsie, dans 2 bras : le bras radiothérapie (50 Gy) + HDR-BT (70 cGy/h), ou le bras radiothérapie seule (50 Gy). Il n'y avait pas de différence significative sur la survie globale entre les 2 groupes (respectivement 13,2 et 13,8 mois, p=0,49) (Laperriere et al., 1998). L'essai du Brain Tumor Cooperative Group (BTCG), multicentrique, a inclus 299 patients répartis dans 2 bras : le bras HDR-BT (40 cGy/h) puis radiothérapie (60 Gy) + carmustine ou le bras radiothérapie (60 Gy) + carmustine (Selker et al., 2002). Une résection première a été réalisée dans >85% des cas dans les 2 groupes. Il y avait une amélioration de la survie globale dans le groupe avec brachythérapie (15,7 mois) par rapport au groupe sans (13,5 mois), mais non significative (p=0,10).

En situation de glioblastome récidivant, il n'y a pas d'essai randomisé publié. Les essais les plus récents utilisaient le GliaSite® avec de l'I-125. Les médianes de survie étaient de 9,1 mois pour les 24 patients de l'étude de Chan et al. (Chan et al., 2005), et de 8,3 mois pour les 95 patients de l'étude rétrospective multicentrique de Gabayan et al. (Gabayan et al., 2006).

Les complications et effets secondaires les plus fréquemment décrits de la brachythérapie sont la radionécrose (22% à 38%), et des lésions aux tissus adjacents entrainant des migraines, un syndrome de Moyamoya, des anévrysmes ou des cavernomes (Barbarite et al., 2016). Des précautions d'isolement sont également à considérer pour éviter d'exposer l'entourage et/ou le personnel soignant aux radiations pendant la durée du traitement, ce qui nécessite une sélection des patients et la mise en place de protocoles strictes.

g. Autres traitements

D'autres traitements ou sensibilisateurs aux traitements existants sont en cours d'essai dans les glioblastomes. On peut citer les champs électriques alternatifs ou **TTFields** (Tumor Treating Fields), qui ont fait l'objet d'une publication importante récemment (Stupp et al., 2015) du fait d'un allongement significatif de la survie sans récidive (+3,1 mois) et de la survie globale (+4,9 mois) en première ligne de traitement adjuvant. Cet essai multicentrique international a inclus 695 patients, randomisés après chirurgie ou biopsie et radiochimiothérapie soit dans le bras témozolomide adjuvant + TTFields, soit dans le bras témozolomide adjuvant seul. Les effets secondaires seraient peu importants selon les auteurs mais des irritations modérées du scalp ont été observées chez 43% des patients dans le bras TTFields, et 2% ont eu une réaction cutanée sévère de grade 3. Ce traitement consiste en la mise en place de 4 électrodes collées sur le scalp (rasage des cheveux indispensable) et reliées à un cartable délivrant le champ électrique. Pour être efficace, ce traitement doit être délivré plus de 18 heures/jour. Les champs électriques délivrés à la tumeur auraient un effet antimitotique, interférant ainsi avec la division des cellules tumorales.

Une autre piste est celle de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique permettant d'augmenter les concentrations de chimiothérapie localement. Récemment, un essai de phase I/IIa a évalué l'efficacité d'un système implantable délivrant des **ultrasons pulsés** en situation de récidive de glioblastome (Carpentier et al., 2016) associé à une chimiothérapie par carboplatine. Il n'y a pas de résultats oncologiques ni de pharmacocinétique interprétables mais une évaluation de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par IRM a confirmé les résultats précliniques positifs.

VII. PARTICULARITES DU SUJET AGE (>70 ANS)

Dans les pays occidentaux, environ la moitié des patients atteints de glioblastome ont plus de 65 ans et plus d'un quart sont âgés de 70 ans ou plus. En 2050, il y aurait une augmentation de 238% de la population des >65 ans (Reardon, 2012). La prise en charge des patients >70 ans atteints de glioblastome occupe donc une place centrale et grandissante dans nos pays. Cependant, il n'y a aucun standard thérapeutique pour cette tranche de population. Le traitement standard (i.e. radio/chimiothérapie concomitante et chimiothérapie adjuvante par

témozolomide) n'a pas démontré de bénéfice significatif pour le sous-groupe des >65 ans, mais cette analyse n'était pas prévue dans l'essai (Stupp et al., 2005). Il existe des données issues d'études rétrospectives (Brandes et al., 2009; Sijben et al., 2008) et d'une étude prospective non randomisée (Minniti et al., 2008) suggérant l'efficacité du traitement standard chez les >70 ans. Cependant, cette attitude n'est pas universellement acceptée étant donnée l'absence d'essai randomisé. Deux essais récents ont évalué l'efficacité du témozolomide en monothérapie comparé à la radiothérapie (hypofractionnée et standard) (Malmstrom et al., 2012; Wick et al., 2012) chez le sujet âgé. Les 2 études concluent à la supériorité du témozolomide en monothérapie lorsque MGMT est méthylée, et à celle de la radiothérapie hypofractionnée lorsque MGMT n'est pas méthylée.

Sur la base des résultats des études menées chez le sujet âgé (>70 ans), différents auteurs proposent la prise en charge suivante (Arvold and Reardon, 2014; Bauchet et al., 2014; Holdhoff and Chamberlain, 2013):

- pour les patients avec un bon état général (KPS ≥60-70 et une évaluation gérontologique favorable), proposition d'exérèse tumorale la plus complète possible (supériorité par rapport à la biopsie) et de traitement adjuvant soit par le traitement standard, soit par le traitement standard avec radiothérapie hypofractionnée (34 Gy en 10 fractions, ou 40 Gy en 15 fractions, ou 50 Gy en fractions de 1,8 Gy), soit par témozolomide en monothérapie si le promoteur de MGMT est méthylé, soit par radiothérapie hypofractionnée seule si MGMT n'est pas méthylée.

- pour les patients avec un état général précaire (KPS <60), 3 options peuvent être discutées : soins de support, témozolomide seul ou radiothérapie hypofractionnée seule.

Il apparaît donc que l'âge n'est plus un facteur à considérer isolément pour la prise de décision, d'autres critères tels que l'évaluation gérontologique et le statut du promoteur de MGMT semblent être incontournables. La prise en charge des sujets âgés doit donc être faite

de manière collégiale et personnalisée, et dépends également des préférences du patient et de son entourage.

VIII. SOINS DE SUPPORT

Les soins de support sont une option à privilégier si la lésion est volumineuse et non réséquable, ou si elle est plurifocale, chez des patients dont l'indice de Karnofsky est < 50. Ils visent à maintenir une qualité de vie et à soutenir la famille et les aidants. La prise en charge est pluridisciplinaire, faisant intervenir le médecin traitant, l'oncologue, le médecin de soins palliatifs, psychologue, kinésithérapeute, psychomotricien, assistante sociale.

IX. SUIVI

Pendant toute la phase de traitement, le suivi clinico-biologique est assuré par l'oncologue et/ou le radiothérapeute, et/ou le neurochirurgien, selon les habitudes de chaque centre et des pays, et de plus en plus, de manière multidisciplinaire. A la fin du traitement par radiothérapie, un suivi clinico-remnologique régulier est nécessaire, en général tous les 3 mois (Weller et al., 2014). Dans 20 à 30% des cas, l'IRM réalisée au décours de la radiothérapie associée au témozolomide montre une majoration des dimensions de la lésion sur les séquences injectées, susceptible de s'amender spontanément dans les semaines suivantes. Ce phénomène est décrit sous le terme de « pseudo-progression ». Il s'agit le plus souvent d'une "aggravation" de l'imagerie contrastant avec une stabilité clinique. De fait, les groupes de travail (RANO et ANOCEF) recommandent de ne pas réaliser d'imagerie dans les 12 semaines qui suivent la fin de la radiothérapie, ou de ne pas interpréter ces modifications des prises de contraste de la zone irradiée comme une évolution tumorale.

Pour évaluer la réponse thérapeutique, les critères RANO (Wen et al., 2010) distinguent (Tableau 4) :

- les critères cliniques : état neurologique (amélioration, stabilité, aggravation), tolérance, dose de corticoïdes (sevrage, diminuée, stable, augmentée), qualité de vie.

les critères IRM : intérêt de la volumétrie, évolution de la prise de contraste dans les 2
 dimensions (disparition, diminution < 50%, stabilité, augmentation > 25%) et de l'hypersignal
 T2/FLAIR, apparition de nouvelles lésions. En fonction de l'évolution de ces critères, les
 réponses sont classées en réponse complète, réponse partielle, stabilité ou progression.

Réponse	Complète	Partielle	Progression
Clinique	Stable/amélioration	Stable/amélioration	Aggravation
Corticoïdes	+	+	<i>OU</i>
	0 mg	Stable/diminution	Stable/augmentation
IRM T1+	+	+	<i>OU</i> Nouvelle
	Disparition PDC	Réduction>50%	PDC/majoration>25%
IRM T2/FLAIR	+	+	<i>OU</i>
	Stable/amélioration	Stable/amélioration	Majoration

Tableau 4. Critères RANO clinico-radiologiques de réponse au traitement (Wen et al., 2010).

X. RECIDIVE

1. Généralités

Il n'y a pas de consensus concernant la prise en charge de la récidive (Weller et al., 2014). La décision doit être discutée en RCP et se base en général sur les traitements déjà reçus par le patient, son âge, son état général (KPS), le délai de récidive et son aspect en imagerie.

2. Diagnostics différentiels

Il est tout d'abord nécessaire de différencier une récidive tumorale d'une pseudoprogression, ou d'une radionécrose, qui sont les 2 diagnostics différentiels principaux. La pseudo-progression survient habituellement dans les 12 semaines qui suivent la fin de la radiothérapie et évolue favorablement (Sanghera et al., 2010; Taal et al., 2008). La radionécrose, qui survient dans 7,1 à 9,3% des cas après radio-chimiothérapie concomitante (Brandes et al., 1998; Ruben et al., 2006), est parfois difficile à différencier d'une progression tumorale, tant sur le plan clinique que radiologique. Il s'agirait d'un dysfonctionnement des cellules endothéliales avec augmentation de la perméabilité capillaire et de l'œdème extracellulaire, dans un contexte d'inflammation chronique (Yoshii, 2008). Le délai médian de survenu serait de 11 mois (Tye et al., 2014). L'IRM de perfusion et la spectroscopie sont considérées comme des outils intéressants mettant en évidence une hypoperfusion (baisse du rCBV) et une baisse du NAA et de la choline. La TEP-TDM au 18FDG ou plus récemment à la 18F-DOPA peut aider au diagnostic (hypofixation de la radionécrose). Toutefois ces examens manquent de sensibilité et de spécificité, en partie car il peut exister d'authentiques récidives tumorales au sein de lésions de radionécrose (Brandes et al., 2008). Le traitement standard de la radionécrose est la corticothérapie à fortes doses (Telera et al., 2013). Les antiagrégants plaquettaires, l'anticoagulation et l'oxygénothérapie hyperbare n'ont pas démontré d'efficacité significative. La chirurgie d'exérèse peut-être une solution si la symptomatologie est évolutive et après échec de la corticothérapie (McPherson and Warnick, 2004). Plusieurs séries avec de petits effectifs semblent suggérer un effet radiologique et clinique du bévacizumab chez plus de la moitié des patients (Levin et al., 2011; Tye et al., 2014).

3. Prise en charge de la récidive

La première option à discuter chez des patients sélectionnés est celle d'une **nouvelle** chirurgie d'exérèse (Chaichana et al., 2013) (figure 4). Les considérations sur l'étendue d'exérèse sont les mêmes que lors d'une première chirurgie (Oppenlander et al., 2014; Quick et al., 2014).



Figure 4. Glioblastome récidivant multi-opéré. Glioblastome initialement temporal droit récidivant une 1^{ere} fois en temporo-occipital, re-opéré, et une 2^{eme} fois en pariéto-occipital, une nouvelle fois re-opéré.

La chimiothérapie *in situ* par **implants de carmustine** est une option à discuter en fonction des habitudes de chaque centre et des conditions opératoires (Brem et al., 1995; Lombardi et al., 2014) et *a priori* pour une exérèse macroscopiquement complète ou subtotale.

Le rôle d'une **nouvelle irradiation** est discuté au cas par cas devant le risque de radionécrose. Différents protocoles avec de multiples fractionnements ont été proposés, de 6 doses de 5 Gy à 18 doses de 2 Gy (Fogh et al., 2010; Grosu et al., 2005).

En l'absence de consensus sur la **chimiothérapie** à la récidive, les schémas thérapeutiques sont variables selon les centres. Globalement, 3 stratégies médicales peuvent être proposées en cas de récidive de glioblastome (recommandations EANO (Weller et al., 2014)) :

- une chimiothérapie contenant un **nitrosourée** : fotémustine IV, carmustine IV, bélustine per os. Le taux de réponse est en général faible (entre 10 et 25%) et la toxicité hématologique et pulmonaire est importante (de 20% à 40%) (Addeo et al., 2011; Fabrini et al., 2009).

- reprise du **témozolomide** soit à dose standard, soit sous forme intensifiée (Easaw et al., 2011; Perry et al., 2010; Wick et al., 2007). Cette option parait intéressante lorsque la récidive survient après un délai conséquent après l'arrêt du témozolomide adjuvant.

- le **bévacizumab** en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie anticancéreuse (irinotécan, lomustine ou autre). Des études ont rapporté un meilleur taux de réponse (environ 50%) et une prolongation de la survie sans progression à 6 mois (de 19% à 50%) chez les patients traités par bévacizumab, seul ou en association, par rapport aux contrôles historiques sans bévacizumab (Chamberlain and Johnston, 2010; Friedman et al., 2009).

Un essai de phase II multicentrique réalisé aux Pays-Bas (BELOB, (Taal et al., 2014)) a comparé la survie globale à 9 mois de patients traités pour un glioblastome récidivant après traitement standard, répartis dans 3 bras de traitement : bevacizumab seul, lomustine seule, association des 2 (avec des doses progressives de lomustine). La combinaison bevacizumab+lomustine (110 mg/m²) semblait la plus efficace et a été retenu pour évaluation dans un essai de phase III.

45

Par ailleurs, une étude récente de phase II du groupe Italien de Neuro-Oncologie (AINO) n'a pas réussi à démontrer la supériorité d'un traitement combiné bévacizumab+fotémustine par rapport au bévacizumab en monothérapie (Soffietti et al., 2014). Ces résultats sont concordants avec d'autres études rétrospectives (Chamberlain and Johnston, 2010; Raizer et al., 2010), suggérant l'utilisation préférentiellement du bévacizumab en monothérapie. Le bévacizumab est également reconnu pour le contrôle des symptômes neurologiques et son effet d'épargne de la corticothérapie significatif (Weller et al., 2014). L'évaluation de la réponse au bévacizumab est difficile car les réponses cliniques et en imagerie ne sont pas systématiquement corrélées. L'imagerie surestime la réponse au traitement anti-angiogénique en montrant une diminution de la prise de contraste, en rapport avec la diminution de la perméabilité capillaire, alors que l'infiltration tumorale peut ne pas être prise en compte dans l'évaluation. Il est donc nécessaire d'utiliser des critères de réponse radiologique qui prennent en compte l'hypersignal T2/FLAIR (RANO ou RECIST+F, (Gallego Perez-Larraya et al., 2012)).

XI. LA REUNION DE CONCERTATION PLURIDISCIPLINAIRE (RCP), LE DISPOSITIF D'ANNONCE, ET LE PARCOURS DE SOINS EN CANCEROLOGIE (DAPS)

Le plan cancer 2003-2007 a eu pour objectif de mettre en place les RCP (mesure 31) et le dispositif d'annonce du cancer (mesure 40) (Paquis and Menei, 2010).

la RCP de neuro-oncologie réunit tous les professionnels concernés (neurochirurgiens, neuro-oncologues et/ou, oncologues médicaux, radiothérapeutes, neuroradiologues, neuropathologistes, généticiens...) de façon périodique mais régulière (ex: 1/semaine).
 L'objectif est d'analyser les dossiers des patients et de définir les indications thérapeutiques en se rapportant à un référentiel de prise en charge, régional ou national. Ce référentiel est

basé recommandations sociétés sur les des savantes (ex : http://www.anocef.org/download.php?modele=anocef_referentiels) et doit être validé par le groupe constituant la RCP. L'ensemble des avis est formalisé par l'élaboration d'une fiche individuelle de RCP qui propose la démarche diagnostique ou thérapeutique. Cette fiche est systématiquement adressée au médecin traitant référent du patient. Dans le cadre de la neurooncologie, il faudrait en principe analyser le dossier à plusieurs reprises : une première fois pour définir l'indication chirurgicale (biopsie vs. exérèse, ou abstention thérapeutique), une 2^{eme} fois après confirmation histologique pour définir le programme thérapeutique, et pour tous les événements significatifs ultérieurs (récidive, poursuite évolutive, effets secondaires graves, etc...). En pratique, et du fait de certaines situations d'urgence, de nombreux patients sont opérés sans passer par la RCP.

- le DAPS repose sur 2 grands principes (i) l'information adaptée au patient. Tout patient atteint d'un cancer doit pouvoir bénéficier, au début de sa maladie, et/ou en cas de récidive, d'un dispositif d'annonce organisé. Tout établissement traitant des patients pour un cancer doivent mettre en place ce dispositif ; (ii) la coordination interprofessionnelle et la communication relationnelle avec le patient et ses proches. Le plan cancer 2009-2013 a renforcé le dispositif d'annonce et avait pour objectif de personnaliser la prise en charge du malade (parcours personnalisé de soins) et de renforcer le rôle du médecin traitant.

XII. CONSULTATION D'ONCOGENETIQUE

Bien que rares, les syndromes de susceptibilité héréditaire aux cancers et en particulier aux glioblastomes doivent être connus du clinicien pour pouvoir les dépister (voir chapitre *Facteurs de risque*). Ils peuvent être évoqués devant une présentation tumorale « atypique », une histoire personnelle évocatrice, ou des antécédents chez des apparentés du 1° et 2° degré

de cancers ou de maladie génétique (Almairac et al., 2010). Une consultation spécialisée d'oncogénétique doit être proposée au patient dès lors qu'une susceptibilité héréditaire aux tumeurs est suspectée.

Les intérêts d'une prise en charge oncogénétique sont multiples : pour le patient puisque l'histoire naturelle de ces tumeurs peut être différente de celles apparaissant de façon sporadiques, pouvant influencer la nature de l'information apportée, les choix thérapeutiques, le suivi et le dépistage d'autres cancers associés; pour évaluer le risque d'atteinte chez les apparentés et le risque de transmission à la descendance par le conseil génétique; à titre scientifique afin de mieux documenter et comprendre l'implication de certains gènes et les conséquences de leur mutation dans la gliomagénèse.

XIII. CONCLUSION

1. Synthèse

En pratique clinique, principalement 2 situations sont individualisées : les patients pour lesquels une exérèse complète/subtotale a pu être réalisée et ceux qui ont eu une biopsie/exérèse partielle. Les patients du premier groupe ont une survie globale significativement augmentée dans la plupart des études par rapport à ceux du deuxième groupe (15,8 mois vs. 9,4 mois (Stupp et al., 2005)), ainsi qu'un taux de survivants à 5 ans supérieur (10% vs. 5,2% (Stupp et al., 2009)). Il est donc important de proposer au patient une exérèse aussi large que possible dans des conditions de sécurité suffisantes, en s'aidant notamment des techniques opératoires récentes. La biopsie ne doit être réservée qu'aux patients inopérables pour des raisons de co-morbidités ou pour lesquels une exérèse satisfaisante n'est pas envisageable (gliomatose, plurifocalité, atteinte profonde). La chimiothérapie par témozolomide concomitante puis adjuvante à la radiothérapie a également permis d'améliorer la survie des patients de façon significative, surtout lorsque le promoteur

de MGMT est méthylé. La prise en charge du sujet âgé est conditionnée par son état général, sa comorbidité et la présence ou non de cette méthylation. La recherche des mutations génétiques et épigénétiques est devenue incontournable et permet dans certaines situations d'adapter le traitement. Un suivi clinico-remnologique régulier est nécessaire pour détecter suffisamment tôt la récidive/poursuite évolutive. Il n'y a pas de consensus sur le traitement de la récidive. Une nouvelle intervention chirurgicale est la première option à discuter. Toutes les décisions doivent être prises de manière collégiale en RCP afin de proposer au patient un programme de soins personnalisé.

2. Analyse récursive par répartition (RPA) des glioblastomes

Les facteurs pronostiques ont une valeur prédictive supérieure lorsqu'ils sont rassemblés et permettent de répartir les patients en sous-groupes dont les survies respectives sont significativement différentes. C'est la méthode d'analyse récursive par répartition (RPA). A partir des données de plusieurs essais sur des gliomes malins du Groupe de Radiothérapie Oncologique américain (RTOG), 6 classes pronostiques ont été identifiées (Curran et al., 1993). Les glioblastome sont classés dans les groupes III à VI, dont les pronostics sont de plus en plus péjoratifs. Par la suite cette classification a été simplifiée (Li et al., 2011). En 2006, l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (EORTC) a proposé une classification similaire (**Tableau 5**) établie sur 573 patients traités par le protocole standard radio-chimiothérapie concomitante par témozolomide (Mirimanoff et al., 2006).

En pratique clinique, ces classifications RPA permettent d'estimer grossièrement l'espérance de survie médiane d'un patient donné et d'éventuellement adapter la prise en charge thérapeutique. Les patients appartenant aux classes RPA III et IV bénéficieraient d'un traitement adjuvant agressif, contrairement à ceux appartenant aux classes RPA les plus péjoratives (V et VI) (Mirimanoff et al., 2006). Toutefois, il s'agit d'une évaluation globale, basée sur des critères cliniques (âge, KPS ou PS, MMS) et opératoires (résection
complète/subtotale ou biopsie), qui ne prennent pas en compte les données biologiques récentes (statut MGMT, IDH1) permettant de mieux appréhender le pronostic individuel des patients. Plus récemment une classification RPA a été proposée pour les patients âgés (>70 ans) (Scott et al., 2012) mais elle n'intègre pas les comorbidités ni l'évaluation gériatrique.

	RPA Classes					
	III	IV	V			
Critères	Age<50 PS=0	Age<50 et PS=1-2 ou Age≥50 et R+ et MMS≥27	Age≥50 et R- ou MMS<27			
Survie médiane (mois)	17	15	10			
Taux de survie à 2 ans (%)	32	19	11			

Tableau 5. Analyse récursive par répartition de l'EORTC (Mirimanoff et al., 2006)

3. Particularités des longs survivants

La proportion de longs survivants (>3 ans) semble avoir augmentée depuis l'avènement du protocole radio-chimiothérapie concomitante et adjuvante par témozolomide (Stupp et al., 2009). Dans l'étude de phase III de l'EORTC, les taux de longs survivants dans le groupe radio-chimiothérapie concomitante et adjuvante par témozolomide était significativement supérieurs à ceux du groupe radiothérapie (Stupp et al., 2009). Ils étaient de 16% à 3 ans, de 12,1% à 4 ans, et de 9,8% à 5 ans. Le facteur prédictif principal identifié par les auteurs était la méthylation du promoteur de MGMT. Une étude collaborative allemande portant sur 55 patients « longs survivants » a identifié les facteurs prédictifs suivants : âge jeune (médiane dans cette étude de 51 ans), bon état général (KPS médian = 80) et méthylation du promoteur de MGMT. Tous les patients de l'étude ont eu une exérèse complète, ils ont tous été traités par radiothérapie, et 65% ont eu au moins une ligne de chimiothérapie. Il est intéressant de

noter que 45% des patients ont été opérés 2 fois, et 22% trois fois (Krex et al., 2007). Une étude transcriptomique récente sur 7 longs survivants (>4 ans) a retrouvé une méthylation de MGMT chez 71% des patients, mais aucune mutation IDH1/2. Les auteurs concluaient que la mutation IDH1 est un facteur pronostic favorable à court terme mais pas pour les longs survivants (Gerber et al., 2014). D'autres signatures moléculaires non identifiées pour le moment doivent être caractéristiques de ce sous-groupe de patients.

B. GLIOBLASTOMES : ALTERATIONS CYTOGENETIQUES, ONCOGENESE ET MICROENVIRONNEMENT

I. VOIES DE PROGRESSION DES GLIOMES

Parmi les glioblastomes, deux entités se distinguent : les glioblastomes primaires ou *de novo* et les glioblastomes secondaires.

Les glioblastome primaires représentent plus de 90% des cas de glioblastome. Ils se développent chez des sujets souvent âgés de plus de 60 ans, se caractérisent par une histoire clinique courte (<3 mois) sans notion antérieure de gliome de grade inférieur. A l'inverse, les glioblastomes secondaires sont rares (<10%) et résultent de la transformation d'un gliome de plus bas grade. Les patients atteints sont plus jeunes, en moyenne 45 ans et l'histoire clinique est plus longue. Leur pronostic est meilleur que celui des glioblastomes primaires. Ces deux types de glioblastome présentent des anomalies moléculaires différentes (figure 5) (Louis et al., 2007):

- Les glioblastome primaires présentent une amplification d'*EGFR* dans environ 40% des cas et des mutations de *PTEN* dans 25% des cas, alors que les mutations de *p53* sont plus rares.

- Les glioblastome secondaires présentent fréquemment des mutations de *p53* (65%) alors que les mutations de *PTEN* sont rares (4%) ainsi que l'amplification d'*EGFR* (8%).

- En revanche, les 2 types de glioblastome ont en commun des altérations du chromosome 10 (60%) : perte totale ou partielle du 10p ou du 10q.

La voie de progression des **astrocytomes** de grade II puis III est caractérisée par la présence précoce de mutations de *p53* et d'une boucle autocrine PDGF/PDGFR. L'évolution vers l'astrocytome anaplasique se fait par l'acquisition de délétions ou de mutations de

52

p16/CDKN2A. La progression vers le glioblastome secondaire est marquée par la survenue de délétions du chromosome 10q.

La voie des **oligodendrogliomes** est caractérisée par la présence à un stade précoce de codélétion 1p19q. On retrouve également une boucle autocrine PDGF/PDGFR. La transformation en oligodendrogliome anaplasique s'accompagne de la perte 10q, de l'inactivation de p16/CDKN2A, de RB1 et de p53.

Les oligo-astrocytomes présentent soit des anomalies d'astrocytomes (mutations de *p53*, délétion du 10 et gain du chromosome 7) soit des anomalies d'oligodendrogliomes (codélétion 1p19q). Cette notion de gliome mixte est actuellement remise en question (voir chapitre *Anatomopathologie et biologie moléculaire*).

Récemment, il a été montré que les mutations d'*IDH1* étaient fréquentes dans les glioblastomes secondaires alors qu'elles étaient rares dans les glioblastomes primaires, confirmant encore l'existence de deux voies de progression distinctes (Parsons et al., 2008). La présence fréquente de ces mutations d'*IDH1* dans les gliomes de grade II et III, qu'ils soient de type astrocytaire, oligodendroglial ou mixte, suggère que ces gliomes partageraient avec les glioblastomes secondaires, un précurseur commun *IDH1* muté. Cette hypothèse est renforcée par l'étude de Watanabe *et al.*, qui a montré, sur des biopsies itératives, que les mutations d'*IDH1* précédaient l'apparition des mutations de *p53* ou la codélétion 1p19q dans les gliomes de bas grade (Watanabe et al., 2009). Les mutations d'*IDH1* sont donc des anomalies précoces, qui se produiraient dans un précurseur glial commun. C'est suite à l'accumulation d'autres anomalies moléculaires (mutations de *p53* et codélétion 1p19q) que les gliomes de bas grade acquerraient un phénotype astrocytaire, oligodendroglial ou mixte (Figarella-Branger et al., 2010; Riemenschneider et al., 2010).



Figure 5. Voies génétiques et moléculaires de progression des gliomes (Riemenschneider et al. 2010).

Plus récemment, le Cancer Genome Atlas Research Network (CGARN) a analysé les altérations génomiques les plus fréquentes des gliomes diffus, permettant de mieux comprendre les anomalies moléculaires qui surviennent au cours de la gliomagénèse et ainsi d'optimiser la classification des gliomes (voir chapitre *anatomopathologie et biologie moléculaire*) (Brat et al., 2015). Ils ont réalisés, sur 293 gliomes de grade II et III, des analyses exhaustives du génome incluant l'ensemble des exons (régions codantes), le nombre de copie ADN, la méthylation de l'ADN, l'expression des ARN messagers, l'expression des micro-ARN, et l'expression de protéines ciblées. Des tests de corrélation ont été réalisés entre

ces données biologiques et les données cliniques. Ainsi, 3 groupes distincts de gliomes II et III ont été identifiés sur la base des mutations de *IDH*, de *TP53*, et de la codélétion 1p19q. Les patients atteints de gliomes mutés *IDH* et codélétés 1p19q étaient ceux au pronostic le plus favorable, suivis de ceux *IDH* mutés mais sans la codélétion 1p19q. Par contre les patients avec des gliomes *IDH* non mutés avaient un pronostic équivalent à ceux atteints de glioblastomes. De façon intéressante, 96% des gliomes *IDH* muté/codélétés 1p19q avaient une mutation activatrice du promoteur de *TERT*, et les mutations de *ATRX* étaient rares dans ces tumeurs, confirmant le caractère quasi-exclusif de ces 2 voies d'allongement des télomères. Par contre les altérations de *ATRX* étaient fréquentes (86%) dans le groupe *IDH* muté/non codélété 1p19q, à l'image des mutations *TP53* (94%) entrainant une perte de fonction de p53. D'autres altérations moléculaires (activatrices ou inhibitrices) ont été associées à ces 3 groupes de gliomes, et sont résumées dans la **figure 6**.



Figure 6. Principales altérations moléculaires et présentations cliniques correspondantes d'après les données du CGARN

II. ALTERATIONS CYTOGENETIQUES DANS LES GLIOMES

De nombreuses altérations cytogénétiques ont été retrouvées dans les gliomes, les plus fréquentes étant des délétions de 1p, 9p, 10p et 10q, 13q, 17p, 19q, 22q et des gains sur le chromosome 7 (Rasheed et al., 1999; Smith et al., 2000). La fréquence des altérations augmente au fur et à mesure de la progression tumorale et de l'acquisition de caractères d'agressivité (grade II à IV) (Rasheed et al., 2002). Certaines de ces altérations chromosomiques ont été associées à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou à l'activation de proto-oncogènes appartenant à des voies impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (pour revue (Rasheed et al., 1999)).

A noter que les délétions en **1p et/ou 19q** sont bien plus rares dans les glioblastomes (0 à 19%) que dans les oligodendrogliomes (Batchelor et al., 2004; Fontaine et al., 2008). Aucune étude n'a pu mettre en évidence de relation significative entre le statut 1p ou 19q et la survie ou la chimiosensibilité dans les glioblastomes (Batchelor et al., 2004; Houillier et al., 2006).

III. DEREGULATION DU CYCLE CELLULAIRE

Le développement des gliomes résulte d'une prolifération incontrôlée de cellules d'origine gliale. La prolifération cellulaire tumorale est en grande partie due au fait que les cellules tumorales ont acquis des altérations génétiques qui leur permettent d'échapper aux points de contrôle du cycle cellulaire. L'abrogation des points de contrôle du cycle cellulaire peut résulter, soit d'une expression aberrante de régulateur positifs (proto-oncogènes), soit d'une perte d'expression de régulateurs négatifs (suppresseurs de tumeurs) (Dirks et al., 1997).

1. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se compose, avant la mitose, d'une phase G1 (croissance cellulaire et synthèse des composants nécessaires à la future division) puis d'une phase S (synthèse et réplication de l'ADN), et d'une phase G2 (vérification de la réplication correcte de l'ADN avant division). Un premier point de contrôle sert à s'assurer en fin de phase G1, que les facteurs extrinsèques nécessaires à la division cellulaire sont bien réunis (présence suffisante de facteurs de croissance, d'acides aminés, adhérence correcte à la matrice extracellulaire, ...) (Dirks and Rutka, 1997). Un deuxième point de contrôle vérifie en phase G2 l'absence d'erreur de réplication de l'ADN.

La progression de la cellule à travers ce cycle est contrôlée par des protéines kinases dont l'activité est dépendante de cyclines (CDK). Les complexes CDK-cyclines agissent en phosphorylant des substrats intervenant dans les différentes phases du cycle. Certains gènes suppresseurs de tumeur codent pour des protéines qui inhibent la formation de ces complexes, freinant ainsi la croissance cellulaire. On distingue 2 grandes familles : la famille p21/p27/p57 inhibe plusieurs complexes cycline-CDK, la famille p16/p15/p18/p19 inhibe spécifiquement les complexes cycline-CDK4 ou CDK6.

Dans un cancer, ces points de contrôle ne fonctionnent plus, soit par surexpression des régulateurs positifs (cyclines et CDK), soit par inactivation des régulateurs négatifs. Parmi ces régulateurs négatifs, la protéine p21 peut être inactivée par différents mécanismes dont la perte de fonction de p53, qui en active la transcription. D'autres régulateurs négatifs comme p16^{INK4A} (multiple tumor suppressor/CDKN2) ou RB (protéine du gène suppresseur de rétinoblastome) peuvent être inactivés par délétion ou mutation (**figure 7**)

En conséquence, la cellule devient incapable de réagir aux signaux externes ou internes qui contrôlent sa croissance, ce qui entraîne une prolifération cellulaire aberrante et l'accumulation d'altérations génétiques.



Figure 7. Voies de contrôle du cycle cellulaire impliquées dans l'oncogénèse des gliomes.

2. Altérations de la voie p53/p21/MDM2/p14^{ARF}

La voie p53/p21/MDM2/p14^{ARF} est altérée dans 87% des glioblastomes (Parsons et al., 2008).

Le gène suppresseur de tumeur **TP53**, situé en 17p31, est considéré comme le « gardien du génome », et coordonne une série complexe de processus en réponse à des lésions de l'ADN. Après lésion de l'ADN, l'accumulation de la protéine p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire et active la transcription de multiples gènes cibles, comme p21, ou BAX (Bates et al., 1999) aboutissant à la mort cellulaire programmée. L'inactivation de p53, retrouvée dans de nombreux cancers, peut résulter d'une délétion en 17p, d'une mutation inactivatrice du gène *TP53* ou d'autres mécanismes d'inactivation post-traductionnelle, comme une augmentation de la dégradation de la protéine p53 ou sa séquestration cytoplasmique, notamment par interaction avec la protéine MDM2 (Murine Double Minute 2). Le gène *MDM2* est amplifié

dans 10% des glioblastomes primaires, principalement ceux sans mutation de *TP53*, et constitue un mécanisme alternatif à l'inactivation de cette voie dans le contrôle du cycle. Une perte d'hétérozygotie (LOH) du chromosome 17p est souvent associée à une mutation de *TP53* sur le second allèle. L'inactivation de p53 est un événement précoce et fréquent (environ 60%) dans les astrocytomes et les glioblastomes secondaires mais plus rare dans les glioblastomes primaires (10-30%) (Kraus et al., 1994). De nombreuses études expérimentales suggèrent l'implication de p53 dans la genèse des gliomes (Louis et al., 2007). Par ailleurs, la présence d'une mutation germinale de *TP53* (syndrome de Li-Fraumeni) prédispose au développement de tumeurs gliales.

La perte de fonction de p53, quel qu'en soit le mécanisme, entrainerait une augmentation de l'instabilité génomique, et accélèrerait la progression néoplasique. P53 semble donc jouer un rôle à la fois dans la formation des gliomes de bas grade et dans leur dégénérescence en glioblastome secondaire. La mutation du gène *TP53* ne constitue pas un facteur diagnostic et pronostic pertinent dans les glioblastomes (Ohgaki and Kleihues, 2005).

Les protéines $p14^{ARF}$ et p21 sont respectivement des produits du locus *CDKN2A* et *CDKN1A*. La liaison de la protéine $p14^{ARF}$ avec la protéine MDM2 induit une stabilisation des protéines MDM2 et p53, alors que p21 se lie et inhibe plusieurs complexes cycline-CDK. Une inactivation de $p14^{ARF}$, généralement par délétion, est retrouvée dans de nombreux glioblastomes (Newcomb et al., 2000), principalement ceux sans mutation de *TP53* (Fulci et al., 2000). Une augmentation de l'expression de p21 est retrouvée dans certains gliomes malins (Louis et al., 2007). Ces altérations représentent un mécanisme alternatif à l'inactivation de cette voie.

3. Altérations de la voie p16^{INK4a}/CDK4/RB1

Les altérations de la **voie p16^{INK4a}/CDK4/RB1** concernent 78% des glioblastomes (Parsons et al., 2008).

Les gènes *CDKN2A* et *CDKN2B*, situés en 9p21, codent respectivement pour les protéines **p16^{INK4a}** et **p15^{INK4b}**, qui inhibent la formation des complexes cycline-CDK4/CDK6 et la phosphorylation de la protéine RB1 (Louis et al., 2007). Leur surexpression entraîne l'arrêt du cycle cellulaire. Dans les gliomes, leur inactivation résulte dans la majorité des cas d'une délétion homozygote, retrouvé dans 33% des glioblastomes et 24% des astrocytomes anaplasiques (Rasheed et al., 1999). D'autres mécanismes, comme des mutations ou l'hyperméthylation des îlots CpG dans les régions promotrices (Louis et al., 2007) peuvent expliquer le défaut d'expression de p16, observé dans 50% des astrocytomes anaplasiques (Collins, 1999).

Les gènes *CDK4* et *CDK6*, situés respectivement en 12q13-14 et 7q2122, ont un rôle de proto-oncogènes. Leur surexpression a des effets similaires à la perte de p 16^{INK4a} . *CDK4* ou *CDK6* sont amplifiés dans 15% des gliomes de haut grade (Louis et al., 2007).

L'amplification de *CDK4/6* représente donc un autre mécanisme pour l'inactivation de cette voie de contrôle du cycle cellulaire.

Le gène suppresseur du rétinoblastome *RB1*, situé sur 13q14, code pour une protéine qui forme un complexe avec le facteur de transcription E2F. L'absence de protéine RB1 fonctionnelle augmente le taux de E2F libre et favorise la prolifération cellulaire. Comme dans de nombreux autres cancers, une perte de RB1 a été retrouvée dans les gliomes, principalement de haut grade, soit par mutation du gène (14%), soit par hyperméthylation de son promoteur (40%) (Smith and Jenkins, 2000).

Les altérations de ces différents gènes sont généralement exclusives les unes des autres, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas retrouvées au sein d'une même tumeur (Hill et al., 1999), ce qui suggère que l'altération de l'un de ces acteurs est suffisante pour inactiver cette voie de contrôle du cycle et favoriser la prolifération cellulaire.

IV. ALTERATIONS DES VOIES DES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE

Les voies de signalisation impliquant des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), en particulier EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) et FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), aboutissent à la prolifération cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose, et favorisent la migration cellulaire. Les récepteurs sont activés par la fixation de leurs ligands (EGF et TGF α pour EGFR, PDGF pour PDGFR) permettant le recrutement de la PI3K (phosphatidyl-inositol 3-kinases) à la membrane plasmique, ou encore l'activation de RAS, déclenchant ainsi deux grandes voies de signalisation : la voie PI3K/AKT et la voie RAS/RAF/MAPK (**figure 8**).

L'activation de PI3K va induire la phosphorylation de la phosphatidil-inositol-4-5 biphosphonate (PIP2) en PIP3, avec pour conséquence l'activation de la voie AKT. Cette voie est inhibée par la protéine PTEN. La voie des MAPK, quant à elle, peut être inhibée par la neurofibromine 1 (NF-1). PTEN et NF1 agissent donc comme des suppresseurs de tumeur (voir pour revue (Nakada et al., 2011)).

Les gliomes peuvent présenter une dérégulation de ces voies, soit par activation des protooncogènes (RTK, PI3K, AKT, RAS, MAPK) soit par perte des suppresseurs de tumeur (PTEN ou NF1).

61



Figure 8. Voies de signalisation des récepteurs tyrosine kinase (Nakada et al. 2011)

1. Altérations des récepteurs tyrosine kinase

EGFR est un RTK trans-membranaire appartenant à la famille ErbB. Son activation par ses ligands EGF ou TGF α active des protéines kinases comme les mitogen-activated kinases (MAPkinases) et les PI-3 kinases, ce qui favorise la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, l'invasion tumorale et l'angiogénèse tumorale. Le gène *EGFR* est situé en 7p, région chromosomique dont le gain est fréquent dans les gliomes. Parmi les altérations des RTK, l'amplification de *EGFR* est la plus fréquente, retrouvée dans 40% des glioblastomes, principalement les glioblastomes primaires, sous forme d'éléments double-minute extrachromosomiques (Louis et al., 2007; Ohgaki, 2005). Fréquemment, les glioblastomes surexpriment également les ligands de l'EGFR, à l'origine d'une boucle stimulatrice autocrine et/ou paracrine, favorisant davantage les mécanismes d'activation en aval.

Dans 30-50% des glioblastomes avec amplification d'*EGFR*, il existe aussi des réarrangements du gène aboutissant à une forme mutante de EGFR, appelée EGFRvIII ou deltaEGFR (Ohgaki, 2005; Rasheed et al., 1999). Cette forme mutante possède un seuil de phosphorylation inférieur à celui de la protéine sauvage, et un pouvoir de prolifération et d'invasion accru.

L'amplification d'*EGFR* est fréquemment associée à une perte du chromosome 10, et des délétions et/ou mutations dans le gène *CDKN2A*. L'amplification d'*EGFR* est en revanche rarement associée à une mutation de *TP53* et ces deux voies de progression tumorale semblent exclusives l'une de l'autre.

En pratique clinique, l'intense expression d'EGFR en immunohistochimie a une valeur diagnostic importante pour les gliomes infiltrants, y compris de haut grade de malignité, avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 100% (Burel-Vandenbos et al., 2013). Le caractère pronostic de l'expression ou de l'amplification d'EGFR a fait l'objet de controverses. Les premières études sur le sujet étaient en faveur d'un plus mauvais pronostic pour les formes surexprimées (Shinojima et al., 2003). D'autres travaux plus récents démontraient une relation entre l'âge et l'amplification d'EGFR. Elle serait un facteur de bon pronostic pour les patients de > 60 ans, et de mauvais pronostic pour les sujets jeunes (Batchelor et al., 2004).

Le facteur de croissance **PDGF** est d'importance majeure pour les cellules gliales, et est impliqué dans le développement du système nerveux et la différenciation de ces cellules. Le PDGF et son récepteur PDGFR sont surexprimés dans les gliomes, ce qui suggère la présence d'une boucle activatrice auto et paracrine (Hermanson et al., 1992). Cette surexpression semble être un événement précoce dans le développement tumoral puisqu'elle est retrouvée dans des astrocytomes et des oligodendrogliomes de bas grade.

2. Altérations de la voie RTK/PI3K/AKT/PTEN

La délétion du chromosome 10 est l'altération cytogénétique la plus fréquemment retrouvée dans les glioblastomes (60-93% des cas) (Ransom et al., 1992). La plupart des tumeurs ont une délétion de la totalité du chromosome 10. Cependant des délétions segmentaires ont été observées et intéressent au moins 3 régions chromosomiques distinctes, ce qui suggère la présence sur ce chromosome d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur (Ohgaki, 2005). L'une de ces régions, située en 10q23, comprend le gène *PTEN*. PTEN agit comme inhibiteur de la voie PI3K/AKT (figure 9) et son inactivation résulte en une activation constitutive de cette voie (Huang et al., 2000). *PTEN* apparaît muté dans 15-40% des glioblastomes, principalement les glioblastomes primaires, et dans 50-60% des lignées tumorales gliales (Ohgaki, 2005; Ohgaki and Kleihues, 2005). Des délétions homozygotes (32%) ou une hyperméthylation du promoteur du gène peuvent également intervenir dans l'inactivation de *PTEN* mais sont plus rares.

Sur le plan clinique, aucune corrélation n'a été retrouvée entre survie et mutations ou délétions homozygotes de *PTEN* dans le cas des glioblastomes (Ohgaki and Kleihues, 2005; Rasheed et al., 2002; Schmidt et al., 2002).

Les altérations des **PI3K** jouent un rôle oncogénique majeur en dérégulant la transcription de nombreux gènes (Bader et al., 2005). La liaison des RTK avec les PI3K entraîne l'activation d'AKT. Les PI3K sont constituées de 2 sous-unités : une sous-unité catalytique, p110 codée par le gène *PI3KCA* et une sous-unité régulatrice, p85α, codée par le gène *PI3KRI*. Des mutations et des amplifications de *PI3KCA* sont rapportées dans 5% et 13% des glioblastomes primaires, respectivement, et des mutations de *PI3KRI* dans 10% des glioblastomes (Figarella-Branger et al., 2010; Parsons et al., 2008).

3. Altérations de la voie RAS/RAF/MAPK/NF1

La voie RAS/RAF/MAPK est activée par les RTK et est inhibée par la neurofibromine NF1. Son activation induit une cascade de phosphorylations activant les MAPK.

NF1 est un gène suppresseur de tumeur codant pour la neurofibromine. NF1 est un inhibiteur de RAS. Les altérations de *NF1*, par mutations ou délétions homozygotes, sont observées dans 18% des glioblastomes (Parsons et al., 2008).

Les mutations de des gènes *RAS* et *RAF* sont rares dans les glioblastomes. L'activation de la voie RAS/RAF/MAPK est fréquente dans les glioblastomes (Rao and James, 2004) et serait plutôt attribuée à une surexpression des RTK.

Au total, les altérations des voies RTK/PI3K/AKT/PTEN et RAS/MAPK/NF1 intéressent près de 90% des glioblastomes (Parsons et al., 2008).

V. MUTATIONS D'*IDH1* ET D'*IDH2*

Des mutations au niveau des gènes *IDH1* et *IDH2* (isocitrate dehydrogenase 1 et 2) ont été récemment identifiées, intéressant respectivement les codons 132 et 172. Ces mutations prédominent dans les gliomes de grade II, III et les glioblastomes secondaires.

IDH1 et IDH2 sont des enzymes qui catalysent la carboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate au cours du cycle de Krebs, conduisant à la génération de NAPDH. IDH1 est localisé dans le cytoplasme alors qu'IDH2 est localisé dans les mitochondries. Le résidu R132, siège de la mutation d'*IDH1*, et le résidu R172, cible des mutations d'*IDH2*, représentent les sites actifs des enzymes IDH1 et IDH2. Ces mutations entraînent une perte d'affinité des enzymes pour leur substrat et la protéine mutée inhibe l'activité de la protéine sauvage par la formation d'un hétérodimère inactif (Yan et al., 2009). Il en résulte une diminution de la production d' α -cétoglutarate. L' α -cétoglutarate intervient normalement dans la dégradation d'HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor), qui est un puissant régulateur de gènes exprimés en conditions d'hypoxie et qui joue un rôle crucial dans la croissance tumorale (Kaelin and Ratcliffe, 2008). La réduction du niveau d' α -cétoglutarate résulte en une stabilisation et une activation d'HIF-1 α (Zhao et al., 2009). D'autres mécanismes sont également décrits. Dang *et al.* ont montré que la mutation d'*IDH1* entraînait l'apparition d'une nouvelle activité enzymatique (Dang et al., 2009). La protéine IDH1 mutée devient capable de convertir l' α -cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2HG), en particulier le stéreoisomère R(-). Ce métabolite, dont l'accumulation est connue pour favoriser le développement de tumeurs cérébrales (Aghili et al., 2009), est effectivement retrouvé en excès dans les gliomes *IDH1* muté comparativement aux gliomes *IDH1* non muté.

Des travaux récents commencent à apporter des informations sur les mécanismes impliquant *IDH1* dans l'oncogénèse. Tout d'abord, il avait été trouvé une association entre la présence de mutation *IDH1* et le phénotype méthylateur de certains gliomes. Ce phénotype correspond à une sous-classe moléculaire de gliomes qui se caractérise par de multiples méthylations de l'ADN sur des loci spécifiques. Turcan *et al.* ont montré que la présence de mutation d'*IDH1* était suffisante pour induire le phénotype méthylateur des gliomes (Turcan et al., 2012). En effet, les astrocytes mutants IDH1 en culture présentent, à la suite de plusieurs passages successifs, une modification de leur méthylome, avec hyperméthylation de nombreux gènes. Dans cette étude, aucun gliome de grade II et III sans phénotype méthylateur n'était muté pour *IDH1/IDH2*, ce qui suggère que l'acquisition de ce phénotype est hautement dépendante de la présence de mutations *IDH*.

Les mutations d'*IDH1* semblent avoir un impact sur la différenciation cellulaire. En effet, les astrocytes *IDH1* mutés présentent une surexpression des gènes caractérisant l'état souche, tels que la nestine (Turcan et al., 2012). Cette surexpression est concomitante avec l'acquisition du phénotype méthylateur. La progression de progéniteurs vers le stade de cellules différenciées requiert une déméthylation des histones. Lu *et al.* ont montré que le 2HG produit par les mutants IDH1 R132H était capable de bloquer la différenciation en induisant la méthylation des histones (Lu et al., 2012).

Sur le plan pratique, la présence de la mutation d'*IDH* est un facteur important de bon pronostic (survie médiane de 27 à 31 mois vs. 11 à 15 mois sans mutations), mais n'est pas prédictive de la réponse au traitement (Nobusawa et al., 2009; Sanson et al., 2009; Yan et al., 2009).

VI. MAINTENANCE DES TELOMERES

Les télomères humains, localisés à l'extrémité des chromatides, sont des séquences hautement répétitives composées d'un tandem de 6 nucléotides TTAGGG. Ils sont associés à de nombreuses protéines, dont les protéines du complexe shelterin (ou telosome). La fonction première des télomères, régions de l'ADN non codantes, serait de prévenir la perte de données car l'ADN polymérase (enzyme de réplication de l'ADN) est incapable de copier les derniers nucléotides. Les télomères sont initialement longs de plusieurs kilobases, et se raccourcissent à chaque division mitotique. Lorsque le télomère est épuisé, les divisions cellulaires suivantes entrainent une perte de données génomiques, conduisant à une instabilité génomique ce qui induit le phénomène d'apoptose. Ainsi, la déplétion en télomères induit inévitablement la sénescence réplicative et limite les capacités de prolifération des cellules. La longueur des télomères de leucocytes (LTL) est inversement associée à l'âge, et décline de 20 à 40 paires de base par an. Pour les cellules nécessitant un renouvellement illimité (cellules germinales, souches), les télomères sont maintenus par la télomérase. Il s'agit d'une enzyme qui rajoute des nucléotides aux télomères, et qui est composée d'une transcriptase inverse

(encodée par *TERT*, Telomerase reverse transcriptase), et d'une sous-unité ARN (encodée par *TERC*, Telomerase RNA component). La longueur des télomères et l'activité de la télomérase sont fortement influencées par l'âge, et à moindre degré par le stress oxydatif, le tabagisme, le sexe, le régime alimentaire, et par des variations génétiques héritées.

Dans la plupart des cancers humains, la maintenance des télomères est un pré-requis nécessaire aux cellules précancéreuses pour se répliquer et former une tumeur maligne. Il existe au moins 2 façons pour la cellule cancéreuse de maintenir ses télomères : soit en réactivant la télomérase, soit par un mécanisme de recombinaison homologue appelé allongement alternatif des télomères (ou voie ALT pour alternative lengthening of telomeres). Deux mutations activatrices du promoteur de TERT ont été identifiées à partir du séquençage de l'ADN de 2 familles de patients atteints de mélanomes. Dans les gliomes, les mutations du promoteur de TERT ont été observées dans environ 75% des glioblastomes, dans 75% des oligodendrogliomes, et dans 20% des astrocytomes de grade II et III (Eckel-Passow et al., 2015). Lorsque la maintenance des télomères ne se fait pas par l'activation de la télomérase, elle peut se faire par activation de la voie ALT. L'activation de la voie ALT est fortement corrélée avec la mutation inactivatrice de ATRX (Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked) ou de DAXX (Death domain-associated protein). Plus de la moitié des astrocytomes de grade II ou III de l'adulte ont une mutation de ATRX, et cette proportion est supérieure lorsque limitée aux astrocytomes IDH mutés. Les mutations de DAXX sont limitées aux gliomes pédiatriques. Pour revue voir (Walsh et al., 2015).

VII. SYNTHESE DES ALTERATIONS CYTOGENETIQUES IMPORTANTES DES GLIOBLASTOMES

Cible	Altération	Localisation	Fonction	Fréquence	Valeur diagnostic	Valeur pronostic
EGFR	Amplification	7p	RTK	40% des GBM Ir	GBM	Non
PTEN	Inactivation	10q23	GST	25% des GBM Ir	Non	Non
P53	Inactivation	17p31	GST	65% des GBM IIr	Astrocytaire	Non
IDH1/2	Inactivation	Codons 132 et 172	Enzyme	GBM IIr>Ir	Grades II ou III	Oui, meilleur
MGMT	Inactivation	10q26	Enzyme		Non	Non, prédictive
TERT	Activation	5p	Enzyme	75% des GBM IDHwt	Oligodendroglial ou GBM	Non
ATRX	Inactivation	Xq21	Enzyme	50% des GBM IIr	Astrocytaire	Non

Tableau 6. Synthèse des altérations cytogénétiques utilisées en pratique courante dans la prise en charge des glioblastomes. Abréviations : GST = gène suppresseur de tumeurs ; RTK =récepteur à tyrosine kinase ; GBM Ir = glioblastome primaire ; GBM IIr = glioblastome secondaire.

VIII. LES SOUS-TYPES MOLECULAIRES DES GLIOMES

1. La classification de Verhaak

En 2008, le Cancer Genome Atlas Research Network (CGARN ou TCGA) a été créé pour établir un catalogue des anomalies génomiques impliquées dans la tumorigénèse. Pour le glioblastome, le but était de déterminer des profils génétiques capables de stratifier les glioblastomes en vue d'adapter au mieux la prise en charge des patients. Ainsi 4 sous-types moléculaires ont été identifiés (Verhaak et al., 2010):

Le sous-type classique : il présente très fréquemment un gain de chromosome 7
associée à une perte du 10, ainsi qu'une amplification d'*EGFR* et une délétion de *CDKN2A* en
9p21.3. Ce sous-type se distingue des autres par une absence de mutation de *p53* et par une

activation des voies Notch et Sonic hedgehog (Shh). Il exprime en effet des marqueurs de précurseurs neuraux ou de cellules souches neurales comme Nestine, des marqueurs de la voie Notch tels que NOTCH3, JAG1 et LFNG et des marqueurs de la voie Shh (SMO, GAS1, GLI2). Il est associé à une signature transcriptomique de type astrocytaire.

- Le sous-type **mésenchymateux** : il exprime les marqueurs mésenchymateux CHI3L1 (ou YKL-40), MET, CD44 et METRK. Il est caractérisé par une altération de la voie de signalisation PI3K/AKT, via des délétions et mutations fréquentes des gènes *NF1* et *PTEN*. Il présente une signature transcriptomique proche d'astrocytes en culture.

- Le sous-type **proneural** : Ce sous-type, initialement défini par Phillips *et al.* (Phillips et al., 2006) comme exprimant les marqueurs Olig2 et DLL3, est caractérisé par une fréquence élevée d'amplifications activatrices de *PDGFRa* en 4q12, de mutations d'*IDH1* et à un moindre degré de *p53*. Les altérations des chromosomes 7 et 10 sont peu fréquentes dans ce sous-type. Ce sous-type présente une signature transcritptomique de type oligodendroglial. Beaucoup de glioblastomes secondaires sont de type proneural.

- Le sous-type **neural** : il se caractérise par l'expression de nombreux marqueurs neuraux tels que NEFL, GABRA1, SYT1 et SLC12A5. Il présente une signature transcriptomique à la fois astrocytaire, oligodendrogliale et neuronale.

Schématiquement, d'après Verhaak, les sous-types classiques, proneuraux et mésenchymateux se caractérisent respectivement par des anomalies d'*EGFR*, de *PDGFRa/IDH1* et de *NF1*. Il suggère que ces anomalies soient, à l'avenir, utilisées comme biomarqueurs pour typer chaque glioblastome.

D'après les travaux de Phillips *et al.*, la plupart des gliomes de grade II et III seraient de type proneural ou neural (Phillips et al., 2006).

Hormis les anomalies moléculaires, les principales différences entre les sous-types sont l'âge de survenue et la survie. Le sous-type proneural se distingue des autres par un plus jeune âge et une survie plus longue. En revanche, ce sous-type est le seul à ne pas répondre à une intensification de traitement.

En pratique, cette classification, jugée complexe, n'est pas utilisée pour le diagnostic.

2. Le sous-groupe des gliomes au phénotype « méthylateur »

Plusieurs études avaient montré que les glioblastomes primaires et secondaires se différenciaient par des modifications épigénétiques différentes, et notamment que les glioblastomes secondaires présentaient plus d'hyperméthylation de promoteurs de gènes que les glioblastomes primaires (Ohgaki and Kleihues, 2007). En 2010, Noushmehr et al. ont étudié la méthylation des promoteurs de gènes dans 272 glioblastomes de la base du TCGA (Noushmehr et al., 2010). Cette étude a mis en évidence un sous-groupe de glioblastomes caractérisés par un fort taux de gènes au promoteur hyperméthylé, rappelant le phénotype méthylateur (CIMP pour CpG island methylator phenotype) décrit dans certains cancers du côlon (Toyota et al., 1999). L'hyperméthylation n'est pas faite au hasard mais concerne les ilôts CpG d'un sous-groupe de gènes définis. Noushmehr et al. ont également montré que les gliomes au phénotype CIMP (G-CIMP) sont de type proneural selon la classification de Verhaak, qu'ils sont étroitement associés à la présence de mutations d'IDH1 et qu'ils sont plus fréquents dans le groupe des glioblastomes secondaires que dans celui des glioblastomes primaires (Noushmehr et al., 2010). Les G-CIMP touchent des patients plus jeunes (âge moyen de 39 ans) que les non G-CIMP (âge moyen de 59 ans). Ils sont de meilleur pronostic, avec une survie médiane de 150 semaines (versus 42 semaines pour les non G-CIMP). Le profil G-CIMP est particulièrement fréquent dans les gliomes de grade II et III (Noushmehr et al., 2010) où il apparaît être un puissant facteur de meilleur pronostic (Turcan et al., 2012). Sa valeur pronostique apparaît même meilleure que celle de l'hyperméthylation de *MGMT* (Turcan et al., 2012).

IX. VASCULARISATION DES GLIOMES, INVASION ET MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

1. Néovascularisation

La néo-vascularisation des gliomes malins est un processus bien documenté. Elle est caractérisée par une hypervascularisation tumorale associée à des vaisseaux de morphologie aberrante. Les vaisseaux normaux sont formés par un mécanisme de *vasculogénèse* et d'*angiogénèse*. La vasculogénèse est la formation *in situ* de vaisseaux à partir de la différenciation de progéniteurs endothéliaux, les angioblastes, durant la vie embryonnaire et fœtale. Cette phase est suivie par l'angiogénèse, qui contribue à l'expansion et au remodelage de vaisseaux existants par 2 mécanismes : la connexion des vaisseaux par croissance et la scission de la lumière des vaisseaux par le tissu interstitiel (intussusception). En plus de ces 2 mécanismes, les gliomes malins utilisent 2 autres processus de néo-vascularisation : *la cooption vasculaire* et *le mimétisme vasculaire*. Les CIG joueraient un rôle dans les différents mécanismes de la néo-vascularisation des gliomes malins (pour revue voir (Liebelt et al., 2016)).

- *La co-option vasculaire* : les cellules tumorales forment des manchons périvasculaires autours des vaisseaux cérébraux normaux, détournant cette vascularisation au profit de la tumeur. Ce processus est suivi d'une destruction des cellules endothéliales par apoptose, entrainant une ischémie localisée avec hypoxie, stimulant l'angiogénèse.

- L'angiogénèse : ou formation de nouveaux vaisseaux à partir d'une vascularisation préexistante. Le rôle de VEGF (vascular endothelial growth factor) dans ce processus est

72

central, de même que celui des CIG. L'hypoxie stimule la production de VEGF et de SDF-1 (Stroma cell-derived factor 1), également appelé CXCL12, dans les CIG. Le VEGF induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales, pendant que SDF-1 est impliqué dans la migration endothéliale. Les CIG sécrètent également un autre facteur de migration/prolifération des cellules endothéliales, le hepatoma-derived growth factor.

- La vasculogénèse : ou formation vasculaire de novo, qui peut se faire à partir de plusieurs types cellulaires différents : angioblastes, progéniteurs endothéliaux circulants, macrophages associés aux tumeurs (TAMs), monocytes exprimant Tie-2, et CIG. Il a été démontré que les CIG sont capables de se transdifférencier en cellules endothéliales (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). VEGF et SDF-1 semblent également jouer un rôle pivot au travers des CIG dans ce processus. L'inhibition de ces 2 voies entraine une diminution de la prolifération endothéliale, de la mobilisation des progéniteurs endothéliaux et une baisse de la vascularisation (Folkins et al., 2009).

De récentes études suggèrent que les péricytes (cellules contractiles de la lame basale de l'endothélium capillaire) pourraient jouer un rôle important dans la croissance et la progression tumorale (Armulik et al., 2011). Les CIG peuvent générer également des péricytes (Cheng et al., 2013). Bien que le rôle précis des péricytes dérivés des CIG dans la néo-vascularisation des gliomes diffus ne soit pas encore élucidé, il semblerait que de cibler spécifiquement ce contingent cellulaire ait un impact négatif sur la néo-vascularisation et la croissance tumorale.

- *Le mimétisme vasculaire* : est la constitution d'un réseau vasculaire par les cellules tumorales et pas par les cellules endothéliales. C'est un processus observé dans le mélanome et le gliome diffus chez l'humain. Des CIG sont capables de former un réseau vasculaire tubulaire sans présence de cellules endothéliales, via l'activation de la voie VEGFR-2. Dans

73

des conditions hypoxiques, l'élévation des taux de HIF-1 α et HIF-2 β (Hypoxemia inducible factors) dans les CIG contribuent à ce mimétisme vasculaire.

2. Invasion et microenvironnement tumoral

L'environnement tumoral joue un rôle important dans la migration et l'invasion du parenchyme cérébral sain par les cellules tumorales. Les cellules de glioblastome migrent préférentiellement le long des voies myéliniques, en sous-pial autour des neurones et des espaces de Virchow-Robin. La migration et l'invasion du parenchyme cérébral sain par les cellules tumorales dépend de leur interaction avec la matrice extracellulaire, de la destruction de cette dernière par protéolyse et de la formation d'une matrice tumorale qui leur est propre, afin de créer un environnement favorable à la migration des cellules et à la croissance de la tumeur (pour revue voir (Figarella-Branger et al., 2010)).

Lors du développement des glioblastomes, la matrice extracellulaire est largement remodelée par rapport à celle du tissu cérébral normal : l'acide hyaluronique, le peptide α -4 de la laminine, la fibronectine, l'ostéopontine, la vitronectine et la tenascine-C sont surexprimés alors que le versican V2 de la thrombospondine 2 voient leur expression diminuer (Bellail et al., 2004). Afin d'interagir spécifiquement avec cette néo-matrice extracellulaire, les cellules tumorales des glioblastomes expriment une combinatoire de molécules d'adhérence cellulaire, dont la forme standard du récepteur de l'acide hyaluronique, CD44s. Celui-ci est fortement exprimé à la surface des cellules néoplasiques de gliomes et favorise leur migration (Akiyama et al., 2001). Cela souligne que les glioblastomes sont capables de sécréter leur propre matrice et le récepteur correspondant, augmentant ainsi leurs propriétés invasives. De même, les intégrines de la famille β 1 (α 2 β 1, α 5 β 1et α 6 β 1), ayant notamment pour ligands la fibronectine, la laminine et la tenascine, sont surexprimées par de nombreuses lignées astrocytaires malignes et par les glioblastomes en comparaison avec le tissu normal et jouent donc un rôle important dans le caractère invasif de ces tumeurs (Mahesparan et al., 2003). Enfin, les taux d'expression de la molécule d'adhésion cellulaire NCAM de la superfamille des immunoglobulines et de la glycoprotéine N-cadhérine sont en revanche inversement corrélés au potentiel de migration et d'invasion des cellules de gliomes, soit au grade de malignité de la tumeur (Asano et al., 2004).

La protéolyse de la matrice extracellulaire, étape critique pour l'invasion tumorale, fait intervenir des enzymes sécrétées par les cellules cancéreuses elles-mêmes, par les cellules endothéliales et par les cellules du stroma. Il existe plusieurs cascades protéolytiques interconnectées agissant sur les composants de la matrice extracellulaire : le système d'activation du plasminogène composé de la protéase à sérine urokinase-type plasminogen activateur (uPA), de son récepteur uPAR et de l'inhibiteur de type 1 PAI-1, les métalloprotéinases matricielles (MMP) et leurs inhibiteurs tissulaires TIMP et les peptidases de la famille des cystéines lysosomales appelées cathepsines. Plusieurs études ont montré que l'expression et l'activité protéasique du complexe tripartite uPA-uPAR-PAI-1 sont augmentées dans les gliomes de haut grade (Lakka et al., 2004). En particulier, la forte expression de l'inhibiteur PAI-1 est corrélée à un mauvais pronostic. De même, une augmentation de l'expression de la cathepsine B et du PAI-1 est un facteur indépendant de mauvais pronostic dans les glioblastomes (Colin et al., 2009). Par ailleurs, les gélatinases MMP2 et MMP9 sont les deux métalloprotéinases majoritairement impliquées dans le processus d'invasion des glioblastomes et sont parmi les MMP les mieux caractérisées. Toutefois, leur valeur pronostique n'a pas été retrouvée dans toutes les études.

C. GLIOBLASTOMES : CELLULES SOUCHES CANCEREUSES

I. INTRODUCTION

Depuis plus d'une vingtaine d'années, de nombreux liens sont faits entre la biologie des cellules souches et l'oncologie, notamment depuis la découverte de mutations de gènes communs aux 2 disciplines. La notion de cellules souches cancéreuses (CSC) en est l'exemple le plus représentatif. Ce concept énonce l'hypothèse qu'une sous-population cellulaire au sein de la tumeur partage des caractéristiques communes avec les cellules souches normales, à savoir des propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation en plusieurs lignées distinctes. De par ces propriétés, elles initieraient et entretiendraient le développement et la croissance tumorale. Les CSC ont été décrites dans de nombreux cancers hématopoïétiques et solides (mélanome, sein, colon, foie, cerveau) (Meacham and Morrison, 2013). Les CSC impliquées dans les gliomes (Singh et al., 2003) sont appelées cellules souches de gliomes (CSG) ou, plus récemment, cellules initiatrices de gliomes (CIG). Ces cellules auraient également des propriétés de résistance aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles (chimiothérapies, radiothérapie), ce qui expliquerait - au moins en grande partie - les récidives systématiques des gliomes. Elles constituent donc un axe de recherche important en neurooncologie.

Les CIG partagent de nombreuses propriétés avec les cellules souches neurales adultes (CSN), ce qui suggère que les CSN peuvent avoir un rôle important dans le développement tumoral.

II. CELLULES SOUCHES NEURALES ADULTES ET CELLULES PROGENITRICES

1. Définitions

Nous avons longtemps cru que la neurogénèse avait lieu uniquement pendant la vie embryonnaire. Mais de nombreux travaux ont démontré, d'abord chez le rongeur puis chez l'homme, qu'elle persistait à l'âge adulte dans certaines zones du cerveau. Cette neurogénèse adulte est réalisée à partir de CSN (Alvarez-Buylla et al., 2002; Sanai et al., 2011a).

Les CSN sont des cellules du SNC multipotentes, capables de s'autorenouveler par division symétrique (une CSN donne 2 CSN) ou asymétrique (une CSN donne une CSN et un progéniteur), permettant ainsi de maintenir le stock de CSN. Elles peuvent également se diviser en 2 progéniteurs. Bien qu'elles soient dotées de capacité d'autorenouvellement infini, les CSN ne se divisent que rarement, et persistent sous forme quiescente, dans l'attente de signaux de prolifération.

Les progéniteurs (ou cellules progénitrices) sont des cellules précurseur capables d'effectuer plusieurs divisions à court terme avant de s'engager dans un processus de différenciation. Contrairement au CSN, les cellules progénitrices sont généralement très prolifératives, dotées de propriétés migratoires leur permettant de coloniser le cerveau. Ce n'est qu'au niveau de leur site d'arrivée que les progéniteurs donnent naissance aux cellules différenciées matures.

2. Propriétés

La propriété principale des CSN est l'**autorenouvellement**. Elles sont capables de former des clones cellulaires indéfiniment *in vitro*, sous la forme de sphères appelées neurosphères.

Les CSN sont également **multipotentes**, c'est-à-dire capables de différenciation dans les 3 lignées cellulaires constitutives du cerveau (astrocyte, oligodendrocyte, neurone) suite à des

77

évènements successifs de division. Pour le vérifier, des tests de différenciation *in vitro* et *in vivo* doivent être réalisés.

Les cellules progénitrices sont difficiles à distinguer des CSN en pratique. En culture, les 2 types cellulaires auraient des propriétés d'autorenouvellement différentes ; alors que les CSN peuvent se répliquer à l'infini, les progéniteurs ont une capacité d'autorenouvellement épuisable (moins de 7 passages) (Louis et al., 2008; Singh et al., 2003). Egalement, les progéniteurs ont des capacités de différenciation restreintes, et ne semblent être que bipotentes (lignées gliales ou neuronale), voire unipotentes (Louis et al., 2008).

3. Marqueurs des CSN et des progéniteurs

En plus de leurs propriétés fonctionnelles, on peut s'aider de certains marqueurs cellulaires pour identifier les CSN/progéniteurs à l'âge adulte. La distinction entre CSN et progéniteurs est difficile en raison de l'absence de spécificité des marqueurs permettant de les différencier (Morrison and Spradling, 2008).

Les **marqueurs membranaires** suscitent un grand intérêt car ils permettent de trier les cellules souches. L'expression de ces marqueurs de surface par les différentes populations de cellules souches peut changer d'un organe à un autre. Pour le cerveau, la glycoprotéine transmembranaire Prominin-1 ou **CD133** est le marqueur le plus utilisé pour isoler les CSN (Uchida et al., 2000). Cependant, bien que couramment utilisé, ce marqueur est débattu concernant l'isolement des CIG (voir chapitre *marqueurs des CIG*). A titre d'information, le CD34 est le marqueur couramment utilisé pour isoler les cellules souches hématopoïétiques et le CD44 pour isoler les cellules souches épithéliales mammaires.

A2B5 est un ganglioside de surface connu pour être exprimé par les CSN de la SVZ (zone sous-ventriculaire) et par les cellules progénitrices (Nunes et al., 2003).

La nestine (neuroepithelial stem cell intermediate filament) est considérée comme un marqueur de CSN et de progéniteurs (Lendahl et al., 1990). Il s'agit d'un filament

intermédiaire qui est exprimé précocement dans le cerveau en développement chez les mammifères, y compris chez l'homme. Elle est exprimée dans le cerveau adulte au niveau des CSN et des progéniteurs. Son expression régresse dans les cellules neurales différenciées.

La **GFAP** (glial fibrillary acidic protein) est considérée comme un marqueur astrocytaire et des cellules multipotentes de type B de la SVZ (voir chapitre suivant) (Doetsch et al., 1999).

L'**EGFR**, et son principal ligand EGF, ont un rôle majeur dans la survie, la migration et la différenciation des CSN/progéniteurs embryonnaires et adultes (Codega et al., 2014; Gonzalez-Perez and Alvarez-Buylla, 2011). En pratique, il est considéré comme un marqueur de cellules multipotentes proliférantes de type C de la SVZ.

Les **marqueurs intracellulaires** les plus spécifiques sont les facteurs de transcription impliqués dans l'état souche (autorenouvellement et multipotence) : **Sox1 et Sox2** (Zhang and Jiao, 2015). Etant intracellulaires, ils ne sont cependant pas exploitables pour isoler spécifiquement les CSN/progéniteurs.

On remarque l'importance de ne pas considérer un seul marqueur, mais plusieurs marqueurs fonctionnels, intracellulaires et membranaires afin de renforcer la spécificité d'identification des CSN/progéniteurs.

4. Régions cérébrales germinales et « flux migratoire rostral » des CSN et progéniteurs

Les CSN et progéniteurs ont été isolés dans plusieurs sites cérébraux appelées régions germinales : la **zone sous-ventriculaire** (SVZ) correspondant à une fine couche cellulaire qui jouxte les ventricules latéraux, la **zone sous-granulaire du gyrus** *dentatus* (SGZ) de l'hippocampe, et dans la substance blanche sous-corticale (**figure 9**). Ces sites sont appelées « **niches neurogéniques** » en raison des propriétés de leur micro-environnement qui contient des facteurs de croissance, des vaisseaux, une lame basale et des cellules spécifiques permettant l'entretien de l'autorenouvellement des CSN, et également leur différenciation et

79

migration en fonction des facteurs sécrétés. Une multitude de signaux moléculaires proviennent des cellules endothéliales, et d'autres cellules stromales du micro-environnement perivasculaire, pour réguler l'activité et supporter les propriétés souches des CSN.



Figure 9. Régions cérébrales germinales. Zone sous-ventriculaire (SVZ) et sous-granulaire du gyrus *dentatus* (Sanai et al., 2005).

La SVZ est la zone cérébrale germinale la mieux caractérisée. Plusieurs types de progéniteurs ont été identifiés dans la SVZ, et seraient organisés de manière hiérarchique. Les cellules de **type B** (GFAP+) quiescentes, donnent des cellules très proliférantes dites de **type C** (ou cellules de transition proliférantes, EGFR+) qui se différencient en 2 progéniteurs distincts : pour la voie neuronale les cellules de **type A** (ou neuroblastes migrants), et pour la voie gliale les précurseurs oligodendrogliaux (**OPC**). Les cellules de type A vont ensuite migrer vers le bulbe olfactif le long d'une chaine cellulaire appelée le **flux migratoire rostral**. Une fois à destination, ces cellules rejoignent les couches plus superficielles du bulbe olfactif (couches granulaire et périglomérulaire) dans lesquelles elles se différencient en

neurones (**figure 10**). Cette activité migratoire serait intense pendant les premiers mois de vie, après 18 mois on note une nette diminution de l'activité proliférante et de l'expression de marqueurs souches de ces cellules immatures (Sanai et al., 2011a). Un autre flux migratoire de cellules progénitrices issues de la SVZ et destinées au cortex préfrontal ventromédian a été observé chez l'enfant de moins de 6 mois : le **flux migratoire médian** (Sanai et al., 2011a). Cette migration aurait pour objectif de fournir en interneurones les régions préfrontales pendant cette période de développement, comme un mécanisme de plasticité postnatale retardée potentiellement impliquée dans des fonctions cognitives comme l'émotion et la cognition spatiale.

Les progéniteurs de la SGZ sont constitués de 2 types cellulaires morphologiquement et fonctionnellement différents. Les progéniteurs de type 1 expriment GFAP et Sox2, alors que ceux de type 2 n'expriment pas GFAP. La relation entre les 2 types de progéniteurs n'est pas clairement établie. Les progéniteurs exprimant Sox2 sont autorenouvellants et capables de se différencier en neurones et en astrocytes (Suh et al., 2007). La migration des progéniteurs de la SGZ est plus limitée que pour ceux de la SVZ, et reste cantonnée à la couche granulaire du gyrus *dentatus* de l'hippocampe.



Figure 10. Neurogénèse dans la zone sous-ventriculaire (SVZ). Les progéniteurs (A, B, C) logent au contact des cellules épendymaires (E). Les cellules de types A migrent vers le bulbe olfactif (OB) constituant la chaine migratoire rostrale (RMS). Dans le bulbe olfactif elles se différencient pour constituer les couches externes : granulaire (GCL), mitrale (Mi), externe plexiforme (EPL) et glomérulaire (GL) (Zhao et al. 2008).

5. Fonctions des CSN chez l'adulte

La fonction exacte des CSN/progéniteurs en dehors du développement n'est pas clairement élucidée. Les CSN de la SVZ seraient impliquées dans l'olfaction, plus précisément dans l'apprentissage olfactif et la discrimination des odeurs en lien avec la mémoire à court terme (Lledo et al., 2006). Les CSN de la SGZ seraient impliquées dans l'apprentissage et la mémorisation, ainsi que dans la régulation des humeurs. En pathologie, la neurogénèse dans la SVZ et la SGZ aurait un rôle après la survenue de crises d'épilepsie, d'accidents vasculaires cérébraux, et serait également impliquée dans certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, ou toute autre affection inflammatoire du SNC (Zhao et al., 2008).

6. CSN et gliomes

a. Théorie des CSN à l'origine des gliomes

L'origine des gliomes est sujette à débat. Toutes les cellules, qu'elles soient différenciées, progénitrices, ou souches, sont capables, sous l'effet de mutations génétiques successives, de former un gliome (pour revue voir (Siebzehnrubl et al., 2011)). Les théories les plus récentes incriminent essentiellement les astrocytes réactionnels (Lindberg et al., 2009; Silver and Steindler, 2009), les précurseurs oligodendrogliaux (OPC) ou polydendrocytes ou cellules NG2+ (Lindberg et al., 2009), et les CSN/progéniteurs (**figure 11**).



Figure 11. Cellules d'origine des gliomes. Toutes les cellules, de la plus différenciée (astrocyte réactionnel), à la cellule souche neurale de la SVZ, en passant par les précurseurs oligodendrogliaux (NG2+), peuvent former un gliome sous l'effet de modifications géniques et épigénétiques particulières (Siebzehnrubl, 2011).

Les régions germinales, et particulièrement la SVZ, sont depuis longtemps suspectes d'être à l'origine des gliomes en raison de propriétés partagées entre les CSN et les cellules tumorales (Sanai et al., 2005). Plusieurs arguments viennent étayer cette hypothèse (i) la localisation privilégiée des gliomes proche des zones péri-ventriculaires ; (ii) les similitudes de propriétés (autorenouvellement infini et différenciation) et d'altérations génétiques (voir paragraphe suivant) entre les CSN et les cellules tumorales, a fortiori entre les CSN et les CIG ; (iii) les similitudes d'expression des marqueurs tels que nestine, qui est exprimé dans les progéniteurs et fréquemment dans les cellules tumorales ; (iv) la capacité oncogénique privilégiée des CSN des SVZ par rapport à d'autres régions cérébrales, démontrée par simple exposition (chez l'animal) à des agents oncogéniques chimiques ou viraux ; (v) le caractère « pro-oncogénique » des niches neurogéniques comme la SVZ, riches en facteurs de croissance (EGF/PDGF) ; (vi) les propriétés migratoires des CSN similaires à celles des cellules tumorales.

Cependant, la théorie de la CSN à l'origine des gliomes ne permet pas à elle seule d'expliquer l'hétérogénéité intra-tumorale et l'association au sein de la tumeur de plusieurs profils moléculaires différents. De plus, même si statistiquement les gliomes sont volontiers localisés dans des zones periventriculaires, certains se développent à distance des niches neurogéniques. Afin de pouvoir expliquer l'initiation et le développement des gliomes, leur localisation possible au sein de l'ensemble du parenchyme cérébral, l'hétérogénéité cellulaire, génétique et épigénétique, il convient de ne pas considérer une seule théorie d'origine mais un ensemble d'évènements qui peuvent survenir sur différentes cellules susceptibles de se transformer. Sur le plan conceptuel, il apparaît même que la multitude des aberrations génétiques et épigénétiques rencontrées dans un gliome ne peut être que la conséquence de la transformation de plusieurs cellules d'origine différentes (Visvader, 2011).

b. Voies géniques communes aux CSN et aux gliomes

Les CSN et les gliomes ont de nombreuses voies géniques actives en commun (Sanai et al., 2005). Ces voies sont régulées dans les CSN, et altérées dans les gliomes. En particulier, il a été mis en évidence une activation anormale de la voie **sonic hedgehog (Shh**), normalement

impliquée dans l'autorenouvellement des CSN. Une suractivation de la voie Shh entraine une inactivation du gène suppresseur de tumeur *RB* (voir chapitre *altérations cytogénétiques et oncogénèse des gliomes infiltrants*). De même la voie hedgehog active 3 facteurs de transcription – Gli1, Gli2, et Gli3 – qui régulent les cellules progénitrices en promouvant l'entrée dans le cycle cellulaire et la réplication de l'ADN. Une surexpression de **EGFR** est également retrouvée dans les CSN, en particulier dans les cellules de type C, rendant ces cellules hautement proliférantes et migrantes. *PTEN* (voir chapitre *altérations cytogénétiques et oncogénèse des gliomes infiltrants*), qui régule normalement la prolifération des CSN et qui est impliquée dans leur motilité, est dérégulé dans les gliomes. De même la voie **Wnt/β-catenine**, qui régule normalement la population des CSN, serait modifiée dans les CIG. La voie de signalisation **Notch** intervient également dans le maintien de l'état non différencié des CSN à l'âge adulte. Elle est souvent dérégulée dans les gliomes et serait impliquée dans les CIG. L'activité **telomérase** est également modifée dans les CSN et les gliomes, les rendant répliquantes « indéfiniment ».

Cependant, comme discuté précédemment, la relation entre gliome et CSN reste encore à démontrer. La théorie de la cellule souche cancéreuse (CSC) dans les gliomes (ou cellule initiatrice de gliomes - CIG) ne statue pas sur l'origine des gliomes mais sur leur présence et rôle au sein de la tumeur, permettant d'expliquer l'organisation hiérarchique (avec la cellule souche cancéreuse au sommet), l'hétérogénéité tumorale (caractère multipotent des CIG) et la résistance aux stress génotoxique (récidives systématiques). Comme nous allons le voir, l'origine des CIG peut être multiple et provenir d'une CSN, d'un progéniteur, d'une cellule tumorale différenciée, d'une cellule gliale différenciée non tumorale, ou de l'association de plusieurs de ces cellules en fonction des besoins de la tumeur.
III. LES CELLULES INITIATRICES DE GLIOMES (CIG)

1. Définitions

Les CSC semblent jouer un rôle primordial dans de nombreux cancers, dont les glioblastomes. Les CIG seraient responsables, au moins en grande partie, de l'importante hétérogénéité phénotypique, cellulaire, génétique et épigénétique des glioblastomes. Les CIG joueraient un rôle crucial dans l'initiation et le développement des glioblastomes, mais également dans leur récidive. Leur origine est débattue, mais de plus en plus d'arguments sont en faveur d'un enrichissement tumoral en CIG, non seulement à partir de la réplication des CIG, mais également de la reprogrammation en CIG de cellules tumorales différenciées. Cette plasticité cellulaire confèrerait à la tumeur une plasticité phénotypique dont elle a besoin pour s'adapter à son environnement.

2. Propriétés

Comme les CSN, les CIG ont comme propriétés principales l'**autorenouvellement** et la **multipotence**. Elles forment également des neurosphères en culture cellulaire. Les CIG ont avec les CSN de nombreuses voies d'activation communes nécessaires à la préservation de ces propriétés. Cependant, elles possèdent des propriétés oncogéniques supplémentaires qui leur confèrent une haute **tumorigénicité** chez l'hôte. Un faible nombre de CIG suffit à initier le développement d'une tumeur chez la souris immunodéprimée, ayant les caractéristiques histologiques d'un glioblastome, alors qu'un nombre important de cellules tumorales différenciées ne permet pas de former de tumeur (Singh et al., 2003; Valent et al., 2012).

3. Les différents modèles de croissance tumorale

Le modèle tumoral classique est le **modèle stochastique**, qui considère que chaque cellule de la tumeur a un potentiel tumoral équivalent sous l'effet de mutations génétiques oncogéniques. Cependant, la découverte dans des cancers hématopoïétiques (Lapidot et al., 1994) puis dans de nombreux cancers solides (Visvader and Lindeman, 2008) d'une hiérarchie cellulaire au sein de la tumeur avec des cellules « clés » aux propriétés particulières capables d'initier et de développer une tumeur (CSC) à fait naître le concept de **modèle tumoral des CSC**. Ce modèle s'est rapidement imposé comme pouvant expliquer la récidive tumorale et son caractère hétérogène, pour certains cancers. Le fait que les CSC soient capables de division asymétrique permet d'une part de maintenir le pool de cellules pluripotentes autorenouvellantes tumorigéniques (entretien de la tumeur), et d'autre part de donner des cellules différenciées spécifiques nécessaires au fonctionnement de la tumeur mais non tumorigeniques (hétérogénéité). Cependant, cette hiérarchie cellulaire unidirectionnelle est remise en question depuis la découverte récente par plusieurs équipes (Friedmann-Morvinski and Verma, 2014) du caractère dynamique à la fois des CSC et des cellules plus différenciées. Ces 2 populations cellulaires sont capables d'interconversion d'un état « souche » vers un état « différencié » et inversement (= reprogrammation) en fonction des contraintes environnementales (Chaffer et al., 2011). Ceci a fait émerger le concept du **modèle de plasticité des CSC (figure 12)**.



Figure 12. Les différents modèles tumoraux. (Singh et al., 2015)

4. Origine des CIG

Comme vu précédemment dans le chapitre CSN et gliome, les CSC (et a fortiori les CIG) ne sont pas nécessairement originaires de la transformation de cellules souches normales du tissu (Visvader, 2011). Bachoo et al. ont démontré que aussi bien des astrocytes matures que des CSN exprimant EGFR peuvent générer une cellule tumorale de glioblastome sous l'effet de la dérégulation de certaines voies d'activation génétiques telles que p16(INK4a)/p19(ARF) (Bachoo et al., 2002). De même, Friedmann-Morvinski et al. ont démontré que la transduction lentivirale de vecteurs oncogéniques (ciblant NF1 et p53) dans le cerveau de souris transgéniques induisait la formation de glioblastomes à partir de nombreuses variétés de cellules cérébrales incluant les astrocytes et les neurones corticaux (Friedmann-Morvinski et al., 2012). Ils ont également démontré que les cellules tumorales ainsi formées exprimaient majoritairement les marqueurs souches/progéniteurs tels que nestine et Sox2 et perdaient l'expression de marqueurs de différenciation tel que GFAP, avec une cinétique concomitante à la progression tumorale. Ainsi, il semble exister un enrichissement en CIG de la tumeur à partir de cellules différenciées tumorales ou non tumorales. D'autres équipes ont démontré que des cellules cancéreuses peuvent se « transdifférencier » en cellules endothéliales, participant ainsi à la néovascularisation tumorale (Ricci-Vitiani et al., 2010) (voir chapitre vascularisation des gliomes, invasion et microenvironnement tumoral). Il a été suggéré que dans le contexte des tumeurs gliales, ce processus de transdifférenciation peut être réversible, avec la formation de CIG à partir de cellules endothéliales (figure 13) (Soda et al., 2013). Enfin, même si les mécanismes de transdifférenciation sont méconnus et qu'il n'existe pas de preuve de l'existence de ce processus à partir d'autres cellules que les cellules endothéliales, certaines équipes n'écartent pas les cellules stromales péritumorales comme étant potentiellement sources de CIG (Friedmann-Morvinski and Verma, 2014).



Figure 13. Origine des CIG à partir de la dédifférenciation d'astrocytes et de neurones transformés et éventuellement de la « transdédifférenciation » de cellules endothéliales (Friedmann-Morvinski, 2014).

- 5. Marqueurs des CIG
 - a. Marqueurs membranaires

Le rôle du marqueur de surface **CD133** pour identifier les CIG a été largement étudié. Au sein du glioblastome, CD133 identifie classiquement la proportion de cellules capables de former des neurosphères en culture, et de générer des tumeurs à l'identique lorsque transplantées dans des souris immunodéficientes, même en faible nombre (Singh et al., 2003). Cette proportion de cellules CD133+ au sein d'une tumeur est variable selon les études quantitatives, de à peine détectable à 60% des cellules (Clement et al., 2009; Singh et al., 2004; Zeppernick et al., 2008). Cependant, il a été démontré que des cellules de glioblastome CD133- seraient également capables des mêmes propriétés « souches ». Patru et al. ont démontré que des cellules CD133- sont capables de former des neurosphères *in vitro* et des tumeurs lorsque transplantées chez l'animal (Patru et al., 2010). De façon plus approfondie, Chen et al. ont émis l'hypothèse d'un modèle hiérarchique des CIG au sein de la tumeur

d'origine (Chen et al., 2010). Trois types de CIG coexisteraient au sein du glioblastome, caractérisées par l'expression de CD133, et seraient promoteurs de différents profils de croissance tumorale (**figure 14**). Le type 1 correspond à des CIG CD133- capables de générer des tumeurs mixtes (CD133- et CD133+) très agressives, le type 2 à des CIG CD133+ capables de former des tumeurs mixtes, et le type 3 CD133- qui n'est capable de générer que des tumeurs CD133- moins agressives et plus différenciées. Ainsi, ils estiment que toutes les CIG seraient issues à l'origine de cellules CD133-, mais représenteraient des CIG à différences stades de différenciations. Ceci permettrait d'expliquer, au moins en partie, les différences constatées.



Figure 14. Les 3 types de CIG en fonction de l'expression de CD133 et leur correspondance fonctionnelle (Chen et al., 2010)

A partir d'analyses clonales, Brescia et al. ont démontré qu'il n'y avait pas d'organisation hiérarchique entre les cellules CD133+ et CD133-. L'expression de CD133 serait plutôt liée à un état convertible des cellules d'une neurosphère avec une modification de la localisation cellulaire de CD133 entre le cytoplasme et la membrane plasmique. L'utilisation de shRNA spécifiques inactivant la transcription de CD133 dans les neurosphères en culture avait pour effet de perturber les capacités d'autorenouvellement et de tumorigénicité des cellules (Brescia et al., 2013). De plus, plusieurs études ont démontré une corrélation négative entre l'expression de CD133 et la survie des patients (Beier et al., 2008; Zeppernick et al., 2008), ainsi qu'un enrichissement en population CD133+ (de 69% à 92%) lorsque les cellules sont en condition hypoxique (Bidlingmaier et al., 2008). Toutes ces données suggèrent que CD133 possède un rôle majeur dans l'autorenouvellement et la tumorigénicité des cellules de glioblastome, bien que sa fonction biologique ne soit pas connue.

Le **CD44** est également un marqueur membranaire utilisé pour identifier les CIG (Anido et al., 2010). Il s'agit d'un récepteur pour des composants de la matrice extracellulaire (essentiellement l'acide hyaluronique et l'osteopontine), qui agit également comme une molécule de signalisation intracellulaire (rôle peu connu). Il semble jouer un rôle important dans l'interaction CIG-niche périvasculaire (voir *chapitre niche péri-vasculaire*). Il est surexprimé des le sous-type mésenchymateux des glioblastomes (Phillips et al., 2006), et son expression a été utilisée pour enrichir une population tumorale de glioblastome en CIG (Anido et al., 2010). Enfin, il a été démontré que l'expression de CD44 est corrélée à l'agressivité du sous-type proneural des glioblastomes, et que son expression est corrélée à l'expression des gènes induits par l'hypoxie (HIF). Son rôle intracellulaire pourrait être lié à l'interaction des CIG avec l'osteopontine dans les niches perivasculaires et jouer un rôle dans l'agressivité et dans le maintien des caractères souches des CIG via l'activation de HIF-2 α , expliquant – au moins en partie – la résistance à la radiothérapie des CIG des niches périvasculaires (Pietras et al., 2014).

D'autres marqueurs spécifiques des CSC dans les glioblastomes ont été décrits tels que Nestine (Jin et al., 2013), A2B5 (Tchoghandjian et al., 2010), L1CAM (Bao et al., 2008),

CD15 (ou SSEA-1) (Read et al., 2009), **integrine α6** (Fael Al-Mayhani et al., 2009), mais aucun ne semble assez discriminant isolément pour l'identification des CIG (pour revue voir (Brescia et al., 2012)). Ils sont souvent utilisés en association avec le CD133.

b. Marqueurs intracellulaires

Les marqueurs intracellulaires les plus spécifiques aux CIG correspondent aux facteurs de transcription impliqués dans l'autorenouvellement et la multipotence. Comme pour les CSN, Sox2 est exprimé dans les CIG, et semble même requis pour le maintien de leurs propriétés souches (Favaro et al., 2014). Gangemi et al. ont démontré que la transplantation de cellules glioblastome Sox2 négatives (silencing par knockdown) de dans des souris immunodéficientes ne provoquait pas de tumeur (Gangemi et al., 2009). Oct4 (octamerbinding transcription factor 4) et Nanog (Nanog homeobox) sont des facteurs de transcription majeurs qui maintiennent la pluripotence des cellules souches embryonnaires (ESC) et des cellules souches somatiques (Guo et al., 2011), mais dont l'expression dans le cerveau adulte normal n'est pas claire (Seymour et al., 2015). Oct4 et Nanog sont localisés dans le noyau des cellules tumorales, et l'intensité de leur expression en immunofluorescence (IF) semble corrélée à l'agressivité de la tumeur (Niu et al., 2011). L'expression de ces 3 marqueurs (Sox2, Oct4 et Nanog) semble corrélée à une sous-population particulièrement agressive de CIG (Seymour et al., 2015).

Récemment, un nouveau marqueur a été mis en évidence dans les glioblastomes : **ALDH1** (aldehyde dehydrogénase 1). Cette enzyme cytosolique est surexprimée dans les CIG, comme dans d'autres CSC d'autres cancers (Rasper et al., 2010). L'expression de ALDH1 semble corrélée aux contraintes environnementales de la tumeur telles que l'hypoxie, suggérant son rôle dans la détoxification et le maintien de l'état souche - et donc quiescent - des cellules, à visée protectionniste (Soehngen et al., 2014).

A l'instar des CSN, afin d'identifier une population souche au sein d'un glioblastome, il semble important de considérer plusieurs marqueurs phénotypiques et fonctionnels d'autorenouvellement et de tumorigénicité tels que CD133, Sox2, Oct4, Nanog, Nestine, ALDH1, la formation de neurosphère et la prolifération clonale *in vitro*, et la tumorigénicité *in vivo*.

6. Microenvironnement péritumoral ou niches perivasculaires

Comme pour les CSN et de leurs niches environnementales, il semble exister une organisation similaire au sein des niches périvasculaires (NPV) des glioblastomes. Les cellules endothéliales et du stroma perivasculaire (figure 15) de ces tumeurs hypervascularisées sécrètent des facteurs qui entretiennent les propriétés souches des CIG (Calabrese et al., 2007). Les cellules constituant les NPV sont de plusieurs types. Les péricytes et les cellules musculaires lisses pariétales, recrutées par les cellules endothéliales exprimant PDGF-B, semblent jouer un rôle fondamental dans la survie des cellules endothéliales des NPV (Song et al., 2005). Les astrocytes localisées dans les NPV engainent les cellules endothéliales de leur prolongements cytoplasmiques, jouant un rôle important dans le maintien de la barière hémato-encéphalique (Kim et al., 2006). Les fibroblastes activés par les cellules tumorales associées ont été identifiés dans les NPV, et seraient impliqués dans la progression des gliomes au travers de la production et de l'activation de MMP2 (matrix metalloproteinase 2) (Belien et al., 1999). Les cellules endothéliales n'ont pas pour seuls rôles l'oxygénation et la nutrition des cellules tumorales, mais également la sécrétion de facteurs (essentiellement des facteurs de croissance) nécessaires au maintien des propriétés souches des CIG (pour revue voir (Charles et al., 2012)).



Figure 15. Niches périvasculaires d'un glioblastome. Ces niches sont constituées de diverses cellules stromales et seraient impliquées dans la progression tumorale, l'invasion et l'entretien des caractères souches des CIG (BTSC = brain tumor stem cell-like) (Charles et al., 2006).

7. Régulation des CIG

a. Voies de signalisation

Les CIG surexpriment de nombreuses voies de signalisation nécessaires au maintien de l'état souche et permettant à ces cellules de survivre de façon aberrante, conduisant à la tumorigénèse. Ainsi, de nombreuses voies sont communes à celles retrouvées dans les CSN, telles que **les voies Notch, Shh, Wnt/β-caténine** (voir chapitre *altérations communes aux CSN et gliomes*). D'autres sont plus spécifiques aux CIG telles que les voies impliquant **BMP**, **EGFR, RAS/MAPK, PI3K/AKT/mTOR** leur conférant le caractère tumorigénique (pour revue voir (Liebelt et al., 2016)) et voir chapitre *altérations des récepteurs à activité tyrosine kinase*).

Les voies impliquant les **BMP** (bone morphogenic proteins) sont perturbées dans les CIG. BMP régule la prolifération, la différenciation, et l'apoptose dans les CSN. Les voies de signalisation BMP sont activées dans différents processus développementaux, dépendant de leur interaction avec plusieurs molécules de signalisation incluant Wnt/ β -caténine, basic helix-loop-helix (bHLH), et HIF-1 α . La signalisation de Wnt induit l'expression de BMP, ce qui prédispose les CSN à une différenciation astrocytaire. De même, dans les CIG, BMP semblent jouer un rôle dans la différenciation gliale en inhibant le potentiel tumorigénique des CIG. De manière spécifique, BMP-2 diminue la prolifération des CIG en induisant la différenciation astrocytaire et en sensibilisant les CIG au témozolomide au travers de la déstabilisation de HIF-1 α (Persano et al., 2012). BMP-4 a un effet suppresseur de tumeur *in vivo* (Piccirillo et al., 2006). Un antagoniste de BMP, Gremlin1, inhibe la différenciation des CIG et maintient leur propriété d'autorenouvellement et de tumorigénicité (Yan et al., 2014).

La voie de signalisation **EGFR** est impliquée dans la promotion de la prolifération et de la tumorigénèse des CIG par transactivation de la β -caténine (Yang et al., 2011). De plus, la surexpression de EGFR augmente les capacités d'autorenouvellement des CIG et leur potentiel tumorigénique (Doetsch et al., 2002).

Comme nous l'avons vu précédemment, la surexpression ou une mutation activatrice des récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR, PDGFR, FGFR) aboutit à l'activation de voies de transduction dans les glioblastomes, en particulier des voies **RAS/MAPK** et **PI3K/AKT/mTOR** (mammalian target of rapamycin). Sunayama et al. ont démontré que ces voies jouent un rôle important dans la régulation des CIG, et qu'un blocage simultané des 2 voies de signalisation entraine une différenciation des CIG et inhibe leur tumorigénicité *in vivo* chez l'animal (Sunayama et al., 2010a). De plus, ils ont également démontré que la voie de signalisation PI3K/mTOR est nécessaire au maintien des propriétés souches des CIG (Sunayama et al., 2010b).

b. Facteurs épigénétiques et micro ARN (microRNA ou miR)

Les facteurs épigénétiques ont également été incriminés dans l'oncogénèse et l'hétérogénéité des gliomes. L'epigénétique peut être définie comme les modifications externes de l'ADN qui régulent l'expression des gènes, sans modification de la séquence ADN correspondante.

Les mécanismes connus de régulation épigénétique sont :

95

- la méthylation de l'ADN. Il s'agit d'une modification épigénétique relativement stable qui entraine un « silencing » des éléments répétitifs et de certains promoteurs de gènes. Dans les cellules cancéreuses, des gains anormaux de méthylation de l'ADN sur des promoteurs de gènes normalement non méthylés (sites CpG) sont les anomalies épigénétiques les plus étudiées (Baylin and Jones, 2011). Elles entrainent une répression transcriptionnelle stable et donc une perte de fonction du gène. Pratiquement tous les cancers possèdent des méthylations anormales de centaines de gènes, affectant 5 à 10% des milliers de promoteurs sur les ilôts CpG qui ne sont normalement pas méthylés. Les DNA methyltransferases (DNMT) sont impliquées dans l'initiation et le maintien de la méthylation de l'ADN. Des inactivations ou des hyperexpressions des DNMT ont été rapportées dans de nombreux cancers, et sont potentiellement incriminés dans les signatures méthylées anormales de l'ADN des cellules cancéreuses (Linhart et al., 2007). Dans les glioblastomes, un sous-type au génome hyperméthylé dit «G-CIMP » serait plus fréquemment retrouvé dans les glioblastomes secondaires que primaires, et serait associé à un meilleur pronostic (voir chapitre *les sous-types moléculaires des gliomes*).

- les mutations histone. Elles entrainent un remodelage chromatinien et sont donc classées parmi les régulateurs de la chromatine. Les régulateurs de la chromatine ont été incriminés dans de nombreux cancers, aussi bien comme tumorigéniques que comme suppresseurs de tumeurs. L'histone H3 est une des 5 principales histones impliquées dans la structure de la chromatine des cellules eucaryotes. Dans les gliomes, des mutations distinctes et récurrentes d'un variant histone spécifique, l'histone H3.3, ont été impliquées dans une large proportion chez l'enfant/adolescent. La présence du mutant histone H3.3 entraine une rupture des modifications post-traductionnelles normales de gènes proches ce qui serait impliqué dans les processus tumorigéniques. Les mutations les plus couramment identifiées du variant histone H3.3 concernent 2 résidus : la lysine en position 27 (lysine à méthionine,

K27M), et la glycine en position 34 (glycine à arginine ou valine, G34R/V) (Jones and Baker, 2014).

- **les micro-ARN (miRNA ou miR)**. Ce sont des petits ARN non codant de 17 à 24 nucléotides qui régulent l'activité post-transcriptionnelle des gènes et jouent donc un rôle fonctionnel important dans de nombreux processus cellulaire. Dans le glioblastome, un nombre important de miR dérégulés (hyper ou hypo exprimés) ont été identifiés (**Tableau 7**), intervenant dans de nombreuses fonctions cellulaires et tumorigéniques telles que la prolifération (miR-21, miR-10b, miR-125, cluster de miR-17-19, miR-381, miR-7, cluster de miR-302-367, miR-18a*), l'invasion (miR-451, miR-21, miR-137, miR-10b, miR-128, miR-124, cluster de miR-302-367, miR-18a*), la résistance aux agents alkylants (miR-130a, miR-195, miR-455, miR-10, miR-145, etc...) (pour revue voir (Bronisz et al., 2016)).

miRNA identified	Expression versus control brain	miRNA identified	Expression versus control brain
miR-21	Up-regulated	miR-132	Down-regulated
miR-10b	Up-regulated	miR-218	Down-regulated
miR-25	Up-regulated	miR-124	Down-regulated
MiR-106b	Up-regulated	miR-128a	Down-regulated
miR-155	Up-regulated	miR-138	Down-regulated
miR-210	Up-regulated	miR-7	Down-regulated
miR-15b	Up-regulated	miR-128	Down-regulated
miR-92a	Up-regulated	miR-149	Down-regulated
miR-92b	Up-regulated	miR-124	Down-regulated
miR-93	Up-regulated	miR-129*	Down-regulated
miR-9	Up-regulated	miR-129	Down-regulated
miR-10b*	Up-regulated	miR-137	Down-regulated
miR-15a	Up-regulated	miR-203	Down-regulated
miR-16	Up-regulated	miR-323	Down-regulated
miR-17	Up-regulated	miR-323-3p	Down-regulated
miR-21*	Up-regulated	miR-329	Down-regulated
miR-27a	Up-regulated	miR-330	Down-regulated
miR-130b	Up-regulated	miR-379	Down-regulated
miR-142-3p	Up-regulated	miR-410	Down-regulated
		miR-432	Down-regulated
		miR-433	Down-regulated
		miR-485p	Down-regulated

Tableau 7. Liste non exhaustive des micro-ARN (miRNA ou miR) dérégulés identifiés dans le glioblastome (Areeb et al., 2015).

Le rôle des miR a également été exploré dans les CIG. Silber et al., ont rapporté des niveaux diminués des miR-124 et miR-137 dans les gliomes de haut grade par rapport à du tissu cérébral non tumoral, suggérant un rôle potentiellement suppresseur de tumeurs dans les CIG (Silber et al., 2008). La surexpression du miR-128 régule négativement les CIG en culture (Godlewski et al., 2008). Le miR-125b est sous exprimé dans les CIG CD133+ comparativement aux cellules CD133- (Shi et al., 2012). De même, le miR-34a (Guessous et al., 2010) et le miR-451 (Gal et al., 2008) ont été retrouvés sous exprimés dans les CIG.

Notre équipe a caractérisé le rôle de 2 microRNA dans l'état souche ou différencié des CIG. Nous avons identifié le cluster de miR-302-367, constitué de 5 miR (miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367), comme étant surexprimé à l'état différencié comparativement à l'état souche des cellules de glioblastomes. Lorsqu'il est exprimé stablement par les CIG (transduction lentivirale), il inhibe leurs caractères souche (fonctionnel et phénotypique) et les rend non tumorigéniques lorsque transplantées chez l'animal. Les cibles du miR-302-367 sont nombreuses : inhibition du récepteur CXCR4 (rôle dans la prolifération, mobilité cellulaire, survie, transcription génique), de la voie d'autorenouvellement Shh-Gli-Nanog, et de régulateurs du cycle cellulaire tels que E2F1, cycline A, cycline D1 (Fareh et al., 2012). A l'inverse, nous avons caractérisé un microRNA surexprimé à l'état souche : le miR-18a*. Nous avons démontré que, dans les CIG, le miR-18a* promeut la prolifération clonale in vitro et la tumorigénicité in vivo. Sur le plan mécanistique, l'induction de miR-18a* réprime l'expression de DLL3, un inhibiteur autocrine de Notch, entrainant une augmentation de Notch-1 activé. Notch-1 activé est nécessaire à l'entretien de l'activation de ERK (extracellular signal-regulated kinase) qui joue un rôle activateur de la voie d'autorenouvellement Shh-Gli-Nanog (Turchi et al., 2013).

8. Communication intercellulaire et vésicules extracellulaires

a. Définitions

La coexistence de plusieurs cellules au sein d'un organisme ou d'une tumeur nécessite un haut niveau de coordination intercellulaire. Cette coordination nécessite une communication entre les cellules. Plusieurs moyens de communication sont décrits :

-le contact cellulaire direct

-les **facteurs solubles**, correspondant en général à des ligands protéiques (hormones, neurotransmetteurs) qui se fixent sur les récepteurs membranaires pour activer une ou des cascades de signalisation dans la cellule réceptrice

-les vésicules extracellulaires (VE), correspondant à des structures sphéroïdes complexes délimitées par une bicouche lipidique similaire à la membrane plasmique, et pouvant transporter des facteurs de signalisation solubles et non solubles tels que des protéines, des acides nucléiques, et des lipides. En fonction de leur origine intracellulaire, de leur taille, et de leur composition, plusieurs classes de VE ont été décrites incluant les exosomes et microvésicules (Heijnen et al., 1999). Les exosomes sont les plus petites vésicules avec un diamètre allant de 30 à 100 nm, et avec une morphologie caractéristique en forme de cuvette. Elles sont formées à partir des corps multivésiculaires issus de la membrane endosomale par bourgeonnement interne. Les exosomes sont ensuite relargués dans le milieu extracellulaire par fusion des corps multivésiculaires à la membrane plasmique (Kowal et al., 2014). Les microvésicules sont plus grosses (100 à 1000 nm) et sont originaires de la membrane plasmique directement par un mécanisme de bourgeonnement identique à celui des virus. Les VE transportent de nombreuses molécules bioactives comme des protéines, de l'ADN, des ARNm, et des ARN non codants comme les micro-ARN et des longs ARN non-codants.

Dans le cerveau, les VE sécrétées sont impliquées dans la communication entre les neurones, les cellules gliales et endothéliales afin de réguler plusieurs processus

99

physiologiques comme la barrière hémato-encéphalique (Schiera et al., 2007). Les VE sont également un thème émergent en neuro-oncologie. Les cellules tumorales de gliomes sécrètent dans le microenvironnement tumoral des quantités importantes de VE contenant des molécules pro-oncogéniques telles que les micro-ARN. La **figure 16** représente les différentes fonctions identifiées des micro-ARN contenus dans les VE. Les micro-ARN représenteraient environ un tiers des ARN non-codants des VE des glioblastomes. Les VE des glioblastomes, comme pour les autres tumeurs, contiennent des signatures de micro-ARN qui ne reflètent que partiellement la composition en micro-ARN de la cellule dont la VE est originaire. Il existe un enrichissement spécifique des VE en micro-ARN qui sont spécifiquement adressés pour les VE (Li et al., 2013).



Figure 16. Résumé des différentes fonctions identifiées des micro-ARN contenus dans les vésicules extracellulaires (exosomes et microvésicules) dans le glioblastome. Abréviations : MVB = microvesicular bodies ; EV = extracellular vesicles (Rooj et al., 2016).

b. Rôles des micro-ARN des VE dans la modulation du microenvironnement des glioblastomes

De nombreux micro-ARN oncogéniques ont été retrouvés dans les VE des glioblastomes, comme le miR-21, le miR-23a, le miR-30a, le miR-221 et le miR-451 (Li et al., 2013). Ce mode de transmission des micro-ARN oncogéniques est susceptible d'être fortement impliqué dans la croissance, l'invasion et la survie tumorale, notamment au travers d'une interaction avec les cellules non tumorales du microenvironnement. Les miR-21 et miR-451 contenus dans les VE des glioblastomes modifient le phénotype des macrophages et des cellules gliales du microenvironnement tumoral afin de favoriser la progression tumorale (van der Vos et al., 2016). En réponse à l'hypoxie tumorale, les cellules endothéliales peuvent également être activées par des micro-ARN des VE (miR-210, miR-1275, miR-376c, miR-23b, miR-193a) afin de stimuler la néovascularisation (Kucharzewska et al., 2013).

c. Les micro-ARN des VE comme biomarqueurs des glioblastomes

Etant donné leur importance dans la régulation tumorale et leur spécificité, les complexes de micro-ARN circulants dans les VE peuvent servir de biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi des patients atteints de glioblastomes.

Dans une méta-analyse récente, Qu et al. ont démontré que le miR-21 circulant dans le LCS avait une sensibilité et une spécificité respectivement de 0,82 et 0,94 pour le diagnostic de glioblastome (Qu et al., 2015). Dans une autre étude sur les micro-ARN circulants dans le LCS, les auteurs ont trouvé que les taux de miR-10b et de miR-21 étaient significativement augmentés chez les malades atteints de glioblastomes et de métastase cérébrale (cancers du poumon et du sein), comparativement aux patients en rémission et à ceux sans cancer. Les membres de la famille miR-200 n'étaient élevés que pour les patients avec métastase cérébrale, permettant ainsi de discriminer les 2 types de tumeur cérébrale (Teplyuk et al., 2012).

Comparativement à des sujets sains, des taux élevés de miR-128, miR-320 et miR-574-3p ont été retrouvé dans le sérum de patients atteints de glioblastomes (Manterola et al., 2014; Roth et al., 2011). De façon surprenante, il a été démontré que les miR-128 et miR-320 étaient suppresseurs de tumeurs avec une expression réduite dans les glioblastomes comparativement à du tissu sain (Godlewski et al., 2008; Sun et al., 2015). Les auteurs concluent que des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier la source de ces micro-ARN dans le sang des patients.

d. Les micro-ARN des VE comme traitement des glioblastomes

Il est possible de développer une approche thérapeutique utilisant les VE comme vecteurs de micro-ARN (ou de molécules anti-micro-ARN) pour inhiber la communication protumorigénique entre les cellules au sein d'une tumeur. Cependant, de nouvelles méthodes de thérapie génique doivent être développées. Des modèles pré-cliniques utilisant les VE comme vecteur de micro-ARN ont été testées, mais l'applicabilité à l'homme n'est pour l'instant pas envisageable compte-tenu des limitations dans la spécificité d'adressage aux cellules cibles in vivo (ciblage et internalisation). Katakowki et al. ont utilisé des VE de cellules stromales de moelle osseuse enrichies en miR-146b par surexpression du transcrit primaire par les cellules donneuses. Des injections thérapeutiques des VE modifiées ont significativement diminué la croissance tumorale de gliomes greffées dans un modèle de rat (Katakowski et al., 2013). Une autre étude portant sur l'utilisation de VE sécrétées par des cellules souches mésenchymateuses enrichies en un inhibiteur de miR-9, a démontré un effet sensibilisant au témozolomide. Le miR-9 est connu pour stimuler l'expression du multidrug transporter (MDR) incriminé dans la chimiorésistance des cellules de glioblastome. Ces résultats ont démontré qu'il est possible d'utiliser les cellules souches mésenchymateuses et leurs VE pour délivrer des anti-miR synthétiques (Munoz et al., 2013).

Dans notre laboratoire, nous avons utilisé des exosomes sécrétés par des cellules de glioblastomes modifiées exprimant stablement le cluster de miR-302-367, décrit précédemment pour ses propriétés suppresseur de tumeur, dans le but d'induire la différenciation de CIG. Les exosomes extraits du milieu de culture des cellules modifiées étaient riches en cluster de miR-302-367. Lorsque les CIG étaient cultivées dans le milieu de culture comprenant les exosomes riches en miR-302-367, elles perdaient leurs caractères souches phénotypiques et fonctionnels. Nous avons également réalisé des greffes orthotopiques dans des souris NOD/SCID de mélanges de CIG et de cellules modifiées exprimant le miR-302-367 (ratio 1/1 et 5/1), comparativement à des groupes contrôles qui n'ont reçus que des CIG. Les co-injections cellulaires ont altéré significativement l'initiation, la croissance et l'infiltration des tumeurs par rapport aux groupes contrôles (Fareh et al., *en révision*).

9. Hétérogénéité des glioblastomes

a. Définitions

L'hétérogénéité des cancers se situe à de multiples niveaux et représente une des caractéristiques principale de nombreux cancers d'organes. L'hétérogénéité génétique rencontrée dans la majorité des cancers est le reflet d'une instabilité génomique, mais également le fruit de modifications épigénétiques qui surviennent dans la cellule. L'hétérogénéité phénotypique se réfère à diverses propriétés fonctionnelles et expressions de marqueurs que les cellules tumorales adoptent au cours de la progression du cancer. A partir des marqueurs de surface cellulaires, nous pouvons identifier différentes souspopulations de cellules tumorales au sein de la même tumeur, suggérant qu'il coexiste dans la même tumeur des cellules tumorales plus ou moins différenciées. Cette hétérogénéité est également définie par le terme d'hétérogénéité intratumorale, pour expliquer les différences retrouvées au sein d'une même tumeur. Le terme d'hétérogénéité intertumorale fait

référence aux différences moléculaires des tumeurs développées dans un même organe, ce qui permet de les classer en différents sous-types et peut conduire à l'établissement d'entités biologiques distinctes (Visvader, 2011).

b. Hétérogénéité inter- et intratumorale

Un aperçu des mutations génétiques rencontrées dans les glioblastomes a été apporté par de nombreuses études, notamment par les données du TCGA (Verhaak et al., 2010). Différents sous-groupes moléculaires ont pu être constitués en fonction des grands groupes de mutations rencontrées, et corrélés à des valeurs pronostiques et prédictives putatives (voir chapitre les sous-types moléculaires des gliomes). Plus récemment, Sottoriva et al. ont démontré qu'il existe non seulement une hétérogénéité cellulaire au sein d'un glioblastome (coexistence de différents sous-types moléculaires) mais également qu'il semblerait y avoir une organisation hiérarchique des lignées cellulaires (figure 17). A partir de biopsies étagées dans différentes zones tumorales sur 11 patients atteints de glioblastomes, ils ont réalisé une analyse de l'ensemble du génome et reconstruit la phylogénie pour chaque fragments de chacun des patients afin d'établir une chronologie d'apparition des mutations. Parmi les résultats de cette étude, on peut retenir qu'il existe des mutations génomiques communes aux cellules tumorales d'un même patient mais avec une importante variété du nombre de copies des altérations. Ceci suggère une origine clonale de la tumeur avec des altérations communes survenant précocement lors du développement tumoral, puis des altérations partagées ou uniques qui surviennent plus tardivement au sein des lignées tumorales. De même, en classant les altérations moléculaires selon la classification de Verhaak, plusieurs sous-types distincts coexistent au sein d'une même tumeur, avec au moins 2 sous-groupes représentés. Enfin, ils n'ont pas pu démontrer de clone tumoral dominant au sein d'une même tumeur (défini par >60% des cellules). Les auteurs concluent que le caractère hétérogène des glioblastomes, leur évolution clonale, et la dynamique tumorale observée expliquent les variations de réponse au traitement. De manière plus spécifique, la population cellulaire survivante après traitement n'est peut-être pas un seul clone résistant mais une population hétérogène de clones qui possèdent les altérations génétiques propices à leur survie (Sottoriva et al., 2013).



Figure 17. Reconstitution de la progression d'un glioblastome dans le temps et l'espace. A. sites des prélèvements tumoraux. B. reconstitution de la phylogénie tumorale. C. reconstitution de l'ontogénie tumorale. La dynamique tumorale est illustrée par l'accumulation des altérations génomiques à différents endroits de la tumeur (Sottoriva et al., 2013).

c. Causes de l'hétérogénéité des glioblastomes

L'hétérogénéité tumorale est une cause majeure d'échec des traitements, matérialisée par les réponses dissociées au sein d'une même tumeur (hétérogénéité intratumorale), et entre les patients (hétérogénéité intertumorale). La constatation de l'hétérogénéité tumorale soulève de nombreuses questions sur l'origine des tumeurs, le modèle de développement des tumeurs, la hiérarchie cellulaire au sein d'une tumeur, la dynamique cellulaire tumorale, et le moyen d'explorer ces phénomènes cellulaires et génétiques.

Nous avons déjà abordé les sujets de l'origine des tumeurs (voir chapitre *origine des CIG*) et des modèles de développement des tumeurs (voir chapitre *les différents modèles de* *croissance tumorale*). Cependant, les modèles ne sont peut-être pas aussi « figés » et des évènements nouveaux peuvent survenir dans chacun d'entre eux (**figure 18**). Le modèle stochastique énonce que chaque cellule tumorale a une capacité équivalente à initier et développer une tumeur. Le modèle des CSC est un modèle hiérarchique qui attribue à un nombre limité de cellules la capacité de s'autorenouveler et de donner naissance à une cellule tumorale plus différenciée de manière asymétrique, conduisant ainsi au développement tumoral. Cependant, dans les 2 modèles, de nouvelles mutations somatiques peuvent survenir et ainsi générer une diversité clonale (évolution clonale) qui augmente l'hétérogénéité tumorale (Beck and Blanpain, 2013).



Figure 18. Les différents modèles de croissance tumorale (Beck et al., 2013).

Les différences constatées entre les patients peuvent refléter également une différence d'organisation hiérarchique des cellules tumorales au sein des tumeurs. Cette organisation est difficile à mettre en évidence dans une tumeur en raison de l'absence de marqueurs membranaires assez robustes pour distinguer les cellules tumorigéniques des non tumorigéniques. Une des possibilités est que toutes les cellules tumorales suivent le modèle des CSC. Une autre possibilité est que seulement une partie des cellules tumorales suit ce modèle. Cette notion de hiérarchie peut même être variable d'un patient à l'autre, avec une prédominance « très hiérarchique » pour certaines tumeurs, et « peu hiérarchique » voire « presque pas hiérarchique » pour d'autres (**figure 19**).



Figure 19. Différents modèles d'organisation hiérarchique entre les cellules tumorigéniques et non tumorigéniques (Meacham et al., 2013).

L'hétérogénéité tumorale peut également provenir du mode de transmission des mutations oncogéniques. Soit les mutations sont le fruit de l'évolution clonale de cellules tumorigéniques, soit de la différenciation de cellules tumorigéniques en cellules non tumorigéniques dans lesquelles de nouvelles mutations surviennent de manière stochastique, soit les deux mécanismes. L'évolution clonale et les mutations stochastiques ne s'opposent pas, ce qui rajoute une couche de complexité dans les causes possibles d'hétérogénéité tumorale (**figure 20**).



Figure 20. Les modèles d'évolution clonale et de mutations stochastiques ne sont pas exclusifs l'un de l'autre et peuvent contribuer, séparément ou conjointement, à l'hétérogénéité tumorale (Meacham et al., 2013).

Dans les cancers qui suivent le modèle des CSC, ce qui semble être le cas des glioblastomes (Sottoriva et al., 2013), il est important d'identifier des marqueurs « souches » robustes qui permettent d'identifier les CSC et leur fonction exacte en fonction du contexte. L'intégration de notre compréhension de la biologie des CSC avec celle d'autres sources d'hétérogénéité nous permettra de développer une vision plus réaliste de la contribution de chacun des mécanismes dans la progression tumorale (Meacham and Morrison, 2013).

Un autre concept émergent qui peut expliquer l'hétérogénéité tumorale concerne les modifications dynamiques des propriétés phénotypiques et fonctionnelles dont sont capables les cellules cancéreuses, en d'autres termes les capacités de plasticité des cellules tumorales et *a fortiori* des CSC.

10. Plasticité des CSC

a. Définitions et modèles d'étude

Le concept de plasticité des cellules tumorales énonce le fait que les cellules tumorales ont la capacité de transiter de manière effective et réversible d'un état non tumorigénique à un état tumorigénique, contribuant ainsi à la croissance tumorale. Ceci ne rend compte que du caractère tumorigénique des cellules, pas forcément de leurs propriétés souches. C'est la raison pour laquelle le concept de **plasticité des CSC** est plus approprié. Ce modèle considère que la majorité des cellules tumorales peut avoir des propriétés souches (à différents degrés) en fonction des contraintes environnementales et/ou d'autres mécanismes stochastiques (Chaffer et al., 2011; Gupta et al., 2011).

Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents de la plasticité des CSC ne sont pas connus, ce concept fait le lien entre le modèle de développement tumoral classique des CSC et le modèle d'évolution clonale (voir **figure 20**, paragraphe *causes de l'hétérogénéité des glioblastomes*). La hiérarchie des CSC est plus flexible et doit être perçue comme bidirectionnelle entre les CSC et les cellules différenciées. De plus, quel que soit le/les mécanisme(s) de la plasticité des CSC, elle semblerait liée au type de tumeur et aux altérations génétiques qu'elle présente (Medema, 2013).

Une des limites majeure à l'évaluation du phénomène de plasticité des CSC est le modèle d'étude. La plupart des études sur la transition réversible de cellules tumorigéniques (CSC) en non tumorigéniques ont été faite à partir de **lignées cellulaires**. Les cellules en culture acquièrent une certaine plasticité endogène au fur et à mesure des passages en culture, ce qui pourrait majorer ce phénomène par rapport à un état spontané (Meacham and Morrison, 2013). Une autre limite d'exploration provient du **test de lignage marqué** des cellules *in vivo*, expérimentation de référence pour évaluer l'évolution et le potentiel de renouvellement à long terme de cellules souches (cancéreuses ou normales pendant le développement). Ce test consiste à induire de manière permanente l'expression d'un marqueur associé à un gène Cre inductible au sein d'une lignée cellulaire, afin de suivre son renouvellement au travers de l'expression du marqueur dans les cellules filles (**figure 21**). Cette expérimentation a apporté des arguments solides pour établir un lien direct entre une CSC et des cellules filles non tumorigéniques, sans lequel les différences fonctionnelles observées entre les 2 types cellulaires auraient pu être le reflet de différences génétiques. Par contre, ce test n'explore pas la reprogrammation de cellules différenciées en CSC, car la possibilité que les CSC marquées proviennent elles-mêmes de cellules plus différenciées ne peut être exclue (Singh et al., 2015)



Figure 21. Test de lignage cellulaire *in vivo*. Les cellules marquées sont représentées en vert, les cellules rouges sont les cellules souches (cancéreuses ou normales), les cellules beiges sont les progéniteurs, et les cellules violettes sont les cellules différenciées. Seules les cellules souches sont capables de donner à long terme un nombre important de clones marqués (autorenouvellement infini). Les progéniteurs ne donnent qu'un faible nombre de clones marqués, et les cellules différenciées ne peuvent pas donner de clones marqués (Beck et al., 2013).

Les **transplantations chez l'animal** (orthotopiques ou hétérotopiques) permettent d'évaluer le caractère tumorigénique ou non des lignées greffées mais pas le comportement des cellules individuellement au sein des tumeurs. Cependant, même si les cellules humaines greffées chez l'animal se heurtent à la réaction immunitaire inter-espèce de l'hôte, les greffes orthotopiques permettent de reproduire plus fidèlement le microenvironnement d'origine des tumeurs que les greffes hétérotopiques.

Il apparaît donc que pour évaluer les capacités de réversibilité des cellules tumorales, et plus particulièrement des CSC, il est recommandé d'utiliser des tumeurs fraichement réséquées de patients plutôt que des lignées cellulaires, d'identifier des marqueurs des caractères souches robustes (autorenouvellement et multipotence essentiellement) afin d'établir un tri cellulaire sélectif, et de caractériser les cellules sur le plan fonctionnel non seulement *in vitro* (clonogénicité) mais également *in vivo* dans le même site que la tumeur d'origine (tumorigénicité).

b. Plasticité des CSC de tumeurs non gliales

La capacité de cellules tumorales non tumorigéniques à transiter vers un état tumorigénique a été observée dans plusieurs cancers en réponse à différents signaux tels que l'hypoxie (via HIF), TGF β , FGF, IL-6 (interleukin-6) (Gonzalez and Medici, 2014; Thiery et al., 2009). Ce phénomène a d'abord été décrit sous le terme de EMT (epithelial-mesenchymal transition) en raison des modifications biochimiques qui surviennent dans les cellules épithéliales et qui conduisent à l'acquisition de propriétés mésenchymateuses incluant la perte d'adhésion et l'acquisition de propriétés migratoires. L'EMT est un processus normal du développement car il permet la migration de cellules du mésoderme durant la gastrulation ou la délamination des cellules de la crête neurale. En oncologie, ce processus a été associé à l'agressivité et aux capacités métastatiques, ainsi qu'au phénotype souche des cellules de certains cancers (Mani et al., 2008; Thiery et al., 2009).

Le phénomène de conversion d'un état différencié vers un état souche des cellules tumorales a été décrit dans le cancer du sein (Hollier et al., 2013; Mani et al., 2008; Morel et al., 2008), dans le cancer du pancréas (Rhim et al., 2012; Wang et al., 2009), et le cancer colorectal (Fan et al., 2012).

A ce jour, une seule étude sur la dédifférenciation spontanée des cellules tumorales différenciées en CSC a été publiée. Chaffer et al. ont identifié une sous population de cellules tumorales épithéliales mammaire capables d'acquérir spontanément des propriétés souches *in vitro* et *in vivo* sans manipulation génétique (Chaffer et al., 2011).

c. Plasticité des CIG

Dans le domaine des gliomes, il a été démontré que des astrocytes et des neurones matures pouvaient former un glioblastome dont les cellules tumorales exprimaient des marqueurs souches, sous l'effet de mutations génétiques induites (Friedmann-Morvinski et al., 2012) (voir chapitre origine des CIG). La reprogrammation des cellules de glioblastomes différenciées en CIG a été démontrée dans un environnement hypoxique riche en HIF-2a (Heddleston et al., 2009), sous l'effet d'un stress acide dans un environnement au pH bas (Hjelmeland et al., 2011), et après exposition des cellules tumorales à l'oxyde nitrique (NOS) (Charles and Holland, 2010). Auffinger et al. ont démontré que l'exposition des cellules tumorales d'un gliome au témozolomide augmente le compartiment des CIG in vitro et in vivo par dédifférenciation de cellules différenciées (Auffinger et al., 2014). Ils proposent comme explication que le témozolomide provoquerait des changements du microenvironnement tumoral avec sécrétion de HIF-1 α et HIF-2 α , signaux semblables à ceux retrouvés dans les niches périvasculaires et propices à l'entretien des CIG. Les radiations ionisantes auraient également un effet de reprogrammation de cellules gliales différenciées comme démontré par Dahan et al. à partir de plusieurs glioblastomes fraîchement réséqués. L'irradiation des cellules tumorales à des doses infra-toxiques (3 Gy) a permis un enrichissement des populations cellulaires en cellules exprimant les marqueurs souches tels que Olig2, Sox2, Nestine. Cet enrichissement était indépendant d'un processus de sélection clonale d'un clone résistant puisque les doses reçues par les cellules étaient non létales et n'ont pas entrainé d'altération du taux de prolifération ni de mort cellulaire (Dahan et al., 2014).

d. Implications thérapeutiques

Le phénomène de plasticité des CSC apporte un niveau de complexité supplémentaire mais permet de mieux comprendre la biologie des cellules, leur organisation au sein des tumeurs et leur mécanisme de résistance aux traitements.

Comme vu précédemment, pour les cancers suivant le concept de plasticité des CSC, n'importe quelle cellule tumorale différenciée (non tumorigénique) est capable, en fonction des signaux émis par le microenvironnement, de se reprogrammer en CSC (tumorigénique). Les capacités de conversion bidirectionnelle de ce modèle remettent en question l'organisation hiérarchique et la notion de tumorigénicité/non tumorgénicité des cellules. Il permet également de mieux expliquer l'hétérogénéité intra- et intertumorale, en raison de la multiplication des clones survivants et des risques supplémentaires de survenue stochastique des mutations génétiques.

Les études sur les effets de la chimiothérapie (Auffinger et al., 2014) et de la radiothérapie (Dahan et al., 2014) sur la reprogrammation des cellules différenciées en CSC suggèrent un nouveau mécanisme d'échappement aux traitements et donc de récidive tumorale. Selon le modèle des CSC classique, la population cellulaire cible évidente est le contingent de CSC. L'objectif étant d'induire une déplétion tumorale en CSC, cellules responsables de la récidive et du caractère résistant aux traitements. L'idée générale est de les forcer à se différencier afin de les rendre non tumorigéniques et éventuellement sensibles aux traitements habituels (**figure 22**).

Dans les glioblastomes, Chen et al. ont utilisé une approche ablative par lignage génétique dans un modèle murin. Ils ont identifié un sous-groupe de cellules tumorales quiescentes marquées par nestine-Cre résistantes au traitement par témozolomide et responsables de la récidive tumorale. La déplétion sélective de cette population cellulaire associée à la chimiothérapie a permis de repousser significativement le délai avant récidive tumorale et la

113

survie des souris comparativement au groupe chimiothérapie seule (Chen et al., 2012). Notre équipe a utilisé une approche épigénétique pour forcer les CIG à se différencier, en induisant de manière stable le cluster de miR-302-367. La croissance des cellules greffées chez la souris (groupes de CIG exprimant le cluster de miR-302-367 vs. groupes de CIG contrôles) était suivie en imagerie par luminescence (gène luciférase). La croissance tumorale était significativement altérée dans les groupes cluster de miR par rapport aux groupes contrôles (Fareh et al., 2012). Les résultats de ces études suggèrent une efficacité anti tumorale d'une approche thérapeutique ciblant spécifiquement les CIG, combinée ou non à un traitement conventionnel.

Depuis la découverte du mécanisme de plasticité bidirectionnelle, il semble nécessaire d'associer aux thérapies anti-CSC une approche inhibant la reprogrammation des cellules différenciées. A ce jour aucun essai préclinique n'a été publié dans ce domaine. C'était le sujet principal de cette thèse de Sciences. Notre équipe a démontré que l'ajout du facteur de croissance EGF au milieu de culture (neutre) était suffisant pour induire une reprogrammation de cellules de glioblastome différenciées, et nécessaire car un blocage du récepteur par cetuximab (anticorps anti-EGFR) empêchait la reprogrammation en CIG (Almairac et al., *en révision*).



Figure 22. Approches thérapeutiques dans le modèle classique des CSC et dans le modèle plasticité des CSC. Dans le modèle classique, une thérapie ciblant spécifiquement les CSC permettrait la régression tumorale. Dans le modèle plastique, il faudrait associer une thérapie anti-conversion des cellules différenciées (Singh et al., 2015).

PARTIE II : OBJECTIFS DE LA THESE

Objectifs de la thèse

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus agressives de l'adulte. Malgré les progrès de la chirurgie, des molécules anticancéreuses et de la radiothérapie, la guérison n'est pas possible et la récidive est la règle, le plus souvent précocement (7 mois en moyenne). La résistance au traitement peut être expliquée, au moins en grande partie, par le concept des cellules initiatrices de gliomes (CIG) aux propriétés souches. En effet, il a récemment été découvert que ces tumeurs suivent le modèle tumoral des cellules souches cancéreuses (CSC), comme d'autres cancers, qui énonce qu'une sous-population cellulaire de la tumeur est particulièrement chimio et radiorésistante, et qu'un faible nombre de ces cellules suffit à initier et développer une tumeur. Les mécanismes de résistance au stress génotoxique des CSC/CIG sont multiples, en rapport avec leur caractère quiescent peu renouvelant (résistance naturelle), avec leurs caractéristiques géniques et épigénétiques (systèmes de réparation de l'ADN et anti-apoptotiques efficaces, allongement des télomères) et moléculaires (systèmes d'efflux des molécules de chimiothérapie, multi-drug resistance). Plus récemment encore, le concept de plasticité des cellules tumorales a été décrit dans plusieurs cancers dont les glioblastomes, et vient rajouter une contrainte supplémentaire dans la compréhension de la biologie des tumeurs et leur traitement. Le modèle hiérarchique des CSC est perturbé par le fait que les cellules tumorales non tumorigéniques (différenciées) sont capables de conversion en cellules tumorigéniques (souches), apportant ainsi des explications supplémentaires pour l'hétérogénéité tumorale, l'oncogenèse (cellule d'origine), et la résistance aux traitements. Il s'agit donc d'un concept central dans la pathogénie des glioblastomes, et semble constituer une cible thérapeutique privilégiée.

Dans mon laboratoire d'accueil, initialement en partenariat avec une unité de recherche Parisienne, et maintenant avec les services de neurochirurgie et d'anatomopathologie du CHU de Nice, nous travaillons sur des glioblastomes humains. Nous avons constitué plusieurs cultures de CIG directement issues de l'exérèse de glioblastomes de patients. Les tumeurs étaient dissociées immédiatement après le geste chirurgical, afin de caractériser et collecter les lignées cellulaires. Nous avons également fait des greffes orthotopiques chez la souris, afin de réaliser des tests fonctionnels *in vivo* et des essais potentiellement thérapeutiques précliniques. Nous avions déjà démontré les effets suppresseurs de tumeur d'un cluster de micro-ARN, le miR-302-367, en forçant les cellules l'exprimant stablement par transduction lentivirale à se différencier (Fareh et al. 2011).

Le thème central de ma thèse est la plasticité (ou interconversion) des cellules de glioblastome, avec pour objectifs principaux :

- l'étude des voies de signalisation impliquées dans la différenciation des CIG et dans la reprogrammation (dédifférenciation) des cellules différenciées

l'évaluation *in vivo* des effets différenciant des CIG à distance du cluster de miR-302367

- la caractérisation des exosomes, vecteurs supposés de micro-ARN, contenus dans les milieux de culture des CIG et des cellules tumorales génétiquement modifiées pour exprimer stablement le cluster de miR-302-367

120

PARTIE III : RESULTATS
Article n°1

"EGF/EGFR pathway is sufficient to induce aggressiveness and expression

of pluripotency markers of patients-derived glioblastoma cells"

F. Almairac, L. Turchi, D. Fontaine, P. Paquis, F. Burel-Vandenbos, T. Virolle

En révision

npg	manuscripttrackingsystem

tracking system home

author instructions reviewer instructions ⑦ help tips 🗵 logout journal home

Cell Death & Differentiation

Manuscript #	CDD-16-0640
Current Revision #	0
Submission Date	28th Jun 16
Current Stage	Under Consideration
Title	EGF/EGFR pathway is sufficient to induce aggressiveness and expression of pluripotency markers of patient-derived glioblastoma cells
Running Title	EGF mediated spontaneous reprogramming
Manuscript Type	Original Paper
Manuscript Comment	Karl-Heinz Krause (Karl-Heinz.Krause@unige.ch) Jean Philippe Hugnot (jean-philippe.hugnot@umontpellier.fr)
Corresponding Author	Dr. Thierry Virolle (UMR CNRS 7277 - UMR INSERM 1091 Université de Nice-Sophia Antipolis)
Contributing Authors	Dr. Fabien Almairac , Dr. Laurent Turchi , Prof. Denys Fontaine , Prof. Philippe Paquis , Prof. Hervé Chneiweiss , Dr. Marie-Pierre Junier , Dr. fanny burel-vandenbos
Abstract	There is great interest but little understanding in how cancer stem cells arise. Here we show that tumor cells exhibiting stem-like properties and expression of stemness (CD133) and pluripotency markers (SOX2, NANOG, OCT4), can arise from differentiated tumor cells that are isolated from human glioblastomas. These cells could transit from a more differentiated state that cannot self-renew to a self-renewing stem-like state upon EGF/EGFR signaling. This dedifferentiation process induced expression of pluripotency markers, and restored clonal and tumorigenic properties as well as resistance to temozolomide, the chemotherapy of reference. EGF/EGFR signaling including ERK activation was crucial for this cellular reprogramming. Interestingly, expression of pluripotency markers occurred before the cells re-entered the cell cycle, demonstrating that the cells have the capacity to change and reprogram before the cell division starts. Our findings support a model of tumor homeostasis in which tumor cells driven by environmental cues such as EGF, can spontaneously acquire stem-like properties contributing thus to the enrichment in tumor propagating cells.

Résumé de l'article n°1

« La voie EGF/EGFR est suffisante pour induire l'agressivité et les marqueurs de pluripotence de cellules de glioblastomes humains »

Introduction

La cause principale d'échec des traitements contre les glioblastomes est la récidive, qui survient en moyenne 7 mois après la chirurgie d'exérèse. Les thérapies de 2^{ème} et 3^{ème} ligne comprennent essentiellement des molécules de chimiothérapie anticancéreuse et un antiangiogénique, le bévacizumab (Taal et al., 2014). Les glioblastomes semblent se développer selon le modèle tumoral des cellules souches cancéreuses (CSC), à savoir un modèle hiérarchique qui a pour point de départ les cellules initiatrices de gliomes (CIG) (Visvader, 2011). Les CIG ont été incriminées comme étant la cause majeure des récidives et constituent donc une cible thérapeutique prometteuse (Valent et al., 2012). Cependant, la biologie des CIG et le moyen de les cibler spécifiquement ne sont pas clairement établis. La définition des CIG répond à des critères phénotypiques et fonctionnels multiples (Valent et al., 2012). Une difficulté provient également de l'absence de marqueur cellulaire isolé permettant de cibler et de trier de manière fiable cette population au sein d'une tumeur (Meacham and Morrison, 2013). Le CD133, initialement décrit comme étant le marqueur permettant d'identifier les CIG (Singh et al., 2004), a ensuite été remis en question en raison de la capacité de certaines cellules CD133- à initier le développement d'un glioblastome (Chen et al., 2010; Patru et al., 2010). De plus, il a été démontré qu'il était possible d'enrichir une population cellulaire tumorale en CIG soumettant la tumeur à un stress génotoxique (Auffinger et al., 2014; Dahan et al., 2014; Heddleston et al., 2009; Hjelmeland et al., 2011). Il s'agit d'un phénomène de conversion (ou plasticité cellulaire) qui vient renforcer la complexité biologique et la prise en

charge thérapeutique des glioblastomes. Il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de conversion des cellules de glioblastomes en fonction des modifications du microenvironnement.

Le propos de cette étude est de démontrer que les cellules tumorales de glioblastome, initialement différenciées dans la tumeur, ont la propriété de se convertir spontanément sous l'effet de l'EGF en cellules souches tumorales exprimant des marqueurs de pluripotence. Notre objectif était d'étudier la plasticité des cellules de glioblastomes en fonction des modifications de l'environnement tumoral, de les caractériser sur le plan phénotypique et fonctionnel, et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la conversion de cellules différenciées en CIG.

Matériels et Méthodes

Nous avons travaillé à partir de plusieurs tumeurs fraîchement réséquées de patients (GB3, GB15, GB16, TG1), afin de supprimer les effets secondaires et dérive liés à la culture cellulaire prolongée. Pour caractériser le niveau de différenciation des cellules, nous avons utilisé une association de marqueurs et de caractéristiques propres à chaque condition. Pour l'état souche il s'agissait de la formation de neurosphères en culture, de l'expression du CD133, et des facteurs de pluripotence Sox2, Oct4 et Nanog. Sur le plan fonctionnel nous avons évalué la capacité d'autorenouvellement des CIG par la prolifération clonale, et de leur tumorigénicité *in vivo* par la transplantation dans des cerveaux de souris. Nous avons également fait des tests *in vitro* de résistance au témozolomide, agent anticancéreux alkylant utilisé en première ligne de traitement (Stupp et al., 2005). Pour affirmer l'état différencié, il fallait que les cellules n'expriment pas les marqueurs souches, expriment la GFAP (glial fibrillary acidic protein), adhèrent à la boite de culture avec des prolongements

cytoplasmiques, et n'aient pas de caractères autorenouvelant ni tumorigénique. Sur le plan de la réponse à la chimiothérapie, les cellules différenciées sont plus sensibles au témozolomide que les CIG. En ce qui concerne les modifications de l'environnement tumoral, les milieux de culture habituellement utilisés sont un milieu enrichi en facteurs de croissance (EGF et du FGF-β) pour l'entretien de l'état souche des CSC, et un milieu sans facteurs de croissance et contenant du sérum de veau fœtal à 1% (SVF1%) pour l'entretien des cellules différenciées. Etant donné que les glioblastomes expriment volontiers EGFR (Ohgaki and Kleihues, 2005), et qu'il s'agit d'une voie fortement impliquée dans plusieurs aspects de la tumorigénicité des cancers (Maramotti et al., 2016), nous nous sommes concentrés sur la voie EGF/EGFR/ERK, en ne rajoutant dans le milieu « pro-souche » que de l'EGF. Sur le plan mécanistique, nous avons étudié les conséquences fonctionnelle et moléculaire du blocage spécifique de cette voie en utilisant un anticorps monoclonal anti-EGFR (cétuximab). Dans une étude précédente, nous avions démontré l'implication de ERK phosphorylé (activé) dans l'activation de la voie Shh-Gli-Nanog (Turchi et al., 2013), nécessaire à l'autorenouvellement et à la pluripotence des CIG (Fareh et al., 2012).

Résultats

Nous avons démontré que les cellules de glioblastomes fraîchement dissociées d'une tumeur, lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu seulement enrichi en EGF, étaient capables de se regrouper et de former des neurosphères non adhérentes en seulement 48h (**figure 1a**). A partir de la lignée GB3, initialement (à 0h) la majorité des cellules n'exprimaient pas CD133, Sox2, Oct4 et Nanog, et exprimaient GFAP (**figure 1b**). Elles n'étaient pas capables de former *in vivo* une tumeur à l'identique 3 mois après la xénotransplantation orthotopique (**figure 1c**), et n'étaient pas capables de prolifération clonale (data non montrées). A 48h, les neurosphères nouvellement formées exprimaient CD133 et les marqueurs de pluripotence

Sox2, Oct4 et Nanog, et n'exprimaient plus la GFAP (**figure 1b**). Elles étaient hautement tumorigéniques conduisant à la formation d'une tumeur à 3 mois de la xénotransplantation (**figure 1c**), et étaient autorenouvellantes avec un taux de prolifération clonale à 60% en moyenne après 7 passages (**figure 1d**).

Pour démontrer les capacités d'une population cellulaire négative pour les marqueurs souches et non autorenouvellante à ré-exprimer les marqueurs de pluripotence en présence uniquement d'EGF, nous avons pris 2 autres lignées fraîchement dissociées de glioblastomes (GB15 et GB16) (**figure 2a**). Un tri des cellules à partir du marqueur membranaire CD133 a été réalisé pour les caractériser pour Oct4 et Nanog. La population CD133- constituait respectivement 83,6% et 99% des cellules des 2 glioblastomes (16,4 et 1% de cellules CD133+). Ces populations CD133- exprimaient Oct4 et Nanog dans seulement 1,9 et 3,2% des cas, alors que Oct4 et Nanog étaient exprimés dans plus de 85% des cellules CD133+ (**figure 2b**). La population CD133-/Oct4-/Nanog- n'était pas capable de prolifération clonale (data non montrées). La culture des cellules CD133-/Oct4-/Nanog- dans de l'EGF a permis de restaurer les capacités de prolifération clonale (65% en moyenne après 7 passages), comme constaté précédemment avec les neurosphères de GB3 (**figure 2c**). Les cellules extraites du test de prolifération clonale en milieu EGF exprimaient majoritairement Oct4, Nanog et CD133 (98,7%, 96% et 70,8% respectivement) (**figures 2d, e, f**). De façon intéressante, lorsque du cetuximab était rajouté au milieu EGF, la prolifération clonale était nulle (**figure 2c**).

Pour renforcer l'étude du caractère plastique des cellules de glioblastome, nous avons ensuite observé que les GB3 dédifférenciées dans de l'EGF, se différenciaient en milieu SVF1%, et étaient capables à nouveau de se dédifférencier en présence uniquement d'EGF dans le milieu de culture (**figures 3a, b, c**). Cette dédifférenciation était inhibée par le cetuximab (**figures 3d, e**). A partir d'une autre lignée cellulaire (TG1), nous avons remarqué que les cellules non différenciées (neurosphères directement triées de la tumeur) et les cellules dédifférenciées

avaient le même comportement *in vivo*, à savoir la formation de volumineuses tumeurs dans le cerveau de souris immunodéprimées et selon la même croissance (**figures 4b, c**). Les cellules différenciées en milieu SVF1%, n'exprimant pas Oct4 ni Nanog, n'étaient pas capables de former des tumeurs (**figures 4b, c**). Sur le plan pharmacologique, les cellules non différenciées et dédifférenciées étaient significativement plus résistantes au témozolomide *in vitro* (400µM) que les cellules différenciées en SVF1% (60% de cellules survivantes vs. <20%) (**figure 4d**).

Sur le plan moléculaire, la dédifférenciation s'accompagnait d'une phosphorylation du récepteur EGFR (ERBB1) et de la voie ERK sous-jacente (**figure 3f**). De façon importante, cette activation de la voie EGF/EGFR/ERK survenait dès le début de la dédifférenciation (15 mn) et s'accompagnait des modifications phénotypiques et fonctionnelles dès 48h. Or, les cellules ne se répliquaient qu'à partir de 72h, comme le montraient l'expression de cycline A et la phosphorylation des histones sur la serine 10 (H3Pser10), 2 marqueurs de reprise du cycle cellulaire (**figures 3g, e**). Il ne s'agissait donc pas d'une sélection d'un clone non différencié résiduel dans le milieu, mais bien d'une modification de la cellule différenciée qui ré-exprimait les facteurs de pluripotence avant de se répliquer.

Discussion

Nous avons démontré que des cellules différenciées non tumorigéniques négatives pour CD133, Oct4 et Nanog sont capables de se dédifférencier en cellules aux caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles souches. EGF semble suffisant et nécessaire pour déclencher la reprogrammation en CIG, en activant la voie EGF/EGFR/ERK, dont le processus est inhibé par un anti-EGFR. De façon intéressante, les cellules différenciées issues de CIG sont également capables de dédifférenciation avec les mêmes propriétés cellulaires que les CIG non différenciées.

Ces résultats apportent un argument supplémentaire en faveur de la plasticité cellulaire des glioblastomes, et suggèrent que toutes les cellules tumorales sont capables d'exprimer ou de réprimer à volonté les facteurs de transcription afin de modifier leur phénotype et leur comportement en fonction des contraintes induites par l'environnement. Ces observations contrastent avec le modèle classique des CSC et son organisation hiérarchique unidirectionnelle (Beck and Blanpain, 2013; Visvader, 2011), et indique que le potentiel d'interconversion est intrinsèque aux cellules tumorales et dépend uniquement des signaux émis par le microenvironnement (Medema, 2013).

Les modifications phénotypiques et fonctionnelles que nous avons observées lors de la dédifférenciation survenaient avant la réplication cellulaire, éliminant ainsi la possibilité de sélection d'un clone aux caractères souches résiduel dans le milieu. Cette observation confirme celles d'études sur le stress génotoxique subit par les glioblastomes en pratique courante, à savoir la radiothérapie et la chimiothérapie par témozolomide. Dahan et al. ont démontré que les cellules tumorales différenciées étaient capables d'acquérir des propriétés souches après irradiation à des doses sous-létales, sans altération de leur prolifération ni viabilité (Dahan et al., 2014). Auffinger et al. ont démontré, par une méthode de traçage des lignées, que le pool de CIG était amplifié après traitement par témozolomide à partir de la conversion de cellules différenciées (Auffinger et al., 2014).

Les capacités d'interconversion des cellules au sein d'une tumeur permettent également d'alimenter le débat sur l'origine des cellules tumorales et l'hétérogénéité cellulaire. Sottoriva et al. ont démontré qu'il existe une hétérogénéité intratumorale (Sottoriva et al., 2013). A partir de l'observation des altérations géniques communes et individuelles présentées par les différents sous-types cellulaires présents dans la tumeur, ils ont déduit qu'il existait une cellule d'origine ayant subit différentes altérations génétiques au fur et à mesure des réplications, expliquant la coexistence de plusieurs clones cellulaires, correspondant à plusieurs sous-types moléculaires de la classification de Verhaak (Verhaak et al., 2010). De façon intéressante, le clone suspecté d'origine possédait un gain/amplification de EGFR pour les 9 tumeurs criblées en séquençage à haut débit, confirmant la place centrale qu'occupe la voie EGF/EGFR dans l'état souche. La notion de plasticité des cellules tumorales que l'on démontre ne vient pas en contradiction avec les résultats de Sottoriva et al., mais en complément. La co-existence de différents sous-types moléculaires au sein d'une tumeur peut également être la conséquence de la reprogrammation de plusieurs cellules différenciées différentes, porteuses d'altérations génomiques différentes, ainsi que de l'accumulation de mutations génétiques survenant à chaque « mouvement » conversif de la cellule.

Sur le plan mécanistique, dans notre étude l'activation de la voie EGF/EGFR/ERK semblait nécessaire pour la dédifférenciation des cellules non tumorigéniques. Ces résultats sont concordants avec ceux déjà publiés (Fareh et al., 2012; Turchi et al., 2013; Zbinden et al., 2010). L'activation constitutive de ERK par phosphorylation entraine l'activation de la voie Shh, qui joue un rôle crucial dans l'induction de la production de Nanog, impliqué dans l'invasion et l'autorenouvellement des CIG. De plus, l'expression de Nanog dans les cellules HeLa induit la production endogène de Oct4 et Sox2 (Ding et al., 2016), facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence et l'autorenouvellement de cellules embryonnaires humaines (Boyer et al., 2005).

Pour conclure, nous démontrons ici que des cellules de glioblastomes ont une capacité de conversion bidirectionnelle. Ceci vient alimenter le débat sur la cellule tumorale d'origine, et remettre en question la hiérarchie unidirectionnelle du modèle tumoral à CSC. De plus, les modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules en dédifférenciation surviennent avant la réplication, remettant en cause le modèle mathématique proposé par Kaveh et al. dans lequel les cellules ont besoin de se répliquer pour acquérir des caractéristiques souches et donner une CSC par division asymétrique (Kaveh et al., 2016).

Légendes des figures

Figure 1. EGF induit la formation de neurosphères, la tumorigénicité, et l'expression des marqueurs de pluripotence des cellules de glioblastome.

(a) Vidéo microscopie sur 48 heures montrant la formation de neurosphères (flèches noires) de cellules fraichement dissociées d'un glioblastome humain cultivées dans un milieu ne contenant que de l'EGF (10 ng/ml) (b) Immunofluorescence des cellules de glioblastome pour GFAP, SOX2, OCT4, NANOG et CD133 à H0 (en haut) et à H48 de culture dans de l'EGF (en bas). Les noyaux sont marqués au DAPI. Les flèches blanches indiquent les cellules marquées au sein des neurosphères (c) Immunomarquage des cellules de glioblastome à 3 mois de la transplantation dans des cerveaux de souris immunodéprimées avant (0h, en haut) et après (48h, en bas) la formation de neurosphères dans de l'EGF (d) Prolifération clonale des cellules des neurosphères sur 7 passages dans de l'EGF, 1 cellule par puits sur une plaque de 96 puits.









7 subsequent Rounds

#1

#2

#6

▼ #7





Total Events: 5348

Figure 2. La voie EGF/EGFR est nécessaire et suffisante pour convertir des cellules de glioblastome négatives en cellules positives pour OCT4/NANOG et CD133.

(a) Processus de caractérisation pour les marqueurs souches des cellules de glioblastome (b) Analyses en FACS pour l'expression de CD133, puis pour l'expression de NANOG et OCT4 pour les cellules CD133- (à gauche) et CD133+ (à droite) (c) Prolifération clonale des cellules CD133-/NANOG-/OCT4- sur 7 passages dans de l'EGF sans et avec cetuximab (anti-EGFR), 1 cellule par puits sur une plaque de 96 puits (d) Analyse en FACS des cellules CD133-/NANOG-/OCT4- après 7 passages de prolifération clonale dans de l'EGF pour l'expression de NANOG (à gauche), de OCT4 (à droite), et (e) de CD133 (f) Proportions des cellules de glioblastome exprimant OCT4 et NANOG avant (à gauche), et après (à droite) la sélection clonale dans de l'EGF.

Figure 3. Les cellules de glioblastome dédifférenciées dans de l'EGF conservent leur plasticité *in vitro*.

(a) Photomicrographie en contraste de phase des cellules de glioblastome après 4 jours de différenciation en milieu sérum (0h), et vidéo microscopie pendant 48h de culture dans de l'EGF des cellules différenciées (b) Immunofluorescence pour GFAP, OCT4, SOX2 et NANOG des cellules différenciées en milieu sérum pendant 4 jours (c) Immunofluorescence pour GFAP, OCT4, SOX2 et NANOG des cellules différenciées après 48 heures de culture dans de l'EGF sans cetuximab, (d) et avec cetuximab. Les noyaux sont marqués au DAPI (e) Photomicrographie en contraste à fort grossissement des cellules de glioblastome différenciées pendant le processus de dédifférenciation dans de l'EGF, sans (à gauche), et avec cetuximab (à droite) (f) Western blot montrant l'expression de phospho-ERBB1, ERBB1, phospho-ERK, et ERK1 dans les cellules de GB3 non différenciées (ND), différenciées en milieu sérum (diff), et après 15 mn de dédifférenciation dans de l'EGF (dediff), sans et avec cetuximab (g) Western blot montrant l'expression de ERK2, pRB, et cycline A dans les cellules de GB3 non différenciées (ND), différenciées en milieu sérum (diff), et pendant 4 jours de dédifférenciation dans de l'EGF (dediff) (h) Proportions de cellules de GB3 non différenciées (ND), différenciées en milieu sérum (diff), et dédifférenciées dans de l'EGF (dediff), positives pour H3Pser10 et cycline A.



а

DMEM+EGF (Dediff)













Figure 4. La dédifférenciation induite par l'EGF restaure les propriétés clonales et tumorigéniques *in vivo*, et la résistance au témozolomide.

(a) Prolifération clonale des cellules de glioblastomes (GB3 et TG1) non différenciées, différenciées en milieu sérum, et dédifférenciées dans de l'EGF (48h), pendant 7 passages dans une plaque de 96 puits avec 1 cellule par puits (b) Xénotransplantations orthotopiques dans le cerveau de souris immunodéprimées des cellules de TG1 non différenciées, différenciées en milieu sérum, et dédifférenciées dans de l'EGF. Les tumeurs étaient visualisées (en haut) et leur croissance quantifiées (en bas) par imagerie lumineuse luciférase (c) Immunomarquage à 3 mois de la transplantation dans des cerveaux de souris immunodéprimées de cellules de TG1 non différenciées, différenciées en milieu sérum, et dédifférenciées dans de l'EGF (d) Proportions de cellules de glioblastomes (GB3 et TG1) non différenciées, différenciées en milieu sérum, et dédifférenciées dans de l'EGF (48h), survivantes après traitement des cultures par témozolomide à 400 μ M. EGF/EGFR pathway is sufficient to induce aggressiveness and expression of pluripotency markers of patient-derived glioblastoma cells

Fabien Almairac ^{1,2*}, Laurent Turchi ^{1*}, Denys Fontaine ², Philippe Paquis ^{1,2}, Hervé Chneiweiss ^{3,4,5}, Marie-Pierre Junier ^{3,4,5}, Fanny Burel-Vandenbos ^{1,6#} and Thierry Virolle ^{1#}.

¹ Univ. Nice Sophia Antipolis, CNRS, Inserm, iBV, 06108 Nice, France

² Service de Neurochirurgie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 06107, France

³ CNRS UMR8246 Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

⁴ Inserm U1130, Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

⁵ University Pierre and Marie Curie UMCR18, Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

⁶ Service d'Anatomopathologie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 06107, France

*,# equal contribution

Correspondence should be addressed to TV: <u>Virolle@unice.fr</u>. iBV, Institut de Biologie Valrose, Université Nice Sophia Antipolis, Bâtiment Sciences Naturelles, UFR Sciences, Parc Valrose, 28, avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

Runnig title : EGF mediated spontaneous reprogramming

ABSTRACT

There is great interest but little understanding in how cancer stem cells arise. Here we show that tumor cells exhibiting stem-like properties and expression of stemness (CD133) and pluripotency markers (SOX2, NANOG, OCT4), can arise from differentiated tumor cells that are isolated from human glioblastomas. These cells could transit from a more differentiated state that cannot self-renew to a self-renewing stem-like state upon EGF/EGFR signaling. This dedifferentiation process induced expression of pluripotency markers, and restored clonal and tumorigenic properties as well as resistance to temozolomide, the chemotherapy of reference. EGF/EGFR signaling including ERK activation was crucial for this cellular reprogramming. Interestingly, expression of pluripotency markers occurred before the cells re-entered the cell cycle, demonstrating that the cells have the capacity to change and reprogram before the cell division starts. Our findings support a model of tumor homeostasis in which tumor cells driven by environmental cues such as EGF, can spontaneously acquire stem-like properties contributing thus to the enrichment in tumor propagating cells.

INTRODUCTION

The cancer stem cell concept sustains the idea of a hierarchical organization of cells within a tumor where only a subpopulation of stem-like cells, the tumor propagating cells (TPCs), shares with normal adult stem cells the property to self-renew and to differentiate according to a unidirectional scheme of commitment ¹. Due to these stemlike properties, the TPCs are the type of tumor cell responsible for tumor initiation, maintenance, resistance and recurrences ¹. Based on this concept, the targeting of tumor stem cells is a prerequisite to develop novel prospective treatments, and which requires a better understanding of the mechanisms involved in TPC maintenance ^{2, 3, 4}. Cell populations that display TPC characteristics were found in a variety of hematopoietic and solid cancers ^{5, 6, 7, 8}. It is possible to enrich for TPCs from many tumors using a variety of cell surface markers such as CD133, which define, according to their expression, heterogeneous populations of cells within the same tumor. Indeed, subtypes of TPCs have been isolated from glioblastoma (GBM) according to their CD133 status. 9, ¹⁰ Not only GBM CD133+ cells but also some GBM CD133⁻ cells are capable of long-term self-renewal and initiation of a heterogeneous tumor when xenotransplanted ^{10, 11, 12}. Thus, self-renewal and tumor initiation properties may not be restricted to a uniform cell population but rather to heterogeneous populations of stem-like cells. In this context of intra-tumor heterogeneity, failure of glioblastoma treatment is mostly due to tumor recurrence in which remaining glioma stem cells (GSCs) are thought to have a crucial role according to their self-renewal, differentiation and resistance properties. To date, there is compelling evidence showing that tumor differentiated cells have the potential to reprogram into stem-like cells when exposed to various stresses such as hypoxia, acidification or genotoxic stress ^{13, 14}, thus enriching the GSC compartment. Therefore, in terms of therapeutic targeting, it is of importance to determine whether the concept of cancer stem cells defines a minor and specified subpopulation of tumor cells or a functional state that may be acquired by many tumor cells when placed in an environment that supports a stem-like state.

In the present study, we address the question of whether long-term self-renewal, pluripotency markers and tumorigenicity can be spontaneously acquired by tumor cells that are already differentiated in the original tumor when placed in a permissive environment. We have previously demonstrated using human GBM samples that infiltrating undifferentiated cells expressed high levels of EGFR, a hallmark of infiltrating glioma as compared to gliosis or non infiltrating brain tumors^{15, 16}. We postulate that activation of the EGFR pathway may be sufficient to trigger tumor cell dedifferentiation. By sorting CD133⁻ tumor cells from freshly resected GBM we have demonstrated that GBM cells have an intrinsic property to spontaneously reprogram into aggressive GSCs, positive for pluripotency markers, in response to a defined change of their environment. Our findings constitute one more milestone leading to a better understanding of tumor cell behavior, influencing tumor biogenesis and aggressiveness.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Patient-derived cells were isolated from surgical resection of human primary GBM provided by the department of neurosurgery of the University Hospital of Nice (GB1, GB15, GB16). TG1 cells have been provided by Hervé Chneiweiss, University of Pierre and Marie Curie, Paris. The dissociation of tumor cells was performed as described elsewhere ¹⁷. The resulting primary cultures were used immediately for experiments. Neurospheres were grown in NS34+ medium containing EGF and bFGF (DMEM-F12 1/1 ratio, 10 mM glutamine, 10 mM Hepes, 0.025% Sodium bicarbonate, N2, G5, and B27). Defined medium for dedifferentiation experiments was only supplemented by EGF. Differentiation experiments were performed in serum medium (DMEM-F12, Glutamine 10 mM, hepes 10 mM, Sodium bicarbonate 0,025%, FCS 0.5%). When indicated the cells were treated with 5µg/ml cetuximab (EGFR blocking antibody, kindly provided by Centre Antoine Lacassagne).

Cell death

Cell death was assessed by trypan blue staining. At least 500 cells were counted in three independent experiments.

Western blot analysis

Proteins were extracted (buffer : 50 mM Tris-Hcl ph7.6, 150mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40). After migration the proteins were transferred to Immobilon P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and probed with antibodies to pERK1/2, (ref sc16982-Santa-Cruz), or mouse antibody to ERK1 (ref sc94-Santa-Cruz).

Orthotopic xenografts

TG1 cells (2x10⁵) and GB1 (2X10⁴) were resuspended in 5µL of Hanks balanced salt solution (Invitrogen) and stereotactically implanted unilaterally into the striatum of male NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd mice (Harlan, <u>rms.fr@harlan.com</u>). The cells stably expressed a luciferase reporter gene, which allowed tumor detection in living animals. Three groups of five mice were injected. Cell survival and tumor growth were monitored and quantified in the living animals up to 90 days using the IVIS Lumina II system (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). 3 months after injection, the brains were dissected, sliced, and analysed by immunohistochemistry. All animal procedures have been approved by the local ethics committee.

FACS analysis and Cell sorting

Living CD133+ and CD133- populations were separated from fresh tumor, using an anti-CD133-PE (1/100°) (Miltenyi Biotech) and a cell sorter (BDFACS ARIA). Alternatively cell populations may be separated using CD133 microbeads (Miltenyi Biotech). Cells were fixed with paraformaldehyde 4% 15 min at room temperature. For the FACS analysis, the cells were permeabilized, blocked and hybridized in DMEM containing 10% FCS and 0.5% TritonX100 with the following antibodies: anti-OCT4 (1/100°) (Ab19857, AbCam), anti-NANOG (1/250°) (Ab21624, Abcam) or anti-CD133-PE (1/100°) (Miltenyi Biotech). Cell staining were analysed on FACS Calibur (Beckton Dickinson). Alternatively NANOG and OCT4 positive cells have been counted and quantified using fluorescent microscopy (TIE NIKON).

Immunofluorescence

Cells were seeded on polylysine coated glass slides in EGF medium or serum medium. At indicated times, cells were fixed with methanol 5min at -20°C. Blocking and hybridization were realized in PBS containing 10% FCS and 0.1% Triton X100 with the following primary antibodies : anti-SOX2 at 1/200 (AB15766, Upstate), anti-Oct4 at 1/50° (H-134) (ref sc9081, Santa-Cruz), anti-Nanog at 5ug/mL (ref AF1997- R&D system), anti-GFAP 1/250° (ref 2203PGF-R&D System), anti-phosphoactive-ERK (ref V803A, Promega) at 1/100°), anti-CD133 at 1ug/mL (Ab19898, Abcam). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (1ug/mL).

Clonogenic assay

1 cells were seeded in each well of 96 wells plates. After three weeks, each well was observed and the number of oncospheres was assessed. Experiments were repeated three independent times. Error bars are the meaning of three separate experiments.

RESULTS

EGF induces neurosphere formation, tumorigenicity, and expression of pluripotency markers in freshly dissociated GBM cells.

To assess EGFR pathway capability in inducing expression of pluripotency markers and tumorigenicity in cells dissociated from a freshly resected GBM sample (GB1), we plated the cell suspension in a defined medium supplemented only with EGF (10 ng/ml). Cell observed over a period of 48 hours displayed chronological stages of phenotypic changes and cell aggregation from most adherent cell foci, leading to neurosphere-like structures (Figure 1a). Remarkably, while GBM cells at the beginning of culture in EGF (0 h), were mostly negative for stemness markers and strongly positive for the marker of glial differentiation, glial fibrilary acidic protein (GFAP), the cells composing the neoformed neurospheres at 48 hours of culture, displayed a strong immunoreactivity for the pluripotency markers Sox2, OCT4, NANOG and the adult stem cell marker CD133. Conversely, the surrounding adherent cells did not express adult stem cell and pluripotency markers but exhibited strong GFAP expression (Figure 1b). The cells kept their differentiated phenotype and did not express any stemness markers when placed in serum medium (data not shown). To assess the effects of EGF treatment on the tumorigenic potential of GBM cells, the cells before EGF treatment (0h) and the neoformed neurospheres (48h) were orthotopically xenografted in NOD/SCID mice. Three months later, specific staining of human tumor cells in mice brains, revealed by a human specific vimentin anti-body, showed that Sox2/OCT4/NANOG positive cells were the most aggressive and developped a large tumor with distal foci, while the negative population harvested before EGF treatment, did initiate only a small cellular focus surrounded by infiltrating cells. Accordingly, the Sox2/OCT4/NANOG positive cells displayed long term self-renewal (at least 7 rounds of clonal dilution at single cell) with an average of more than 60% of single-cell generating secondary spheres when dissociated (Figure 1d). These observations suggest that EGF has the capacity to trigger the conversion of GBM cells into aggressive Sox2/OCT4/NANOG/CD133 positive glioma stem-like cells.

The EGF/EGFR pathway is required and sufficient to convert negative GBM cells into OCT4/NANOG/CD133 positive at the single-cell level.

To address this issue, we separated the CD133⁺ and CD133⁻ cell populations from two freshly collected glioblastomas (GB15 and GB16) (Figure 1a and b and supplemental figure 1). The CD133⁻ population, which poorly expressed either NANOG or OCT4 proteins (1.9% and 3.2%, respectively), was tested in a clonogenic assay where 1 cell was seeded into each well of the 96 well plates, in either EGF medium with or without EGFR inhibitor (cetuximab) (Figure 2C) or 0.5% FCS-supplemented medium (data not shown). Remarkably, CD133⁻ population exhibited an average of 64% clonal proliferation efficiency in EGF medium (counted from 7 rounds of clonal dilution) and none in the presence of cetuximab (Figure 2c) or in FCS medium (data not shown). Even considering that 1.9% and 3.2% of the CD133- population expressed NANOG or OCT4 protein, and therefore had originally some self-renewal properties, the majority of CD133⁻/OCT4⁻/NANOG⁻ cells acquired clonal properties following EGF treatment, thus producing cell populations that were 96%, 98% and 70% positive, respectively, for OCT4, NANOG and CD133 (Figure 2d and e). Similar results were obtained using GB16 in which 99% of the population was CD133⁻ (4% and 7% positive for OCT4 and NANOG respectively) and displayed an average of 79% clonal proliferation (counted from 7 rounds of clonal dilution) when treated with EGF (Supplemental figure 1). This cell population became in its vast majority positive for NANOG and OCT4 (94% and 97%, respectively) after EGF-mediated clonal amplification.

Therefore in these tumors, CD133⁻/OCT4⁻/NANOG⁻ cells have the potential to acquire stem-like and pluripotency markers as well as self-renewal potency when EGF is present in their environment. Activation of EGFR receptor is also necessary to trigger their conversion into stem-like cells.

Isolated EGF-dedifferentiated GBM cells maintain their plastic property in culture.

To determine whether dedifferentiated GBM cells maintained their plastic property in culture, we differentiated GB1 neurospheres in serum medium for 4 days. This treatment led to neurosphere dissociation, cell adhesion, spreading, loss of stemness markers, and increased expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Figure 3a and b). We then assessed the conversion of non-stem-like GB1 into self-renewing stem-like cells by substituting serum-containing medium with EGF medium. Video microscopy (from 0 to 48h) showed that the cells had the same capacity as freshly dissociated tumor glial cells to form neurospheres (Figure 3a). OCT4+ positive cells were quantified both at 4 days of serum treatment and after 48 hours of culture in EGF medium. Although only 2% of the serum treated cells were OCT4+, after 48 hours of EGF exposure, 98% of cells expressed this marker. In addition to Oct4, other pluripotency markers such as Nanog and Sox2 were re-expressed while GFAP expression was strongly reduced (Figure 3c). This process was strongly inhibited when the cells were incubated with cetuximab

(Figure 3d and e). Accordingly, the phosphorylated form of EGFR was firmly increased upon EGF treatment leading to strong activation of ERK (Figure 3f) that we previously described as central in the activation of the miR-18a* network necessary for GSC selfrenewal (Turchi et al). As expected, most of ERK activation was prevented when EGFR activation was blocked by cetuximab (Figure 3f). To demonstrate that enrichment in OCT4+, SOX2+, NANOG+ cells was the result of cell conversion into stem-like cells and not the clonal expansion of the remaining 2% of OCT4+ cells (Figure 3a), we analyzed pRB phosphorylation status and cyclin A expression by western blot in self-renewing, differentiated and dedifferentiated GB1 cells. While phosphorylated pRB level was clearly detected in self-renewing cells, it decreased along with cycling A expression after 4 days of serum-mediated differentiation (Figure 3g) indicating an arrest of the cell cycle in differentiated cells. According to pRB mediated E2F inhibition, cyclin A expression was lost as long as pRB was dephosphorylated but was strongly induced at 3 days of dedifferentiation when pRB was re-phosphorylated (Figure 3g). The number of cycling/mitotic cells, determined by cyclin A and histone H3 phosphorylated on serine 10 (H3Pser10) expression, dropped in differentiated cells and was only restored at 3 days of dedifferentiation reaching the level observed in self-renewing cells (Figure 3h). These results ruled out the possibility of a clonal expansion of the few remaining stemlike cells in the culture since sphere formation and acquisition of pluripotency markers occurred within 48 hours when the cells were not cycling.

To determine whether EGF-mediated dedifferentiation restored clonal and tumorigenic properties, we compared both the clonal ability and the capacity to form a tumor *in vivo* following intracranial xenograft of self-renewing, serum-differentiated and EGFdedifferentiated cells. Results obtained after limited dilution assays in 96 well plates showed equivalent clonal efficiency between self-renewing and EGF-dedifferentiated cells cultured in EGF medium (Figure 4a). Accordingly, while the cells differentiated in serum medium for 4 days failed to form a tumor, the dedifferentiated cells displayed similar tumorigenic abilities to self-renewing cells with identical tumor growth and the formation of a tumor mass and large area of infiltrating cells (Figure 4b and c). In addition, we compared the relative sensitivity to temozolomide (TMZ) of self-renewing, differentiated and EGF-dedifferentiated cells. While roughly 40% of self-renewing and dedifferentiated cells were sensitive to TMZ effects, more than 85% of the differentiated cells were sensitive, illustrating a significant difference between stem-like and nonstem-like cells (Figure 4d). Taken together, these results show that a second round of EGF-dedifferentiation in culture still efficiently restores the main properties of stem-like tumor cells.

DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that non-aggressive tumor cells freshly isolated from surgical resections of human glioblastomas and negative for stemness markers such as CD133, OCT4 and NANOG, have the potential to spontaneously undergo an efficient conversion into aggressive tumor cells expressing OCT4, NANOG and CD133

when placed in a defined environment enriched in EGF. We further showed that these cells retained this plastic property in culture even after several passages restoring stemness, clonal proliferation, resistance to chemotherapy and ability to grow a tumor *in vivo*. Such plastic properties of glial tumor cells may account for the maintenance of the GSC population and thus may likely contribute to glioblastomas homeostasis as well as to the propagation and initiation of tumor foci at a distance. Our results further support the idea that stem-like properties are not restricted to original GSCs but may be a functional state that can be acquired by any tumor cell in response to defined changes in their environment. This paradigm contrasts with the unidirectional commitment originally described in the cancer stem cell model ^{1, 18} and rather defines a bidirectional commitment, which allows tumor cells to transition from stemness to differentiated state and vice versa.

First described in normal cells ^{19,20}, several reports, mainly in a breast cancer model, have described the conversion of tumor cells into stem-like cells. The dedifferentiation process was first associated with epithelial to mesenchymal transition (EMT) where a direct link between gain of epithelial stem-cell properties and EMT transcription factors such as SNAIL, TWIST or activation of the Ras-MAPK pathway has been clearly established ^{21, 22, 23, 24, 25}. Another study, still in a breast cancer model, has demonstrated that direct chromatin remodeling using HDAC inhibitors led to the dedifferentiation of ALDH negative into ALDH positive cells, mainly through induction of the WNT pathway ^{24, 26}. Genotoxic stress provided by anticancer treatments may also be a trigger of cell dedifferentiation. Indeed, in the context of breast, head and neck cancer and glioblastomas, compelling results show that radiation may trigger the reprogramming of differentiated cancer cells into cancer stem cells with re-expression of stemness related genes such as Oct4, Nanog and Klf4^{14, 27, 28} explaining the increased number of cancer stem cells after anticancer therapies. From a mechanistic point of view, OCT4 overexpression in melanoma cells is sufficient to promote tumor cell dedifferentiation, increasing malignancy as well as NANOG and KLF4 expression ²⁹. Similarly, forced expression of NANOG in HeLa cells led to increased invasion, resistance to chemotherapeutic agents and tumorigenicity ³⁰. This NANOG-dependent process was also associated with increased expression of OCT4, SOX2 and KLF4 suggesting that expression of at least one of these pluripotency markers, originally described as core transcriptional circuitry in embryonic stem cells involved in pluripotency and selfrenewal regulation ³¹, is a prerequisite for the conversion of tumor cells into aggressive stem-like cells. Supporting this information, engraftment of embryonic stem cells, which expresses high levels of NANOG and OCT4 in immunocompromised mice, leads to the formation of teratocarcinoma, while using normal adult stem cells, which do not express these markers, does not induce any tumor formation ^{32, 33}. This reprogramming capacity is not restricted to stem-like cells artificially differentiated in culture since our study demonstrates that this property already exists in patient-derived tumor cells that are originally differentiated in the tumor. This suggests an intrinsic capacity and not a side effect developed in culture. In this context, EGF exposure was sufficient to spontaneously trigger the reprogramming into aggressive/self-renewing tumor cells, positive for pluripotency and stemness markers. Through EGFR activation, this pathway induces ERK phosphorylation, which plays a crucial role in allowing proper reprogramming and stem-like cell self-renewal ¹⁶. Our previous published data have already demonstrated the requirement of ERK activation for sustaining SHH production and consequently for activation of this pathway ³⁴ making a link with pluripotency marker expression since it has been demonstrated to be crucial for NANOG production ³⁵. According to cancer stem-cell hypothesis, tumor stem-like cells have the potential to produce lineages of non-stem-like cells via a hierarchal division scheme. This can happen through symmetric or asymmetric division therefore inducing the production of committed progeny. Based on this concept, Kaveh et al. have proposed in breast cancer cells a mathematical model of the replicator dynamics of cancer stem cells ³⁶. In this model they hypothesized that dedifferentiation of partially differentiated tumor cells may occur through asymmetric division and, therefore, the production of a progeny committed to dedifferentiate. Contrary to this hypothesis, our results revealed that expression of pluripotency and stemness markers occurred before re-entry in the cell cycle. This reveals that the reprogramming of GBM cells relies on epigenetic changes and does not require the production of a progeny.

In conclusion, our results sustain the idea of a bidirectional commitment that may likely have an important contribution to the maintenance of glioma stem-like cells subpopulation and consequently to intra-tumor heterogeneity.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention 3161), Association Sauvons Laura, Association Dimitri Bessières, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses, « GLIOMIRSTEM project »), Fondation de France, ARC projet (SFI20111203773), INCA PLBI02012, ITMO CANCER plan cancer, Association pour le développement de la Recherche sur les tumeurs urologiques, cérébrales et pulmonaires (ADeRTU), INSERM, CNRS, UNSA.

REFERENCES

- 1. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008, **8**(10): 755-768.
- 2. Hegi ME, Murat A, Lambiv WL, Stupp R. Brain tumors: molecular biology and targeted therapies. *Ann Oncol* 2006, **17 Suppl 10:** x191-197.
- 3. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, *et al.* Stem cellrelated "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 2008, **26**(18): 3015-3024.

- 4. Stupp R, Hegi ME. Targeting brain-tumor stem cells. *Nat Biotechnol* 2007, **25**(2): 193-194.
- 5. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004, **5**(7): 738-743.
- 6. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005, **65**(13): 5506-5511.
- 7. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, *et al.* Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008, **451**(7176): 345-349.
- 8. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004, **64**(19): 7011-7021.
- 9. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, *et al.* A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 2010, **17**(4): 362-375.
- 10. Prestegarden L, Svendsen A, Wang J, Sleire L, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, *et al.* Glioma cell populations grouped by different cell type markers drive brain tumor growth. *Cancer Res* 2010, **70**(11): 4274-4279.
- Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, Fusco D, Lopez K, Ellis JA, *et al.* Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 2008, 62(2): 505-514; discussion 514-505.
- 12. Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, *et al.* CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 2008, **122**(4): 761-768.
- 13. Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, Ingels JF, Jensen LC, Smith KD, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2012, **14**(1): R6.
- Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, *et al.* Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell death & disease* 2014, 5: e1543.
- 15. Burel-Vandenbos F, Benchetrit M, Miquel C, Fontaine D, Auvergne R, Lebrun-Frenay C, *et al.* EGFR immunolabeling pattern may discriminate low-grade gliomas from gliosis. *Journal of neuro-oncology* 2011, **102**(2): 171-178.
- 16. Burel-Vandenbos F, Turchi L, Benchetrit M, Fontas E, Pedeutour Z, Rigau V, *et al.* Cells with intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio are specific

for infiltrative glioma: a useful marker in neuropathological practice. *Neuro-oncology* 2013, **15**(10): 1278-1288.

- 17. Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, *et al.* CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer* 2010, **10**: 66.
- Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* 2013, 13(10): 727-738.
- 19. Sharif A, Legendre P, Prevot V, Allet C, Romao L, Studler JM, *et al.* Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene* 2007, **26**(19): 2695-2706.
- 20. Dufour C, Cadusseau J, Varlet P, Surena A, de Faria G, Dias-Morais A, *et al.* Astrocytes Reverted to a Neural Progenitor-Like State with Transforming Growth Factor Alpha (TGFalpha) are Sensitized to Cancerous Transformation. *Stem Cells* 2009.
- 21. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, *et al.* The epithelialmesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008, **133**(4): 704-715.
- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* 2008, 3(8): e2888.
- 23. Ansieau S. EMT in breast cancer stem cell generation. *Cancer letters* 2012.
- 24. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, *et al.* Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(19): 7950-7955.
- 25. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Seminars in cancer biology* 2012, **22**(5-6): 396-403.
- 26. Debeb BG, Lacerda L, Xu W, Larson R, Solley T, Atkinson R, *et al.* Histone Deacetylase Inhibitors Stimulate Dedifferentiation of Human Breast Cancer Cells through WNT/beta-catenin Signaling. *Stem Cells* 2012.
- 27. Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Dekmezian C, Pajonk F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells* 2012, **30**(5): 833-844.
- 28. Vlashi E, Chen AM, Boyrie S, Yu G, Nguyen A, Brower PA, *et al.* Radiation-Induced Dedifferentiation of Head and Neck Cancer Cells Into Cancer Stem Cells Depends on Human Papillomavirus Status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016, **94**(5): 1198-1206.

- 29. Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, *et al.* Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene* 2012.
- 30. Ding Y, Yu AQ, Wang XL, Guo XR, Yuan YH, Li DS. Forced expression of Nanog with mRNA synthesized in vitro to evaluate the malignancy of HeLa cells through acquiring cancer stem cell phenotypes. *Oncol Rep* 2016, **35**(5): 2643-2650.
- 31. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005, **122**(6): 947-956.
- 32. Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 2004, **23**(43): 7150-7160.
- 33. Andrews PW. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002, **357**(1420): 405-417.
- 34. Turchi L, Debruyne DN, Almairac F, Virolle V, Fareh M, Neirijnck Y, *et al.* Tumorigenic Potential of miR-18A* in Glioma Initiating Cells Requires NOTCH-1 Signaling. *Stem Cells* 2013, **Jul;31(7):** 1252-1265.
- 35. Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *The EMBO journal* 2010, **29**(15): 2659-2674.
- 36. Kaveh K, Kohandel M, Sivaloganathan S. Replicator dynamics of cancer stem cell: Selection in the presence of differentiation and plasticity. *Math Biosci* 2016, **272:** 64-75.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. EGF induces neurosphere formation, tumorigenicity, and expression of pluripotency markers in freshly dissociated GBM cells.

(a) High magnification phase-contrast video microscopy showing a time course of neurosphere formation (black arrow) of freshly dissociated GBM cells during 48 hours of culture in a defined medium supplemented only with EGF (10 ng/ml) (b) Immunofluorescence staining of GBM cells for GFAP, SOX2, OCT4, NANOG and CD133 at 0h (upper panels) and 48h following incubation in EGF medium (lower panels). Nuclei were stained with DAPI. White arrows indicate the positive cells.(c) GBM cells before (0h, upper panel) and after (48h, lower panel) sphere formation in EGF medium have been orthotopically engrafted for 3 months. Panels represent the staining of human GBM cells. (d) 7 round of clonogenic assay in EGF medium of cells dissociated from newly

formed neurospheres at a density of 1 cell/well in a 96-wells plate. Red bar is the meaning of the 7 rounds.

Figure 2. The EGF/EGFR pathway is required and sufficient to convert negative GBM cells into OCT4/NANOG/CD133 positive at the single-cell level.

(a) Flowchart describing the methodology to reveal the dedifferentiated cells (b) FACS analyses revealing the % of CD133 positive cells in freshly resected GBM cells. Similarly the lower panels reveal the % of NANOG and OCT4 positive cells in the CD133-population. (c) Clonogenic assay using CD133- cell population at a density of 1 cell/well in a 96-wells plate (average obtained from 7 subsequent rounds), in EGF-supplemented medium with and without EGFR inhibitor (cetuximab). (d) FACS analysis revealing the % of NANOG (left panel) and OCT4 (right panel) positive cells, following the clonogenic assay in EGF medium. (e) FACS analysis revealing the % of CD133 positive cells, following the clonogenic assay in EGF medium. (f) Histograms showing the proportion of GBM cells expressing OCT4 and NANOG before and after the clonal selection in EGF.

Figure 3. Isolated EGF-dedifferenciated GBM cells maintain their plastic property in culture.

(a) Low magnification phase-contrast photomicrograph of GBM cells after 4 days of differentiation in serum medium (0h), and low magnification phase-contrast video microscopy during 48 hours of serum-differentiated cells cultured in EGF medium. (b) Immunofluorescence staining of GFAP, OCT4, SOX2 and NANOG expression after 4 days of culture in serum medium. (c) Immunofluorescence staining of GFAP, OCT4, SOX2 and NANOG expression of serum-differentiated cells after 48 hours of culture in EGF without and with (d) anti-EGFR (cetuximab). Nuclei were stained with DAPI. (e) High magnification phase-contrast photomicrograph of differentiated GBM cells during the dedifferentiation process in EGF without (left panel) and with anti-EGFR (right panel). (f) Immunoblot analyses showing the phospho-ERBB1, ERBB1, phospho-ERK and ERK1 levels in undifferentiated (ND), serum-differentiated (diff), and EGF-dedifferentiated for 15 mn (dediff) GB1 cells, without and with anti-EGFR (g) Immunoblot analyses showing the ERK2, pRB, and cycline A levels in undifferentiated, serum-differentiated, and EGFdedifferentiated GB1 cells during 4 days (h) Histograms showing the proportion of positive cells for the H3Pser10 and cycline A expression in undifferentiated, serumdifferentiated, and EGF-dedifferentiated cells at 48h and 72h.

Figure 4. EGF-mediated dedifferentiation restores clonal and *in vivo* tumorigenic properties, as well as resistance to temozolomide.

(a) Clonogenic assay of undifferentiated, serum-differentiated, and EGF-dedifferentiated GBM cells (GB1 and TG1) at a density of 1 cell/well in a 96-wells plate during 7 rounds in EGF medium (b) Orthotopic xenografts of undifferentiated, differentiated, and EGF-

dedifferentiated TG1 cells in NOD/SCID mice brains. Tumors were visualized (upper panel) and their growths were quantified (lower panel) as described in the Methods section **(c)** Staining of undifferentiated, serum-differentiated, and EGF-dedifferentiated cells transplanted in NOD/SCID mice brains 3 months after engraftment **(d)** Histograms showing the proportion of undifferentiated, serum-differentiated, and EGF-dedifferentiated (48h) GBM living cells (GB1 and TG1) after 400 μ M temozolomide exposition.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGEND

Supplemental Figure 1. The EGF/EGFR pathway is required and sufficient to convert negative GBM cells into OCT4/NANOG/CD133 positive population at the single-cell level.

(a) FACS analyses revealing the % of CD133 positive cells in freshly resected GBM cells. (b-c) % of NANOG and OCT4 positive cells in the CD133- population. (d) Clonogenic assay using CD133- cell population at a density of 1 cell/well in a 96-wells plate (average obtained from 7 subsequent rounds), in EGF-supplemented medium with and without EGFR inhibitor (cetuximab). (e) FACS analysis revealing the % of NANOG (left panel) and OCT4 (right panel) positive cells, following the clonogenic assay in EGF medium.





Almairac/Turchi et al Figure 2



а

DMEM+EGF (Dediff)









Almairac/Turchi et al Figure 3










Article n°2

"Cell-based therapy using miR-302-367 expressing cells represses

glioblastoma development"

M. Fareh, <u>F. Almairac</u>, L. Turchi, F. Burel-Vandenbos, P. Paquis, D. Fontaine, S. Lacas-Gervais, MP. Junier, H. Chneiweiss, T. Virolle

En révision

Résumé de l'article n°2

« Une thérapie cellulaire utilisant des cellules exprimant stablement le cluster de miR-302-367 réprime le développement de glioblastomes »

Introduction

Les cellules initiatrices de gliomes (CIG) ont été incriminées dans les récidives systématiques des glioblastomes après traitements conventionnels (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie). Cette sous-population cellulaire présente dans la tumeur est résistante aux traitements et suffit à initier et promouvoir le développement de la maladie. Il s'agit donc d'une cible thérapeutique privilégiée. Les exosomes sont des vésicules extracellulaires de petite taille (30 à 120 nm), secrétées par la plupart des cellules, et impliquées dans la communication inter-cellulaire. Elles transportent des molécules fonctionnelles telles que des ARNm, des micro-ARN, des protéines et des métabolites. Ces vésicules ont été identifiées également dans les tumeurs. Elles serviraient à promouvoir la progression tumorale, les métastases, la suppression du système immunitaire en rendant le microenvironnement plus permissif aux cellules tumorales au travers de modifications induites aux cellules péritumorales (Grange et al., 2011; Sheldon et al., 2010). L'intérêt clinique des exosomes réside dans plusieurs aspects, aussi bien diagnostics, pronostics, pour le suivi des patients (Qu et al., 2015), que thérapeutiques en s'en servant pour délivrer des molécules anticancéreuses (Johnsen et al., 2014). Dans le glioblastome, plusieurs études ont démontré l'importance du rôle des exosomes dans la communication intercellulaire, notamment au travers du transfert de micro-ARN (Bronisz et al., 2016; van der Vos et al., 2016).

Le propos de cette étude preuve de concept est de démontrer que les exosomes contenant des micro-ARN différenciant peuvent cibler les CIG et servir de thérapie cellulaire.

L'objectif était de démontrer que les cellules exprimant stablement le cluster de miR-302-367 secrétaient des exosomes contenant ce micro-ARN permettant d'induire la différenciation des CIG, et donc la suppression de leur tumorigénicité *in vivo*.

Matériels et Méthodes

Nous avons utilisé des lignées cellulaires issues de glioblastomes fraîchement réséquées, les TG1, TG6 et GB1. Nous avons transduit avec un lentivirus la séquence du cluster de miR-302-367, groupement de 5 miR préalablement caractérisés comme étant suppresseurs de tumeur (Fareh et al., 2012), à des TG1 (TG1-miR) et GB1 (GB1-miR). Les milieux de culture cellulaires conditionnés par les différentes lignées ont été recueillis, et les exosomes des différents milieux ont été extraits et analysés. Les exosomes extraits ont été utilisés in vitro pour évaluer leurs effets sur les CIG. Les CIG ont été caractérisées sur le plan phénotypique et fonctionnel par les marqueurs d'autorenouvellement et de pluripotence (Sox2, Shh, Nestine), par clonogénicité in vitro et par tumorigénicité in vivo. Des tests d'infiltration tumorale ont été réalisés sur du tissu neural humain reconstitué (ENT), comme précédemment décrit (Preynat-Seauve et al., 2009). Les cellules différenciées étaient caractérisées par la perte des marqueurs souches, l'expression de GFAP, l'absence de prolifération clonale et de tumorigénicité in vivo. Les xénotransplantations étaient réalisées en position orthotopique dans le striatum de souris immunodéprimées NOD/SCID. Les cellules tumorales transplantées n'exprimant pas le cluster de miR-302-367 étaient porteuses du gène « luc » de la luciférase, permettant de suivre le développement tumoral en imagerie après injection du métabolite à la souris (luciférine). Le signal lumineux (photons) était recueilli par imageur dédié (IVIS). Les souris étaient ensuite sacrifiées pour analyse un anatomopathologique.

Résultats principaux

Les milieux de culture conditionnés par les TG1-miR et GB1-miR induisaient une différenciation des TG6, alors qu'un traitement avec des milieux de culture contrôles (conditionnés par des TG1 et GB1) maintenait l'expression des caractères souches des TG6. La perte des caractères souches s'accompagnait d'une perte des capacités d'infiltration dans l'ENT. Les mêmes résultats sur les TG6 étaient observés en présence seulement d'exosomes extraits des milieux de culture.

Une analyse en RT-PCR a démontré que les milieux de culture conditionnés par TG1-miR et GB1-miR et les exosomes extraits de ces milieux étaient riches en cluster de miR-302-367, alors que la présence du miR-302-367 n'était pas détectable dans les milieux et exosomes contrôles.

Le transfert d'exosomes marqués riches en miR-302-367 depuis des TG1-miR vers des TG6 a été objectivé au microscope à fluorescence dès les 5 premières minutes qui ont suivi le traitement cellulaire. Ce transfert s'est accompagné d'un enrichissement rapide de la cellule en miR-302-367, excluant l'hypothèse d'une synthèse endogène par la cellule réceptrice.

La transplantation *in vivo* des TG1-miR simultanément à des TG1-luc a permis d'empêcher le développement tumoral par rapport aux groupes contrôles dans lesquels des tumeurs se sont développées. De plus, l'injection de TG1-miR 40 jours après la transplantation de TG1-luc dans le même site a permis de diminuer progressivement le volume tumoral sur les 2 mois qui ont suivi. La survie des souris des groupes TG1-miR+TG1-luc était significativement supérieure à celle des groupes contrôles.

Discussion

Les résultats de notre étude suggèrent un effet anti-tumoral *in vitro* et *in vivo* par induction d'une différenciation cellulaire du cluster de miR-302-367 délivré par des exosomes

à des CIG. Une fois le cluster de miR-302-367 délivré dans la cellule réceptrice, les cibles et modes d'action cellulaires sont les mêmes que dans les cellules qui l'expriment stablement (Fareh et al., 2012).

D'autres études ont utilisés les exosomes comme vecteurs de molécules anticancéreuses. Munoz et al. ont utilisé les cellules souches mésenchymateuses modifiées pour délivrer à des cellules de glioblastomes un anti-miR synthétique, l'anti-miR-9, à visée chimiosensibilisante (Munoz et al., 2013). Sur le même principe, Katakowki et al. ont utilisé des microvésicules de cellules de moelle osseuse enrichies en miR-146b par surexpression du transcrit primaire par les cellules donneuses. Des injections thérapeutiques des microvésicules modifiées ont significativement diminué la croissance tumorale de gliomes greffées dans un modèle de rat (Katakowski et al., 2013).

Les résultats combinés des études dont la nôtre apportent la preuve de concept d'une approche par thérapie cellulaire délivrant des molécules anticancéreuses par l'intermédiaire de microvésicules. Dans le cas du glioblastome, il est licite d'imaginer délivrer in situ des exosomes ciblant les effecteurs responsables de l'état souche (et donc de la tumorigénicité) des CIG afin de les forcer à se différencier. Même si l'approche consiste à utiliser des cellules tumorales modifiées qui sont bloquées dans un état de différenciation (comme les TG1-miR ou GB1-miR), elle risque d'être difficile à transposer à l'homme. L'utilisation de cellules modifiées non tumorales avec un tropisme neurologique particulier, comme les cellules souches mésenchymateuses (Roger et al., 2010), semble plus facilement acceptable par le milieu oncologique.

Cell-based therapy using miR-302-367 expressing cells represses glioblastoma development

Mohamed Fareh^{1,8}, Fabien Almairac^{1,3}, Laurent Turchi¹, Fanny Burel-Vandenbos^{1,2}, Philippe Paquis^{1,3}, Denys Fontaine³, Sandra Lacas-Gervais⁴, Marie-Pierre Junier^{5,6,7}, Hervé Chneiweiss^{5,6,7} and Thierry Virolle^{1*}

¹ Univ. Nice Sophia Antipolis, CNRS, Inserm, iBV, 06108 Nice, France

² Service d'Anatomopathologie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 06107, France

³ Service de Neurchirurgie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 06107, France

⁴ Centre Commun de Microscopie Electronique Appliquée, Univ. Nice Sophia Antipolis, France

⁵ CNRS UMR8246 Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

⁶ Inserm U1130, Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

⁷ University Pierre and Marie Curie UMCR18, Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

⁸ Present address: Kavli Institute of NanoScience and Department of BioNanoScience, Delft University of Technology, Delft, 2628CJ, The Netherlands

*Correspondence should be addressed to TV: <u>Virolle@unice.fr</u>. iBV, Institut de Biologie Valrose, Université Nice Sophia Antipolis, Bâtiment Sciences Naturelles, UFR Sciences, Parc Valrose, 28, avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

ABSTRACT

Glioblastomas are incurable primary brain tumors that affect patients of all ages. The aggressiveness of this cancer has been attributed in part to the persistence of treatment-resistant glioblastoma stem-like cells. We have previously discovered the tumor-suppressor properties of the microRNA cluster miR-302-367, representing a potential treatment for glioblastoma. Here, we attempted to develop a cell-based therapy by taking advantage of the capability of glioma cells to secrete exosomes that enclose small RNA molecules. We engineered primary glioma cells to stably express the miR-302-367. Remarkably, these cells altered, in a paracrine manner, the expression of stemness markers, the proliferation and the tumorigenicity of neighboring glioblastoma cells. Further characterization of the secretome derived from miR-302-367 expressing cells showed that a large amount of miR-302-367 was enclosed in exosomes, which were internalized by the neighboring glioblastoma cells. This miR-302-367 cell-to-cell transfer resulted in the inhibition of its targets such as CXCR4/SDF1, SHH, cyclin D, cyclin A and E2F1. Orthotopic xenograft of miR-302-367-expressing cells together with glioblastoma stem-like cells efficiently altered the tumor development in mice brain.

INTRODUCTION

Exosomes are extracellular nanoparticles of a size ranging from 30 to 120 nm which are secreted by most cell types in the human body (Valadi et al, 2007). Exosomes are produced through the formation of multivesicular bodies (MVB) during the endosome maturation by the inward budding of the membrane (Johnsen et al, 2014). The sorting of biomolecules into exosomes involves specific protein machineries that ensure active and specific transport of functional mRNAs, miRNAs, proteins and metabolites (Baietti et al, 2012; Roucourt et al, 2015; van der Vos et al, 2011). MVBs fuse with the cell membrane through a process, which depends on the release of exosomes out of the cells by Rab GTPase proteins. Considered to be the main route of excretion of harmful RNA and proteins for a long time (Johnsen et al, 2014), exosomes have been reconsidered instrumental for cell-to-cell communication, mediating the exchange of bio-molecules in normal and tumor tissues, including glioma (Kucharzewska et al, 2013; Salido-Guadarrama et al, 2014). Tumor-derived exosomes can promote tumor progression, metastasis (Grange et al, 2011; Sheldon et al, 2010) and immune system suppression by manipulating tumor microenvironment through reprograming the gene expression of the surrounding cells. The relative accessibility of tumor-derived exosomes from corporal fluids including blood, semen and urine led to the exosomes being used as diagnosis and prognosis tools in several cancers including hepatocellular carcinoma (Sugimachi et al, 2015), gastrointestinal (Lindner et al, 2015), lung cancers (Fujita et al, 2014) and glioma (Skog et al, 2008a). The clinical interest in exosomes has been further strengthened by several studies, which describe exosome-based drug delivery strategies for anti-cancer treatment (Johnsen et al, 2014; Srivastava et al, 2014).

Numerous reports have suggested an important role of exosomes in glioma cell-tocell communication and cell fate decision through the transfer of various molecules, including miRNA (Bronisz et al, 2014; van der Vos et al, 2011).

Glioblastomas (GBM) are the most common form of primary brain tumors which can affect adult patients of any age. These highly vascularized and infiltrating tumors are resistant to current treatment therapies and most often lead to a fatal outcome in less than 18 months. The current treatment involving radiotherapy and the use of temozolomide provides better results for patients presenting a methylated profile of MGMT gene (Stupp & Hegi, 2007; Stupp et al, 2005). However, the efficiency of this treatment, even involving the use of anti-angiogenic molecules (bevacizumab), is limited and this tumor remains incurable. The aggressive behavior of GBM, including resistance to current treatments and tumor recurrences, has been attributed to the presence of GBM stem-like or progenitor cells (GSC) (Singh et al, 2003; Singh et al, 2004). Thus, new treatment methods that specifically target GBM stem-like cells needs to be developed urgently in order to eradicate these incurable tumors.

Using a collection of patient-derived primary culture of glioma stem-like cells (GSC) we have shown that the miR-302-367 cluster commits GSCs to an irreversible differentiated state and blocks their ability to initiate and progress tumors *in vivo* (Fareh et al, 2012). In the present study, we show that patient-derived GSC, engineered to stably and constitutively express the miR-302-367 cluster were able to release miR-302-367 containing exosomes. These exosomes were rapidly internalized by neighboring GSC, leading to the alteration of stemness and proliferative properties in a miR-302-367-dependent manner. Orthotopic xenograft of miR-302-367-expressing cells together with GSC, efficiently altered the tumor development in mice brain, demonstrating their therapeutic potential. Our study suggests that cell-based therapy could constitute an innovative anti-cancer solution.

RESULTS

GSC expressing the miR-302 cluster represses SHH and SOX2 expression, proliferation and infiltration in a paracrine manner.

To assess whether GBM cells expressing the miR-302-367 cluster might affect the stemness state of naïve GSC in a paracrine manner, we harvested conditioned media from two different GSC primary cultures stably expressing the miR-302-367 cluster (TG1-miR-302 and GB1-miR-302) or a non-relevant construct (TG1-ctl and GB1-ctl). We then treated a control GSC primary culture (stably expressing the red fluorescent protein, TG6-RFP) with TG1-miR-302 and GB1-miR-302 conditioned media and tracked the evolution of cell morphology over 4 days. While the cells incubated in the control medium remained unchanged, the cells incubated in the medium collected from miR-302-367 expressing cells became adherent and displayed a typical morphology of more differentiated cells with low nuclear-cytoplasmic ratio and long cell extension (Fig. 1A). These phenotypic changes occurred together with repression of self-renewal markers such as SOX2 and SHH, as well as a clear increase in GFAP expression (Fig. 1B and 1C). The treatment of naïve GSC with miR-302 conditioned medium strongly repressed the number of mitotic cells and impaired their ability to be clonal (Fig. 1D and 1E). To assess the effects of miR-302 conditioned medium on GSC ability to infiltrate a cerebral tissue, we used organotypic cultures of mouse brain slices (MBSs). We placed cloning rings on MBSs surface (Fig. 1F and 1G) in which we have seeded naïve TG6-RFP cells for three weeks. The seeded cells were regularly treated with either control or miR-302 conditioned medium. While TG6 cells, in the control conditions, confirmed their strong ability to invade and survive within the cerebral tissue (Fareh et al, 2012), the treatment with miR-302 conditioned medium repressed their ability to penetrate cerebral tissues. Taken together, these results show that GSCs expressing the miR-302 cluster secrete molecules that efficiently altered the stemness state and repressed cell proliferation and tissue infiltration.

TG1-miR-302 and GB1-miR-302 cells secrete exosomes capable to repress GSC stemness and proliferation.

To identify the molecules responsible for the anti-tumor effect we performed size-based ultrafiltration of the conditioned media. We noticed that a fraction with high molecular weight (<100 Kda) exclusively retained the anti-tumor effect (data not shown). We hypothesized that exosomes might mediate the observed paracrine effect. Electron microscopy analysis of TG1 cells showed the presence of several MVB in the cytoplasm, harboring typical cup-shaped small vesicles of 30 to 70 nm in size (Fig. 2A and 2B). We have therefore purified exosomes from conditioned media of either TG1 and GB1 control or TG1-miR-302 and GB1-miR-302 cells. Protein extraction from these exosome extractions revealed expression of exosome markers such as the tetraspanin CD81 or the prostaglandin F2 receptor negative regulator (PTGFRN) (Fig. 2C). We then used exosomes suspended in a fresh medium (NS34+) for treating naïve self-renewing TG6. After treatment the cells displayed a clear increase of GFAP expression and the repression of stem/progenitor markers such as SHH, SOX2 after 2 days and Nestin after 10 days following the addition of TG1-miR-302 or GB1-miR-302derived exosomes (miR-302-EXO) (Fig. 2D and 2E; Table 1). Furthermore, miR-302-EXO treatment induced a drastic decrease in the number of mitotic cells and the capacity of TG1 and TG6 cells to be clonal (Fig. 2F and 2G). The control exosomes (ctl EXO) isolated from TG1-ctl or GB1-ctl did not modify cell behavior and proliferation or the expression of stemness markers.

The miR-302 cluster is transferred to neighboring cells via the secretion of exosomes. Following the exosome extraction from TG1 or GB1 conditioned media, we have assessed the presence of the miR-302 cluster in both the exosome pellet and the supernatant. Each member of the miR-302 cluster has been strongly detected by qRT-PCR in miR-302-EXO while weakly detected in the corresponding supernatant and undetected in similar preparation from TG1-ctl or GB1-ctl (ctl EXO) (Fig. 3A and Table 2). To assess the interactions between the exosomes and the recipient cells, we labeled TG1 miR-302-EXO with fluorescent lipophilic carbocyanine dilC16 and incubated naïve TG6 cells with the resulting fluorescent exosomes. The cells were then extensively washed before the fluorescence analysis. The images obtained using a confocal fluorescence microscope revealed a physical interaction between the fluorescent exosomes (red fluorescence) and single naïve TG6 cells (unlabeled) within the first 5 minutes following the treatment with redfluorescent exosomes (Fig.3B, left). 24h after treatment, we observed the transfer of fluorescence to the plasma membrane of TG6 recipient cells, indicating the internalization of the fluorescent exosomes (Fig.3B, right). Lysis of the TG6 recipient cells followed by qRT-PCR analysis revealed a strong increase in the expression level of all microRNAs members of miR-302 cluster. The enrichment of recipient cells with the cluster miR-302 occurred within

15 minutes following the treatment with exosomes. In comparison, cells treated with ctl EXO did not show any enrichment with the cluster miR-302. The rapid enrichment in the cluster miR-302 (15 minutes) indicates an external source of these microRNAs rather than internal neo-synthesis. We have previously shown that miR-302 cluster neo-synthesis occurred few hours later after serum induction in GSC (Fareh et al, 2012). 4 hours of serum stimulation induced 20-fold enrichment with the endogenous miR-302b. In comparison, 300-fold enrichment was obtained after only 15 minutes of miR-302-Exo treatment (Fig.3C and supplementary figure 1A). To demonstrate that miR-302 expression in recipient TG6 cells was the result of the transfer from exosomes as opposed to endogenous synthesis, we inhibited the transcription by blocking the RNA polymerase II using actinomycin D. The blockade of the polymerase did not prevent the enrichment in miR-302 cluster in the recipient cells treated with miR-302-EXO, while it efficiently blocked the endogenous synthesis induced by the serum (Fig.3C). These results indicate that exosomes carrying miR-302 are able to rapidly deliver a high quantity of miR-302 cluster to the recipient cells. As result, the known targets of the mir-302 cluster such as CXCR4, SDF1, Cycline D1, Cycline A and E2F1(Barroso-del Jesus et al, 2009; Cai et al, 2013; Card et al, 2008; Fareh et al, 2012) were repressed in TG6 cells upon TG1-miR-302 EXO treatment (Fig.3D and 3E). To probe the direct targeting of the 3' untranslated region (3'UTR) of CXCR4 by the exosomal miR-302, we employed a luciferase reporter assay. The luciferase activity of a reporter construct, which contained the 3'UTR of CXCR4 fused to the 3' end of the luciferase coding sequence (Δ 3'UTR CXCR4-Luc), was significantly reduced when the cells were treated with miR-302 EXO. A similar construct lacking miR-302 binding elements (Δ 3'UTR CXCR4-Luc) remained insensitive to the miR-302-EXO treatment (Fig. 3F). Transfection of recipient TG6 cells with a mixture of Locked Nucleic Acid (LNA) probes, which specifically target the miR-302 cluster (mix LNA-302) (supplementary Figure 1B), suppressed the miR-302-EXO effects, preventing the invalidation of the miR-302 targets (Fig 3E and 3F), increase of GFAP, repression of SHH pathway (Fig 3G) as well as the decrease of cell proliferation and clonal efficiency (Fig 3H and 3I). Taken together, these results show that delivery of the miR-302 cluster is required to alter the stemness and proliferation properties of GSC.

Expression of the miR-302 cluster in GSC promotes a paracrine tumor suppressor effect *in vivo*.

To assess whether the paracrine effect of miR-302 might act as a tumor suppressor *in vivo*, we conducted orthotopic xenograft experiments by performing stereotaxic injections of TG1-luc (TG1 cells stably expressing luciferase) in the striatum of four groups of immuno-deficient NOD/SCID mice. TG1-luc cells were injected alone as a control of tumor formation, together with TG1-miR-302 cells (at a ratio of one-to-one and five-to-one respectively) or together with TG1 cells expressing a non-relevant construct (TG1-scrb, control)

(Fig. 4A). Live imaging using the luciferase activity of TG1-luc cells allowed monitoring tumor growth over time. Our results showed that TG1-luc alone or mixed with TG1-scrb were capable of initiating and developing tumors in vivo (Fig. 4B and 4D). Immuno-staining with a human-specific anti-vimentin antibody revealed the presence of infiltrating cells and the formation of several tumor foci in the striatum of the control animals (Fig. 4B). However oneto-one as well as five-to-one ratio between TG1-luc and TG1-miR-302 cells altered tumor initiation, growth and the formation of infiltration foci (Fig 4B and 4D). In addition, our data indicates that a minor population of TG1-miR-302 cells (one TG1-miR-302 for five TG1-luc) was sufficient to suppress tumor development in vivo (Fig 4B and 4D). In these conditions, the immuno-staining revealed the infiltration of the striatum and the corpus callosum by isolated tumor cells and the absence of massive proliferation and infiltration, as observed in the brain of the control animals (Fig 4B). To assess the capability of TG1-miR-302 cells to repress the growth of established tumors, we first developed intra-cranial tumors for 40 days using TG1-luc (Fig 4C). We then injected TG1-miR-302 and followed the tumor growth by live imaging. The results showed significant alteration of tumor growth as compared to control cells (Fig 4C and D (red line)). Accordingly, TG1-miR-302 co-injection, maintained mice survival. In contrast, mice in the control group, died within 120 days (Fig 4F).

These results indicate that miR-302 over-expression in GSC induced an efficient paracrine tumor suppressor effect on neighboring tumor cells, and highlight their potential use as cell therapy. Accordingly, TG1-miR-302 co-injection, maintained mice survival while mice in the control group, died within 120 days (**Fig 4F**).

DISCUSSION

Numerous reports have confirmed the tumor suppressor effect of the miR-302-367 in a variety of cancers (Fareh et al, 2012; Ge et al, 2014; Wang et al, 2013; Yan et al, 2014; Yang et al, 2015) suggesting its potential use for therapeutic applications. In this context, efficient delivery of therapeutic small RNAs constitutes the main obstacle to make small interfering RNA available for clinical use. In this study, we took advantage of the capacity of GSC to abundantly secrete exosomes (Skog et al, 2008b) to create patient-derived cells able to continuously deliver exosomes enclosing the miR-302-367 cluster. The secretion of these exosomes ensures the propagation of the miR-302 effects to neighboring naïve GSC. Once in the recipient cells, the miR-302-367 cluster efficiently represses its targets, namely Cyclin D1, Cyclin A, E2F1 and the CXCR4 pathway (Fareh et al, 2012). The consequence of this repression was reflected by a strong repression of GSC mitosis, clonal proliferation, as well as the capacity of GSC to penetrate and proliferate within a cerebral host tissue. These effects were prevented when the miR-302-367 cluster expression was abolished in the

recipient cells by the use of specific LNA probes. Importantly, although GSCs release vesicles of all sizes in their media, the nano-sized ones are efficient in promoting the miR-302-367 effects, since conditioned media depleted of small vesicles lost their capacity to induce the miR-302 effects on GSC (data not shown).

In light of the idea that nanoparticles are capable of influencing normal and tumor cells in the tumor microenvironment (lero et al, 2008; Singh et al, 2014; Thery et al, 2009), our results show that the miR-302-367 exosomes efficiently changed the cellular behaviour, challenging stemness properties and inhibiting tumor development in vivo. Our data strengthen the choice of using the strategy of delivering miRNA or anti-miR by exosomes as a therapeutic option, which has been recently highlighted by studies showing that exosomal delivery of anti-miR-9 or miR-1, efficiently modifies GBM cell chemosensitivity (Munoz et al, 2013), migration and proliferation (Bronisz et al, 2014). Considering the therapeutic efficiency, one critical aspect of this strategy is to achieve an efficient and prolonged delivery of exosomes into the organism. Akao et al have recently shown that intravenous THP1-cells injection in nude mice, pretransfected with miR-143, induced an increased level of miR-143 in serum and kidneys (Akao et al, 2011), demonstrating efficient delivery of miRNA into the organism. Based on this study, we have chosen to perform the co-transplantation of patientderived-GSCs expressing miR-302-367 cluster along with control GSCs, into the brain of immunodeficient mice, rather than making injections of exosomes, which would have provided only transitory effects. This strategy was particularly efficient since it induced a long-term inhibition of not only tumor initiation and development but also tumor growth of already established tumors. This tumor suppressor effect is of particular interest, in term of therapeutic applications, to prevent tumor relapse and to inhibit tumor growth in patients unable to undergo surgical resections.

The results of this approach that we obtained in mice are the proof-of-principle that cellular therapy for anti-cancer strategies deserves to be considered. In our study we used GSC capacities to release exosomes. In addition, exosome-secreting cells, such as macrophages, isolated from patient and genetically modified in vitro to stably express therapeutic miRNA could be used as well. The transplantation of these cells directly to the tumor site during the surgery would allow extended delivery of tumor suppressor exosomes to the site of tumor, avoiding heavy and stressful periodic injections of exosomes to the patient.

In conclusion, we believe that our study will spark interest in using cell therapy for in situ delivery of therapeutic exosomes to target human GBM.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Electron microscopy:

Scanning Electron Microscopy (SEM). For SEM analysis, cells were fixed with 1,6 % glutaraldehyde in 0.1 M phosohate buffer for several before washing with distilled water, and cryoprotection in a solution of 30% glycerol for 1h. The samples were, then dehydrated in a graded ethanol series, and finally immersed in hexamethyldisilazane (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and dried at room temperature. Sample were then mounted on aluminium stubs and sputter-coated with a 3-nm gold–palladium coating (Cressington 308EM, UK) prior to analysis with a Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM JEOL 6700F, Japan) Transmission Electron Microscopy (TEM. For TEM, the samples were fixed by the same procedure as for SEM. After an adequate fixation, the samples were rinsed in 0.1M cacodylate buffer, and post-fixed for 1h in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer. Samples were then rinsed in distilled water, dehydrated in alcohols and lastly embedded in epoxy resin. Contrasted ultrathin sections (70 nm) were analyzed under a JEOL 1400 transmission electron microscope mounted with a Morada Olympus CCD camera.

Microvesicles extraction: ~10⁶/ml GSCs were cultured in a defined microvesicle-free medium (NS34+ medium, Fareh et al). After 72h, The GSCs were pulled down by centrifugation (276 g , 4 °C, for 5 min) and the conditioned medium was collected, filtered through a 0.2-µm filter (Millipore) and concentrated using 100KDa cut-off Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore,). The concentrated conditioned medium was used to purify the microvesicles by ultracentrifugation at 200,000 g for 110min.

Reagents and antibodies: Cell culture reagents including DMEM, F12, glutamine, Hepes, Sodium bicarbonate, N2, G5, and B27, pENTR cloning kit, LR Clonase II, Superscript II reverse transcriptase, DilC16(3), DiO16(3) and TRIzol® Reagent were purchased from Life technologies (Cergy Pontolse, France). Foetal calf serum was purchased from Hyclone (Brebières, France), and Exoquick kit was purchased from Ozyme (France). Hoechst 33342 and Actinomycin D were supplied by Sigma (France), Micromount Mounting Media was purchased from Leica Biosystems (Nanterre, France). Taqman Reverse transcription microRNA kit, Universal Taqman PCR Master Mix, and Taqman probes were purchased from Applied Biosystems (Villebon sur Yvette, France). Enhanced chemiluminescence detection reagent was purchased from BioRad (Marnes la Coquette, France).

The antibodies used in this study are listed here: Goat polyclonal anti-Shh (1/50°, sc1194, Santa Cruz Biotechnology, Germany); Mouse monoclonal anti-CXCR4 (1/50°, MAB 172, R&D Systems, United Kingdom); Rabbit polyclonal anti-H3-phospho-S10 (1/100°; ab5176, Abcam); Rabbit polyclonal Anti-sox 2 (1/100°; Sox-2 (H65), sc-20088, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC); Mouse monoclonal Anti-Nestin (1/100°, ab22035, Abcam);

Anti-goat Alexa 488 (1/500°; Dusseldorf, Germany); Anti-rabbit Alexa 488 (1/500°, Dusseldorf, Germany); Anti-mouse Alexa 488 (1/500°, Dusseldorf, Germany); Anti-goat Alexa 546 (1/500°, Dusseldorf, Germany); Anti-rabbit Alexa 546 (1/500°, Dusseldorf, Germany); Anti-mouse Alexa 546 (1/500°; Dusseldorf, Germany); Anti-GFAP (1/200°, 2203PGF, EUROPROXIMA, the Netherlands). Anti-PTGFRN (1/500°, ab174180, abcam); Anti-CD81 (1/500°, Clone # 454720, R&D systems)

The mix miRCURY LNA Knockdown probes that target miR-302a, miR-302b, miR-302c and miR-302d were purchased from EXIQON. Scrambled sequence was used as a control.

Cell culture: The GSCs primary cell lines TG1, TG6, and GB1 were isolated from human glioblastomas (Fareh et al, 2012; Patru et al, 2010; Turchi et al, 2013). When kept as self-renewing GSCs, neurospheres were grown in NS34+ medium containing EGF and bFGF (DMEM-F12 1/1 ratio, 10 mM glutamine, 10 mM Hepes, 0.025% Sodium bicarbonate, N2, G5, and B27). The medium for cell differentiation (MFCS) was composed of DMEM-F12, glutamine 10 mM, Hepes 10 mM, 0.025% Sodium bicarbonate, and 0.5% fœtal calf serum (FCS). In the experiments of differentiation, the neurospheres were dissociated and 500 000 single cells were cultured in MFCS.

Plasmid constructs and stable cell lines: The miR-302 cluster was amplified from genomic human DNA by PCR (Forward primer: 5'-GGCTGAAGTCCCTGCCTTTTACCC-3' Reverse primer: 5'-TGGCTTAACAATCCATCACCATTGC-3') and cloned into a pENTR commercial vector (life technology). Subcloning in the 2K7 blasticidin lentiviral vector (2K7BSD) was realized by recombination in the presence of LR clonase II. A scramble form of shLuc (2K7BSD-shLuc-scb) that prevents inhibition of the luciferase gene was used as non-relevant construct (ctl). Lentiviral particles were produced by transfecting the 293T cell line with the 2K7BSD-Cluster mir-302 or 2K7BSD-shLuc-scb constructs along with the packaging vectors (Invitrogen). After lentiviral infection, cell lines stably expressing the miR-302 cluster (TG1 cluster miR-302 and GB1 cluster miR-302) or the control shLuc-scb (TG1 ctl and GB1 ctl) were selected in blasticidin containing medium (1 µg/mL) for 15 days. Two stable cell lines were developed from independent viral productions/infections and exhibited similar behaviors. Cells stably expressing the Red Fluorescent Protein (RFP) were obtained after the infection of GSCs with 2K7BSD-RFP lentiviral particles.

Immunofluorescence: Cells were grown on poly-L-lysine-coated glass coverslips in NBE, MFCS, or conditioned mediums. At indicated time points, cells were fixed with methanol 10 min at -20 °C, and washed with pre-chilled PBS twice. Blocking and antibody hybridization were performed in PBS containing 10% FCS and 0.1% Triton X100 (see table SX). After 1 h

of incubation with the primary antibodies at room temperature, cells were washed three times with PBS and stained for 30 min at room temperature with species-specific fluorophore-coupled secondary antibodies. At the same time, nuclei were stained with Hoechst 33342 (1 μ g/ml). The slides were washed twice with PBS, once with distilled water, and finally mounted with Gel Mount solution. Immunofluorescence and transmission light pictures were taken with a Nikon eclipse Ti microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France).

Clonogenical assay: Neurospheres were dissociated by 20 times gentle pipetting up and down to obtain single cells. Overall, 10 cells were seeded in each well of 96-wells plates containing control or miR-302 conditioned medium. After 21 days of incubation, each well was examined and the number of neutrospheres was counted. The experiments were repeated three independent times.

Quantitative real-time RT-PCR: RNA was extracted using Trizol reagent. MicroRNA and mRNA expression levels were quantified by two step real-time RT-PCR. Reverse transcription steps were performed with Superscript II reverse transcriptase and Taqman Reverse transcription microRNA kit for mRNA and miRNA, respectively, following the manufacturer's instructions. Real time PCR experiments were performed using universal Taqman PCR Master Mix. U54 expression was used as internal control to determine the relative expression of each gene. Fold changes were estimated using the CT method.

Orthotopic xenografts: 2.10^5 TG1 control cells stably expressing luciferase were resuspended in 5 µl of Hanks balanced salt solution (Invitrogen) and stereotactically implanted unilaterally into the striatum of male NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd mice (Harlan, France). Luciferase expressing cells were co-injected with TG1 cells stably expressing scrambled sequence of the cluster miR-302 (TG1 scrb) or stably expressing the cluster miR-302. The luciferase activity allowed the monitoring of tumor development in living animals. Cell survival and tumor growth were monitored and quantified in the living animals up to 120 days by detecting the luciferase activity with the IVIS Lumina II system (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA).

Organotypic MBS culture: Brains were dissected from new born mice, embedded in 4% agar-agar artificial cerebroSpinal fluid (124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO3, 2 mM CaCl2, 1 mM MgSO4, 1.25 mM KH2PO4, 10 mM glucose), and cut in slices of 400 mm thickness using a vibratome. The slices were placed on a Millicell-CM ($0.4 \mu m$) culture plate, inserted and maintained under air-liquid interface conditions for more than 3 weeks.

Paraffin embedding: Mice brain slides were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, then washed with PBS. Samples were subsequently dehydrated with the following sequence of incubations: ethanol 70% 15 min, twice; ethanol 90% 15 min; ethanol 95% 15 min; ethanol 100% 5 min, thrice; Roticlear 5 min.

Ex vivo tumorigenesis assay: 10 neurospheres from TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells stably expressing the red fluorescent protein were seeded at the top surface of the MBS and cultured under air-liquid interface conditions for 3 weeks. The cells were treated with the conditioned mediums every 48 hours. The Cell infiltration and growth was visualized within the thin slices by tracking the red fluorescent protein signal (RFP) using a Nikon eclipse Ti microscope.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention 3161), Association Sauvons Laura, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses, « GLIOMIRSTEM project »), Fondation de France, ARC projet (SFI20111203773), INCA PLBIO2012, ITMO CANCER plan cancer, Association pour le développement de la Recherche sur les tumeurs urologiques, cérébrales et pulmonaires (ADeRTU), INSERM, UNSA. M. F. was partly supported by Fondation pour la Recherche Medicale. We thank Viktorija Globyte for her critical reading of this manuscript.

References

Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Itoh Y, Ohtsuki Y, Naoe T (2011) Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **19**: 395-399

Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology* **14**: 677-685

Barroso-del Jesus A, Lucena-Aguilar G, Menendez P (2009) The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle* **8**: 394-398

Bronisz A, Wang Y, Nowicki MO, Peruzzi P, Ansari KI, Ogawa D, Balaj L, De Rienzo G, Mineo M, Nakano I, Ostrowski MC, Hochberg F, Weissleder R, Lawler SE, Chiocca EA, Godlewski J (2014) Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer research* **74**: 738-750

Cai N, Wang YD, Zheng PS (2013) The microRNA-302-367 cluster suppresses the proliferation of cervical carcinoma cells through the novel target AKT1. *RNA* **19**: 85-95

Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y, Archer TK (2008) Oct4/Sox2regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **28**: 6426-6438

Fareh M, Turchi L, Virolle V, Debruyne D, Almairac F, de-la-Forest Divonne S, Paquis P, Preynat-Seauve O, Krause KH, Chneiweiss H, Virolle T (2012) The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell death and differentiation* **19**: 232-244

Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T, Takeshita F (2014) The impact of extracellular vesicleencapsulated circulating microRNAs in lung cancer research. *BioMed research international* **2014:** 486413

Ge T, Yin M, Yang M, Liu T, Lou G (2014) MicroRNA-302b suppresses human epithelial ovarian cancer cell growth by targeting RUNX1. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **34**: 2209-2220

Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G (2011) Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer research* **71**: 5346-5356

lero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L (2008) Tumourreleased exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell death and differentiation* **15:** 80-88

Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, Pilgaard L, Moos T, Duroux M (2014) A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1846**: 75-87

Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringner M, Morgelin M, Bourseau-Guilmain E, Bengzon J, Belting M (2013) Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 7312-7317

Lindner K, Haier J, Wang Z, Watson DI, Hussey DJ, Hummel R (2015) Circulating microRNAs: emerging biomarkers for diagnosis and prognosis in patients with gastrointestinal cancers. *Clin Sci (Lond)* **128**: 1-15

Munoz JL, Bliss SA, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P (2013) Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Molecular therapy Nucleic acids* **2**: e126

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

Roucourt B, Meeussen S, Bao J, Zimmermann P, David G (2015) Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell research* **25**: 412-428

Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A, Rodriguez-Dorantes M (2014) MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *OncoTargets and therapy* **7**: 1327-1338

Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, Leek R, Edelmann M, Kessler B, Sainson RC, Sargent I, Li JL, Harris AL (2010) New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* **116:** 2385-2394

Singh R, Pochampally R, Watabe K, Lu Z, Mo YY (2014) Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Molecular cancer* **13**: 256

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* **63**: 5821-5828

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

Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008a) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* **10**: 1470-1476

Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008b) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* **10**: 1470-1476

Srivastava A, Filant J, Moxley KM, Sood A, McMeekin S, Ramesh R (2014) Exosomes: A role for naturally occurring nanovesicles in cancer growth, diagnosis and treatment. *Current gene therapy*

Stupp R, Hegi ME (2007) Targeting brain-tumor stem cells. Nat Biotechnol 25: 193-194

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 987-996

Sugimachi K, Matsumura T, Hirata H, Uchi R, Ueda M, Ueo H, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Shirabe K, Ochiya T, Maehara Y, Mimori K (2015) Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *British journal of cancer* **112**: 532-538

Thery C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews Immunology* **9**: 581-593

Turchi L, Debruyne DN, Almairac F, Virolle V, Fareh M, Neirijnck Y, Burel-Vandenbos F, Paquis P, Junier MP, Van Obberghen-Schilling E, Chneiweiss H, Virolle T (2013) Tumorigenic Potential of miR-18A* in Glioma Initiating Cells Requires NOTCH-1 Signaling. *Stem Cells* **Jul;31(7):** 1252-1265

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* **9**: 654-659

van der Vos KE, Balaj L, Skog J, Breakefield XO (2011) Brain tumor microvesicles: insights into intercellular communication in the nervous system. *Cellular and molecular neurobiology* **31**: 949-959

Wang L, Yao J, Shi X, Hu L, Li Z, Song T, Huang C (2013) MicroRNA-302b suppresses cell proliferation by targeting EGFR in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *BMC cancer* **13**: 448

Yan GJ, Yu F, Wang B, Zhou HJ, Ge QY, Su J, Hu YL, Sun HX, Ding LJ (2014) MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenicity of endometrial cancer cells by suppression of Cyclin D1 and CDK1. *Cancer letters* **345**: 39-47

Yang CM, Chiba T, Brill B, Delis N, von Manstein V, Vafaizadeh V, Oellerich T, Groner B (2015) Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes. *International journal of cancer* **137**: 2296-2309

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.F and T.V. designed the research. M.F, F.A, L.T, F.B.V, S.L.G performed the experiments. M.F, F.A, L.T, F.B.V, S.L.G and T.V analyzed the data. M.F, F.A, L.T, F.B.V, M.P.J, H.C and T.V. discussed the data. M.F. and T.V wrote the manuscript.

Figure legends:

Figure 1: Conditioned medium harvested from miR-302 expressing cells repressed SHH, GLI1, SOX2 expression and naïve GSC proliferation and infiltration properties.

A. Naïve TG6 cells expressing RFP were treated with a conditioned medium harvested from TG1-ctl or GB1-ctl (left panel) or TG1-miR-302 or GB1-miR-302 (right panel). Fluorescence microscope and electron microscope were used to analyze the change in the morphology induced by conditioned media.

B. Immunofluorescence analysis of Shh and Sox2 expression level in naïve GSCs cells treated with control (TG1-ctl med, upper panels) or miR-302 (TG1 miR-302 med, lower panel) conditioned media.

C. qRT-PCR analysis of SHH, GLI-1 and GFAP expression level in naïve GSCs cells treated with control (TG1 ctl med or GB1 ctl med) or miR-302 (TG1 miR-302 med, or GB1 miR-302 med) conditioned media.

D. Immunofluorescence analysis of Histone-H3 phosphorylation (marker of mitosis) in naïve GSCs treated with control (TG1 ctl med or GB1 ctl med) or miR-302 (TG1 miR-302 med, or GB1 miR-302 med) conditioned media. The histogram (right) displays a quantification of mitotic GSCs naïve cells in both conditions.

E. Clonal proliferation of naïve GSCs cells (TG1 or TG6) treated with control (TG1 ctl med or GB1 ctl med) or miR-302 (TG1 miR-302 med, or GB1 miR-302 med) conditioned media.

F, G. Naïve GSCs (TG6) stably expressing red fluorescent protein (RFP) were seeded on the top surface of an organotypic mouse brain slice. The organotypic cultures were treated with control (TG1 ctl med or GB1 ctl med) or miR-302 (TG1 miR-302 med, or GB1 miR-302 med) conditioned media. After 3 weeks, each organotypic culture was embedded in paraffin and sliced. Cell infiltration and growth within the neural host tissue were visualized by tracking the red fluorescent protein. Dashed lines mark the neural tissue boundaries.

Figure 2: TG1-miR-302 and GB1-miR-302 cells secrete exosomes capable to repress GSC stemness and proliferation

A, B. Electron micrographs showing exosomes within multi-vesicular bodies (MVB) of TG1 miR-302 cells.

C. Protein extracts prepared from TG1/GB1-ctl exosomes (lines 1-3) or TG1/GB1-miR-302 exosomes (lines 2-4). Exosomal proteins were electrophoretically separated on 4-12% SDS-PAGE gel and analyzed by western blotting using antibodies against PTGFRN and CD81.

D. Naïve GSCs (TG6) were treated with exosomes purified from control TG1/GB1 cells or from miR-302 expressing TG1/GB1 cells. The expression level of SHH, Gli-1 and GFAP in the exosomes treated cells was quantified by qRT-PCR.

E. Immunofluorescence analysis of SHH, SOX2 and NESTIN expression level in naive GSCs (TG6) treated with control exosomes (Ctl EXO) or miR-302 exosomes (miR-302 EXO) purified from TG1-miR-302.

F. Immunofluorescence analysis of Histone-H3 phosphorylation (marker of mitosis) in naïve GSCs (TG6) treated with control exosomes (Ctl EXO) or miR-302 exosomes (miR-302 EXO) purified from TG1-miR-302 or GB1-miR-302. The histogram (right) displays the quantification of mitotic TG1 or TG6 naïve cells.

G. Clonal proliferation of naïve GSCs cells (TG1 and TG6) treated with control exosomes (Ctl EXO) or miR-302 exosomes (miR-302 EXO) purified from TG1-miR-302 or GB1-miR-302.

Figure 3: Secreted exosomes transferred functional miR-302-367 cluster to neighboring cells

A. q-RT-PCR analysis of cluster miR-302 expression levels in the exosomes derived from miR-302 cells (TG1-EXO-miR-302 and GB1-EXO-miR-302). Data are normalized to the expression levels of cluster-miR-302 in exosomes derived from control cells (TG1-EXO-CRL and GB1-EXO-CRL).

B. Naïve TG6 were treated with Dye-labelled exosomes extracted from TG1-miR-302 (prelabelled with DiO16 membrane-dye). Fluorescence microscope was used to track exosome fusion at 5 minutes and 24 hours. The dash circle surrounds one single cell.

C. Time course analysis of miR-302-367 cluster expression following exosomes internalization by the recipient cells. The Actinomycin D was used to block RNA synthesis (endogenous expression of cluster miR-302) in exosome (TG1-miR-302 EXO) or serum (0.5%) treated naïve TG6.

D. Immunofluorescence analysis of CXCR4 in recipient TG6 cells treated with control exosomes (TG1-ctl EXO) or exosomes purified from miR-302 cells (TG1-miR-302 EXO).

E. q-RT-PCR analysis of the expression level of CXCR4, SDF1, CycD1, CyCA and E2F1 transcripts in recipient cells (TG6) treated with control exosomes (TG1-ctl EXO) or exosomes purified from miR-302 cells (TG1-miR-302 EXO). A mixture of LNA probes specific to each miR-302 members (LNA-302) were used to neutralize the miR-302 effects. Scramble LNA sequences were used as negative control (LNA ctl). The relative expressions were normalized to the mRNAs expression levels in untreated cells.

F. Dual-luciferase assay of 293T HEK cells transfected with luciferase reporter constructs containing CXCR4 3'UTR fused to the luciferase gene (3'UTR CXCR4-Luc) or identical construct but deleted of miR-302 recognition elements (Δ 3'UTR CXCR4-Luc). The cells were simultaneously transfected with mix LNA 302 or LNA ctl. The cells were treated with control exosomes (TG1-ctl EXO) or exosomes purified from miR-302 cells (TG1-miR-302 EXO).

G-I. TG6 cells were treated with nothing (mock) or TG1-EXO-miR-302 in presence or not of LNA ctl or LNA-302. (G) q-RT-PCR analysis of the expression level of GFAP, SHH and GLI-1 transcripts in recipient TG6 cells 24 hours after treatment. (H). Immunofluorescence analysis of Histone 3-phospho-Ser 10 shows the percentage of mitotic TG6 cells 24 hours after treatment. (I) Limiting dilution of naïve TG6 cells to assess their clonal proliferation capacity.

Figure 4: The co-injection of miR-302 overexpressing cells along with naïve GSC inhibits tumor development in mouse brain

A. Cartoon representing the procedure of injection. 200 000 TG1 control cells (TG1 luc) stably expressing the luciferase gene have been injected into the striatum of male NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd mice, alone or in combination with 40 000 TG1 stably expressing a scramble construct (TG1-scrb) or 40 000 TG1 stably expressing the miR-302-367 cluster (TG1-miR-302) (ratio= 5 to 1 respectively) or 200 000 TG1-miR-302 (ratio = 1 to 1).

B. Live imaging has been used to analyze tumor formation and growth in living animals (IVIS lumina II) for the procedures of co-injections (top panels). After sacrificing the animals, the brains have been dissected, embedded in paraffin and sliced in order to undergo a staining using specific human alpha vimentin to visualize the human tumor cells (lower panels).

C. 200 000 TG1 luc were injected into the brain of mice for 40 days in order to establish a tumor. 40 000 TG1-miR-302 cells have been then injected on the site of the tumor. The tumor growth has been observed by live imaging (IVIS lumina II).

D. Quantification of tumor growth in living animals (IVIS lumina II). The results showed significant differences (p value <0.01, t-test) between the group of control cells (TG1 luc and TG1 luc mixed with TG1-scrb cells) and the group of TG1 luc mixed with TG1-miR-302 (ratio = 1 to 1 and 5 to 1). The red curve represents the injection of TG1-miR-302 cells in established tumor and displays a significant difference (p value <0.01, t-test) with the group of control cells .

E. Mice survival analysis using Kaplan-Meier plot. The two groups correspond to 10 mice that have undergone intracranial injection of TG1 control cells alone or mixed with TG1-scrb (5 mice per conditions, n=10) and TG1 control cells mixed with TG1 miR-302 cells at a ratio of 1 to 1 or 5 to 1 respectively (5 mice per conditions, n=10). p-value = 0.002 (Wilcoxon test).

Table 1: quantification of SHH, SOX2, NESTING immunofluorescence in TG6 and TG1 treated 2 days and 10 days by exosomes purified from TG1/GB1 ctl or TG1/GB1 miR-302. 100 hundred cells have been counted in three separate experiments.

Table 2: miR-302-367 quantification by q-RT-PCR in the supernatant and the pellet of exosome preparations from TG1/GB1 ctl or TG1/GB1 miR-302. The values correspond to the number of cycles obtained using equal amount of RNA extract in three separate experiments.

Supplementary figure legends:

Supplemental figure 1: A. Time course analysis of miR-302-367 cluster expression following exosome internalization by TG6 recipient cells treated with TG1 ctl EXO, TG1-miR-302 EXO, or serum (0.5%).

B. miR-302-367 quantification by q-RT-PCR in TG1-miR-302 treated with LNA ctl or LNA-302.



B TG1 ctl med (TG6)





D TG1 ctl med (TG6) Dapi/H3-ser10-P TG1 miR-302 med (TG6) Dapi/H3-ser10-P Dapi/H3-ser10-P











2 days of nanovesicles treatment

10 days of nanovesicles treatment

F













			TG6		TG1			
			days of treatme	nt	days of treatment			
		2 days		10 days	2 d	ays	10 days	
		Shh	SOX2	Nestin	Shh	SOX2	Nestin	
	CM	90.38% ±3.8	94.68% ±0.73	99.78% ±0.28	91.86% ±4.53	93.18% ±5.02	99.4% ±0.75	
TG1-ctl	EXO	91.80% ±2.99	94.48% ±1.45	97.77% ±2.96	90.08% ±4.95	92.03% ±0.67	100% ±0.00	
	CM	8.32% ±2.78	7.32% ±1.50	1.21% ±0.62	7.79% ±1.54	6.81% ±2.56	0.14% ±0.18	
TG1-miR-302	EXO	9.06% ±1.6	6.24% ±1.34	0.65% ±0.23	11.17% ±4.03	6.07% ±0.86	1.00% ±0.44	
	CM	97.19% ±1.16	91.4% ±5.15	98.78% ±0.80	89.12% ±3.37	93.57% ±5.14	100% ±0.00	
GB1-ctl	EXO	94.30% ±1.83	96.43% ±0.46	99.11% ±1.17	95.89% ±1.41	95.50% ±1.97	99.72% ±0.36	
	СМ	8.68% ±1.84	8.51% ±1.32	0.89% ±0.59	10.70% ±4.15	5.79% ±1.30	0.77% ±0.32	
GB1-miR-302	EXO	8.40% ±1.59	6.20% ±1.53	0.26% ±0.35	8.16% ±0.79	7.10% ±1.10	0.15% ±0.20	

	TG1-ctl		TG1-miR-302		GB1-ctl		GB1-miR-302	
	supernatant	pellet (exo)						
miR-302a	ND	ND	36,43 ±0,21	26,47 ±0,35	ND	ND	35,67 ±0,25	24,09 ±0,22
miR-302b	ND	ND	35,82 ±0,13	25,23 ±0,10	ND	ND	34,72 ±0,18	25,22 ±0,55
miR-302c	ND	ND	34,12 ±0,43	25,29 ±0,05	ND	ND	34,22 ±0,23	23,23 ±0,11
miR-302d	ND	ND	35,46 ±0,31	24,34 ±0,025	ND	ND	34,64 ±0,22	23,30 ±0,01
miR-367	ND	ND	34,29 ±0,37	28,77 ±0,025	ND	ND	34,40 ±0,17	27,98 ±0,14

PARTIE IV : DISCUSSION et PERSPECTIVES

Discussion et Perspectives

1. Cibler les propriétés souches des cellules de glioblastome

Un des enjeux majeurs dans le traitement des glioblastomes est la résistance aux traitements conventionnels, probablement dû aux CIG. Les mécanismes de résistance des CIG sont multiples, liés à des facteurs intrinsèques propres à la biologie de ces cellules tels que le caractère quiescent, les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN efficaces, la survie en milieu hypoxique, le système multidrug-resistance (Bao et al., 2006; Hambardzumyan et al., 2006), mais aussi probablement liés au phénomène de plasticité de n'importe quelle cellule tumorale capable de se reprogrammer en CIG et de reformer une tumeur (Meacham and Morrison, 2013). De plus, il semblerait que les traitements conventionnels enrichissent la tumeur en population cellulaire souche (Auffinger et al., 2014; Chen et al., 2012; Dahan et al., 2014). Une des pistes thérapeutique est donc de cibler spécifiquement les CIG avec des thérapies non génotoxiques pour forcer leur différenciation, seules ou en association avec les traitements habituels (**figure 23**). Plus précisément, proposer une thérapie qui ciblerait les propriétés souches des cellules tumorales permettrait à la fois de différencier les CIG et d'empêcher la conversion de cellules différenciées non tumorigéniques en CIG.

Plusieurs équipes de recherche ont développé des approches précliniques utilisant différentes molécules ou principes actifs. Cependant, l'applicabilité en clinique soulève d'autres questions, notamment sur le mode d'administration et la toxicité. Nous allons discuter des différentes approches ciblant les CIG, ainsi que des perspectives thérapeutiques telles que nous les concevons dans notre équipe.



Figure 23. Implication des CSC dans la récidive tumorale et perspectives de traitement ciblant les CSC (Beck et al., 2013).

2. Les thérapies ciblant les CIG

Plusieurs approches précliniques ont été décrites ciblant le microenvironnement tumoral participant à l'entretien des CIG, ou dirigées contre les caractéristiques souches des CIG.

a. Stratégies ciblant le microenvironnement tumoral

L'objectif est de cibler les éléments participant au maintien de l'état souche des cellules tumorales, essentiellement la microvascularisation et les macrophages associés aux tumeurs (TAM).

La voie **VEGF** est une voie centrale dans l'angiogénèse et a fait l'objet de nombreux développements de molécules ciblées anti-VEGF. La plus répandue dans le glioblastome est le bévacizumab. Calabrese et al. ont traité avec du bévacizumab des souris transplantées avec la lignée gliale U87. Ils ont observé une diminution du nombre de cellules CD133+/nestine+,

de la densité vasculaire, et de la croissance tumorale chez les souris traitées par rapport à des souris contrôle (Calabrese et al., 2007).

Plusieurs études ont décrit un enrichissement en **TAM** dans les glioblastomes et l'importance de leur rôle dans le microenvironnement tumoral (Li and Graeber, 2012). Zhou et al. ont démontré que les CIG secrètent la periostin (POSTN) pour recruter les TAM, avec une corrélation positive entre taux de POSTN et nombre de TAM. Le silencing de POSTN dans les CIG a permis de réduire significativement la densité en TAM et la croissance tumorale *in vivo*, et d'augmenter la survie des souris transplantées avec les CIG modifiées par rapport à des CIG contrôles (Zhou et al., 2015).

Ces études suggèrent que de cibler l'interaction entre les CIG et le microenvironnement peut être une approche alternative intéressante contre le glioblastome. Concernant le bevacizumab, les résultats présentés ici sont cependant à nuancer au vu des résultats décevants des essais cliniques (voir chapitre *traitements médicaux* de la partie I).

b. Stratégies ciblant les marqueurs de surface

Comme nous l'avons vu, le marqueur **CD133** est l'un des mieux caractérisés pour la sélection des CIG, et certaines études ont retrouvé une corrélation inverse entre le taux d'expression tumorale de CD133 et la survie des patients. Brescia et al. ont démontré qu'un blocage de l'expression du CD133 par un shRNA (short hairpin RNA) dans les neurosphères altérait l'autorenouvellement et la tumorigénicité *in vivo* (Brescia et al., 2013). Une autre étude a porté sur la co-expression **CD133/EGFRvIII**, qui définirait selon les auteurs une population de CIG avec des caractères souches très marqués. Ils ont éliminé la population CD133+/EGFRvIII+ en utilisant un anticorps bi-spécifique et ont remarqué une diminution significative de la tumorigénicité *in vivo* des cellules transplantées par rapport à des cellules traitées par un anticorps mono-spécifique dirigé contre l'un ou l'autre épitope (Emlet et al., 2014). Ces résultats complémentaires des 2 études pourraient être liés au manque de
spécificité du CD133 pour les caractères souches des CIG. En effet, une thérapie ciblant seulement ce marqueur risquerait d'exclure des cellules aux caractères souches CD133- (Chen et al., 2010; Patru et al., 2010). De plus, le rôle mécanistique du CD133 n'est pas clairement établi.

Une étude de Bao et al. a porté sur le blocage de l'expression de L1CAM par utilisation d'un shRNA. Ils ont remarqué une diminution de la capacité de formation de neurosphères et ont induit une apoptose sélective de la population CD133+ par rapport aux cellules CD133- *in vitro*. Les souris transplantées par les cellules L1CAM-/CD133+ avaient une survie prolongée par rapport aux L1CAM+/CD133+. De façon intéressante, le traitement *in situ* par un shRNA anti-L1CAM a permis une diminution significative de la croissance tumorale et une survie prolongée des souris traitées par rapport aux souris contrôles (Bao et al., 2008). Il n'y a pas eu à ce jour d'essai clinique publié sur une thérapie ciblant le L1CAM.

c. Stratégies ciblant les voies de signalisation

Les voies de signalisations telles que Notch, Shh, BMP, ou EGFR, sont très fortement impliquées dans l'autorenouvellement et la tumorigénicité des CIG (voir chapitre *voies d'activation des CIG*), et ont fait l'objet d'inhibitions sélectives dans de nombreuses études. Toutefois, en raison d'une importante toxicité sur des cellules non tumorales, la plupart des essais précliniques ne sont pas applicables en l'état à l'homme.

Il a été rapporté que l'inhibition de l'activation de **Notch** par des inhibiteurs de la γ -sécrétase diminuerait la prolifération clonale, la fraction de cellules CD133+ *in vitro*, et la tumorigénicité *in vivo* de lignées de méduloblastomes transplantés dans des souris immunodéprimées (Fan et al., 2006). Dans les glioblastomes, un effet suppresseur de tumeur *in vitro* sur des CIG a été retrouvé avec un inhibiteur de la γ -sécrétase, le MRK003, agissant sur la voie Notch et Akt (Tanaka et al., 2015).

148

La voie **Shh** peut être inhibée par la cyclopamine. Plusieurs études ont mis en évidence un effet suppresseur des propriétés souches de CIG *in vitro* et *in vivo* de la cyclopamine (Bar et al., 2007) ou d'une prodrogue moins toxique (Balbous et al., 2014).

Le cluster de miR-302-367 que nous avons identifié agit comme un inhibiteur de la voie **Shh-Gli-Nanog**. L'expression stable de ce micro-ARN par les CIG induisait une perte d'expression des marqueurs souches *in vitro* et un effet anti-tumoral *in vivo* dans des cerveaux de souris NOD/SCID (Fareh et al., 2012).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre *voies de signalisation des CIG*, l'activation de la voie **BMP** entraine une différenciation des CIG dans des conditions expérimentales. Piccirillo et al. ont démontré que l'administration de BMP4 à des souris transplantées avec des cellules CD133+ induisait une baisse significative de l'expression du marqueur et de la formation de neurosphères. De plus, les tumeurs étaient plus petites et la survie des souris plus longue comparativement aux groupes contrôle (Piccirillo et al., 2006).

La voie **EGFR** peut également être la cible d'une thérapie visant à éradiquer les caractères souches des cellules de glioblastome. Une étude récente a porté sur l'utilisation du cetuximab (anticorps anti-EGFR) dans les CIG associé à une nanoparticule ferromagnétique afin d'être suivie en IRM et internalisée par les cellules cibles. Les auteurs ont rapporté un effet antitumoral sur les cellules de glioblastome, quel que soit le statut EGFR et CD133, *in vitro* et *in vivo*. Sur les CIG plus spécifiquement, ils ont remarqué une forte diminution de l'expression de CD133 et Sox2, suggérant une perte des caractères souches par inhibition de la voie EGFR (Kaluzova et al., 2015).

d. Stratégies de modulation de la plasticité des CIG

Une autre approche consiste à également induire une différenciation des CIG en un type cellulaire défini en forçant l'expression d'une voie de différenciation spécifique.

Il a été démontré récemment qu'il était possible de forcer la différenciation de CIG en neurones fonctionnels et d'inhiber la tumorigénicité des cellules modifiées. Plus précisément, Zhao et al. ont transduit des cellules de gliomes avec des facteurs de transcription exprimés dans les neurones (Ascl1, Brn2, Ngn2) (Zhao et al., 2012). La même approche a été réalisée sur des CIG. Guichet et al. ont forcé l'expression de Ngn2, facteur de transcription neurogénique, dans des CIG humaines exprimant CD133+ et Sox2 (Guichet et al., 2013). Les effets observés sur les CIG étaient l'induction soit d'une mort cellulaire massive, soit d'une différenciation neuronale phénotypique et fonctionnelle nette, dont certaines étaient capables de générer des potentiels d'action. Ils ont alors observé une perte des caractères souches (Shh, Sox2, Nestin), la perte d'expression de GFAP et d'Olig2 (marqueurs de différenciation gliale), l'induction des marqueurs de différenciation neuronale (NeuroD1, Dcx) et l'apparition d'un phénotype neuronal à partir des CIG Ngn2+ (**figure 24**). Les CIG Ngn2+ n'étaient plus capables de former des tumeurs *in vivo*.



Figure 24. Effets de l'expression du facteur de transcription Ngn2 dans les CIG (Guichet et al., 2013)

Cette même équipe a également exploré les voies de **différenciation vasculaires** (Guichet et al., 2015). En activant Notch1 par expression de sa forme intracellulaire dans des CIG humaines, ils ont induit une perte des marqueurs souches, et une augmentation d'expression des marqueurs cellulaires de péricytes (NG2, PDGFR β , et α -smooth muscle actin [α -SMA]). Cette différenciation phénotypique en péricytes était également accompagnée d'une perte de la tumorigénicité *in vivo* et de l'acquisition de propriétés fonctionnelles vasculaires avec la formation de vaisseaux fonctionnels étroitement associés avec des cellules endothéliales de l'environnement. Ces résultats sont concordants avec ceux sur la transdifférenciation d'autres équipes (voir chapitre *Vascularisation des gliomes, invasion et microenvironnement tumoral*).

3. Les méthodes d'administration du cluster de miR-302-367

Après réalisation d'une exérèse tumorale à visée décompressive et histologique, l'administration du cluster de miR-302-367 pourrait se faire par plusieurs voies, directes *in situ* ou systémiques. Les CIG résiduelles, qui font systématiquement le lit de la récidive, pourraient ainsi être forcées à sortir de leur état souche et être accessibles à un traitement adjuvant anticancéreux conventionnel.

a. Cluster de miR-302-367 et thérapie génique

L'utilisation de la nouvelle génération de vecteurs viraux (lentivirus et adénovirus) a révolutionné les approches de la thérapie génique (Kim and Rossi, 2007). Ces vecteurs permettent de contrôler l'expression des transgènes dans l'espace, grâce à l'utilisation de promoteurs tissu spécifiques. En outre, la disponibilité des vecteurs viraux modifiés exprimant des épitopes particuliers permet de cibler un organe ou une population cellulaire donnée (Kroeger et al., 2010).

Nos perspectives de thérapie génique visent à utiliser le cluster de miR-302-367 en l'administrant directement dans la cavité de résection. Nous pourrions nous appuyer sur les avancées technologiques réalisées dans le domaine de la vectorisation pour cibler les CIG.

Cette méthode permettrait de forcer la différenciation des CIG de manière continue grâce à l'expression stable du cluster de miR-302-367 par les cellules tumorales.

Bien que les perspectives de la thérapie génique soient prometteuses, son utilisation pour traiter les gliomes connait certaines limites. Les études cliniques de thérapie génique montrent une transduction localisée au niveau du site traité, et souffre d'un défaut de répartition du vecteur dans le parenchyme cérébral (Ram et al., 1997). Cette limitation pourrait faire défaut dans le traitement des gliomes du fait de leur caractère infiltrant. Une autre limite vient des modifications cellulaires induite par le microenvironnement. Les pressions induites à la cellule peuvent provoquer une exclusion ou un « silencing » de la séquence codante pour le cluster de miR-302-367 entrainant ainsi une perte d'efficacité. Des injections répétées du micro-ARN seraient alors nécessaires.

b. Cluster de miR-302-367 et thérapie cellulaire

Il serait envisageable de réaliser une thérapie cellulaire, sur la base de la sécrétion d'exosomes, en utilisant une lignée cellulaire modifiée comme décrit dans l'article n°2 (lignées TG1-miR ou GB1-miR exprimant le cluster de miR-302-367).

Après l'exérèse tumorale, les cellules modifiées exprimant le cluster de miR-302-367 pourraient être administrées directement dans la zone péri-lésionnelle, afin qu'elles délivrent les exosomes suppresseurs de tumeur aux CIG résiduelles. Du fait de l'utilisation de cellules tumorales à visée thérapeutiques, il serait indispensable d'exprimer un gène suicide tel que la Thymidine Kinase (TK) dans ces cellules, pour induire leur élimination par simple prise de Ganciclovir en fin de traitement (Caruso et al., 1993; Culver, 1993).

Une autre possibilité serait d'enfermer les cellules modifiées exprimant le cluster de miR-302-367 dans un compartiment d'encapsulation qui serait placé dans la cavité de résection. Ce dispositif perméable laisserait passer les exosomes secrétés par les cellules encapsulées vers le site tumoral, et empêcherait la diffusion cellulaire. Du fait de l'utilisation de cellules tumorales, et bien qu'encapsulées, le retrait du biomatériau en fin de traitement semble indispensable. De nombreux biomatériaux d'encapsulation cellulaire ont été développés dans le cadre d'une utilisation en thérapie cellulaire (Jiao and Cui, 2007; Uludag et al., 2000). Ces biomatériaux sont très sollicités dans l'ingénierie tissulaire du système nerveux, notamment pour des thérapies cellulaires visant à traiter des maladies neurodégénératives (Bellamkonda and Aebischer, 1994; Emerich et al., 1992; Maysinger and Morinville, 1997).

Les principales limitations à la thérapie cellulaire utilisant les cellules tumorales comme vecteurs des exosomes sont de 2 ordres : le fait que ce sont des cellules cancéreuses, et le système immunitaire de l'hôte. En effet, les tests précliniques de faisabilité que nous avons conduits ont été réalisés dans la souris immunodéprimée NOD/SCID. Nous ne savons pas comment un système immunitaire compétent se comporterait, même face à des cellules tumorales extraites du patient lui-même.

L'utilisation de **cellules souches mésenchymateuses** (CSM) permettrait de contourner ces 2 obstacles. Plusieurs études ont montré que les CSM présentent un tropisme pour plusieurs types de tumeurs, incluant le cancer du poumon (Loebinger et al., 2009), du colon (Menon et al., 2007), du sein (Kidd et al., 2009; Patel et al., 2010) et les gliomes infiltrants (Sasportas et al., 2009; Sonabend et al., 2008). Les mécanismes moléculaires régissant ce « homing » des CSM vers la tumeur ne sont pas clairement établis. Néanmoins, la contribution de certains chimio-attractants dans cette migration a été largement étudiée. Plusieurs équipes sont parvenues à exploiter le tropisme des CSM pour les tumeurs en les chargeant avec des agents anticancéreux. Pour les tumeurs gliales, Roger et al. ont décrit la combinaison de CSM et de nanoparticules chargées avec des molécules anticancéreuses. Ils ont montré que les CSM peuvent internaliser des nanoparticules biodégradables sans altération de leur viabilité ni de leur potentiel de différenciation. Ces cellules migraient vers le site tumoral et délivraient localement les nanoparticules à activité anti-tumorale. Cette combinaison de nanoparticules et de CSM permettait une meilleure vectorisation des drogues et compromettait le développement tumoral *in vivo* (Roger et al., 2010).

En s'appuyant sur ces travaux, on pourrait envisager l'utilisation des CSM comme véhicule du cluster de miR-302-367. Une expression stable du cluster dans ces cellules (par transduction lentivrale) aurait pour principal avantage de délivrer en continue et sur site les exosomes différenciant. Cependant, le risque que les CSM modifiées délivrent le produit à des cellules non tumorales, et en particulier aux cellules souches de la moelle osseuse, est non négligeable, et peut représenter une limitation majeure à cette approche thérapeutique.

c. Cluster de miR-302-367 et nanoparticules

Les nano-systèmes ou les nanoparticules d'origine lipidique ou de polymères, sont des petites structures d'une taille pouvant varier de 1 à 100 nm, connues pour leur capacité à interagir de façon unique avec un système biologique donné, selon leur conception et en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les nanoparticules peuvent être conçues pour interagir spécifiquement avec les cellules tumorales, notamment de gliomes. Elles ont un intérêt pour l'imagerie (Moffat et al., 2003) et pour l'administration d'agents anticancéreux spécifiquement aux cellules tumorales (Muller and Keck, 2004). Le principe actif emprisonné dans ces nanoparticules est protégé du reste de l'organisme jusqu'à sa libération à proximité de sa cible, pour garantir plus d'efficacité, de spécificité, et de sécurité biologique (Petit et al., 2008). De plus, pour permettre à ces nanoparticules un ciblage, non seulement au niveau cellulaire, mais également à l'échelle subcellulaire, des groupements de reconnaissance moléculaire comme des peptides et des anticorps peuvent leur être greffés. Ceci pour leur franchir certaines barrières biologiques, permettre de telle que la barrière hématoencéphalique, ou encore pour cibler une population cellulaire donnée, telle que les CIG (Brigger et al., 2002; Fenart et al., 1999; Jallouli et al., 2007; Kaluzova et al., 2015). Les qualités de vectorisation exceptionnelles de ces nanoparticules permettraient l'administration du cluster de miR-302-367 dans les CIG, à l'image des exosomes.

4. Stimulation de la production endogène du cluster de miR-302-367 par les cellules tumorales

Du fait des difficultés de synthèse à grande échelle et d'administration du cluster de miR-302-367 à la tumeur, nous explorons également des approches pharmacologiques. En partenariat avec le centre de chimie de l'institut de Biologie Valrose à Nice, nous développons des molécules chimiques dont le but est d'induire la différenciation des CIG sans génotoxicité. Plusieurs candidats pharmacologiques et leurs dérivés semblent répondre au cahier des charges in vitro, en particulier un dérivé d'une molécule utilisée en pratique clinique (donc facilement transposable à l'homme). A faible concentration, ce dérivé induit la perte d'expression des marqueurs d'autorenouvellement et de pluripotence Nanog, Oct4 et Sox2, et la perte de la prolifération clonale des CIG traitées. Il induit une augmentation du cluster de miR-302-367 dans les cellules traitées. Le traitement des cellules n'a pas entraîné de mort cellulaire, à la concentration d'utilisation. D'une façon intéressante, le traitement des CIG par ce composé les sensibilise au temozolomide. En effet le nombre de cellules mortes, qui est d'environ 20% après traitement par témozolomide, atteint 70 à 80% lors d'un traitement combiné. Les cellules résistantes restent sensibles aux effets du composé, et évoluent vers un état différencié et non mitotique. Les effets différenciant sur les CIG semblent constants quelle que soit la lignée cellulaire testée, suggérant un effet ubiquitaire de cette molécule. Ces résultats augmentent l'intérêt de ce composé pour des applications cliniques. D'autres essais mécanistiques et sur l'effet suppresseur de tumeur in vivo sont nécessaires et envisagés à court terme au laboratoire.

Parmi les questions qui vont se poser en vue d'une transposition en clinique, les plus évidentes sont : la toxicité du produit *in vivo*, le moyen de le délivrer aux cellules tumorales, le délai d'action sur les CIG pour induire leur différenciation et la durée de l'effet différenciant sur les cellules *in vivo*. Ces aspects conditionnent non seulement le système d'administration (injections répétées nécessaires ? délivrance en continu ? durée du traitement ?), mais aussi la synchronisation avec les thérapies anticancéreuses usuelles (délivrance du produit différenciant dès le postopératoire immédiat ? juste avant la séquence thérapeutique adjuvante ? pendant toute la durée du traitement adjuvant ? prolongée même après le traitement adjuvant ?).

Concernant les aspects de toxicité, les études précliniques et de phases précoces répondront à ces questions. L'utilisation de dérivés de molécules déjà utilisées chez l'homme facilite naturellement cette approche.

Concernant la méthode d'administration, 2 systèmes semblent plus prometteurs et réalisables actuellement : la convection-enhanced delivery (voir chapitre *Administration locale de traitement* dans la première partie) et les microcapsules (Chaichana et al., 2015; Scott et al., 2011). Comme nous l'avons vu précédemment, la CED permet de délivrer en continu et sous pression un produit qui va diffuser relativement en profondeur dans le parenchyme (1,5 à 3 cm) et également le long des fibres de substance blanche d'association (voies privilégiées de diffusion des gliomes). Les microcapsules permettent de délivrer *in situ* un ou plusieurs produits avec un débit variable en fonction du diamètre du/des orifices d'échappement et des propriétés physico-chimiques du produit. Un essai préclinique sur un modèle de rats traités par témozolomide *in situ* a démontré sa faisabilité et son efficacité par rapport à des groupes contrôles de rats non traités et traités par témozolomide oral seulement (Scott et al., 2011). Cependant, si une administration répétée sur une période prolongée du produit est nécessaire, le système de délivrance par CED semble plus facilement transposable actuellement. A noter qu'il semble possible de programmer le relargage par les microcapsules grâce à des

micropuces informatiques (Chaichana et al., 2015). Ces techniques d'ingénierie de bioinformatique modernes pourraient être idéales mais ne semblent pas encore disponibles. Concernant l'effet différenciant provoqué par le produit et sa synergie avec les traitements adjuvants, les résultats des essais précliniques devraient permettre de répondre à ces questions en vu d'un passage à l'homme.

PARTIE V : CONCLUSION

Conclusion

En conclusion, il existe un besoin urgent de développer des stratégies innovantes pour le traitement des gliomes cérébraux, en particulier des glioblastomes. La découverte des cellules souches cancéreuses responsables de l'initiation et du développement tumoral a été cruciale dans la compréhension des mécanismes de résistance des glioblastomes. Cependant, le concept récent de plasticité cellulaire remet en cause les dogmes établis sur la hiérarchie tumorale. Il permet d'élargir notre vision sur l'origine des cellules initiatrices de gliomes, l'hétérogénéité tumorale et les mécanismes de résistance des tumeurs.

Dans notre équipe, à partir de lignées cellulaires issues de l'exérèse de glioblastomes humains, nous contribuons à la compréhension des mécanismes de régulation moléculaires impliqués dans la plasticité des cellules tumorales. Nous avons décrit des voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'expression des caractères souches telles que EGF/EGFR/ERK, EGR1, NOTCH, la boucle d'autorenouvellement Shh-Gli-Nanog, le rôle central du miR-18a*. Nous avons décrit des voies impliquées dans l'état différencié des cellules tumorales telles que DOCK4/béta-caténine, le rôle suppresseur de tumeur du cluster de miR-302-367. Nous avons également mis en évidence la capacité de sécrétion de microvésicules par les cellules différenciées qui peuvent agir à distance sur les cellules initiatrices de gliomes en réprimant leurs caractères souches, aux effets *in vivo* prometteurs. Enfin, nous avons démontré que les cellules tumorales sont capables d'interconversion entre un état différencié et un état souche en fonction des modifications de l'environnement.

PARTIE VI : ANNEXES

Article n°3

"Tumorigenic Potential of miR-18a* in Glioma Initiating Cells Requires NOTCH-1 Signaling"

L. Turchi, D. Debruyne, <u>F. Almairac</u>, V. Virolle, Y. Neirijnck, F. Burel-Vandenbos, P. Paquis, MP. Junier, E. Van Obberghen-Schilling, H. Chneiweiss, T. Virolle

Résumé

Les propriétés souches des cellules initiatrices de gliome (CIG) entretiennent le développement des glioblastomes en fournissant les différentes cellules tumorales. Les mécanismes moléculaires qui permettent aux CIG de rester dans un état autorenouvelant ou de se différencier constituent une cible thérapeutique potentielle. Nous avons identifié un micro-ARN surexprimé à l'état souche, le miR-18a*. Dans cette étude, à partir de CIG issues de l'exérèse de glioblastomes humains, nous avons démontré que l'expression du miR-18a* promouvait la prolifération clonale *in vitro* et la tumorigénicité *in vivo*. Sur le plan mécanistique, l'activation de ERK par phosphorylation induisait la production de miR-18a*, entrainant une baisse de l'expression de DLL3 et par conséquent une augmentation des taux de NOTCH-1 (activé). DLL3 est un inhibiteur autocrine de NOTCH. NOTCH-1 activé maintenait la phopshorylation de ERK et activait la voie Shh-Gli-Nanog. Cette boucle autorégulatrice, centrée autour du miR-18*, semble requise pour activer la voie d'autorenouvellement Shh-Gli-Nanog, nécessaire à l'état souche des CIG. Par une régulation fine de l'expression de DLL3, le miR-18a* constitue un médiateur de signalisation puissant de l'état souches des CIG.

CANCER STEM CELLS

Tumorigenic Potential of miR-18A* in Glioma Initiating Cells Requires NOTCH-1 Signaling

Laurent Turchi^{1,2}, David N. Debruyne^{1,2}, Fabien Almairac^{1,2,4}, Virginie Virolle^{1,2}, Mohamed Fareh^{1,2}, Yasmine Neirijnck^{1,2}, Fanny Burel-Vandenbos^{1,2,3}, Philippe Paquis^{1,2,4}, Marie-Pierre Junier⁵, Ellen Van Obberghen-Schilling^{1,2}, Hervé Chneiweiss⁵ and Thierry Virolle^{1,2,6}

¹Université de Nice-Sophia Antipolis, ² institut de Biologie Valrose, CNRS UMR7277 - INSERM UMR1091, Nice, France; ³Service d'Anatomopathologie Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 06107, Nice, France; ⁴Service de Neurochirurgie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 06107, Nice, France; ⁵Plasticité Gliale, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, UMR 894 INSERM / Faculté de Médecine Université Paris Descartes, 2ter rue d'Alésia 75014 Paris France

Key words. miR-18a* • DLL3 • glioblastoma • NOTCH • SHH • ERK

ABSTRACT

Stem cell-like properties of Glioma initiating Cells (GiCs) fuel glioblastoma (GBM) development by providing the different cell types that comprise the tumor. It is therefore likely that the molecular circuitries that regulate their decision to self-renew or commit to a more differentiated state may offer targets for future innovative therapies. In previous micro-RNA profiling studies to search for regulators of stem cell plasticity we identified miR-18a* as a potential candidate and its expression correlated with the stemness state. Here, using human GiCs we found miR-18a* that expression promotes clonal proliferation in vitro and tumorigenicity in vivo.

Mechanistically, ERK-dependent induction of miR-18a* directly represses expression of DLL3, an autocrine inhibitor of NOTCH, thus enhancing the level of activated NOTCH-1. Activated NOTCH-1 in turn is required for sustained ERK activation. This feedforward loop, driven by miR-18a*, is required to turn on the SHH-GLI-NANOG network, essential for GiC self-renewal. Hence, by tightly regulating expression of DLL3, miR-18a* constitutes an important signaling mediator for fine tuning the level of GiC self-renewal.

INTRODUCTION

The notion of cancer stem cell suggests there is a hierarchical organization of cells within a tumor where only subpopulation of stem-like cells, the tumor initiating cells (TiCs), have unlimited capacity for self-renewal and are responsible for tumor initiation and maintenance [1]. According to this model, the targeting of tumor stem cells is viewed as a major therapeutic challenge. For the development of novel prospective treatments it is therefore necessary to understand the

⁶Correspondence should be addressed to: Dr. Thierry Virolle, Institut de Biologie Valrose, CNRS UMR7277 - INSERM UMR1091 – UNS, Parc Valrose, 06108 Nice, France. virolle@unice.fr; This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention 3161), Association Sauvons Laura, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses, «GLIOMIRSTEM project »), Fondation de France, ARC projet, INSERM, UNSA. ' Received September 24, 2012; accepted for publication February 28, 2013; 1066-5099/2013/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.1373

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/stem.1373

Author contributions: The corresponding author has received permission from all the contributing authors for the submission of each version of the paper.; L.T.: conception and design, manuscript writing, data analysis and interpretation, collection and or assembly of data; D.N.D.: conception and design, data analysis and interpretation, collection and or assembly of data; F.A.: conception and design, data analysis and interpretation; V.V.: conception and design, data analysis and interpretation; M.F.: conception and design, data analysis and interpretation; Y.N.: conception and design, data analysis and interpretation; F.B.-V.: provision of study material of patients, data analysis and interpretation; P.P.: provision of study material of patients; M.-P.J.: provision of study material of patients, data analysis and interpretation; H.C.: provision of study material of patients; M.-P.J.: provision of study material of patients, data analysis and interpretation; C.: provision of study material of patients, data analysis and interpretation; H.C.: provision of study material of patients, and interpretation; E.V.O.-S.: manuscript writing; H.C.: provision of study material of patients, data analysis and interpretation, collection and or assembly of data, final approval of manuscript writing; T.V.: conception and design, manuscript writing, data analysis and interpretation, collection and or assembly of data, final approval of manuscript writing; T.V.: conception and design, manuscript writing, data analysis and interpretation, collection and or assembly of data, final approval of manuscript writing; T.V.: conception and design, manuscript writing, data analysis and interpretation; collection and or assembly of data, final approval of manuscript

mechanisms involved in TiC maintenance and self-renewal [2, 3]. Cell populations that display TiC characteristics have been found in most human cancers including leukemia [4], breast cancer [5], melanomas [6] and brain tumors [7]. While it is possible to enrich for TICs in many tumors using a number of cell surface markers such as CD133, there is compelling evidence that a fraction of the CD133⁻ population might similarly exhibit TiC properties. Subtypes of TiCs have been isolated from Glioblastoma (GBM) according to their CD133 status [8, 9] and some GBM CD133⁻ cells are capable of long-term selfrenewal and initiation of a heterogeneous tumor when xenotransplanted [8-11]. Thus, self-renewal and tumor initiation properties may not be restricted to a uniform cell population, but rather they may be displayed by а heterogeneous population. This heterogeneity is illustrated by the multiplicity of signaling systems which control selfrenewal, stemness and tumorigenic properties, including NOTCH [12], extracellular signalregulated kinase (ERK), [13], and Hedgehog pathways [14, 15]. Whether these pathways are independent and compensatory, or whether they exhibit a complex interplay is poorly described to date.

By miRNA profiling in GiC [16], we previously identified miR-18a* as a potential regulator of GiC plasticity. Here we examined the effect of miR-18a* on clonal prolifieration in vitro and on tumor promotion in vivo. By taking advantage of the ability of GICs to turn on and turn off their self-renewing property we uncovered a novel molecular mechanism underlying the control of GiC stemness and tumorigenicity. We demonstrate a positive regulatory feedback between ERK and NOTCH pathways which strongly relies on miR-18a*-mediated repression of DLL3 expression. Importantly this mechanism is necessary to turn on the SHH-GLI-NANOG signaling network, which is essential for the maintenance of GiCs [14, 15]. Our findings provide mechanistic insights into tumor cell plasticity and highlight a key miRNAdependent control of stemness and the self renewal status of GiC.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Patient-derived cells were isolated from surgical resections of human primary GBM provided by the Neurosurgery Departments of St Anne Hospital in Paris (TG1 and TG6 cells [17]) and the CHU of Nice (GB1 and GB3 cells, from 62- and 71-year-old male patients, respectively). According to the Verhaak classification [18], all cells display a gain on chromosome 7, a loss on chromosome 9p, no mutation of IDH1, active SHH and NOTCH pathways. TP53 is not mutated, except in GB3 cells, which bear a G244S p53 mutation. GB1 and GB3 cells also display a loss on chromosome 10. TG1 and TG6 cells were shown to initiate tumors when orthotopically grafted (<500 cells) in immune-compromised mice [17]. As self-renewing GiCs, TG1, TG6, GB1 and GB3 cells grow as neurospheres in serum-free defined medium as described elsewhere [17]. For differentiation experiments, neurospheres were dissociated and 5×10^5 cells were seeded in MFCS (DMEM-F12, 10 mM glutamine, 10 mM Hepes, 0.025% sodium bicarbonate, 0.5% FCS). Where indicated, cells were treated with U0124 or U0126 (15µM), or DATP (10mM). For GB1 and GB3, the results showing their ability to self-renew, to lose stemness markers upon serum treatment as well as their capability to survive and infiltrate in mouse brain tissues are shown in Supplemental Figure S1.

Plasmid constructs and stable cell lines

Full length DLL3cDNA was obtained from Origene (9620 Medical Center Dr., Suite 200 Rockville, MD 20850). The DLL3 coding sequence (DLL3CS) and 3'UTR (wt) were subcloned in pCMV and psiCheck, respectively. The constructs pDLL3mut and DLL3 3'UTR deleted for the miR18a* seed (Del) were respectively obtained by site directed mutagenesis using the following oligos: olDLL3mut: 5'ctcaagggatctacgttatctccgctccttc-3'; olDEL: 5'tactcagcgggggggggggcagcctctctaatg-3'.

Synthetic double strand DNA sequences for miR-18a/a* precursor and control non relevant

shRNA (sh-CTL) (EUROGENTEC S.A.) were cloned in pEnter H1/T02 (ref K4920-00, Life Technologies) and then subcloned in the 2K7 blasticidin lentiviral vector (2K7BSD) by recombination in presence of LR clonase II (ref 11791-020, Life Technologies), as described elsewhere [30]. Lentiviral particles were produced by transfection of 2K7BSD-miR-18a* or 2K7BSD-sh-Ctl constructs along with the packaging vectors in the 293T cell line. After lentiviral infection, stable cell lines expressing miR-18a* (TG6 miR-18a* / TG1 miR-18a*) or the control sh-CTL (TG6 CTL / TG1 CTL) were selected in NBE medium containing 1µg/mL blasticidin for at least 15 days. Two stable cell lines generated separately from different viral productions / infections displayed the same behavior. Stable expression of sh-ERK1 and sh-ERK2 in TG1 and TG6 has been carried out as described [19].

Western blot analysis

Total proteins were extracted from GiCs at the indicated times, culture conditions and treatment (buffer: 50 mM Tris-Hcl pH7.6, 150mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40). After migration on SDS-polyacrylamide gels, proteins were transferred to Immobilon P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and probed with rabbit polyclonal antibodies to active-phospho-ERK (ref V8031, PROMEGA Corporation) or ERK1 (ref sc93, Santa Cruz Biotechnology), mouse antibody to ERK2 (ref sc1647- Santa Cruz), or rabbit monoclonal antibody to C-term DLL3 (ABGENT, Interchim).

Immunofluorescence

Cells were seeded on polylysine-coated glass coverslips in NBE or MFCS. At the indicated time, cells were fixed with methanol (5min at -20°C). Blocking and staining were performed in PBS containing 10% FCS and 0.1% Triton X100 with the following primary antibodies: goat antibodies to SHH (C18) (1/20 dilution, sc1195, Santa Cruz); goat antibodies to Nanog (5µg/ml, AF1997, R&D Systems, Inc); rabbit antibodies to active NOTCH-1 (1/100 dilution Abcam 24 rue Louis Blanc 75010 Paris France). SHH and DLL3 (DLL3 C-term antibody clone RB23871, ref AP9328b, ABGENT) double-immunolabelings were performed on paraffin-embedded GBM sections (selected from the database of the Department of Pathology, CHU-Nice). Nuclei stained with 4',6'-diamidino-2were phenylindole (Dapi). Fluorescence was observed on a Nikon Eclipse Ti inverted microscope.

Clonogenic assay

Neurospheres were dissociated by pipeting gently up and down to obtain single cells. Cells were serially diluted and seeded in 96 well plates (1 cell per well) in defined medium, or in serum containing medium (DMEM, 0.5% serum). When indicated the cells were cultured in serum-containing medium for 4 days prior to being switched to defined medium NBE. In some experiments cells were seeded under similar conditions in presence or absence of MEK (U0126) or NOTCH (DAPT) inhibitors. After three weeks, each plate was observed and the number of neurospheres was assessed and quantified.

Quantitative real-time RT-PCR

RNAs were extracted using Trizol reagent. MicroRNA and mRNA expression levels were quantified by real-time two step RT-PCR. Reverse transcription steps were performed with Superscript II reverse transcriptase and Taqman Reverse transcription microRNA kit (ref 4366596, Life Technologies) for mRNA and miRNA, respectively, accordingly to the manufacturer's instructions. Real time PCR was performed with universal Tagman PCR Master Mix (Life Technologies). The expression of each gene was determined relative to U54 expression as an internal control. Fold stimulation was calculated using the $\Delta\Delta$ CT method.

siRNA and anti-miR cell transfection

GiCs in NBE or serum-containing medium were transfected with lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to manufacturer's instructions 24h before the end of the experiment or the EGF stimulation. Stealth siRNA (Life Technologies) is located at position 1725 in DLL3 mRNA (The sequence is not avalaible). Anti-miR-18a* and scrambled sequences were from Ambion.

Orthotopic xenografts

2.10⁵ TG1 control or TG1 miR-18a* cells and 50,000 or 500 TG6 control or TG6 miR-18a* were resuspended in 5µl of Hanks balanced salt (Life Technologies) solution and stereotactically implanted unilaterally into the male NOD.CB17striatum of Prkdcscid/NCrHsd mice (Harlan Laboratories). According to a protocol approved by the local institutional animal care and experimentation committee. Trypan blue staining was performed prior injection to assess cell viability. TG1 cells stably expressed a luciferase reporter gene, which allowed tumor detection in living animals. Two groups of 5 mice were injected. Cell survival and tumor growth were monitored and quantified in the living animals using the IVIS Lumina II system (Caliper Life Sciences).

miRNA in situ Hybridization

The experiments were carried out with the miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit (FFPE) as indicated by Exigon (Exigon A/S Skelstedet). Briefly, sections of paraffinembedded glioma samples (selected from the database of the Department of Pathology, CHU-Nice) were deparaffinized in xylene, hydrated in successive ethanol baths (99% to 70%) and rinsed in PBS. Rehydrated sections were treated with proteinase K at a final concentration of 15µg/ml for 10 min at 37°C and washed with PBS. Slides were dehydrated in ethanol (70%-99%) and air dried. Slides were hybridized with hsa-miR-18a*miRCURY LNA detection probe (ref 38781-15 Exigon) at a final concentration of 10nM at 55°C in a humidified chamber then washed by successive incubations with 5xSSC to 0.2xSSC. Slides were then incubated with anti-DIG antibody diluted at 1/800 in the blocking solution for 1 hour at room temperature then washed with 0.1% Tween PBS. Slides were then incubated with NBT-BCIP alkaline phosphate substrate containing 0.2 mM levamisol, for 1 hour at 37°C to reveal anti-DIG antibody and double DIG miRCURY LNA probe immunocomplexes. Nuclei were stained with Nuclear fast red then slides were dehydrated and mounted with mounting medium (Eukitt, Sigma-Aldrich).

RESULTS

miR-18a* promotes GiC clonal proliferation and tumorigenicity.

We have previously described that GiCs cultured in serum-containing medium became committed to a more differentiated state, lost the SHH-NANOG regulatory network [16] and consequently were incapable of self-renewal (Figure 1A, B, C) [14, 15]. Under these conditions we observed the repression of miR-18a* expression, as compared to cells cultured in serum-free defined medium appropriate for self-renewal of adult neural stem cells (Figure 1D). Using four different patient derived primary GiC cultures isolated from primary GBM (TG1, TG6 [17], GB1, GB3), we further showed that the serum-induced loss of clonal proliferation may be totally rescued if the cells are switched to defined medium (Figure 1C). Upon this treatment, expression of SHH and NANOG were efficiently restored at the mRNA and protein levels (Figure 1A and B). Although only 0.35% and 0.47% of the serumdifferentiated TG1 population was positive for SHH and NANOG, 97% and 98% of the cells expressed these markers after 48 hours of dedifferentiation (Supplemental Figure S2A). The same results were obtained using TG6, GB1 and GB3 (Supplemental Figure S2A). A similar enrichment was also observed using OCT4 as a stemness marker (Supplemental Figure S2B). Interestingly, video microscopy of the switch from serum-containing to defined medium (from 0 to 48h) showed that dedifferentiated cells had the same capacity as neurospheres original GiCs to form (Supplemental Figure S2B). To demonstrate that enrichment of stemness markers resulted from cell dedifferentiation, and not clonal expansion of remaining self-renewing cells, we labelled differentiated cells with CFSE and compared levels of fluorescence after the switch to defined medium for 48 hours. An equivalent staining and cell distribution (Figure 1E) demonstrated that enrichment of stemness markers was independent of proliferation and was rather due to a conversion to the stemness state.

Interestingly, miR-18a* was also stimulated after the replacement of serum medium with

defined medium (Figure 1D and Supplemental Figure S2C). miR-18a* expression may therefore be correlated with the self-renewal ability of cells and may somehow contribute to clonal proliferation and tumorigenic potential of GiCs. To test this hypothesis, we generated modified TG1 and TG6 cells (TG1 miR-18a*; TG6 miR-18a*), which stably and constitutively overexpress miR-18a*, approximately 6-fold above the levels observed in control cells (TG1 ctl; TG6 ctl) infected with a non-relevant construct (Supplemental Figure S2 D and E). We first assessed the clonal proliferation of each cell line and observed that miR-18a* overexpression significantly increased cloning efficiency by 16 % (70% for TG1 ctl versus 86% for TG1 miR-18a*, p value = 0.0002) and 15% (69.4% for TG6 ctl versus 84.6% for TG6 miR-18a*, p value = 0.00007) for TG1 and TG6 cells, respectively (Figure 1F). In addition, BrdU staining revealed that cells overexpressing miR-18a* displayed a proliferation rate that was 10% higher than in control cells (Figure 1G). Constitutive miR-18a* overexpression leads therefore to increased cell proliferation and clonogenicity. We then grafted either TG1 ctl or TG1 miR-18a* cells in the cortex of immunocompromised mice (NOD/SCID) to test their tumorigenicity. Tumor development was monitored in live animals by measuring the activity of a luciferase reporter gene constitutively expressed in each cell line. As shown in Figure 1H, overexpression of miR-18a* significantly increased tumor growth, compared to TG1 ctl cells. Similar results were obtained following orthotopic injection of TG6 ctl or TG6 miR-18a* cells (<500 cells), as shown in Supplemental Figure 2F), confirming that miR-18a* is capable of promoting GiC tumorigenicity in vivo.

miR-18a* expression is under the control of the ERK pathway

We next sought to determine the pathway responsible for the regulation miR-18a*. Since the MAPK ERK has been reported to be involved in regulation of the Hedgehog pathway [20], we examined its contribution to SHH-Gli-NANOG expression and ensuing regulation of clonal proliferation of GiCs. Therefore, we cultured TG1, TG6, GB1 and GB3 cells under serum conditions for four days then induced miR-18a* expression bv switching them to defined medium for 48 hours, in presence or absence of the MEK inhibitor U0126 or Parke-Davis PD98059. Inhibition of ERK phosphorylation was monitored by immunofluorescence and western blotting (Supplemental Figure S3A and C). qPCR analyses revealed that ERK inhibition efficiently blocked expression of mRNA encoding SHH, as well as that of its effector GLI-1 in all of the GiCs (Figure 2A and B). Accordingly, the expression of SHH and NANOG proteins was also blunted under these conditions (Figure 2C and Supplemental S3D). Figure Consequently, clonal proliferation was drastically repressed following inhibition of ERK signaling (Figure 2D and 2E and Supplemental Figure S3I and J). Interestingly, miR-18a* repression upon serum treatment could not be reversed by defined medium when ERK was inactivated (Figure 2F). Similar results were obtained when RNAi-based silencing was used instead of U0126 to inhibit ERK phosphorylation (Figure 2D, E and Supplemental Figure S3F, G and H). Thus, the ERK pathway plays a major role in controlling the clonal proliferation of GiCs through tight regulation of the SHH-GLI-NANOG regulatory network. In that context, our results suggest miR-18a* is an effector of ERK. To identify miR-18a* targets, we performed micro-array profiling of mRNAs that were down-regulated by switching from serum-containing to defined medium (48 hours), but remained unchanged when ERK was inhibited (data not shown). Examination of the microarray data in silico (target scan) revealed 10 putative miR-18a* targets. Since the NOTCH pathway is required for GiC clonal proliferation and tumorigenicity [12], we focused our attention on the known inhibitor of NOTCH activity [21, 22], Delta like 3 protein (DLL3). qPCR and western blot analyses confirmed the microarray data and revealed a drop in DLL3 mRNA and protein expression when cells were cultured in defined medium (Figure 2F and G). This drop in DLL3 levels was totally abrogated by MEK inhibition (Figure 2F). Thus, DLL3 and miR-18a* expression are both under the control of ERK. In addition, the inverse correlation between

their expression levels strongly suggests that miR-18a* is able to regulate DLL3 expression.

miR-18a* directly down-regulates DLL3 protein levels

In order to assess the impact of miR-18a* on DLL3 expression, we performed loss of function analyses by transfecting TG1, GB1, GB3 or TG6 cells with an anti-miR-18a* probe, or a scrambled probe as control (Supplemental Figure S4A and B). Thereafter, we promoted the drop in DLL3 levels by shifting cells from serum-containing to defined medium and determined the effect of miR-18a* on this response. As shown in Figure 3A, the drop in DLL3 levels was totally abolished when miR-18a* was functionally invalidated while the presence of the scrambled probe did not affect DLL3 repression. Similar results have been obtained in GB1 and GB3 (Figure 3A). Conversely miR-18a* overexpression abrogated DLL3 expression at both mRNA and protein levels in TG1 and TG6 cells (Figure 3B and C, and Supplemental Figure S4C). These results demonstrate the ability of miR-18a* to negatively regulate DLL3 protein expression, thus confirming miR-18a* activity. In order to assess whether this miR-18a* regulation occurs directly, we cloned the 3' UTR of the DLL3 mRNA into a luciferase reporter construct. A similar construct lacking the sequence bound by the miR was also generated as negative control. Both constructs were transfected along with a miR-18a* synthetic sequence. Strong inhibition of luciferase activity was observed only in cells expressing the wt construct (Figure 3D). Taken together these results clearly demonstrate the ability of miR-18a* to directly modulate DLL3 protein expression levels.

miR-18a* constitutes an important MAPK effector for the regulation of SHH signaling

To assess the relevance of miR-18a* mediated down-regulation of DLL3 on clonal proliferation of GiCs, we first assessed the level of SHH and GLI-1 mRNA in TG1 miR-18a* and TG1 ctl cells cultured 4 days in serum conditions prior to the addition of defined medium for 48 hours. SHH and GLI-1 mRNA expression were respectively 3.5 and 2 fold higher in TG1 miR-18a* than in TG1 ctl cells (Figure 4A and B). Similar results were observed in TG6 miR-18a*. Taking advantage of the fact that TG1 miR-18a* stably expressed exogenous miR-18a* independently of MAPK activity (Supplemental Figure S5A), we tested whether this forced expression could be sufficient, to rescue the SHH signaling when ERK activation was inhibited. Thus, cells were treated, with U0126 or U0124, an inactive form of the inhibitor. In the absence of ERK activation, miR-18a* over-expression failed to induce SHH and GLI-1 expression (Figure. 4A and B) thus demonstrating the requirement of an active MAPK to turn on the SHH pathway. Similar results have been obtained using TG6. In order to confirm the impact of miR-18a* on regulation of the SHH pathway, we performed its functional invalidation using a specific antimiR-18a* probe in similar culture conditions. Alternatively, a non-relevant scrambled probe was used as control (Figure 4C and D). While the scrambled probe had no effect, repression of miR-18a* with the anti-sense probe substantially decreased the levels of SHH and GLI-1 (Figure 4C and D). In accordance with the miR-18a*-mediated repression of DLL3, SHH and GLI-1 expression was clearly enhanced when DLL3 was inhibited, while their levels remained unchanged by the rescue of DLL3 expression (Figure 4C and D). Consequently, while NANOG protein levels were strongly repressed in absence of miR-18a* (Figure 4E and Supplemental Figure S4D) its expression appeared earlier and was more robust in TG1 or TG6 miR-18a* as compared to TG1 or TG6 ctl cells (Figure 4F and Supplemental Figure S4E). As shown in Figure 4A and B, we found that the regulation of SHH and GLI-1 expression by the miR-18a*, required an activated ERK. It is therefore likely that miR-18a* and DLL3 levels may interfere with ERK activation. To test this hypothesis we first compared TG1 or TG6 miR-18a* and TG1 or TG6 ctl for ERK MAPK activity 48 hours after placing cells in defined medium. Our results showed that ERK proteins were phosphorylated to a greater extent, and earlier, in TG1 and TG6 miR-18a* cells than in TG1 and TG6 ctl cells (Figure 4G and Supplemental Figure S4F). Similarly, the reduction of DLL3 protein expression in naïve TG1 or TG6 cells, using specific siRNA, led to

increased ERK phosphorylation (Figure 4H and Supplemental Figure S4G). This gain in ERK phosphorylation was abolished by expression of a functional DLL3 construct (pDLL3mut) that is insensitive to the siRNA (Figure 4H and Supplemental Figure 4G). These results suggest the existence of a miR-18a* dependent positive feedback loop affecting ERK activation.

miR-18a*/DLL3 mediated NOTCH activation is required for ERK activation, SHH-Gli-NANOG network expression and clonal proliferation of GiCs

DLL3 is an inhibitor of NOTCH signaling when expressed in the same cell as the NOTCH receptor [21, 22]. In light of the fact that miR-18a* represses DLL3 expression, it is likely that positive regulation of NOTCH signaling by miR-18a* may contribute to the activation of the SHH-GLI-NANOG network, and thereby enhance clonal proliferation of GiCs. Immunofluorescence using an antibody specific to the activated form of NOTCH-1 revealed substantial staining of activated NOTCH-1 in self-renewing cells (Figure 5A and Supplemental Figure S5B). NOTCH-1 activation, lost upon serum treatment, was totally rescued 24h or 48h after the change from serum to defined medium (Figure 5A Supplemental Figure S5B). Furthermore the use of a gamma secretase complex inhibitor, DAPT, which prevents NOTCH activation and translocation into the nucleus, induced a drastic loss of mRNA encoding its known targets HES1, 2 and 5 as well as HES3 to lesser extent (Figure 5B and Supplemental Figure S5C), thus demonstrating efficient activation of NOTCH signaling by the defined medium. In order to maintain a high level of DLL3 expression, we transfected a miR-18a*insensitive DLL3 construct lacking the 3'UTR of the gene (pDLL3-CDS) in serum-cultured TG6 or TG1 cells 24h prior to placing them in defined medium. Effects on NOTCH activation assessed 24 hours were later by Whereas immunofluorescence. the cells transfected with a non-relevant plasmid displayed high levels of activated NOTCH, DLL3 overexpression strongly antagonized (Figure NOTCH activation 5C and Supplemental Figure S6A). Interestingly the blockade of ERK1/2 phosphorylation led to similar effects confirming that, NOTCH activation, similar to DLL3 expression, was dependent on ERK in this system (Figure 5C and Supplemental Figure S6A). Conversely, the loss of DLL3 protein in the same culture conditions led to an increase of HES1, 2 and 5 levels, confirming that activation of NOTCH signaling was strongly dependent on DLL3 levels (Figure 5D and Supplemental Figure S6B). Expectedly, and according to its repressor effect on DLL3 expression, miR-18a* invalidation significantly inhibited the level of HES1, 2 and 5 while its overexpression strengthened their expression (Figure 5D and Supplemental Figure S6B). In addition, restoring DLL3 expression (pDLL3-CDS construct), abolished miR-18a* mediated induction of HES1, 2 and 5 (Figure 5D and Supplemental Figure S6B). These results demonstrate that NOTCH-1 activation in GiCs relies on miR-18a*-mediated down-regulation of the DLL3 protein, and this mechanism is strongly dependent on ERK activation.

We demonstrated (Figure 4G and H and Supplemental Figure 4F and G) that DLL3 and miR-18a* modulation impacts the activation of ERK. Since NOTCH-1 activation was found to be strongly dependent on DLL3 and miR-18a*, it is possible that the NOTCH pathway may contribute to ERK activation. Indeed. inhibition of NOTCH activation, using DAPT, upon switching cells to defined medium, repressed ERK phosphorylation (Figure 5E) and consequently affected both miR-18a* and DLL3 expression (Supplemental Figure S6C and D). These results demonstrate that activated NOTCH constitutes a major miR-18a* effector for maintaining activated ERK. Accordingly, and since the ERK pathway is essential to turn on the SHH pathway (Figure 2A, B and C), inhibition of NOTCH activation, prevented SHH, GLI, NANOG expression at the mRNA and protein levels (Figure 5F and G Supplemental Figure S6E). siRNA and mediated knock-down of NOTCH-1 showed similar results, confirming the impact of NOCTH-1 activation on ERK phosphorylation as well as SHH, GLI and NANOG expression (supplemental Figure S7). Consequently, invalidation of NOTCH signaling, led

ineluctably to the loss of clonal proliferation (Figure 5H and Supplemental Figure S6F). Taken together, our results demonstrate that miR-18a*, by down-regulating the DLL3 protein, promotes NOTCH-1 activation, which in turn contributes to SHH-GLI-NANOG regulation, at least in part, through ERK activation (as schematized in Figure 6A).

Status of miR-18a*, DLL3 and SHH expression in GBM samples

We have demonstrated in culture that high miR-18a* levels positively correlate with increased clonal proliferation/tumorigenicity of GiCs and with the down-regulation of DLL3 expression. To assess the miR-18a* status in GBM we performed in situ hybridization on surgical resections from human tumors. Five different cases are displayed in Figure 6B. Interestingly, miR-18a* staining revealed distinct territories containing more or less densely packed positively stained cells within the tumor. From our results, we would expect higher miR-18a* levels in cells which express lower levels of DLL3 protein. To test this hypothesis, we isolated tumor cells harboring low DLL3 levels and highly positive DLL3 cells from the same surgical resections and subjected them to RNA extraction and gPCR analysis. Consistent with our in vitro results using GICs, the data revealed two-fold higher miR-18a* expression in cells displaying low DLL3 levels, as compared to highly DLL3positive cells (Figure 6C), suggesting that miR-18a*-mediated DLL3 regulation may occur within the tumor. Accordingly, higher levels of SHH, GLI-1, HES1 mRNAs were observed in cells with low DLL3 expression (Figure 6C). Based on these results, it is likely that DLL3 down-regulation within the tumor might lead, as observed in culture, to positive SHH protein regulation. We therefore analyzed SHH and DLL3 protein co-expression by immunofluorescence on sections of paraffinembedded GBM from 10 different patients. Consistent with the low number of selfrenewing cells within a tumor mass, the results revealed that SHH positive cells are much less frequent than SHH negative cells (Figure 7A). Remarkably, all SHH positive cells were either negative for DLL3, or displayed very weak staining of the protein. Strikingly, highly

positive DLL3 cells were all negative for SHH staining (Figure 7A and B, Supplemental Figure S7A) confirming in vivo, the inverse correlation between DLL3 and SHH expression. Identical exclusion between DLL3 expression and the well-known neural stem cell marker SOX2 (Figure 7A and B) or SOX1 also associated with neural stem cells [23-25], (Supplemental Figure S7B and C) further confirmed the inverse correlation between DLL3 expression and stemness.

DISCUSSION

In this study we have demonstrated the contribution of miR-18a* to the promotion of GiC self-renewal and tumorigenicity through NOTCH-1 activation. In addition we found that miR-18a*-mediated NOTCH-1 activation, in that context, was absolutely required for expression and activation of the SHH-GLI-NANOG regulatory network, previously described as essential for GiC self-renewal and expression of an (ES)-like signature [14, 15]. Further, we have demonstrated that not only miR-18a* expression, but also NOTCH-1 activation and clonal proliferation, rely on ERK phosphorylation (schematized in Figure 6A).

Although MAPK/ERK signaling has previously been implicated in promoting the differentiation spontaneous of mouse embryonic stem cells [26] or maintenance of the differentiated state of somatic cells [27], its requirement for adult neural stem cell selfrenewal [28, 29] as well as its regulation of the Hedgehog pathway [20] has recently been reported. Consistently, our results demonstrate that, by regulating SHH and GLI expression levels, MAPK/ERK constitutes a major player for controlling the SHH-GLI-NANOG regulatory network and thereby GiC selfrenewal. In self-renewing conditions, we found that miR-18a* expression was dependent on ERK activation. This result is in good agreement with recent reports, demonstrating that production of growth-promoting miRNA through pERK1/2arises mediated phosphorylation of TRBP protein, a member of the miRNA generating complex [30]. miR-18a* belongs to the "miR-17 approximately

92" cluster. While members of this cluster are known to have growth-promoting effects [30, 31], miR-18a* has also been described as a putative tumor suppressor through the repression of K-Ras [32]. However its regulation and contribution to the control of cancer stem cell self-renewal and tumorigenicity has not yet been reported. In our primary GiCs cultures, miR-18a* constitutes an important effector of ERK since its inhibition strongly repress expression of SHH, GLI and NANOG proteins, thus compromising integrity of the SHH-GLI-NANOG regulatory network. Conversely, ectopic miR18a* over-expression leads to the opposite effect and clearly strengthens SHH, GLI, NANOG expression, and enhances GiC tumorigenicity in intracranial xenograft experiments. Thus, modulation of miR-18a* expression and ERK activity induce similar effects on the SHH pathway and NANOG expression. The relationship between these two elements is further reinforced by a positive feedback loop in which ERK1/2phosphorylation is augmented by miR-18a*, and miR-18a* expression is dependent on ERK activation. However, even if miR-18a* plays a prominent role in the control of the SHH-GLI-NANOG regulatory network, the rescue of its expression is not sufficient to bypass ERK inhibition. This places ERK at a central place for the control of GiC self-renewal. In that context we have demonstrated that miR-18a* directly down-regulates expression of DLL3 protein. Importantly we showed that DLL3 silencing has the same effect on ERK activity and the SHH pathway, as miR-18a* overexpression. DLL3 is a divergent member of the DSL family of NOTCH ligands that does not activate signaling but instead inhibits NOTCH signaling when expressed in the same cell as the NOTCH receptor [21, 22]. In this study we confirmed the inhibitory potential of DLL3 on NOTCH-1 activity in GiCs. Consistent with other reports, describing that NOTCH-1 pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells [12], our results clearly demonstrate its requirement for self-renewal of primary GiC cultures. We further demonstrate here that inhibition of NOTCH-1 activation clearly compromises ERK activity and consequently the SHH-GLI-NANOG regulatory network. This is consistent with other reports, which describe a pro-survival role of NOTCH signaling through activation of the ERK pathway [33]. By decreasing DLL3 protein levels, miR-18a* strengthens NOTCH-1 signaling, which in turn activates ERK, thereby inducing SHH and GLI expression. Activated NOTCH-1 acts as miR-18a* effector for the positive feedback loop for fine-tuning of constitutive and basal activated ERK. Thus, miR-18a* mediated DLL3 regulation constitutes an important signaling event for controlling the switch between the selfrenewing and non self-renewing state. We have extended our observations to human tumor samples. Indeed, miR-18a* expression was detected by in situ hybridization in GBM sections. Interestingly miR-18a* expression was approximately two times higher in tumor cells expressing low level of DLL3 as compared to highly positive DLL3 cells thus corroborating our in vitro data. We further demonstrated, in several GBM samples, that SHH expression is detected only in cells harboring negative or low level of DLL3 protein.

In conclusion our study reveals a miR-18a*/DLL3 dependent interplay between ERK and NOTCH-1 pathways, responsible for GiC self-renewal and tumorigenicity. GBM is the most aggressive brain tumor against which conventional therapies only provide transient clinical response always followed by tumor recurrence. In this context of therapeutic challenge, miR-18a* and DLL3 may be putative targets for the design of innovative treatment interfering with cancer growth and recurrence.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention 3161), Association Sauvons Laura, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses, « GLIOMIRSTEM project »), Fondation de France, ARC projet, INSERM, UNSA. We thank Arnaud Borderie, Sandrine Bestrée and Coralie Hagnere for technical assistance and Pr JF Michiels is gratefully acknowledged for helpful comments on the study. We thank Dr P Lenormand for providing us with sh-ERK1 and

REFERENCES

- 1. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer. 2008;8:755-768.
- 2. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, et al. Stem cellrelated "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. J Clin Oncol. 2008;26:3015-3024.
- 3. Stupp R, Hegi ME. Targeting brain-tumor stem cells. Nat Biotechnol. 2007;25:193-194.
- Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. Nat Immunol. 2004;5:738-743.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer Res. 2005;65:5506-5511.
- 6. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, et al. Identification of cells initiating human melanomas. Nature. 2008;451:345-349.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res. 2004;64:7011-7021.
- 8. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. Cancer Cell. 2010;17:362-375.
- Prestegarden L, Svendsen A, Wang J, et al. Glioma cell populations grouped by different cell type markers drive brain tumor growth. Cancer Res. 2010;70:4274-4279.
- Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, et al. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. Neurosurgery. 2008;62:505-514; discussion 514-505.
- 11. Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. Int J Cancer. 2008;122:761-768.
- 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.
- 13. Karsy M, Albert L, Tobias ME, et al. All-trans retinoic acid modulates cancer stem cells of glioblastoma multiforme in an MAPK-dependent manner. Anticancer Res. 2010;30:4915-4920.
- 14. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, et al. HEDGEHOG-GLI-1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. Curr Biol. 2007;17:165-172.
- 15. Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, et al. NANOG regulates glioma stem cells and is essential

sh-ERK2.

in vivo acting in a cross-functional network with GLI-1 and p53. Embo J. 2010;29:2659-74.

- 16. Fareh M, Turchi L, Virolle V, et al. The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. Cell death and differentiation. 2012;19:232-244.
- Patru C, Romao L, Varlet P, et al. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. BMC Cancer. 2010;10:66.
- 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.
- Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. Molecular and cellular biology. 2008;28:511-527.
- Seto M, Ohta M, Asaoka Y, et al. Regulation of the hedgehog signaling by the mitogen-activated protein kinase cascade in gastric cancer. Mol Carcinog. 2009;48:703-712.
- Chapman G, Sparrow DB, Kremmer E, et al. Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. Hum Mol Genet. 2011;20:905-916.
- 22. Hoyne GF, Chapman G, Sontani Y, et al. A cell autonomous role for the Notch ligand Delta-like 3 in alphabeta T-cell development. Immunol Cell Biol. 2011;89:696-705.
- Alcock J, Sottile V. Dynamic distribution and stem cell characteristics of Sox1-expressing cells in the cerebellar cortex. Cell Res. 2009;19:1324-1333.
- 24. Elkouris M, Balaskas N, Poulou M, et al. Sox1 Maintains the Undifferentiated State of Cortical Neural Progenitor Cells Via the Suppression of Prox1-Mediated Cell Cycle Exit and Neurogenesis. Stem Cells. 2011;29:89-98.
- 25. Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, et al. Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in smallcell lung cancer. Br J Cancer.2010;102:1636-1644.
- Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature. 2008;453:519-523.
- Lluis F, Cosma MP. Somatic cell reprogramming control: signaling pathway modulation versus transcription factor activities. Cell Cycle. 2009;8:1138-1144.
- 28. Lee JA, Jang DJ, Kaang BK. Two major gatekeepers in the self-renewal of neural stem cells:

Erk1/2 and PLCgamma1 in FGFR signaling. Mol Brain. 2009;2:15.

- 29. Ma DK, Ponnusamy K, Song MR, et al. Molecular genetic analysis of FGFR1 signalling reveals distinct roles of MAPK and PLCgamma1 activation for self-renewal of adult neural stem cells. Mol Brain. 2009;2:16.
- 30. Paroo Z, Ye X, Chen S, et al. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. Cell. 2009;139:112-122.
- Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. Cancer Sci. 2008;99:1147-1154.
- 32. Tsang WP, Kwok TT. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. Carcinogenesis. 2009;30:953-959.
- 33. Liu ZJ, Xiao M, Balint K, et al. Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression. Cancer research. 2006;66:4182-4190.

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

Figure 1. miR-18a* promotes clonal proliferation of GiCs and tumorigenicity.

A) qPCR analysis of Sonic HedgeHog (SHH) mRNA expression in four different GiC primary lines (TG6, TG1, GB1, GB3) either cultured in defined medium (DM), in serum for 4 days (serum), or in serum for 4 days then in defined medium for 2 days (serum / DM). Results are the average of three independent experiments. B) Similar culture conditions were used to assess SHH and NANOG expression by immunofluorescence in TG6 cells. Scale bar = 20μ m. The nuclei were stained with DAPI. C) TG6, TG1, GB1 and GB3 cells were cultured as single cells either in defined medium (DM), in serum for 4 days (serum), or in serum for 4 days then in defined medium (serum / DM). Hundred wells were counted for each condition to assess the clonal proliferation efficiency. Results are the average of 4 independent experiments. D) Histogram shows HSA-miR-18a* expression in TG1, TG6, GB1 and GB3 cells either cultured in defined medium (DM), in serum (serum) or cultured in serum (4 days) prior to defined medium for 6h or 48h. HSA-miR-18a* expression has been determined by qPCR using a Taqman probe as described in the Methods section. E) Upper panel, FACS analysis displaying CFSE quantifications in cells cultured in serum for 4 days and then switched to defined medium for 48 hours. Lower panel, fluorescent and phase contrast images of CFSE-labeled cells. F) TG1-ctl or TG1-miR-18a* and TG6-ctl or TG6-miR-18a*, were seeded as single cells in defined medium (DM) to assess their clonal proliferation efficiency. Hundred wells were counted for each condition and the results represent the average of 4 independent experiments. G) BrdU staining of TG1-ctl or TG1-miR-18a* and TG6-ctl or TG6miR-18a*, cells was quantified by counting fluorescent nuclei under the microscope.. H) TG1 cells stably expressing miR-18a* (miR-18a*), or a non-relevant construct (ctl), were grafted in the brain of NOD/SCID mice. Both cell lines stably expressed a luciferase reporter gene. Tumor growth was assessed in living animals by measuring luciferase activity. Results represent the average of five mice for each group. (**** p value < 0,001 *** p value < 0,001 and ** p value < 0,01.





Figure 2. ERK activation is required for SHH, GLI-1 and NANOG expression in GiC.

A) SHH and B) GLI-1 mRNA level were assessed by qPCR in four different primary GiC lines cultured either 4 days in serum (serum) or 4 days in serum then switched to defined medium (serum / DM) for 48h. When indicated, the MEK inhibitor U0126 was added to the culture medium. C) Similar conditions, plus inhibition of ERK activation with Parke Davis 98059 (PD), were used in TG6 cells to assess NANOG and SHH protein expression by immunofluorescence. The nuclei were stained with DAPI. D) TG1 or E) TG6 cells were cultured as single cells in defined medium (DM), in presence or absence of the MEK inhibitor U0126, Parke Davis 98059 (PD) or following shRNA-mediated silencing of ERK1/2, to assess their clonal proliferation efficiency. Hundred wells were counted for each condition. Results are the average of four independent experiments. F) TG1 and TG6 cells were cultured either in defined medium (DM), for 4 days in serum (serum) or for 4 days in serum then in defined medium (serum / DM) for 48h. The U0126 was added in the medium where indicated. qPCR analysis using Tagman probes show the miR-18a* and DLL3 expression in these conditions. G) TG6 and TG1 cells were cultured in defined medium (DM), in serum for 4 days (serum), or cultured in serum for 4 days then in defined medium (serum / DM) for 1 and 2 days. DLL3 expression in protein extracts was assessed by western blotting. Western blot quantifications (image J software) are indicated above the lanes. (*** p value < 0,001 and ** p value < 0,01).

Turchi_Fig 2



Figure 3. miR18a* directly regulates DLL3 protein levels.

A) TG1, TG6, GB1 and GB3 cells were cultured in serum for 4 days, then transfected with anti miR-18a*, anti miR scrambled or mock (WO) and then switched to defined medium for 2 days. DLL3 mRNA expression was assessed by qPCR using a TAQMAN probe and compared to DLL3 levels measured in serum-treated cells. Results are the average of 3 independent experiments. B) DLL3 mRNA levels were assessed by qPCR in TG1-ctl and in TG1-miR-18a* cells and in TG6-ctl and in TG6-miR-18a* cells, cultured in defined medium (DM). C) TG1-ctl or TG1-miR-18a* cells were cultured for 4 days in serum (serum) or 4 days in serum then switched to defined medium (serum / DM) for 24h or 48h. DLL3 protein expression was assessed in each condition by western blotting. Antibody specific to ERK2 was used as loading control. Histogram displays the immunoblot quantification determined using Image J software (lower panel). Values are the mean of the ratio of DLL3 to total ERK2 intensities. D) The DLL3 3'UTR, wild type (wt) or lacking the miR-18a* binding site (Del), were fused to a luciferase gene (upper panel). The resulting constructs were transfected in HEK293 cells alone or with synthetic miR-18a*. Luciferase activities were assessed 48 hours later by luminometry. Results are the average of 3 independent experiments. (*** p value < 0,001).


Figure 4. Modulation of miR-18a* and DLL3 expression impacts SHH-GLI-NANOG expression and ERK activation.

A) SHH and B) GLI-1 mRNA levels were assessed by qPCR using TAQMAN probes in TG1-ctl, TG1-miR-18a*, TG6-ctl or TG6-miR-18a* cells incubated 4 days in serum (serum), then cultured in defined medium (serum / DM) for 48h in presence of U0126 or its inactive analog U0124. Values are compared to those measured in serum-treated cells. Similar culture conditions were used to assess C) SHH and D) GLI-1 mRNA expression by qPCR, in TG1 and in TG6 cells transfected with either anti miR scrambled or siLuc as control, and with either anti miR-18a*, or siDLL3 with or without a DLL3 construct insensitive to siDLL3 (pDLL3mut). Cells were cultured 4 days in serum prior transfection and then incubated in defined medium for 48 hours. Each experiment has been repeated at least 3 times. E) TG1 cells transfected with either anti miR scrambled (Scrb) or anti miR18a* were incubated 4 days in serum prior to being placed for 48h in defined medium. NANOG protein expression is revealed by immunostaining. Quantification of NANOG positive cells is displayed. The nuclei were stained with DAPI. F) TG1-ctl or TG1-miR-18a* were incubated 4 days in serum prior to being cultured for 24h or 48h in defined medium. NANOG protein expression is revealed by immunostaining. Quantification of NANOG positive cells is displayed. G) Immunoblot analyses showing the phospho-ERK levels in TG1-ctl or TG1miR-18a* cells previously cultured in serum medium for 4 days then incubated in defined medium for 24h or 48h. Middle and lower panels display total ERK1 and ERK2 proteins. Western blot quantification, using image J software, is indicated above the lanes. H) Immunoblot analyses showing DLL3 protein expression and phospho-ERK levels in TG1 cells following functional invalidation of DLL3 (siDLL3) or rescue of DLL3 expression (siDLL3 + pDLL3 mut). siLuc and pcDNA were used as control. Western blot quantifications (image J software) are indicated above the lanes. (*** p value < 0.001 and ** p value < 0.01).



Figure 5. miR-18a*/DLL3 mediated NOTCH activation is required for ERK activation, SHH-Gli-NANOG network expression and GiC clonal proliferation.

A) Immunostaining showing cleaved NOTCH1 expression in TG6 cells either cultured in defined medium (DM), serum (serum), or serum for 4 days prior to defined medium for 24h or 48h. The nuclei were stained with DAPI. B) qPCR shows relative HES mRNA expression in TG6 cultured for 4 days in serum prior to defined medium for 24h in the presence or absence of DAPT. Results are the average of three independent experiments. C) Immunostaining showing the effects of DLL3 overexpression and ERK inhibition on cleaved NOTCH-1 expression. As indicated, TG6 cells, cultured in defined medium, were transfected with either pCDNA3 as control or pDLL3-CDS, or treated with U0126 to inhibit ERK activity. D) qPCR shows the level of HES mRNA in TG6 cells switched to defined medium for 24h and transfected either with siLuc, siDLL3, pcDNA3, synthetic miR-18a*, anti miR-18a* and synthetic miR-18a*+ pDLL3-CDS. E) Immunoblot analyses show phospho-ERK levels in TG6 cells (upper panels) cultured in defined medium, in serum, or in serum 4 days prior to being incubated in defined medium for 96 hours in the presence or absence of DAPT. Results for TG1 and GB1 cells switched to defined medium in presence or absence of DAPT are shown in lower panels. F) qPCR shows the impact of the inhibition of NOTCH-1 cleavage on SHH and GLI-1 mRNA levels, in TG6 or TG1 following the switch to defined medium for 24h. Results are the average of 3 independent experiments. G) Similar conditions were used to show SHH and NANOG protein levels by immunostaining. Nuclei were stained with DAPI and confirm the presence of cells. H) TG6 cells were cultured as single cells in defined medium (DM) in presence or absence of DAPT, to assess their clonal proliferation efficiency. Hundred wells were counted for each condition and the results are the average of 4 independent experiments. (*** p value < 0,001 and ** p value < 0,01).



Figure 6. miR-18a* expression in GBM samples.

A) Cartoon showing the miR-18a* dependent molecular pathway involved in the control of clonal proliferation. Arrows indicate direct regulations. Dash arrows indicate the effects of NOTCH-1 and MAPK activation on MAPK and SHH signaling. B) in situ hybridization showing miR-18a* expression in GBM paraffin sections (purple staining, white arrow). Scale bars are shown in the pictures. C) Four different GBM samples (HP10-24, HP10-9848, HP11-11527 and HP11-537) were dissociated and cells expressing low DLL3 levels were separated from cells expressing high DLL3 levels. Total RNAs were prepared for both cell populations and miR-18a*/SHH/GLI-1/HES1 expression was measured by qPCR. The data are the meaning of the results obtained for each sample (*** p value < 0,001).



Figure 7. Inverse correlation between DLL3 and SHH or SOX2 expression in GBM samples.

A) Immunofluorescence staining shows DLL3 (red) and SHH (green) or SOX2 (green) coexpression in paraffin sections of human GBM. Nuclei were stained with DAPI (blue). White arrows show the SHH or SOX2 positive cells. Scale bars are shown in the pictures. B) Quantification of the SHH+ DLL3- cells, SHH+ DLL3+ cells, SHH- DLL3+ and SHH- DLL3cells or SOX2+ DLL3- cells, SOX2+ DLL3+ cells, SOX2- DLL3+ and SOX2- DLL3- cells in 10 different GBM cases. Percentage represents the partitioning of each cell population within the tumor. Five independent fields per case have been counted.



В

		SHH+/					SOX2+/			
		DLL3- or	SHH+/	SHH-/	SHH-/	cells	DLL3- or	SOX2+/	SOX2-/	SOX2-/
CASES	cells nbr	weakly +	DLL3+	DLL3+	DLL3-	nbr	weakly +	DLL3+	DLL3+	DLL3-
				170	162				276	277
HP11-11527	350	18 (5.1%)	0	(48.6%)	(46.3%)	553	10 (1.8%)	0	(49.9%)	(50.1%)
				147					198	147
HP11-11537	298	20 (6.7%)	0	(49.3%)	131 (44%)	345	4 (1.2%)	0	(57.4%)	(42.6%)
				112	103				298	359
HP10-2132	225	10 (4.4%)	0	(49.8%)	(45.8%)	657	15 (2.3%)	0	(45.4%)	(54.6%)
				114	105					
HP10-24	234	15 (6.4%)	0	(48.7%)	(44.9%)	520	13 (2.5%)	0	239 (46%)	281 (54%)
				90	104				212	223
HP10-318	201	7 (3.5%)	0	(44.8%)	(51.7%)	435	14 (3.2%)	0	(48.7%)	(51.3%)
				111	102				289	314
HP10-2024	225	12 (5.3%)	0	(49.3%)	(45.3%)	603	11 (1.8%)	0	(47.9%)	(52.1%)
				181	161				254	211
HP11-9890	365	23 (6.3%)	0	(49.6%)	(44.1%)	465	17 (3.7%)	0	(54.6%)	(45.4%)
				130	80				176	701
HP10-9248	226	16 (7.1%)	0	(57.5%)	(35.4%)	877	14 (1.6%)	0	(20.1%)	(79.9%)
				87	61					
HP10-10112	154	6 (3.9%)	0	(56.5%)	(39.6%)	344	16 (4.6%)	0	134 (39%)	210 (61%)
				91	185				102	354
HP10-12916	281	5 (1.8%)	0	(32.4%)	(65.8%)	456	9 (2.2%)	0	(22.4%)	(77.6%)

Article n°4

"Cells with intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio are specific for infiltrative glioma: a useful marker in neuropathological practice"

F. Burel-Vandenbos, L. Turchi, M. Benchetrit, E. Fontas, Z. Pedeutour, V. Rigau, <u>F. Almairac</u>, D. Ambrosetti, JF. Michiels, T. Virolle

Résumé

Le diagnostic différentiel entre les gliomes infiltrants et les lésions gliales bénignes ou curables telles que la gliose, les astrocytomes pilocytiques, les tumeurs neuroepithéliales dysembryoplasiques, les gangliogliomes, ou les lésions démyélinisantes, peut représenter un challenge pour l'anatomopathologiste du fait de l'absence de marqueur spécifique.

L'objectif de cette étude était de déterminer la valeur discriminante de l'intense expression de EGFR associée à un ratio noyau/cytoplasme élevé dans tous types de gliomes infiltrants par rapport aux lésions gliales non infiltrantes.

L'expression de EGFR en immunohistochimie a été comparée dans cent un gliomes infiltrants par rapport à 58 lésions gliales non infiltrantes. L'anticorps reconnaissait un épitope du domaine extracellulaire de EGFRwt et EGFRvIII. Les cellules hautement positives pour EGFR et avec un ratio noyau/cytoplasme élevé ont été isolées et caractérisées.

Les cellules hautement positives pour EGFR et avec un ratio noyau/cytoplasme élevé étaient significativement associées au diagnostic de gliome infiltrant (p<0,0001), avec une sensibilité et une spécificité respectivement de 95% et 100%. L'expression de EGFR était indépendante de la mutation *IDH1* et de l'amplification de *EGFR*. Ces cellules avaient le phénotype et les propriétés de cellules progénitrices, et co-exprimaient CXCR4, un marqueur d'invasion cellulaire. L'intense expression de EGFR associée à un rapport noyau/cytoplasme élevé semble être un outil fiable pour discriminer un gliome infiltrant, quel que soit son grade et son sous-type histologique, d'une lésion gliale non infiltrante.

Cells with intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio are specific for infiltrative glioma: a useful marker in neuropathological practice

Fanny Burel-Vandenbos, Laurent Turchi, Maxime Benchetrit, Eric Fontas, Zoe Pedeutour, Valérie Rigau, Fabien Almairac, Damien Ambrosetti, Jean-François Michiels, and Thierry Virolle

Department of Pathology, University Hospital of Nice (F.B.-V., M.B., Z.P., D.A., J.-F.M.); University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences (F.B.-V., L.T., T.V.); CNRS, UMR7277 (F.B.-V., L.T., T.V.); Inserm, U1091 (F.B.-V., L.T., T.V.); and Department of Clinical Research, University Hospital of Nice, Nice, France (E.F.); Department of Pathology, University Hospital of Montpellier, Montpellier, France (V.R); and Department of Neurosurgery, University Hospital of Nice, France (F.A.)

Background. The differential diagnosis between infiltrative glioma (IG) and benign or curable glial lesions, such as gliosis, pilocytic astrocytoma, dysembryoplastic neuroepithelial tumor, ganglioglioma, or demyelinating disease, may be challenging for the pathologist because specific markers are lacking. Recently, we described a strong EGFR immunolabelling pattern in cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio that enables the discrimination of low-grade IG from gliosis. The aim of this study was to extend our observation to high-grade glioma to assess whether EGFR expression pattern is of value in the discrimination of all IG from noninfiltrative glial lesions (NIG), including gliosis, benign tumors, and demyelinating disease.

Methods. One hundred one IG and 58 NIG were compared for immunohistochemical expression of EGFR with use of an antibody that recognizes an epitope in the extracellular domain of both EGFRwt and EGFRvIII. Highly EGFR-positive cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio were isolated and further characterized.

Results. Cells with intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio were significantly associated with the diagnosis of IG (P < .0001). The sensitivity and specificity of this staining pattern for the diagnosis of IG were 95% and 100%, respectively. EGFR expression

was independent of *IDH1* mutations and *EGFR* amplification. Finally, we showed that these particular cells displayed the phenotype and properties of glial progenitors and coexpressed CXCR4, a marker of invasiveness.

Conclusions. We demonstrate that cells with intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio are specific criteria for the diagnosis of IG, irrespective of grade, histological subtype, and progression pathway, and their identification represents a tool to discriminate IG from benign or curable glial lesions.

Keywords: EGFR, glioblastomas, gliosis, immuno histochemistry, infiltrative gliomas, progenitors.

Infiltrative gliomas (IG), including astrocytomas, oligodendrogliomas, and glioblastomas, are the most common primary brain tumors in humans.¹ IG display a poor prognosis, especially glioblastomas, which represent the most aggressive subtype.¹ The tumors of this group are characterized by a pattern of infiltrative growth into the surrounding normal brain,² making complete surgical excision very difficult. Recurrence or progression after surgery almost always occurs despite adjuvant treatment with radiotherapy and/or chemotherapy.¹

Morphological patterns of IG are often heterogeneous, and the diagnosis may be challenging for pathologists.² Glial tumor cells may also be difficult to distinguish from reactive cells on the basis of morphology alone. Reactive astrocytes may become very large and may even display pleomorphic nuclei resembling neoplastic

© The Author(s) 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Neuro-Oncology. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

Received September 11, 2012; accepted May 10, 2013.

Corresponding Author: Fanny Burel-Vandenbos, MD, Laboratoire Central d'Anatomie Pathologique, Hopital Pasteur, 30 avenue de la Voie Romaine, 06000 Nice, France (burel-vandenbos.f@chu-nice.fr).

tumor cells.³ The differential diagnosis between IG and gliosis can thus be difficult, especially in small biopsy samples.⁴ IG can also be difficult to differentiate from benign and/or curable noninfiltrative glial tumors, including pilocytic astrocytomas, gangliogliomas, and dysembryoplastic neuroepithelial tumors,^{1,2} and from demyelinating disease.⁵ It is therefore very important for pathologists to develop histological markers to identify infiltrating glioma cells. To date, no ideal marker has been identified for this purpose. In practice, the most useful markers are MIB1/Ki67^{6,7} and p53,^{8,9} but these lack sensitivity and specificity.¹⁰ More recently, the mutated R132H form of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1), which can be specifically detected by immunohistochemistry, ^{11,12} has been shown to be a good marker of grade II and grade III gliomas and of secondary glioblastomas.^{13–15} However IDH1 (R132H) is rare in primary glioblastomas¹⁶ and is not useful for the diagnosis of this subtype, which represents the most common IG. A marker specific for infiltrating cells, which are characteristic of IG regardless of grade or histological subtype, would be of value.

Recently, we showed that the EGFR immunolabelling pattern can discriminate low-grade glioma from gliosis. The criterion that characterized low-grade gliomas was strong EGFR immunostaining in cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio. EGFR overexpression is frequent in gliomas. In 40% of glioblastomas, EGFR overexpression is secondary to gene amplification and is often associated with expression of EGFRvIII, a constitutively activated mutated variant.¹⁸ Conversely, *EGFR* amplification is rare in low-grade gliomas,^{18–21} although protein overexpression has been detected with a frequency ranging from 11.5% to 100% of cases in the literature.^{19,20,22–24} The mechanism of this overexpression in low-grade IG remains unknown. Several ligands, including EGF and TGF α , may activate EGFR. The activation of EGFR is involved in several processes, including cell survival, differentiation, proliferation, and migration.²⁵ Because EGFR has been shown to influence cell migration during the development of the central nervous system²⁶⁻²⁸ and in gliomas,²⁹⁻³¹ we postulated that EGFR could be a marker of migrating cells, specific for IG. The aim of the present study was to assess whether elevated EGFR expression in cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio, as we previously observed in low-grade glioma,¹⁷ may be a valuable criterion to discriminate infiltrative gliomas of any grade or histological subtype from noninfiltrative glial lesions. We also sought to further characterize these strongly EGFR-positive cells.

Materials and Methods

Tissue Collection

This retrospective study comprised a total of 159 human glioma tissue samples and nonneoplastic cerebral tissue samples selected from the database of the Departments of Pathology of Nice and Montpellier (Supplementary Materials).

Immunohistochemistry

EGFR immunohistochemistry was performed on paraffinembedded tumor sections with the use of an anti-mouse monoclonal antibody (clone 2-18C9, Dako EGFR pharmDX Kit K1494; Carpinteria) as previously described.¹⁷ Clone 2-18C9 recognizes an epitope in the extracellular domain and has been found to recognize both EGFRwt and EGFRvIII forms. The evaluation of staining intensity was performed using the same controls as previously described¹⁷ (Supplementary Materials and Methods). IDH1 mutational status was determined using immunohistochemistry with an antibody specific for the R132H mutant of IDH1 (clone H09, Abnova, 1/100). Deparaffinization, rehydration, and antigen retrieval were performed using the pretreatment module PTlink (Dako). Double-immunolabelling EGFR/Mib1 on paraffin-embedded tumor sections was performed as previously described.¹⁷

Measurement of Nuclear to Cytoplasmic Ratio

In 7 cases of IG (3 glioblastoma, 2 oligodendroglioma grade II, 1 astrocytoma grade II, and 1 oligodendroglioma grade III), paraffin-embedded sections immunolabelled with EGFR were scanned using the Slide Scanner Leica SCN400. For each case, nuclear and cytoplasmic areas of strongly EGFR-positive cells were measured using the software Leica SlidePath Gateway. In each case, these measurements were made both on the population of small undifferentiated cells displaying morphological criteria previously described¹⁷ and on a population of more differentiated cells (astrocytic or oligodendroglial).

Immunofluorescence

Sorted cells were seeded on polylysine-coated glass slides and subjected to immunostaining using anti-EGFR at 1/ 100 (ab24293, mouse monoclonal, Abcam), anti-Oct4 at 1/50 (H-134, sc-9081, rabbit polyclonal, Santa-Cruz), anti-Sox1 at 1/50 (AB15766, rabbit polyclonal, Millipore), anti-Sox2 at 1/50 (sc-20088, rabbit polyclonal, Santa-Cruz), and anti-A2B5 at 1/100 (cl A2B5-105, mouse monoclonal, Millipore).

For double labelling, sections were incubated with mouse anti-EGFR antibody (clone 2-18C9, Dako EGFR pharmDX Kit K1494) or rabbit anti-EGFR (ab2430, Abcam) and either a goat polyclonal anti-Olig2 (R&D Systems, 1/50), a rabbit polyclonal anti-GFAP (Dako, 1/500), or a mouse monoclonal anti-Nestin (MAB353, Chemicon) antibody.

Slides were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Microscopic analysis was performed using a Nikon eclipse Ti microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France) (Supplementary Materials).

Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

EGFR gene copy number per cell was investigated by FISH performed on 5-µm sections cut from formalin-fixed, paraffin-embedded gliomas (Supplementary Materials).

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) and Flow Cytometry

After enzymatic and mechanical dissociation, cells from fresh GBM (n = 5) were stained with rabbit antihuman EGFR (ab2430, Abcam), followed by FITC-anti-rabbit IgG (BD Biosciences) and with PE-Cy5 mouse antihuman CXCR4/CD184 (BD Biosciences). Small, highly positive EGFR-expressing cells were sorted on a FacsAriaI cytometer (BD) equipped with 3 lasers (488 nm, 405 nm, 633 nm) (Supplementary Materials and Methods).

Cell Culture

Sorted cells were grown in NS34+ medium containing EGF and bFGF, specific for neural stem cells (DMEM-F12 1/1, glutamine 10 mM, Hepes 10 mM, Sodium bicarbonate 0.025%, N2, G5 and B27).

Statistical Analysis

The association of the criterion of strongly stained cells showing a high nuclear to cytoplasmic ratio with the diagnosis of IG was studied using the χ^2 test. The analysis was adjusted according to patient age using the Mantel-Haenszel test. Lastly, the diagnostic efficacy of this criterion to identify IG was evaluated by calculating its sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value, both for the whole series and for adults and children separately. The staining intensity between infiltrative and solid areas of IG was compared using χ^2 test. Mean values of nuclear to cytoplasmic ratio were compared using the *t* test. All the tests were considered to be statistically significant at a 5% type I error rate (P < .05). Statistical analyses were performed using SPSS, version 11.0 (SPSS; Chicago, IL).

Results

Strongly EGFR-Positive Cells with a High Nuclear to Cytoplasmic Ratio Are Specific for Infiltrative Gliomas

In a previous study,¹⁷ we identified EGFR staining criteria specific for tumor cells, which allowed the discrimination of low-grade IG from gliosis—namely, strong EGFR staining in cells that displayed a high nuclear to cytoplasmic ratio. To assess whether these criteria could faithfully discriminate IG, regardless of grade or histological subtype, from noninfiltrative glial lesions, we compared EGFR immunostaining between 101 IG and 58 noninfiltrative lesions (Table 1). EGFR immunolabelling was detected in 99 of 101 cases of IG. The intensity of staining, often heterogeneous within the same tumor (Fig. 1), was predominantly weak in 15 cases (14.9%), moderate in 14 cases (13.9%), and strong in 70 cases (69.2%). The

proportion of positive cells varied from 0% to 100% (Table 2). Nearly all tumors (96/101) contained at least some strongly EGFR-positive cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio, including the tumors with a predominantly weak level of EGFR expression (Fig. 1). These cells were poorly differentiated, consistently characterized by scant cytoplasm, with or without a small unipolar process and without conspicuous astrocytic or oligodendroglial differentiation (Fig. 1). The nuclear to cytoplasmic ratio of these cells had a mean value of 0.58 ± 0.1 (n = 300). This was significantly higher (P > .0001) than the mean value of 0.19 ± 0.06 observed in more differentiated (astrocytic or oligodendroglial) cells, which were strongly EGFR positive (n = 300) and which were identified in the same tumors (Supplemental Fig. S1).

The proportion of the poorly differentiated strongly EGFR-positive cells was extremely variable across the series, with a mean of 37.8% (range, 0.3%-100%). Although EGFR staining was detectable in some cases of non-infiltrative lesions (31/58), the proportion of stained cells was low ($\leq 25\%$) in most cases (Table 3), the staining intensity was weak, and the positive cells displayed a stellate, spindle, or gemistocytic morphology, suggestive of differentiated astrocytes (Fig. 2). Conversely to IG, no cells displaying strong EGFR staining with a high nuclear to cytoplasmic ratio were observed in noninfiltrative lesions.

The specificity and sensitivity of the pattern of strong EGFR immunostaining in the context of a high nuclear to cytoplasmic ratio for the diagnosis of IG were 100% and 95%, respectively. Epidemiological data indicate that the diagnosis of IG as opposed to noninfiltrative lesions is correlated with patient age (P < .0001); therefore, we verified that patient age was not a confounding factor in our study. After adjustment for age, the association between this pattern of strong EGFR immunostaining and diagnosis remained significant (P < .0001). In adults, the specificity and sensitivity of this pattern of strong EGFR immunostaining for IG were 100% and 98.9%, respectively (Table 4). The positive predictive value and negative predictive value were 100% and 97.3%, respectively. In children, the specificity and

Table 1. Patients and lesions

	Non infiltrative lesions	Infiltrative gliomas
Children	12 PA	
	6 DNET	2 oligo II
	3 gangliogliomas	4 astro II
	1 gliosis	3 astro III
Adults	1 PA	20 oligo II
	2 DNET	13 oligo III
	1 ganglioglioma	15 astro II
	24 gliosis	4 astro III
	5 PML	1 oligo-astro II
	2 ADEM	2 oligo-astro III
	1 multiple sclerosis	37 GBM

Abbreviations: PA, pilocytic astrocytoma; DNET, dysembryoplastic neuroepithelial tumor; PML, progressive multifocal leukoencephalopathy; ADEM, acute disseminated encephalomyelitis; oligo, oligodendroglioma; astro, astrocytoma; oligo-astro, oligo-astrocytoma; GBM, glioblastoma; II, WHO grade II; III, WHO grade III.



Fig. 1. EGFR immunostaining in infiltrative glioma (×400). Diffuse and strong EGFR expression in a glioblastoma (A). Strongly EGFR-stained cells with a high nucleus to cytoplasm ratio and an apolar or unipolar shape in the invasive edge of a glioblastoma (B), in an anaplastic astrocytoma (C), in an anaplastic oligo-astrocytoma (D), and in a low-grade astrocytoma (E). Low-grade oligodendroglioma showing few cells with strong EGFR staining and scant cytoplasm (arrow) intermingled with positive and negative typical tumor cells with a fried-egg appearance (F).

Table 2. Proportion of EGFR-positive cells in infiltrative gliomas

	Proportion of EGFR positive cells						
	0	≤25%	26%- 50%	51%- 75%	>75%		
Oligo II ($n = 22$)		7	6	2	7		
Oligo III ($n = 13$)		2	4	1	6		
Astro II (<i>n</i> = 19)	1	7	7	1	3		
Astro III ($n = 7$)	1	1	1	2	2		
OA II (<i>n</i> = 1)					1		
OA III (<i>n</i> = 2)					2		
GBM (<i>n</i> = 37)		11	7	2	17		

Abbreviations: Oligo, oligodendroglioma; Astro, astrocytoma; OA, oligo-astrocytoma; GBM, glioblastoma; II, WHO grade II; III, WHO grade III.

sensitivity were 100% and 55.6%, respectively, with positive predictive value and negative predictive value of 100% and 84.6%, respectively.

Table 3. Proportion of EGFR-positive cells in noninfiltrative lesions

	Proportion of EGFR positive cells					
	0	≤25%	26 to 50%	>50%		
Gliosis ($n = 25$)	2	13	5	5		
PA (<i>n</i> = 13)	10	2		1		
DNET (<i>n</i> = 8)	6	1	1			
Ganglioglioma ($n = 4$)	4					
PML ($n = 5$)	4	1				
ADEM (<i>n</i> = 2)	2					
Multiple sclerosis ($n = 1$)	1					

Abbreviations: PA, pilocytic astrocytoma; DNET, dysembryoplastic neuroepithelial tumor; PML, progressive multifocal leukoencephalopathy; ADEM, acute disseminated encephalomyelitis.

Taken together, our observations, strengthened by a statistical analysis, show that the criterion of strong EGFR staining in cells with a high nuclear to cytoplasmic



Fig. 2. EGFR immunostaining in noninfiltrative lesions. Absence of EGFR expression (A) in a pilocytic astrocytoma and (B) in a dysembryoplastic neuroepithelial tumor (\times 400). Oligodendroglioma-like pattern entirely immunonegative for EGFR (C) in a pilocytic astrocytoma (\times 200) and (D) in a dysembryoplastic neuroepithelial tumor (\times 400). (E) Weak EGFR expression in stellate astrocytes in a case of gliosis (\times 400). (F) EGFR-negative atypical cells in a pilocytic astrocytoma (\times 400). (G and H) Weak EGFR expression in large bizarre astrocytes in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy (\times 400).

Table 4. EGFR status according to diagnosis and age of patients

		Infiltrative gliomas	Non infiltrative lesions
Adults	EGFR+	91 (98,9%)	0
	EGFR-	1 (1,1%)	36 (100%)
Children	EGFR+	5 (55,6%)	0
	EGFR-	4 (44,4%)	22 (100%)

EGFR status was defined by the presence (+) or not (-) of strongly EGFR-positive cells with a high nucleus-cytoplasm ratio.

ratio is significantly and highly restricted to the diagnosis of IG (P < .0001), regardless of patient age.

EGFR Overexpression in Infiltrative Glioma Is Independent of EGFR Amplification and of IDH1 Mutation Pathway

EGFR amplification is classically associated with primary glioblastomas. Because strongly positive EGFR-expressing

cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio were constant in nearly all IG regardless of grade or histological subtype, we hypothesized that *EGFR* amplification was probably not required for the overexpression of EGFR in these cells. To test this hypothesis, we chose to analyze EGFR copy number by FISH in a series of 33 IG, including numerous cases (n = 32) of low-grade and/or oligodendroglial glioma, which are tumors unlikely to have EGFR gene amplification. EGFR amplification and EGFR gain (ratio EGFR/centromere >1.5) were detected in only 2 cases (1 glioblastoma and 1 high-grade oligoastrocytoma, respectively) of 33 cases (Fig. 3), whereas cells with intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio were present in 31 cases (Supplementary Table). This result demonstrated that, in IG, EGFR amplification was not required for strong EGFR expression in cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio.

IDH1 mutations, particularly IDH1 R132H, are involved in the progression of grade II/III gliomas and secondary glioblastomas, whereas they are rare in primary GBMs. To assess whether the presence of strongly EGFR-positive cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio was dependent on the IDH1 mutation, we compared EGFR and IDH1 R132H expression by immunohistochemistry. As expected, IDH1 R132H was essentially found in grade II and grade III IG (45/64) and in only 1 glioblastoma (1/37). Cells displaying intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio were observed in both IDH1 R132H-positive (46 EGFR+/46 IDH1 R132H+ cases) and IDH1 R132H-negative IG (50 EGFR+/55 IDH1 R132H- cases). Intensely stained EGFR-expressing cells were detected in all IDH1 R132H-negative GBMs, which could be considered as primary GBMs. The presence of these cells was therefore



Fig. 3. Correlation between EGFR expression, *EGFR* copy number, and chromosome 7 number in infiltrative gliomas. This experience was performed using EGFR immunohistochemistry (\times 400) and FISH analysis of *EGFR* gene (red) and centromere of chromosome 7 (green) (\times 1000). (A) Glioblastoma showing numerous strongly EGFR-stained cells and *EGFR* amplification. (B) High grade oligo-astrocytoma showing strongly EGFR-stained cells and gain of *EGFR* (ratio EGFR/centromere >1.5). In both cases, the picture was taken in an infiltrative area where they were more easily individualized. (C) Low-grade astrocytoma showing strongly EGFR-stained cells and normal FISH analysis. (D) Low grade oligodendroglioma showing strong EGFR-stained cells and polysomy 7. (E) Low grade oligo-astrocytoma showing strongly EGFR-stained cells and normal FISH analysis. (G) Anaplastic astrocytoma showing polysomy 7 and no EGFR-stained cells.

not correlated with *IDH1* mutation and, therefore, enabled the discrimination of GBM, regardless of the progression pathway, from noninfiltrative glial lesions.

Strongly EGFR-Stained Cells with High Nuclear to Cytoplasmic Ratio Predominated in Infiltrative Areas of High-Grade Gliomas and Expressed the Invasion Marker CXCR4

High-grade gliomas are classically composed of a solid component of tumor cells and neovascularisation. At the periphery of this solid component, there is an invasive edge of isolated tumor cells that infiltrate the parenchymal tissue. We compared EGFR immunostaining between the solid and infiltrative areas in 30 high-grade gliomas from our series, for which both components were assessable (Fig. 4A). In all cases, the infiltrative area showed a predominant strong intensity of EGFR staining (30/30)in cells displaying high nuclear to cytoplasmic ratio, whereas comparable staining was present in the solid component of only 15 (50%) cases (P < .0001). These results indicate that, unlike the solid areas, the infiltrative areas were enriched in these particular cells displaying the typical morphology of high nuclear to cytoplasmic ratio and a strong EGFR staining. Of interest, we also demonstrated by flow cytometry and immunohistochemistry that EGFR was coexpressed with Ki67/Mib1 and the well-known invasiveness marker CXCR4 (Fig. 4B and C and Fig. 5C), suggesting that these particular cells represent proliferating or infiltrating cells.

Strongly EGFR-Stained Cells Display Properties of Neoplastic Glial Precursor Cells

The peculiar morphology of the strongly EGFR-stained cells (scant cytoplasm and often a unique small process, without astrocytic or oligodendrocytic differentiation) and their presence in nearly all infiltrative gliomas, regardless of the histological subtype and grade, support the hypothesis that these cells could be glial precursor tumor cells.

First, we showed that small strongly stained EGFR-expressing cells in tumor tissue sections were negative for the astrocytic differentiation marker GFAP but were positive for the glial marker olig2, regardless of the histological subtype (Fig. 5A). Expression of olig2 confirmed the glial nature of the cells. Almost all of the strongly EGFR stained cells (88.23%) coexpressed nestin, a marker of neural stem cells (Fig. 5A).

Second, we sorted by FACS from fresh gliomas, small cells strongly prositive for EGFR. The sorted cells were then immediately fixed with methanol and characterized by immunofluorescence. Cells expressed EGFR, as expected, and several stem cell markers, including sox 1, sox 2, oct3/4, A2B5, and CD44 (Fig 5B and C).

Neurosphere formation is the hallmark of neural stem/ progenitor cells in culture. To explore stem cell-like properties of the cells, fresh sorted cells were grown in a



Fig. 4. (A) Comparison of EGFR expression between solid and infiltrative areas in high-grade glioma. In this glioblastoma, the solid area was negative for EGFR, whereas the infiltrative area was rich in small strongly stained cells (immunohistochemistry \times 100). (B) Analysis of EGFR and CXCR4 expression in high-grade glioma by flow cytometry. Small EGFR overexpressing cells showed a high expression of CXCR4. (C) Double immunolabelling of EGFR (brown) and ki67/Mib1 (red) in the invasive edge of a glioblastoma (\times 400): some of the strongly positive EGFR cells coexpressed the proliferative marker ki67/Mib1 (arrow).

medium specific for neural stem cells. The cells slowly proliferated and formed small neurospheres (Fig. 5D). In addition, these cells were capable of self-renewal, because a single cell was able to lead to a novel neurosphere up to 7 successive times. Within the same population, certain cells were able to remain isolated, nonadhesive, and quiescent and survive for several weeks without proliferating (Fig. 5D). Taken together, these results suggest that the strongly EGFR-stained cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio display glioma-initiating cell (GiC) properties.



Fig. 5. (A) Characterization of strongly EGFR-positive cells in infiltrative glioma tissue sections. Double-staining was performed on paraffin-embedded tissue section of infiltrative glioma using anti-EGFR antibody (green), and (a) anti-GFAP antibody (red) or (b) anti-olig2 antibody (red), or (c) anti-nestin antibody (red) (×400). Strongly EGFR-stained cells with a high nucleus to cytoplasm ratio lacked GFAP expression (a) and coexpressed olig2 (b) and nestin (c). (B and C) Characterization of EGFR-overexpressing cells sorted from fresh glioblastoma. Immunofluorescence performed immediately after FACS sorting of small EGFR-overexpressing cells (B) confirmed that cells overexpressed EGFR and showed that these cells expressed the neural stem cell markers oct4, sox1, sox2, and A2B5 and (C) expressed invasion marker CXCR4 and CD44 (×1000). (D) Culture of small EGFR overexpressing cells in a medium specific for neural stem cells (×1000). Cells slowly proliferated and formed small neurospheres (left) or remained nonadhesive quiescent isolated cells (right).

Discussion

In our study, we identified a pattern of EGFR expression specific for infiltrative gliomas, defined by strongly stained cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio. These strongly stained cells often exhibited a scant cytoplasm with or without a small unipolar process. In a previous study,¹⁷ we showed that this pattern of staining allows the discrimination of low-grade glioma from gliosis. Here, we demonstrated that this criterion is sufficient to discriminate IG, regardless of histological subtype and grade, from a large range of differential diagnoses including gliosis, benign gliomas (WHO grade I), and demyelinating diseases. This EGFR expression pattern displays 100% specificity for infiltrative gliomas. Furthermore, the sensitivity of this EGFR pattern for IG was very high in adults (98.9%), indicating that its absence could virtually exclude the diagnosis of infiltrative glioma. The sensitivity for IG was lower in the pediatric population (55.6%). The difference in sensitivity between adults and children could be attributable to the small number of pediatric infiltrative gliomas in our series. This result needs to be confirmed in larger series of cases. Nevertheless, pediatric infiltrative gliomas are known to be genetically different from adult gliomas, and in particular, EGFR overexpression is less common in childhood gliomas than in adult gliomas.^{32,33}

The differential diagnosis between infiltrative glioma and benign noninfiltrative glial lesion, such as WHO grade I glioma, gliosis, or demyelinating disease, can be challenging for the pathologist.⁴ Frequently, magnetic resonance imaging data are suggestive of the diagnosis and have to be taken into account. Nevertheless, despite the development of novel functional imaging techniques (magnetic resonance spectroscopy, perfusion, or diffusion imaging), which improve the accuracy of diagnosis of brain lesions, some cases of neoplastic and nonneoplastic lesions are still misinterpreted radiologically.^{34,35} Therefore, neuropathological examination is still considered to be critical for diagnosis. Elimination of other differential diagnoses is crucial because of prognostic and therapeutic implications.¹ In neuropathological practice, the most useful immunohistochemical markers used are MIB1/Ki67 and p53 and, more recently, the mutated form of *IDH1*, IDH1 R132H. Although a high MIB1/ Ki67 proliferation index and a high p53 immunolabelling index are arguments in favor of infiltrative glioma, $^{6-10}$ a low proliferation index and low or null p53 immunolabelling index are insufficient to exclude the diagnosis. Positive IDH1 R132H immunolabelling is very useful because of a high specificity for grade II and grade III infiltrative gliomas.^{13–15} Nevertheless, IDH1 R132H is usually negative in the most frequent subtype of infiltrative glioma, the primary GBM.^{14,16} The main limitation of all of these markers is the dependence of their staining after either grade for MIB1/Ki67, histological subtype for p53 (overexpressed in astrocytic gliomas, compared with oligodendroglial gliomas^{3,8}), or the progression pathway for IDH1.¹⁴ In our study, we showed that the presence of cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio and with strong EGFR staining is specific for IG regardless of grade, histological subtype, or progression pathway, and thus, it represents a very useful and reliable tool for the diagnosis of IG.

EGFR overexpression is common in IG.² It is classically reported that EGFR expression increases with the grade of glioma.^{21,36} In our study, nearly all IG showed EGFR-positive cells. In some of the cases, the proportion of positive cells was very low. Such cases would probably be considered as negative in other studies using a higher threshold for positivity or using a less sensitive technique of detection. Discrepancies among studies investigating EGFR expression in glioma may also relate to the antibody used. Some antibodies recognize the extracellular domain of the receptor, whereas others recognize the intracellular domain and this affects the results, 37,38 especially in glioma where different isoforms of EGFR may be expressed.³⁹ In our study, we used an antibody directed against the extracellular domain of EGFR. Guillaudeau et al.³⁹ showed that antibodies recognizing the extracellular domain of EGFR were more sensitive for the detection of EGFR expression. This could explain why we found EGFR expression in nearly all IG. The property of tumor cells to overexpress EGFR has already been used for their visualization in living tumor tissue of high and low grade.⁴⁰ As described in the literature, the presence of EGFR-overexpressing cells in our study was not correlated with EGFR amplification.^{36,41,42} Data concerning

EGFR expression in noninfiltrative glioma are far fewer but corroborate our results. Studies described a much lower EGFR expression in pilocytic than in infiltrative glioma.^{43–45} To our knowledge, EGFR overexpression has never been reported in ganglioglioma or in DNET, thus indicating that the EGFR pathway is not involved in the development of these tumors.

The major difference between infiltrative glioma and benign glioma, gliosis, or demyelinating diseases is the presence of infiltrating cells in infiltrative glioma. We showed that the invasive edge was enriched with strongly positive EGFR-expressing cells with a high nuclear to cytoplasmic ratio, compared with the solid tumor components and that these cells coexpressed the invasion marker CXCR4,^{46,47} suggesting that they may be infiltrating cells. The migratory properties of these cells have not been assessed because of difficulties in maintaining sufficient numbers of cells in culture. The reduced capacity for growth of EGFR-positive cell subpopulations after FACS has already been described.⁴⁸ However, our results are in accordance with the known role of EGFR in cell migration^{26–28,30,31} and with the crosstalk between EGFR and CXCR4 pathways as described in the literature.^{49–53}

Strongly stained EGFR-positive cells had a peculiar morphology, characterized by scant cytoplasm and often a unique small process, without astrocytic or oligodendrocytic differentiation. Our results showed that they expressed stemness/progenitor markers but lacked expression of markers of astrocytic differentiation, such as GFAP. In addition, in culture medium appropriate for neural stem/progenitor cells, they displayed the ability to self-renew. All of these features are characteristic of neural stem/progenitor cells and indicate that these particular cells resemble glial progenitors. Cancer neural stem cells/progenitors (CSC) have been identified in glioblastoma since 2002^{54} and are likely to be determinants of tumor aggression and resistance to treatment.⁵⁵ Although CSC are largely described and studied in glioblastomas, they have also been identified in grade II and grade III gliomas.^{56–58} CSC in glioblastomas may express EGFR, and it has been shown that EGFR expression was associated with a more tumorigenic and invasive behavior, compared with EGFR-negative CSC.48 EGFR-knockout in CSCs led to morphologic changes in vitro, typical of differentiated cells. Several ligands may interact with EGFR, including TGF α , which is a member of the EGF family. Several tumors have been shown to coexpress TGFα and EGFR, indicating the existence of autocrine activation loops driving tumor growth.⁵⁹ Of interest, TGFa is able to down-regulate GFAP expression and upregulate nestin expression in glial tumor cells, and this regulation is correlated with increased motility and a less stellate morphology, suggesting that the TGF α -EGFR loop may be required to induce de-differentiation in tumor cells to promote motility.⁶⁰ Therefore, EGFR expression in tumor cells seems to be involved in the acquisition of glial precursor characteristics and migration properties.

In conclusion, cells displaying strong EGFR staining with a high nuclear to cytoplasmic ratio are specific to IG, regardless of grade and histological subtype. EGFR immunolabelling using an antibody which recognizes an epitope in the extracellular domain of both EGFRwt and EGFRvIII forms could be a very useful tool in neuropathological practice to distinguish these tumors from benign or curable glial lesions. The cells that we have described and characterized show stem-like properties and may be important in influencing the aggressive features typical of IG.

Supplementary Material

Supplementary material is available online at *Neuro-Oncology* (http://neuro-oncology.oxfordjournals.org/).

- Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(6):479–489.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, eds. et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon: IARC; 2007.
- Von Deimling A, Burger PC, Nakazato Y, et al. Diffuse astrocytoma. In: Louis, DN, Ohgaki, H, Wiestler, OD, ed.et al. WHO classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon: IARC; 2007:25–29.
- Prayson R, Agamanolis D, Cohen M, et al. Interobserver reproducibility among neuropathologists and surgical pathologists in fibrillary astrocytoma grading. J Neurol Sci. 2000;175:33–39.
- Zagzag D, Miller DC, Kleinman GM, et al. Demyelinating disease versus tumor in surgical neuropathology. Clues to a correct pathological diagnosis. Am J Surg Pathol. 1993;17(6):537–545.
- Scott IS, Morris LS, Rushbrook SM, et al. Immunohistochemical estimation of cell cycle entry and phase distribution in astrocytomas: applications in diagnostic neuropathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005;31(5): 455–466.
- Prayson RA. The utility of MIB-1/Ki-67 immunostaining in the evaluation of central nervous system neoplasms. *Adv Anat Pathol.* 2005;12(3): 144–148.
- Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. J Neuropathol Exp Neurol. 1994;53(1):11–21.
- Yaziji H, Massarani-Wafai R, Gujrati M, et al. Role of p53 immunohistochemistry in differentiating reactive gliosis from malignant astrocytic lesions. Am J Surg Pathol. 1996;20(9):1086–1090.
- Camelo-Piragua S, Jansen M, Ganguly A, et al. A sensitive and specific diagnostic panel to distinguish diffuse astrocytoma from astrocytosis: chromosome 7 gain with mutant isocitrate dehydrogenase 1 and p53. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70(2):110–115.
- Capper D, Zentgraf H, Balss J, et al. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. Acta Neuropathol. 2009;118(5):599–601.
- Capper D, Weissert S, Balss J, et al. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol.* 2010;20(1):245–254.
- Balss J, Meyer J, Mueller W, et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*. 2008;116(6):597–602.

Acknowledgments

We thank Frédéric Labret, Bérengère Szczepaniak, Arnaud Borderie, Sandrine Destrée, and Coralie Hagnere, for their technical assistance, and Dr Michael Coutts, Dr. Nouran Erfan, and Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling, for their helpful suggestions on the manuscript.

Conflict of interest statement. None declared.

Funding

This work has been supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention 3161), Association Sauvons Laura, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses, « GLIOMIRSTEM project »).

References

- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, et al. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1149–1153.
- Yan H, Parsons D, Jin G, et al. *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. N Engl J Med. 2009;360(8):765–773.
- Parsons D, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807.
- Burel-Vandenbos F, Benchetrit M, Miquel C, et al. EGFR immunolabeling pattern may discriminate low-grade gliomas from gliosis. *J Neurooncol*. 2011;102(2):171–178.
- Kapoor GS, O'Rourke DM. Mitogenic signaling cascades in glial tumors. Neurosurgery. 2003;52(6):1425–1434. discussion 1434–1425.
- Reifenberger J, Reifenberger G, Ichimura K, et al. Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *Am J Pathol.* 1996;149(1):29–35.
- Kordek R, Biernat W, Alwasiak J, et al. p53 protein and epidermal growth factor receptor expression in human astrocytomas. J Neurooncol. 1995;26(1):11–16.
- Mottolese M, Natali PG, Coli A, et al. Comparative analysis of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor expression in glial tumours: correlation with histological grading. *Anticancer Res.* 1998;18(3B):1951–1956.
- Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, et al. Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. *Br J Cancer*. 1992;66(1):106–112.
- Hwang SL, Chai CY, Lin HJ, et al. Expression of epidermal growth factor receptors and c-erbB-2 proteins in human astrocytic tumors. *Kaohsiung J Med Sci.* 1997;13(7):417–424.
- Broholm H, Bols B, Heegaard S, et al. Immunohistochemical investigation of p53 and EGFR expression of oligodendrogliomas. *Clin Neuropathol*. 1999;18(4):176–180.
- 25. Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, et al. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. *Anticancer Res.* 2003;23(5A):3639–3650.
- Wong RW, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(2–3): 147–156.

- Wong RW. Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands. Cell Mol Life Sci. 2003;60(1):113–118.
- Boockvar JA, Kapitonov D, Kapoor G, et al. Constitutive EGFR signaling confers a motile phenotype to neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(4):1116–1130.
- Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, et al. Epidermal growth factor receptor mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12(24):7261–7270.
- Penar PL, Khoshyomn S, Bhushan A, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine kinase blocks glioblastoma invasion of the brain. *Neurosurgery*. 1997;40(1):141–151.
- Martens T, Laabs Y, Gunther HS, et al. Inhibition of glioblastoma growth in a highly invasive nude mouse model can be achieved by targeting epidermal growth factor receptor but not vascular endothelial growth factor receptor-2. *Clin Cancer Res.* 2008;14(17):5447–5458.
- 32. Suri V, Das P, Jain A, et al. Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro Oncol*. 2009;11(3):274–280.
- Sung T, Miller DC, Hayes RL, et al. Preferential inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol*. 2000;10(2):249–259.
- Saindane AM, Cha S, Law M, et al. Proton MR spectroscopy of tumefactive demyelinating lesions. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23(8): 1378–1386.
- Hourani R, Brant LJ, Rizk T, et al. Can proton MR spectroscopic and perfusion imaging differentiate between neoplastic and nonneoplastic brain lesions in adults? *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008;29(2):366–372.
- Jarvela S, Helin H, Haapasalo J, et al. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic in situ hybridization: association with clinicopathological features and patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006;32(4):441–450.
- Mathieu A, Weynand B, Verbeken E, et al. Comparison of four antibodies for immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;69(1):46–50.
- Lee HJ, Xu X, Choe G, et al. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: Comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer*. 2010;68(3):375–382.
- Guillaudeau A, Durand K, Rabinovitch-Chable H, et al. Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain. *Int J Oncol.* 2012;40(4):1142–1152.
- Kantelhardt SR, Caarls W, de Vries AH, et al. Specific visualization of glioma cells in living low-grade tumor tissue. *PLoS One*. 2010;5(6): e11323.
- Marquez A, Wu R, Zhao J, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy. *Diagn Mol Pathol*. 2004;13(1):1–8.
- Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, et al. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009;17(3):220–226.
- Huang H, Hara A, Homma T, et al. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(10): 891–901.

- Colin C, Baeza N, Bartoli C, et al. Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using Suppression Subtractive Hybridization. Oncogene. 2006;25(19):2818–2826.
- Rorive S, Maris C, Debeir O, et al. Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(8): 794–807.
- 46. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 2008;267(2):226–244.
- Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochir (Wien)*. 1999;141(3):295–305 discussion 304–295.
- Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, et al. Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Res.* 2010;70(19):7500–7513.
- 49. Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, et al. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on nonsmall cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. J Biol Chem. 2005;280(23):22473–22481.
- Prasad NK. SHIP2 phosphoinositol phosphatase positively regulates EGFR-Akt pathway, CXCR4 expression, and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2009;34(1):97–105.
- Guo Z, Cai S, Fang R, et al. The synergistic effects of CXCR4 and EGFR on promoting EGF-mediated metastasis in ovarian cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;60(1):1–6.
- Porcile C, Bajetto A, Barbero S, et al. CXCR4 activation induces epidermal growth factor receptor transactivation in an ovarian cancer cell line. *Ann N* Y Acad Sci. 2004;1030:162–169.
- Porcile C, Bajetto A, Barbieri F, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation. *Exp Cell Res.* 2005;308(2):241–253.
- 54. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, et al. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002;39(3):193–206.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756–760.
- Thirant C, Bessette B, Varlet P, et al. Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. *PLoS One*. 2011;6(1): e16375.
- Colin C, Baeza N, Tong S, et al. In vitro identification and functional characterization of glial precursor cells in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006;32(2):189–202.
- Varghese M, Olstorn H, Sandberg C, et al. A comparison between stem cells from the adult human brain and from brain tumors. *Neurosurgery*. 2008;63(6):1022–1033. discussion 1033–1024.
- Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, et al. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* 1987;47(3): 707–712.
- Zhou R, Skalli O. TGF-alpha differentially regulates GFAP, vimentin, and nestin gene expression in U-373 MG glioblastoma cells: correlation with cell shape and motility. *Exp Cell Res*. 2000;254(2):269–278.

Article n°5

"A positive feed-forward loop associating EGR1 and PDGFA promotes proliferation and self-renewal in glioblastoma cells"

N. Sakakini, L. Turchi, A. Bergeron, H. Holota, S. Rekima, F. Lopez, P. Paquis, <u>F. Almairac</u>,
 D. Fontaine, N. Baeza-Kallee, E. Van Obberghen-Schilling, MP. Junier, H. Chneiweiss, D.
 Figarella-Branger, F. Burel-Vandenbos, J. Imbert, T. Virolle

Résumé

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales malignes primitives les plus fréquentes. Elles sont hypervascularisées, infiltrantes, et résistantes aux traitements conventionnels. Le pronostic est fatal, en général en moins de 18 mois. Les caractères agressif, récidivant et résistant de ces tumeurs a été attribué aux cellules initiatrices de gliomes (CIG). Le facteur de transcription early growth response 1 (EGR1), un membre de la famille zinc-finger, a été décrit comme étant suppresseur de tumeur lorsque surexprimé de manière ectopique. L'expression de EGR1 dans les glioblastomes humains a été associée à une meilleure survie des patients. Sa localisation précise dans les territoires tumoraux et sa contribution dans la progression des glioblastomes sont cependant mal connues. Dans cette étude nous avons démontré que l'expression de EGR1 était plus fréquente dans les glioblastomes que dans les astrocytomes pilocytiques (gliomes non infiltrants). L'expression de EGR1 dans les glioblastomes était nucléaire, et semblait restreinte aux cellules progénitrices proliférantes. Dans les cultures primaires de CIG, nous avons montré que EGR1 contribuait à l'expression des marqueurs souches et à la prolifération clonale en orchestrant une boucle activatrice dépendante du facteur de croissance PDGFA. De plus, EGR1 agissait comme un régulateur positif de plusieurs gènes impliqués dans l'autorenouvellement des CIG tels que Shh, Gli1, Gli2, PDGFA.

A Positive Feed-forward Loop Associating EGR1 and PDGFA Promotes Proliferation and Self-renewal in Glioblastoma Stem Cells^{*S}

Received for publication, February 10, 2016, and in revised form, March 14, 2016 Published, JBC Papers in Press, March 21, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.720698

Nathalie Sakakini,^{*a,b,c*} Laurent Turchi,^{*a*} Aurélie Bergon,^{*b,c*} Hélène Holota,^{*b,c*} Samah Rekima,^{*a*} Fabrice Lopez,^{*b,c*} Philipe Paquis,^{*a,d*} Fabien Almairac,^{*a,d*} Denys Fontaine,^{*d*} Nathalie Baeza-Kallee,^{*e,f*} Ellen Van Obberghen-Schilling,^{*a*} Marie-Pierre Junier,^{*g,h,i*} Hervé Chneiweiss,^{*g,h,i*} Dominique Figarella-Branger,^{*e,fj*} Fanny Burel-Vandenbos,^{*a,k*1} Jean Imbert,^{*b,c*1,2} and Thierry Virolle^{*a*1,3}

From the ^aUniversité Nice Sophia Antipolis, CNRS, INSERM, iBV, 06108 Nice, France, ^bINSERM, U1090, Transcriptomic and Genomic Marseille-Luminy/Technical Advances for Genomics and Clinics (TGML/TAGC), Marseille F-13009, France, ^cUMR_S 1090, TGML/TAGC, Aix-Marseille Université, Marseille F-13009, France, the ^kService d'Anatomopathologie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, Nice 06107, France, the ^dService de Neurchirurgie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, Nice 06107, France, ^eAix Marseille Université, Faculté de Médecine de la Timone, 13284 Marseille, France, ^tCRO2, INSERM UMR 911, 13284 Marseille Cedex, France, the ⁱDepartement de Pathology, CHU de la Timone, 13385 Marseille Cedex 5, France, ^gCNRS UMR8246 Neuroscience Paris Seine-IBPS, Team Glial Plasticity, 7 Quai Saint-Bernard, Paris 75005, France, ^hINSERM U1130, Neuroscience Paris Seine-IBPS, Team Glial Plasticity, 7 Quai Saint-Bernard, Paris 75005, France, Seine and Marie Curie UMCR18, Neuroscience Paris Seine-IBPS, Team Glial Plasticity, 7 Quai Saint-Bernard, Paris 75005, France

Glioblastomas are the most common primary brain tumors, highly vascularized, infiltrating, and resistant to current therapies. This cancer leads to a fatal outcome in less than 18 months. The aggressive behavior of glioblastomas, including resistance to current treatments and tumor recurrence, has been attributed to glioma stemlike/progenitor cells. The transcription factor EGR1 (early growth response 1), a member of a zinc finger transcription factor family, has been described as tumor suppressor in gliomas when ectopically overexpressed. Although EGR1 expression in human glioblastomas has been associated with patient survival, its precise location in tumor territories as well as its contribution to glioblastoma progression remain elusive. In the present study, we show that EGR1-expressing cells are more frequent in high grade gliomas where the nuclear expression of EGR1 is restricted to proliferating/progenitor cells. We show in primary cultures of glioma stemlike cells that EGR1 contributes to stemness marker expression and proliferation by orchestrating a PDGFA-dependent growth-stimulatory loop. In addition, we demonstrate that EGR1 acts as a positive regulator of several important genes, including SHH, GLI1, GLI2, and PDGFA, previously linked to the maintenance and proliferation of glioma stemlike cells.

Glioblastomas (GBM)⁴ are the most common form of primary brain tumors afflicting adult patients of all ages (1). These highly vascularized, infiltrating tumors are resistant to current therapies and most often lead to a fatal outcome in less than 18 months. The aggressive behavior of GBM, including resistance to current treatments and tumor recurrence, has been attributed, at least in part, to glioma stemlike cells (GSCs). According to the cancer stem cell hypothesis, these cells with long-term self-renewal and differentiation potential are resistant to treatment and are responsible for the initiation, growth, and heterogeneity of tumors by providing progenitors, differentiated tumor cells, and endothelial cells and pericytes (2-4). To better understand the molecular and cellular processes involved in GBM initiation and progression, we sought to identify and decipher the molecular pathways that govern GSC maintenance and proliferation. In that context, we have previously demonstrated a positive regulatory feed-forward control between ERK and NOTCH pathways, which relies on miR-18a*-mediated repression of delta-like 3 protein expression, a ligand inhibitor of NOTCH (5). In this mechanism, activated NOTCH1 is required for sustained ERK activation, which is necessary to turn on the SHH (sonic hedgehog)-GLI-NANOG signaling network, essential for the maintenance of GSC proliferation (5-7). However, other key factors, which might be ERK effectors for the regulation of this regulatory circuitry, remain to be identified.

The transcription factor EGR1 (early growth response 1), also known as NGFI-A, KROX-24, ZIF268, and TIS8, is a sequence-specific DNA-binding protein, a member of a zinc finger transcription factor family comprising EGR2, EGR3, and EGR4. The *EGR1* gene belongs to the immediate early response gene family, strongly and rapidly induced by many environ-



^{*} This work was supported by grants from the Association Sauvons Laura, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses, "GLIOMIRSTEM project" and ANR-10-INBS-0009-10), Fondation de France, Association pour la Recherche sur le Cancer ARC Project SFI20111203773, INCA PLBIO2012, INSERM, UNSA, and ITMO CANCER Plan Cancer Epigenetic. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

^S This article contains supplemental Tables S1 and S2 and Figs. S1 and S2.

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence may be addressed: INSERM U1090, TAGC, Parc Scientifique de Luminy, Case 928, 163 Ave. de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France. E-mail: jean.imbert@inserm.fr.

³ To whom correspondence may be addressed: iBV, Institut de Biologie Valrose, Université Nice Sophia Antipolis, Bâtiment Sciences Naturelles, UFR Sciences, Parc Valrose, 28, avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France. E-mail: virolle@unice.fr.

⁴ The abbreviations used are: GBM, glioblastoma(s); GSC, glioma stemlike cell; qPCR, quantitative PCR; ChIP-seq, ChIP-sequencing; PA, pilocytic astrocytoma(s); PDGFR, PDGF receptor; recPDGFA, recombinant form of PDGFA.

mental signals, such as growth and differentiation factors, neurotransmitters, hormones, and hypoxic, oxidative, and genotoxic stresses (8). Its biological role has been linked to several key cellular functions, such as proliferation, apoptosis, DNA repair, and migration (8). The reported role of EGR1 in cancer is quite disparate because it is described as either a tumor suppressor or an oncogene, depending on the type of tumor cells and their environment. Although EGR1 expression in human GBM has been associated with increased patient survival (9), detailed characterization of its tumoral localization and contribution to GBM progression remain to be determined.

We report here that EGR1-positive cells are frequent in glioblastomas. In these tumors, nuclear localization of EGR1 is restricted to proliferating cells and strongly associated with OLIG2⁺ stemlike or progenitor cells. In non-mitotic tumor cells, EGR1, when expressed, is widely excluded from the nucleus and remains in the cytoplasm. Using several independent patient-derived GSCs, we show that EGR1 contributes to stemness marker expression and proliferation by orchestrating a PDGFA-dependent growth stimulatory loop. We show in addition its contribution for the direct regulation of a panel of genes, such as *SHH*, *GLI1*, *GLI2*, and *PDGFA*, previously associated with stemness and cell proliferation.

Materials and Methods

Primary Cell Culture-The patient-derived primary GSC cultures TG1, TG6, and GB8 were isolated from surgical resections of human glioblastoma, as described previously (10). GB8 cells express stemness markers, including OLIG2, NANOG, NESTIN, and SOX1/2. They display a clonal efficiency of $\sim 60\%$ and amplification of chromosome 7, including the EGFR gene. They display a full deletion of chromosomes 6 and 10 and a partial deletion of chromosome 9, including the CDKN2A gene. Cells were grown in neurospheres in modified DMEM/F-12 medium containing EGF and basic FGF (DMEM/F-12 (1:1), glutamine (10 mM), Hepes (10 mM), sodium bicarbonate (0.025%), N2, G5, and B27), referred to as "defined medium." Cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. To induce cell differentiation, EGF and basic FGF were replaced by 2% fetal calf serum (FCS) (DMEM/F-12 (1:1), glutamine (10 mM), Hepes (10 mM), sodium bicarbonate (0.025%), 2% FCS). When indicated, cells were treated with either a 15 μ M concentration of an inhibitor of ERK activation (U0126) or its inactive form (U0124), with DMSO or AG1296, a specific inhibitor of PDGFR (5 μ M), or with human recombinant PDGFA (150 μм).

EGR1 shRNA Assays—293T cells were seeded in 10-cm dishes coated with collagen. The next day, cells were transfected with shControl or shEGR1 constructs (GeneCopoeia) along with the packaging vectors with Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies, Inc.) as described previously (11). After 48 h, the supernatant was collected. After diluting 10 times the viral supernatant, TG1 and TG6 were infected as described elsewhere (11). TG1 and TG6 cells stably expressing the shControl (shCtl) or the shEGR1 were selected in medium containing 0.5 μ g/ml puromycin for at least 15 days.

Small Interfering RNA Cell Transfection—Cells were seeded in 6-well plates at a density of 0.5×10^6 cells/well and tran-

siently transfected by using Lipofectamine[®] 2000 reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Briefly, a 10 nM concentration of Silencer[®] RNAi (Life Technologies) was diluted in 50 μ l of Opti-MEM medium, and 1 μ l of Lipofectamine[®] was diluted in 50 μ l of Opti-MEM medium. After 5 min of incubation, the diluted Silencer[®] RNAi and the diluted Lipofectamine were combined, mixed gently, and incubated for 20 min at room temperature prior to adding the complexes to cells. After 48 h of incubation, a second transfection was performed. Cells were lysed, and RNA or proteins were extracted for experiments.

Quantitative Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction—RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). Quantity and quality of RNA were checked by spectrophotometry and electrophoresis on agarose gels. Micro-RNA and mRNA expression levels were quantified by two-step RT-qPCR. Reverse transcription was performed with the High Capacity cDNA reverse transcription kit (catalog no. 4368813, Applied Biosystems) and the Taqman microRNA reverse transcription kit (catalog no. 4366597, Applied Biosystems) for mRNA and microARN, respectively, following the manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed using universal Taqman PCR Master Mix (catalog no. 4444557, Applied Biosystems). Gene expression levels were calculated by the $2^{\Delta\Delta CT}$ method, and TBP or GAPDH genes and U54 or U44 snoRNA were used for normalization.

Immunoblotting—Total proteins were extracted from GSCs by using a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, and Complete protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). The protein concentration was determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad).

Total proteins from each sample were separated by SDS-PAGE in appropriate acrylamide gels and transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking, blots were incubated with rabbit polyclonal antibodies to EGR1 (sc-110, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), PDGFA (sc-128, Santa Cruz Biotechnology), ERK (sc-093, Santa Cruz Biotechnology), or mouse monoclonal antibodies to α -tubulin (catalog no. 32-2500, Life Technologies), and activated phosphorylated ERK (M8159, Sigma-Aldrich) and HRP-conjugated secondary antibody. Immunoblots were revealed by chemiluminescence using ECL (GE Healthcare) and exposed to a Fusion FX7 CCD camera (Vilbert Lourmat). When required, quantification of several experiments was performed using ImageJ software (12).

Immunohistochemistry/TMA Construction and Analysis/ Statistical Analysis—All patients were informed and signed their consent for the use of all human samples. Immunolabeling was performed using a DAKO automat with the following primary antibodies: anti-EGR1 (sc-110, Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100, anti-MIB-1 (IR62661, DAKO, catalog no. IR62661) diluted 1:1000. Deparaffinization, rehydration, and antigen retrieval were performed using the pretreatment module PTlink (Dako). Five- μ m sections of formalin-fixed paraffinembedded tissue in tumor microarrays were tested for the presence of EGR1, using a Benchmark Ventana autostainer (Ventana Medical Systems SA, Illkirch, France). All tumor microarray slides were simultaneously immunostained in order





FIGURE 1. **EGR1 expression profile in human glioblastoma tissues.** *A*, tissue microarray analysis showing EGR1 expression in 139 GBM and 110 PA samples (***, *p* < 0.01; Student's *t* test). *B*, Kaplan-Meier analysis of the progression-free survival (*PFS*) showing a better patient outcome for the EGR1-positive subgroup (1) (at the protein level) as compared with the EGR1-negative subgroup (0). *C*, levels of EGR1 transcripts in the four molecular subclasses of GBM defined by the Verhaak molecular GBM classification. The histogram is based on The Cancer Genome Atlas data. *Error bars*, S.D.

to avoid intermanipulation variability. Immunostaining was scored by a pathologist (D. F. B.).

Immunofluorescence-Cells were seeded on polylysinecoated glass slides in cell culture medium. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Cells were washed three times and then incubated 30 min at room temperature with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Triton X-100. Cells were blocked with PBS containing 3% FCS and stained with the following primary antibodies: rabbit polyclonal antibodies to EGR1 (sc-110, Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:50), phosphorylated histone 3 serine 10 (antibody 5176-100, Abcam; dilution 1:100), Sox1 (antibody 15766, Millipore; dilution 1:50), or goat polyclonal Nanog (AF 1997, R&D Systems; 1:50), SHH (sc-1195, Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:50). After 1 h of incubation at room temperature, cells were washed two times with PBS and incubated with species-specific fluorophore-coupled antibodies. At the same time, nuclei were stained with Hoechst 33342 (1:2000 dilution). After 1 h of incubation at room temperature, the slides were washed two times with PBS and mounted with gel/mount. Fluorescence was observed through a ×60 objective on a Nikon Eclipse Ti inverted microscope equipped with a Hamamatsu camera. Image acquisition and quantification were performed with NIS software (Nikon).

Clonogenic Assay—Neurospheres were dissociated by gentle pipetting in their defined medium to obtain individual cells. A serial dilution was performed to obtain one single cell per well in 96-well plates. Immediately after seeding, the presence of one cell/well was verified. After 1 month, the wells containing one neurosphere were counted.

ChIP Assays-Cells were treated with a cross-linking solution of 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. The crosslink reaction was stopped by adding 125 mM glycine for 5 min at room temperature. After three washes with cold PBS, cells were lysed with buffer containing a protease inhibitor mixture. Lysates were then sonicated on ice, and the chromatin was sheared to obtain fragments between 150 and 500 bp. Immunoprecipitation steps were performed using a modified protocol from Upstate. Briefly, 3 µg of anti-EGR1 antibody (sc-189X, Santa Cruz Biotechnology) was bound to protein G magnetic beads overnight at 4 °C under rotation. The sheared chromatin was precleared by incubation with beads for 30 min at 4 °C under rotation. The beads were pelleted, and the precleared chromatin supernatant was then immunoprecipitated with the antibody coupled to the beads overnight at 4 °C under rotation. The beads were washed six times with wash buffer, one time with TE buffer containing 50 mM NaCl, and one time with TE buffer. The antibody-protein-DNA complexes were eluted

twice in 200 μ l of elution buffer by vortexing for 1 h at room temperature. Protein-DNA cross-linking was reversed at 65 °C for no more than 18 h in the presence of 200 mM NaCl. After RNase A and proteinase K digestions, the DNA fragments were purified by phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction. The input fraction was used as a negative control. ChIP-qPCR was performed using the primers listed in supplemental Table S1.

Electrophoretic Mobility Shift Assay—The 293T cell line was transiently transfected with 5 μ g of an EGR1 expression vector by using Lipofectamine[®] 2000 reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Nuclear proteins were extracted 48 h after transfection. Nuclear extracts were incubated for 20 min at room temperature with biotin-labeled probes. Probe sequences are shown in supplemental Table S2.

ChIP-Sequencing (ChIP-seq) and Bioinformatics Analysis— Immunoprecipitated purified DNA was used to prepare a fragment library according to the ChIP-seq kit guide from the manufacturer and the library preparation guide (Applied Biosystems). Sequence reads of 50 nucleotides were produced with a SOLiDTM 4 sequencer, according to standard manufacturer protocols. The sequence reads were analyzed with the

TABLE 1

Summary of clinical data of patients grouped in glioblastoma (n = 139) or pilocytic astrocytoma (n = 110) cohorts

	Glioblastoma cohort $(n = 139)$	Pilocytic astrocytoma cohort ($n = 110$)
Mean age at diagnosis (years) Sex (%)	59.5 ± 10.9	7.8 ± 4.6
Male	58.2	47.8
Female	41.8	52.2
Sex ratio (male/female)	1.4	0.9
Extent of surgery (%)		
Biopsy	31.5	31.2
Surgery	68.5	68.8
Postoperative treatment (%)		
Radiotherapy	6	0.05
Chemotherapy	65.5	0.08
STUPP regimen	28.5	

TABLE 2

Quantification of cells expressing EGR1 on 139 GBM samples

The third line shows the mean percentage of EGR1-positive cells for the three classes (EGR1 = 0, no EGR1-positive cells; EGR1 < 10%, <10% EGR1-positive cells; EGR1 > 10%, >10% EGR1-positive cells).

<i>n</i> = 139	EGR1 = 0	EGR1 < 10%	EGR1 > 10%
No. of GBM	18	18	103
Percentage of GBM	12.9	12.9	74.1
Percentage of EGR1 $^+$ cells	0	4.5 ± 0.85	35.5 ± 23.8

TABLE 3

EGR1 expression profile in human glioblastoma samples

The percentages of OLIG2-, KI67-, or nuclear EGR1-positive cells were counted in 10 independent glioblastoma samples.

BioScopeTM software suite. After sequence read mapping to the Hg19 human genome version, only reads mapping once to the genome were retained for subsequent analyses, to prevent spurious calls in repetitive regions or amplification artifacts. The peak calling was performed with the Picor tool developed at TAGC UMR_S1090. This algorithm uses the principle of two slide windows, one on each DNA strand, separated by a distance of 100-200 nucleotides. The windows scan the genome to search read enrichments, which should be in the same order of magnitude. This correlation is evaluated by Spearman's correlation coefficient. The aligned read files were then analyzed using several bioinformatic tools, including the Integrative Genomics Viewer and Peak-motifs from the RSAT suite (13). The functional annotation was performed by using GREAT software (14).

Results

Nuclear Expression of EGR1 Is Frequent in GBM and Restricted to Proliferating/Progenitor Cells-To assess whether EGR1 might be associated with features of infiltration and malignancy of glial tumors, we sought to compare its expression between pilocytic astrocytomas (PA), a non-infiltrating slow growing tumor considered benign, and GBM, aggressive tumors, always infiltrating and fast growing. We performed immunohistochemical analysis of EGR1 expression in tissue microarrays composed of 110 PA and 139 GBM (Fig. 1A and Table 1). These assays revealed that the percentage of EGR1positive cells was significantly (p = 0.0001) higher in GBM as compared with PA with an average of 27 and 13%, respectively (Fig. 1A). Therefore, the frequency of EGR1 expression is strongly associated with infiltrating and malignant glial tumors. In addition, the quantification of tissue microarrays revealed that EGR1 is expressed in a majority of GBM, almost 82% of the cases (Table 2). Kaplan-Meier analysis using this cohort confirmed that EGR1 expression provided a better patient outcome when the progression-free survival is considered (Fig. 1B). However, according to the The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, no significant difference for EGR1 expression was observed between the different GBM subtypes (Fig. 1C).

To gain insight into the association of EGR1 expression with mitotic stem/progenitor cells in tumors, we sought to compare it with those of known stem/progenitor markers (OLIG2) (15, 16) and proliferation (KI67) by immunohistochemistry on

	Zone 1				Zone 2	
	OLIG2	KI67	Nuclear EGR1	OLIG2	KI67	Nuclear EGR1
	%	%	%	%	%	%
GBM1	0	5	0	0	80	10
GBM2	30	3	0	80	50	20
GBM3	7	25	0	70	50	2
GBM4	12	10	0	60	20	12
GBM5	8	10	0	80	80	25
GBM6	3	5	0	70	50	5
GBM7	0	5	0.5	60	55	50
GBM8	0	7	2	95	40	20
GBM9	20	2	5	98	45	25
GBM10	20	5	0	100	80	50
Average	10 ± 10.3	7.7 ± 6.6	0.7 ± 1.7	71.3 ± 29	55 ± 19.7	21.9 ± 16.7



А



FIGURE 2. Nuclear EGR1 expression is a feature of mitotic progenitor cells in GBM tissues. Experiments were performed on 10 biological replicates (10 different patients). *A*, immunohistochemistry analysis showing EGR1 and OLIG2 expression in serial slices of human GBM. The *dashed line* separates two territories enriched either in OLIG2-negative cells (1) or in OLIG2-positive cells (2). *Scale bars* are shown. *B*, immunofluorescence staining showing EGR1 (*red*), cyclin A (*green*), and OLIG2 (*purple*) co-expression in sections from formalin-fixed paraffin-embedded human GBM. The nuclei were stained with DAPI. *Arrows*, cells positive for three markers. *Dashed arrow*, a negative cell. *Scale bars* are shown.

serial slices of human GBM samples (10 independent cases) (Table 3). As shown in Fig. 2*A*, the OLIG2 staining defined two zones of either rare (zone 1) or frequent (zone 2) staining. Quantitative analysis revealed that only an average of 10 and 7.7% of cells belonging to zone 1 expressed OLIG2 and KI67, respectively. Conversely, a majority of cells, 71.3 and 55%, respectively, expressed OLIG2 and KI67 in zone 2 (Table 3).

Interestingly, EGR1 nuclear expression is observed almost exclusively in cells located in territories enriched in OLIG2-positive cells (Fig. 2*A*) with an average of 21.9% of EGR1-positive cells compared with only 0.7% in zone 1 (Table 3). To confirm the strict correlation between EGR1 nuclear profile and mitotic progenitor cells, we performed a co-staining of EGR1, cyclin A, and OLIG2 by immunofluorescence on the same



TABLE 4

Correlation between EGR1 nuclear profile and mitotic progenitor cells Top quantification of cells either positive for Cyclin A, EGR1, or OLIG2; or doublepositive for Cyclin A/EGR1, Cyclin A/OLIG2, or EGR1/OLIG2; or triple positive for Cyclin A/EGR1/OLIG2. Bottom persentage of cells that are EGR1⁺ or EGR1⁻ among the Cyclin A⁺, OLIG2⁺ or Cyclin A⁺/OLIG2⁺ cells in 10 different human

GBMs. P values were calcul	ated using the studen	ťs <i>t</i> test.		
	Nb of ce	Nb of cells		
DAPI	966.2 +/- 2	00.5	100	
EGR1	52.1 +/- 7	7.7	8.6 +/-2.8	
CyclinA	71.2 +/- 1	0.0	10.6 +/- 3.4	
Olig2	69.0 +/- 1	0.4	10.5 +/-2.9	
EGR1/CyclinA/Olig	2 37.6 +/- 6	5.3	6.1 +/- 2.1	
EGR1/CyclinA	41.2 +/- 6	5.9	6.8 +/- 2.5	
EGR1/Olig2	42.4 +/- 7	7.2	6.8 +/- 2.2	
CyclinA/Olig2	52.3 +/- 8	3.2	8.2 +/- 2.8	
	EGR1 + (%)	EGR1	- (%)	pvalue
CyclinA +	77.1 +/- 9.5	22.8 -	+/- 9.5	3.10-14
Olig2 +	75.9 +/- 3.5	24.0 -	+/- 3.5	1.10-20
CyclinA+/Olig2 +	96.0 +/- 2.6	4.0 +	/- 2.6	4.10-28

GBM samples (10 different cases). The results showed that almost all cyclin $A^+/OLIG2^+$ cells (96%) were also positive for nuclear EGR1 (Fig. 2*B* and Table 4). Taken together, these results demonstrate that EGR1 nuclear expression is frequent in GBM and is strictly restricted to proliferating/progenitor cells.

EGR1 Contributes to Expression of Stemness Markers and GSC Clonal Proliferation—GSCs are a subpopulation of tumor cells that display stemlike characteristics and play unique roles in tumor biogenesis and progression. We previously showed that primary cultures of GSC are able to differentiate and dedifferentiate *in vitro* according to their environment (5, 11). To characterize EGR1 in GSC, we first assessed its expression during cell differentiation and dedifferentiation. Three independent primary cultures of GSCs (TG1, TG6, and GB8) were cultured either in defined medium to maintain their self-renewal properties, in 2% serum-containing medium (3 days) to promote their differentiation, or in serum-containing medium (3 days) and then defined medium (48 h) to trigger their dedifferentiation (5) (Fig. 3A). Contrasting with its expression in self-renewing cells, the level of EGR1 protein was strongly repressed upon cell differentiation, despite the induction of its transcripts (Fig. 3, B and C). Interestingly, EGR1 protein expression resumed upon dedifferentiation (Fig. 3C). These results demonstrate that EGR1 expression correlates with stemness and suggest that it contributes to stemness maintenance. To address this issue, EGR1 was stably overexpressed in GSC using an expression vector (Fig. 3D) and subsequently inhibited with an EGR1-targeted shRNA (Fig. 3E). EGR1 silencing led to a drastic repression of proliferation and stem/progenitor markers, such as SHH, SOX1, and NANOG, as well as a significant drop in the

number of positive cells (Fig. 3F). We previously described that activated ERK plays a major role in clonal proliferation by turning on the SHH-GLI1-NANOG network through a miR-18A*dependent gene regulatory network (5). Prevention of ERK phosphorylation, using U0126 in self-renewing GSC, led to a decrease in EGR1 expression (Fig. 3G). On the other hand, EGR1 silencing led to a significant repression of most of the miR-18a* pathway members, including miR-18a* and NOTCH target genes, whereas its overexpression increased their expression (Fig. 3H). Accordingly, the number of proliferating/mitotic cells, assessed by cyclin A and histone H3 phospho-Ser-10 staining and cell counting, and the self-renewal potential, assessed by a single cell colony-forming assay, were significantly decreased when EGR1 was repressed while being enhanced by its overexpression (Fig. 4, A-D). Taken together, these results demonstrate that EGR1 constitutes an ERK effector, at least in the miR-18a*-dependent network, for the maintenance of GSC stemness and self-renewal.

Identification of EGR1 Direct Target Genes-To gain molecular insights into the mechanism by which EGR1 contributes to the GSC phenotype, we performed a ChIP-seq assay to identify its genomic binding sites, using self-renewing TG6 cells grown in defined medium (supplemental Fig. S1). Using Picor, a stringent custom-designed peak-caller software developed in the TAGC laboratory,⁵ we identified 21,944 peaks, distributed from -500 to +500 kb around transcription start sites (*TSS*); among them, 45% were located in intergenic regions as defined by GREAT gene association rules (Fig. 5A). Motif discovery using the Peak-motifs algorithm (13, 17) revealed that the five most significant motifs are GC-rich. The alignment of these motifs against the core vertebrate JASPAR database carried out with the Web server STAMP (18, 41) highlighted that these five GC-rich motifs are significantly related to the known EGR1 binding site (Fig. 5B). Altogether, these analyses confirmed the validity of our ChIP-seq assay.

In agreement with the chromosome 7 rearrangement in TG6 cells (5), functional annotation analysis of genes located at the position the closest to the identified peaks revealed candidates either up-regulated/amplified in GBM or involved in central nervous system development, differentiation, and regulation of neural precursor cell proliferation (Fig. 5C). Interestingly, a subset of peaks were located either in the core promoter, in the first intron, or in the 3'-UTR sequences of genes, such as EGFR, FGF12, GLI1, GLI2, IGFBP5, IL6R, PDGFA, and SHH, particularly involved in the control of cell growth or GSC self-renewal (Fig. 5D and supplemental Fig. S2). To confirm EGR1 recruitment in vivo, we performed ChIP-qPCR assays in TG1 and TG6 cells using primers spanning these genomic regions. As expected, EGR1 binding was significantly increased in the putative regulatory sequence of almost all of these genes in both cell lines (Fig. 6, A and B). However, it was bound to the SHH regulatory sequence only in TG1 cells (Fig. 6A). The ChIP-seq analysis revealed a strong enrichment of sequences located in the 3'-UTR of the PDGFA gene, whereas several functional EGR1 binding sites were located in its core promoter (19). ChIP



⁵ A. Bergon and C. Lepoivre, unpublished data.





10 15 20 10 15 20munofluorescence staining showing the expression of cell proliferation markers, *iR1*) or overexpressing EGR1 (*2K7EGR1*) compared with the control cells (*shCt* or in A or Ser-10 phosphohistone 3-positive cells. Five independent fields for each 1 and TG6 chopal efficiency following efficient transduction by either shEGR1 or

FIGURE 4. **Impact of EGR1 inhibition or overexpression on GSC proliferation.** *A*, immunofluorescence staining showing the expression of cell proliferation markers, cyclin A and Ser-10 phosphohistone 3 (*H3Ser10P*) in TG6 cells depleted for EGR1 (*shEGR1*) or overexpressing EGR1 (*2K7EGR1*) compared with the control cells (*shCt* or *2K7Luc*). Nuclei were stained with DAPI. *Scale bars* are shown. *B*, quantification of cyclin A or Ser-10 phosphohistone 3-positive cells. Five independent fields for each condition were counted (*, p < 0.05; **, p < 0.01; Student's t test). *C*, evaluation of TG1 and TG6 clonal efficiency following efficient transduction by either shEGR1 or 2K7EGR1 compared with the control condition, shCt, or 2K7Luc, respectively. Single cells were seeded in 96-well plates. Clonal efficiency of 100% corresponds to 1 colony/well for 100 wells. Three hundred wells were counted (**, p < 0.01; ***, p < 0.01; Student's t test). *D*, cell proliferation of TG6 cells efficiently transduced with the control condition shCt, or 2K7Luc, respectively. Single cells were seeded in 96-well plates. Clonal efficiency of 100% corresponds to 1 colony/well for 100 wells. Three hundred wells were counted (**, p < 0.01; ***, p < 0.001; Student's t test). *D*, cell proliferation of TG6 cells efficiently transduced with either an EGR1 expression vector or a specific shRNA and compared with the control condition. Counting was performed over 20 days. *Error bars*, S.D.

FIGURE 3. **EGR1 is associated with stemness and contributes to the regulation of the ERK/miR-18a* network.** TG1, TG6, and GB8 cells (from three different patients) were cultured in defined medium (*unDiff*), in serum (*Diff*), or in serum and then switched to defined medium for 4 days (*DeDiff*). *A*, the efficiency of differentiation (*Diff*) or dedifferentiation (*Dediff*) of TG1, TG6, and GB8 cells was assessed by the expression of SHH, NANOG, and SOX2 used as stemness markers and the number of mitotic cells (Histone H3-phospho-Ser-10-positive cells (*H3Ser10P*)). The result is the mean of three independent experiments. *B*, the relative expression of EGR1 mRNA was assessed by RT-qPCR using a TAQMAN probe. The result is the mean of three independent experiments. *C*, EGR1 protein expression in TG1, TG6, and GB8 cells was assessed by immunoblotting. Antibody specific to α -tubulin was used as loading control. *Numbers below* each Western blot correspond to the relative quantification of the bands. *D* and *E*, EGR1 protein expression was assessed by immunoblotting in TG1, TG6, and GB8 cells after stable infection with either an EGR1 expression vector (*D*) or an EGR1-targeting shRNA (*shEGR1*) (*E*). Specific antibodies to ERK or to α -tubulin were used as a loading control. *Numbers below* the blots correspond to the relative quantification. *F*, immunofluorescence staining showing the SHH, NANOG, and SOX1 expression on TG6 cells expressing an EGR1-targeting (*shEGR1*) or control (*shCtl*) shRNA and cultured in defined medium. Nuclei were stained with DAPI. *Scale bars* are shown. Quantification of positive cells for each condition have been counted (**, p < 0.001; ***, p < 0.001; Student's *t* test). *G*, immunoblotting and QPCR showing EGR1 expression and ERK phosphorylation in TG1, TG6, and GB8 cells treated with U0126 or the U0124 inactive analog. A specific antibody to total ERK was used as loading control. Quantification is shown below the blots. *H*, relative expression of *GL11*, *SHH*, *miR-1*



A





Binomial

Distance to TSS (kb)

С

D



GO Biological Process	FDR Q-Value	Region Hits	Genes
central nervous system neuron development	1.8E-119	599	ARX, ASCL1, APT7A, BTG2, CDK5, CHRNB2, CNTN2, EPHA4, EPHB1, EPHB3, FOXG1, GLI2, HPRT1, LEP, LINGO1, LMX1B, NFIB, NPY, PLXNA4, PTK2
motor axon guidance	4.86e-106	415	ALCAM, CDK5, CXCL12, CXCR4, EPHA4, ETV4, FOXP1, HOXA1, HOXA2, KIF5C, LHX1, LHX4, LHX9, MNX1, NOG, PLXNA4
central nervous system neuron differentiation	1.21e-105	978	AGTPBP1, ARX, ASCL1, ATP282, ATP7A, ATXN2, BCL11B, BTG2, CDK5, CHRNB2, CLN8, CNTN2, EPHA4, EPHB1, EPHB3, EVX1, FOXG1, GL1, GL2, GL3, HOXA1, HPRT1, LEP, LHX1, LHX4, LINGO1, LMX1A, LMX1B, MDGA2, MET, MNX1, MTPN, NFIB, NKX2-1, NPY, OGDH, OTP, PAX3, PLXNA4, POU3F4, PTK2, SHANK3, SHH, SMO, TBX20, TFAP2C, WNT3A
regulation of morphogenesis of a branching structure	1.48e-97	597	AGT, AGTR2, AR, BMP4, BMP7, CTNNB1, ETV4, ETV5, GDNF, HGF, KGFLP2, LHX1, MET, NGG, NTN4, PAX8, PDGFA, RXRA, SHH, SMO, SOX8, SOX9, TGFB1, VEGFA, WNT2, WNT2B
positive regulation of neural precursor cell proliferation	2.35e-95	371	DISC1, EGF, FOXG1, GL1, GL12, GL13, IGF1, LHX1, NES, NOTCH1, OTP, SHH, SMARCD3, SMO
positive regulation of mesenchymal cell proliferation	1.18e-76	495	CTNNB1, FOXF1, FOXP1, FOXP2, GAS1, IHH, IRS2, MYC, MYCN, PDGFA, SHH, SMO, SOX9, TGFBR2, TP63, VEGFA, WNT2
regulation of mesenchymal cell proliferation	1.05e-57	498	BMP4, CTNNB1, FOXF1, FOXP1, FOXP2, GAS1, IHH, IRS2, MYC, MYCN, NFIB, PDGFA, SHH, SMO, SOX9, TGFBR2, TP63, VEGFA, WNT2
dorsal/ventral neural tube patterning	3.03e-54	239	BMP4, FKBP8, GAS1, GLI2, GLI3, GSC, MNX1, PSEN2, PTCH1, SHH, SMO, WNT3A
MSigDB Perturbation	FDR Q-Value	Region Hits	Genes
Genes within amplicon 7p22 identified in a copy number alterations study of 191 breast tumor samples	0.00	910	ACTB, ADAP1, AMZ1, BRAT1, CHST12, COX19, CYP2W1, EIF3B, FAM20C, FBXL18, FOXK1, FTSJ2, GET4, GNA12, GPER, GPR146, INTS1, IQCE, KIAA0415, LFNG, MAD1L1, MAFK, MICALL2, NUDT1, PAPOLB, RADIL, SLC29A4, SNX8, SUN1, TMEM184A, TNRC18, TTYH3, UNCX, WIPI2, ZFAND2A
Marker genes up-regulated in the 'chromosome 7 polysomy' subclass of hepatocellular carcinoma	0.00	850	ABCB4, ADCY1, CHN2, CLDN15, CLDN3, COBL, CROT, CRYAA, EPHA1, GCGR, GCK, GLCCI1, HAAO, ICA1, LAMB3, MAD1L1, MOGAT3, PEPD, PFKFB1, PILRB, POLD2, POR, POT1, PRKAG2 PYGL, RAPGEF4, RHOU, WNK3
Genes up-regulated and displaying increased copy number in glioblastoma samples	7.25e-34	278	ADSS, AKT3, AVIL, C1orf101, CAPZA2, CCND2, CDK6, CEP170, CTDSP2, DDX1, DYRK4, EGFR, ETNK2, GOLT1A, HS1BP3, KISS1, LAPTM4A, LRRN2, MDM4, MET, MYCN, NTSC1B-RDH14, PARP11, PEX1, PIK3C2B, PPP1R15B, REN, RHOB, SAMD9, SDCCAG8, SMC6, SOX13, SOX2,ZNF238

Gene Symbol	Description	Localization
CDKN1A	Pathway in glioma, regulator of cell cycle progression at G1	promotor
EGFR	Involved in the control of cell growth and differentiation, mutated in glioblastoma	promotor
FGF12	Involved in nervous system, cell-cell signaling	intron 1
GLI1	Activated by SHH, regulates stem cell proliferation	intron 1
GLI2	Activated by SHH, regulates stem cell proliferation	intron 1
IGFBP5	Involved in regulation of growth cell	intron 1
IL6R	Regulation of the immune response, activation of MAPKKK cascade	3'UTR
PDGFA	Growth factor, a potent mitogen for cells of mesenchymal origin	3'UTR
SHH	Hedgehog signaling pathway, Cancer pathway, activates GLI1	intron 1

FIGURE 5. EGR1 targets identified by ChIP-seq assay in proliferating GSC. A, bar chart showing the distribution of DNA sequence tags around the transcription start site (TSS) generated by GREAT software. The pie chart shows the percentage of peaks located in genic and intergenic regions. B, the top panel shows the most significant motif identified with the RSAT Peak-motifs pipeline for discovering motifs in massive ChIP-seq peak sequences. The bottom panel shows the output of the Web server STAMP, which reports the best similarity match between the motifs newly discovered by Peak-motifs and motifs known in the JASPAR database; in this case, the motif corresponds to a canonical EGR1 binding site ($p = 3.9 \times 10^{-5}$). *C*, functional annotation enrichments generated with Web server GREAT from genomic regions identified by the EGR1 peak data set generated by the ChIP-seq assay. *D*, candidate gene subset potentially regulated by EGR1. The nine genes were selected among the list of EGR1 targets identified by the ChIP-seq assay, in light of their importance for proliferation and GBM biology.





SASBMB

assays targeting both the core promoter and the 3'-UTR sequence confirmed enrichment of both regulatory regions but displayed much more enrichment for the sequence located in the 3'-UTR (Fig. 6, A and B). The miR-18a* regulatory sequences were not revealed by the ChIP-seq analysis. However, a previous report showed efficient EGR1 binding to miR-18a* regulatory sequences upon PMA treatment (20). Accordingly, we found a possible EGR1 recruitment in TG1 cells (Fig. 6A). The fact that EGR1 did not bind the *miR-18a** promoter in TG6 (Fig. 6B) indicates that two different EGR1-dependent mechanisms, involving direct or indirect binding, occur to regulate miR-18a* expression, as seen in Fig. 3G. Specific EGR1 binding to identified sites located in promoter, 3'-UTR, or intronic regions have been further confirmed by electrophoretic mobility shift assays, where EGR1-specific protein-DNA complexes were only revealed with wild-type probes and efficiently blocked by EGR1 antibody (Fig. 6, C-E).

Interestingly, TG1 and TG6 differentiation, which induced a strong decrease of EGR1 protein levels (Fig. 3*C*), as well as EGR1 silencing using shRNA led to the down-regulation of most of the direct EGR1 targets, especially CDKN1a, GL11, IL6R, and PDGFA, whereas EGR1 overexpression led to their induction (Fig. 6, F–I). Taken together, these results demonstrate that in self-renewing GSCs, EGR1 directly binds and tightly regulates an important set of genes, including *PDGFA* and SHH signaling components, involved in the control of cell proliferation and stemness.

A Positive Feed-forward Control Associating PDGFA and EGR1 Is Necessary for GSC Stemness and Proliferation—Among the direct EGR targets identified above, we focused on PDGFA. Indeed, this growth factor is widely known for activating the ERK pathway (8), which is necessary for EGR1 expression (Fig. 3G) as well as GSC proliferation (5). To further analyze the functional interaction between PDGFA and EGR1, we performed a series of assays illustrated in Fig. 7. Whereas a nonrelevant siRNA control had no effect on EGR1 expression in both TG1 and TG6 cells (Fig. 7A), a PDGFA-specific siRNA led to a decrease of 56 and 47% of ERK phosphorylation in TG1 and TG6 cells, respectively (Fig. 7B). Interestingly, EGR1 silencing, which led to decreased PDGFA expression, produced a similar effect on ERK phosphorylation (Fig. 7C). EGR1 expression was also affected by PDGFA depletion (Fig. 7, B and D), confirming the requirement of activated ERK to maintain its expression. These results indicate that PDGFA is required for ERK activation and subsequent expression of EGR1 in GSC. In full agreement, blocking its receptor with a PDGFR-specific pharmacological inhibitor (AG1296) repressed both EGR1 expression and ERK activation in self-renewing GSC (Fig. 7, *E* and *F*). The stimulation of EGR1 protein expression by this growth factor was further confirmed by treating the cells with increasing

amounts of a recombinant form of PDGFA (recPDGFA) that was completely inhibited by AG1296 (Fig. 7, G and H). Accordingly and as a consequence of PDGFA silencing, the percentage of cyclin A (Fig. 8, A and B) and histone H3 (phospho-Ser-10)positive cells dropped drastically, thus revealing a deep impact on cell proliferation and mitosis (Fig. 8, A-F). PDGFA restoration in a similar context, using recombinant PDGFA directly added to the culture medium, totally rescued the mitotic activity revealed by H3 (Ser-10) phosphorylation (Fig. 8, C-E). However, inhibition of PDGFR α/β prevented the rescue of cell mitosis when PDGFA expression was restored (Fig. 8, C-E). As illustrated in the graph, stable EGR1 overexpression strongly activated TG6 cell proliferation that was very efficiently inhibited by shEGR1-mediated knockdown (Fig. 8F). In parallel, inhibition of the PDGF pathway by the chemical compound significantly reduced EGR1-induced cell proliferation, whereas the addition of recPDGFA partially restored cell proliferation following EGR1 silencing (Fig. 8F).

Similar to EGR1 silencing, PDGFA depletion compromised expression of stemness markers, such as NANOG, SOX1, and SHH, as assessed in TG1, TG6, and GB8 cells by immunofluorescence (Fig. 9, A–D). Altogether, results presented in Figs. 7–9 clearly demonstrate that PDGFA and EGR1 are interdependent for their expression and constitute therefore a positive feed-forward loop necessary to maintain GSC stemness and proliferation.

Discussion

Due to its ability to regulate a large panel of genes, EGR1 is a transcription factor capable of controlling a variety of important cellular events, such as cell growth or apoptosis (8). Whether EGR1 acts as a tumor suppressor or oncogene in cancer cells is still a matter of controversy, and two opposing actions of EGR1 have been described, depending on its expression pattern and the biological context. Indeed, elevated in prostate cancer (21), it contributes to proliferation, cell survival, and tumor progression (22, 23), whereas it is frequently low in lung and breast cancer, where it is rather considered as a tumor suppressor because its exogenous expression inhibits cell growth and tumorigenicity (24, 25). In high grade astrocytomas, EGR1 expression is associated with enhanced patient survival (9), suggesting a tumor suppressor activity. This is further supported by other studies describing its growth suppressor activity when overexpressed or induced by natural compounds, such as curcumin (26, 27). In the present study, we have established the EGR1 expression profile in a large set of human GBM. Importantly, we have taken into account its intracellular localization. We first demonstrated that when tumors express EGR1, the frequency of EGR1-positive cells is much higher in grade IV, aggressive, and infiltrative astrocytomas



FIGURE 6. **Validation of the regulation by EGR1 of its targets in proliferating GSC.** *A* and *B*, EGR1 direct binding within the putative regulatory regions of the nine selected EGR1 target genes and of the miR-17–92 in TG1 and TG6 cells assessed by ChIP qPCR assays (*, p < 0.05 for enrichment obtained with miR-17–92 p2; Student's *t* test). *C–E*, electrophoretic mobility shift assays using wild-type probes containing a putative EGR1 binding site for three EGR1 target genes, EGFR, SHH, and PDGFA. Mutated probes where the putative EGR1 binding site has been disrupted have been used. The *black arrow* on the *right side of panels* indicates the EGR1-specific protein-DNA complex. *F* and *G*, relative expression of nine selected EGR1 target genes assessed by RT-qPCR in differentiated TG1 and TG6 cells. *H* and *I*, relative expression of nine selected EGR1 and TG6 cells cultured in defined medium and efficiently infected with a control vector (*CtI*), or a specific shRNA (*shEGR1*), or an expression vector (*2K7EGR1*). The data represent the average of three independent experiments. *Error bars*, S.E.


FIGURE 7. **PDGFA signaling contributes to the maintenance of EGR1 expression in GSC.** *A*, immunoblotting showing the unaffected EGR1 expression in TG1 and TG6 cells transfected with a non-relevant control siRNA (*siCtI*). This expression is compared with the basal EGR1 expression in untreated cells (*NT*). A specific antibody to α -tubulin was used as loading control. *B* and *C*, immunoblotting showing the effects of siRNA-mediated PDGFA- and EGR1-specific inhibition (*siPDGFA* and *siEGR1*) on phosphorylation of ERK in TG1 and TG6 cells. Antibodies specific to total ERK or α -tubulin were used as loading control. *D*, QPCR showing EGR1 mRNA levels in TG1 and TG6 in response to siPDGFA or siLuc treatment. *E* and *F*, immunoblotting (*E*) and qPCR (*F*) showing the effect of PDGFR chemical inhibitor AG1296 on EGR1 expression and ERK phosphorylation in TG1 and TG6 cells. Cells were treated for 24 or 48 h. A specific antibody to total ERK was used as loading control. *Q*, used as control, or AG1296. A specific antibody to α -tubulin was used as a loading control. *H*, relative expression of EGR1 and PDGFA in untreated (*Ct*) or EGR1-expressing (*EGR1*) cells reated with recPDGFA (*recPDGFA*). *Error bars*, S.E.





FIGURE 8. **PDGFA is involved in the GSC proliferation.** *A*, immunofluorescence staining showing cyclin A expression in TG1, TG6, and GB8 cells transfected with a control siRNA (*siLuc*) or a siRNA to PDGFA (*siPDGFA*). Nuclei were stained with DAPI. *Scale bars* are shown. *B*, quantification of cyclin A-positive cells in each primary culture. Five independent fields were counted. *, p < 0.05; **, p < 0.01; Student's *t* test). *C*, immunofluorescence staining showing mitotic cells assessed by the Ser-10 phosphohistone 3 expression in TG1 and TG6 cells cultured in defined medium. Cells were transiently transfected with a control siRNA (*siDGFA*) in the presence or absence of recombinant PDGFA protein (*recPDGFa*) to rescue the PDGFA signaling. When indicated, cells were treated with AG1296. Nuclei were stained with DAPI. *Scale bars* are shown. *D*, quantification of mitotic cells by counting the Ser-10 phosphohistone 3-positive cells for untreated (*Ctl*) TG1 and TG6 cells or transiently transfected with a non-relevant siRNA (*siCtl*), siPDGFA, or treated with a PDGFA-blocking antibody (*Ab PDGFA*) (**, p < 0.01; Student's *t* test). *E*, quantification of mitotic cells assessed by Ser-10 phosphohistone 3-positive cells for TG1 and TG6 cells or transiently transfected with a non-relevant siRNA (*siCtl*), siPDGFA, or treated with a PDGFA-blocking antibody (*Ab PDGFA*) (**, p < 0.01; Student's *t* test). *E*, quantification of mitotic cells assessed by Ser-10 phosphohistone 3-positive cells for TG1 and TG6 cells or transiently transfected with a locking PDGFA or treated with a blocking PDGFA antibody (**, p < 0.01; Student's *t* test). *F*, cell proliferation of receils or or a specific shRNA and compared with the control condition. When indicated, cells were treated with a PDGFR chemical inhibitor or a recombinant PDGFA protein. The count was performed over 20 days. *Error bars*, S.E.





FIGURE 9. **PDGFA contributes to maintain stemness marker expression in GSG.** *A*, immunofluorescence staining showing NANOG, SOX1, and SHH expression in TG1, TG6, and GB8 cells. Cells cultured in defined medium were transfected with either a non-relevant siRNA (*siLuc*) or a PDGFA-specific siRNA (*siPDGFA*). Nuclei were stained with DAPI. *Scale bars* are shown. *B–D*, quantification of cells positive for NANOG, SOX1, and SHH staining, respectively. Five independent fields were counted. *, p < 0.05; **, p < 0.001; ***, p < 0.001; Student's *t* test. *Error bars*, S.E.

(GBM) than in benign non-infiltrative and slowly growing PA. It is noteworthy that EGR1 expression is quite frequent in GBM, amounting to more than 80% EGR1-positive cases in the cohort we studied. Importantly, we observed that EGR1 nuclear expression occurred in a large majority of proliferating cyclin A/OLIG2-positive cells. In accordance with the essential contribution of OLIG2 to the maintenance and proliferation of GSCs (15, 16), our data show a strong link between basal nuclear expression of EGR1, aggressiveness, and stemness. The consequence of EGR1 deficiency is an alteration of GSC self-renewal, proliferation, and maintenance. This pro-proliferative EGR1 function that we uncovered in GBM stem/progenitor

cells contrasts with its association with patient survival (9), suggesting a deleterious effect on tumor progression. This functional discrepancy could be explained by the fact that patient survival data are established following conventional genotoxic treatments, which most probably induce EGR1 expression. Although an EGR1 contribution to temozolomide resistance has been suggested in certain GBM cell lines (28), it is likely that induced EGR1 expression upon genotoxic pressure may promote proliferation arrest and cell death through induction of tumor suppressor genes (29–32), thus explaining the slightly significant better patient outcome shown in Fig. 1. However, the presence of EGR1 does not prevent the emergence of re-



sistant cells and tumor recurrence in the large majority of GBM. Therefore, based on our results and certain reports in other tumor cell types, in particular in MCF7 breast cancer cells (33), we propose that constitutive basal EGR1 expression in cancer cells contributes to proliferation and tumor progression, whereas inducible EGR1 expression in response to stresses or ectopic overexpression may switch its behavior toward an antiproliferative and death program. This dual EGR1 function, dependent on the biological context and its expression level, seems to be restricted to cancer cells. Indeed, in normal adult hematopoietic stem cells, the repression of constitutive EGR1 expression is required to ensure the switch between non-mitotic and mitotic migrating progenitors (34). We have functionally demonstrated, using primary cultured GSCs, that EGR1 plays a central role in the phospho-ERK/miR-18a*/NOTCH1/ SHH regulatory network that we previously described as crucial for the regulation of self-renewal and GSC maintenance (5). In accordance with other reports in a variety of models (8, 35–37), EGR1 expression in self-renewing GSC is highly dependent on ERK activation. In this context, EGR1 is responsible for miR-18a*, SHH, and GLI1 transcriptional regulation by directly interacting with their regulatory sequences. Interestingly, EGR1-dependent control of SHH and miR-18a* expression may also occur indirectly, as illustrated by the results we obtained in TG6 cells. In this case, it is likely that indirect regulation of EGR1 might occur through a phospho-ERK-dependent mechanism orchestrating EGR1 expression itself. Indeed, by stimulating miR-18a* expression, EGR1 contributes to NOTCH1 activation, which contributes in turn to the maintenance of ERK phosphorylation, which subsequently activates the SHH/GLI/NANOG regulatory network (5, 38). The SHH/ GLI/NANOG network is all the more important because it is required for GSC clonal proliferation (5–7). Therefore in GSC, EGR1 constitutes an important functional link in charge of turning on a constitutive positive feed-forward loop maintaining the activation of the phospho-ERK/miR-18a*/NOTCH1/ SHH network (5).

PDGFA is a well known EGR1 target contributing to EGR1dependent cellular growth control in a variety of models, including head and neck squamous cell carcinoma (8, 39). Although efficient binding of EGR1 has been reported on several canonical binding sequences in the PDGFA core promoter (19), our ChIP-seq analysis revealed the binding of EGR1 to sequences located in the 3'-UTR of the PDGFA gene. Targeted ChIP assays further confirmed that EGR1 binds much more frequently the 3'-UTR sites than the motifs located in the core promoter. EGR1 binding at this position in the PDGFA gene has never been reported and might constitute the trigger of constitutive PDGFA expression in this model. This EGR1-dependent stimulation of PDGFA maintains, as already described in other models (8, 40), a growth-stimulatory loop, which stimulates ERK phosphorylation through PDGFR activation and subsequent EGR1 synthesis.

In conclusion, our study clarifies EGR1 expression and function in GBM. Only nuclear in stem/progenitor cells, constitutive EGR1 expression is crucial for clonal proliferation and stemness maintenance. Author Contributions-N. S. designed, performed, and analyzed all of the experiments and contributed to writing the paper. L. T. designed, performed, and analyzed all of the experiments. A. B. performed bioinformatic analysis. H. H. contributed to the ChIP-seq experiment. S. R. provided technical assistance. F. L. contributed to bioinformatic analysis. P. P. contributed to providing tumor samples and analyzed the results. F. A. provided tumor samples and analyzed the results. D. F. provided tumor samples. N. B. K. designed, performed, and analyzed the experiments shown in Fig. 1, A and B. E. V. O. corrected the manuscript. J. M. P. provided biological material and analyzed data. H. C. provided biological material and analyzed data. D. F. B. designed, performed, and analyzed the experiments shown in Fig. 1, A and B. F. B. V. coordinated the study and analyzed the experiments shown in Fig. 2. J. I. conceived and coordinated the study, wrote the paper, and gave final approval of the version to be published. T. V. conceived and coordinated the study, wrote the paper, and gave final approval of the version to be published.

Acknowledgments—We thank A. Borderie, S. Bestrée, C. Hagnere, and F. Frassinetti for technical assistance and C. Colin for statistical analyses. High throughput sequencing was performed at the TGML Platform, supported by grants from INSERM, GIS IBiSA, Aix-Marseille Université, and ANR-10-INBS-0009-10.

References

- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., and Barnholtz-Sloan, J. S. (2014) The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science". *Neuro. Oncol.* 16, 896–913
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., Fang, X., Sloan, A. E., Mao, Y., Lathia, J. D., Min, W., McLendon, R. E., Rich, J. N., and Bao, S. (2013) Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* **153**, 139–152
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E. A., Stassi, G., Larocca, L. M., and De Maria, R. (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824–828
- Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8, 755–768
- Turchi, L., Debruyne, D. N., Almairac, F., Virolle, V., Fareh, M., Neirijnck, Y., Burel-Vandenbos, F., Paquis, P., Junier, M. P., Van Obberghen-Schilling, E., Chneiweiss, H., and Virolle, T. (2013) Tumorigenic potential of miR-18A* in glioma initiating cells requires NOTCH-1 signaling. *Stem Cells* 31, 1252–1265
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., and Ruiz i Altaba, A. (2007) HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr. Biol.* 17, 165–172
- Zbinden, M., Duquet, A., Lorente-Trigos, A., Ngwabyt, S. N., Borges, I., and Ruiz i Altaba, A. (2010) NANOG regulates glioma stem cells and is essential *in vivo* acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J.* 29, 2659–2674
- 8. Thiel, G., and Cibelli, G. (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J. Cell Physiol.* **193**, 287–292
- Mittelbronn, M., Harter, P., Warth, A., Lupescu, A., Schilbach, K., Vollmann, H., Capper, D., Goeppert, B., Frei, K., Bertalanffy, H., Weller, M., Meyermann, R., Lang, F., and Simon, P. (2009) EGR-1 is regulated by *N*-methyl-D-aspartate-receptor stimulation and associated with patient survival in human high grade astrocytomas. *Brain Pathol.* **19**, 195–204
- Patru, C., Romao, L., Varlet, P., Coulombel, L., Raponi, E., Cadusseau, J., Renault-Mihara, F., Thirant, C., Leonard, N., Berhneim, A., Mihalescu-Maingot, M., Haiech, J., Bièche, I., Moura-Neto, V., Daumas-Duport, C.,



et al. (2010) CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer* **10**, 66

- Fareh, M., Turchi, L., Virolle, V., Debruyne, D., Almairac, F., de-la-Forest Divonne, S., Paquis, P., Preynat-Seauve, O., Krause, K. H., Chneiweiss, H., and Virolle, T. (2012) The miR 302–367 cluster drastically affects selfrenewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell Death Differ.* **19**, 232–244
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675
- Thomas-Chollier, M., Herrmann, C., Defrance, M., Sand, O., Thieffry, D., and van Helden, J. (2012) RSAT peak-motifs: motif analysis in full-size ChIP-seq datasets. *Nucleic Acids Res.* 40, e31
- McLean, C. Y., Bristor, D., Hiller, M., Clarke, S. L., Schaar, B. T., Lowe, C. B., Wenger, A. M., and Bejerano, G. (2010) GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat. Biotechnol.* 28, 495–501
- Mehta, S., Huillard, E., Kesari, S., Maire, C. L., Golebiowski, D., Harrington, E. P., Alberta, J. A., Kane, M. F., Theisen, M., Ligon, K. L., Rowitch, D. H., and Stiles, C. D. (2011) The central nervous system-restricted transcription factor Olig2 opposes p53 responses to genotoxic damage in neural progenitors and malignant glioma. *Cancer Cell* 19, 359–371
- Ligon, K. L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J. A., Bachoo, R. M., Kane, M., Louis, D. N., Depinho, R. A., Anderson, D. J., Stiles, C. D., and Rowitch, D. H. (2007) Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 53, 503–517
- Thomas-Chollier, M., Hufton, A., Heinig, M., O'Keeffe, S., Masri, N. E., Roider, H. G., Manke, T., and Vingron, M. (2011) Transcription factor binding predictions using TRAP for the analysis of ChIP-seq data and regulatory SNPs. *Nat. Protoc.* 6, 1860–1869
- Sandelin, A., Alkema, W., Engström, P., Wasserman, W. W., and Lenhard, B. (2004) JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 32, D91–D94
- Khachigian, L. M., Williams, A. J., and Collins, T. (1995) Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 27679–27686
- Wang, W., Zhou, D., Shi, X., Tang, C., Xie, X., Tu, J., Ge, Q., and Lu, Z. (2010) Global Egr1-miRNAs binding analysis in PMA-induced K562 cells using ChIP-Seq. J. Biomed. Biotechnol. 10.1155/2010/867517
- Eid, M. A., Kumar, M. V., Iczkowski, K. A., Bostwick, D. G., and Tindall, D. J. (1998) Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res.* 58, 2461–2468
- Baron, V., De Gregorio, G., Krones-Herzig, A., Virolle, T., Calogero, A., Urcis, R., and Mercola, D. (2003) Inhibition of Egr-1 expression reverses transformation of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Oncogene 22, 4194–4204
- Virolle, T., Krones-Herzig, A., Baron, V., De Gregorio, G., Adamson, E. D., and Mercola, D. (2003) Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *J. Biol. Chem.* 278, 11802–11810
- Huang, R. P., Fan, Y., de Belle, I., Niemeyer, C., Gottardis, M. M., Mercola, D., and Adamson, E. D. (1997) Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int. J. Cancer* 72, 102–109
- Levin, W. J., Press, M. F., Gaynor, R. B., Sukhatme, V. P., Boone, T. C., Reissmann, P. T., Figlin, R. A., Holmes, E. C., Souza, L. M., and Slamon, D. J. (1995) Expression patterns of immediate early transcription factors in

human non-small cell lung cancer: the Lung Cancer Study Group. *Onco*gene **11**, 1261–1269

- Calogero, A., Lombari, V., De Gregorio, G., Porcellini, A., Ucci, S., Arcella, A., Caruso, R., Gagliardi, F. M., Gulino, A., Lanzetta, G., Frati, L., Mercola, D., and Ragona, G. (2004) Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma. *Cancer Cell Int.* 4, 1
- Choi, B. H., Kim, C. G., Bae, Y. S., Lim, Y., Lee, Y. H., and Shin, S. Y. (2008) p21 Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: role of early growth response-1 expression. *Cancer Res.* 68, 1369–1377
- Kim, J. W., Kim, J. Y., Kim, J. E., Kim, S. K., Chung, H. T., and Park, C. K. (2014) HOXA10 is associated with temozolomide resistance through regulation of the homologous recombinant DNA repair pathway in glioblastoma cell lines. *Genes Cancer* 5, 165–174
- Cibelli, G., Policastro, V., Rössler, O. G., and Thiel, G. (2002) Nitric oxideinduced programmed cell death in human neuroblastoma cells is accompanied by the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcription factor. *J. Neurosci. Res.* 67, 450–460
- Nair, P., Muthukkumar, S., Sells, S. F., Han, S. S., Sukhatme, V. P., and Rangnekar, V. M. (1997) Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J. Biol. Chem.* 272, 20131–20138
- Thyss, R., Virolle, V., Imbert, V., Peyron, J. F., Aberdam, D., and Virolle, T. (2005) NF-κB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J.* 24, 128–137.
- Virolle, T., Adamson, E. D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., and de Belle, I. (2001) The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat. Cell Biol.* 3, 1124–1128
- 33. Mitchell, A., Dass, C. R., Sun, L. Q., and Khachigian, L. M. (2004) Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNAzymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Res.* 32, 3065–3069
- Min, I. M., Pietramaggiori, G., Kim, F. S., Passegué, E., Stevenson, K. E., and Wagers, A. J. (2008) The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 380–391
- Ben-Chetrit, N., Tarcic, G., and Yarden, Y. (2013) ERK-ERF-EGR1, a novel switch underlying acquisition of a motile phenotype. *Cell Adh. Migr.* 7, 33–37
- Gregg, J., and Fraizer, G. (2011) Transcriptional regulation of EGR1 by EGF and the ERK signaling pathway in prostate cancer cells. *Genes Cancer* 2, 900–909
- Pagel, J. I., and Deindl, E. (2011) Early growth response 1: a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian J. Biochem. Biophys.* 48, 226–235
- Seto, M., Ohta, M., Asaoka, Y., Ikenoue, T., Tada, M., Miyabayashi, K., Mohri, D., Tanaka, Y., Ijichi, H., Tateishi, K., Kanai, F., Kawabe, T., and Omata, M. (2009) Regulation of the hedgehog signaling by the mitogenactivated protein kinase cascade in gastric cancer. *Mol. Carcinog.* 48, 703–712
- 39. Worden, B., Yang, X. P., Lee, T. L., Bagain, L., Yeh, N. T., Cohen, J. G., Van Waes, C., and Chen, Z. (2005) Hepatocyte growth factor/scatter factor differentially regulates expression of proangiogenic factors through Egr-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 65, 7071–7080
- Rupprecht, H. D., Sukhatme, V. P., Lacy, J., Sterzel, R. B., and Coleman, D. L. (1993) PDGF-induced Egr-1 expression in rat mesangial cells is mediated through upstream serum response elements. *Am. J. Physiol.* 265, F351–F360
- Mahony, S., Benos, P. V. (2007) STAMP: a web tool for exploring DNAbinding motif similarities. *Nucleic Acids Res.* 35, W253–W258



Supplementary figures and tables.

Figure S1. Strategy to identify and validate the EGR1 target genes in GSG. Flow chart showing the steps followed from the DNA libraries preparation to the selection of potential EGR1 target genes and their validations by functional approaches.

Figure S2. Visualization of ChIP-sequencing data in USCS genome browser Screen shot showing for 4 genes, the locations of EGR1 peak and the primers used in ChIPqPCR assays. The last panel shows the promoter of mir17-92 containing 3 putative EGR1 sites. Three couple of primers noted P1, P2 and P3, were used to assess the EGR1 binding on each putative EGR1 sites by ChIP-qPCR assays.

Table S1. Primer sequences used for ChIP- qPCR analysis.

Table S2. Wild type and mutated probe sequences used for EMSA analysis.

A Positive Feed-forward Loop Associating EGR1 and PDGFA Promotes Proliferation and Self-renewal in Glioblastoma Stem Cells

Nathalie Sakakini, Laurent Turchi, Aurélie Bergon, Hélène Holota, Samah Rekima, Fabrice Lopez, Philipe Paquis, Fabien Almairac, Denys Fontaine, Nathalie Baeza-Kallee, Ellen Van Obberghen-Schilling, Marie-Pierre Junier, Hervé Chneiweiss, Dominique Figarella-Branger, Fanny Burel-Vandenbos, Jean Imbert and Thierry Virolle

J. Biol. Chem. 2016, 291:10684-10699. doi: 10.1074/jbc.M116.720698 originally published online March 21, 2016

Access the most updated version of this article at doi: 10.1074/jbc.M116.720698

Alerts:

- When this article is cited
- · When a correction for this article is posted

Click here to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

http://www.jbc.org/content/suppl/2016/03/21/M116.720698.DC1.html

This article cites 41 references, 13 of which can be accessed free at http://www.jbc.org/content/291/20/10684.full.html#ref-list-1

Article n°6

"The miR-302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the Shh-Gli-Nanog network"

M. Fareh, L. Turchi, V. Virolle, D. Debruyne, <u>F. Almairac</u>, S. de-la-Forest Divonne, P.
 Paquis, O. Preynat-Seauve, K-H Krause, H. Chneiweiss, T. Virolle

Résumé

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales primitives malignes les plus fréquentes et les plus agressives. Les cellules initiatrices de gliomes (CIG) sont définies par des capacités d'autorenouvellement, de différenciation, et d'initiation tumorale. Les CIG sont impliquées dans la croissance et la récidive tumorale, et la résistance aux thérapies conventionnelles. Une stratégie efficace contre les CIG consiste à supprimer leurs caractères souches et par conséquent leur tumorigénicité. Dans cette étude, nous avons démontré que le cluster de miR-302-367 était fortement induit dans les cellules tumorales différenciées en milieu sérum. L'expression stable du cluster de miR-302-367 dans les cellules tumorales par transduction lentivirale permettait de supprimer les propriétés souches, l'autorenouvellement, et l'infiltration sur un tissu neural hôte des CIG modifiées. Les cellules exprimant le cluster de miR-302-367 n'etaient pas capables de former des tumeurs lorsque transplantées dans le cerveau de souris immunodéprimées, contrairement aux CIG contrôles. Les effets différenciant du cluster de miR-302-367 étaient médiés par une inhibition de la voie CXCR4. Nous avons démontré que l'inhibition de CXCR4 entrainait une interruption de la voie Shh-Gli-Nanog, boucle activatrice impliquée dans l'autorenouvellement et l'expression de marqueurs embryonnaires de l'état souche. En conclusion, nous démontrons que le cluster de miR-302-367 est capable de déclencher efficacement une cascade d'événements inhibiteurs conduisant à la perte des propriétés souches et tumorigéniques des CIG.

The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network

M Fareh¹, L Turchi¹, V Virolle¹, D Debruyne¹, F Almairac^{1,2}, S de-la-Forest Divonne¹, P Paquis², O Preynat-Seauve³, K-H Krause³, H Chneiweiss⁴ and T Virolle^{*,1}

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common form of primary brain tumor in adults, often characterized by poor survival. Glioma-initiating cells (GiCs) are defined by their extensive self-renewal, differentiation, and tumor initiation properties. GiCs are known to be involved in tumor growth and recurrence, and in resistance to conventional treatments. One strategy to efficiently target GiCs in GBM consists in suppressing their stemness and consequently their tumorigenic properties. In this study, we show that the miR-302-367 cluster is strongly induced during serum-mediated stemness suppression. Stable miR-302-367 cluster expression is sufficient to suppress the stemness signature, self-renewal, and cell infiltration within a host brain tissue, through inhibition of the CXCR4 pathway. Furthermore, inhibition of CXCR4 leads to the disruption of the sonic hedgehog (SHH)-GLI-NANOG network, which is involved in self-renewal and expression of the embryonic stem cell-like signature. In conclusion, we demonstrated that the miR-302-367 cluster is able to efficiently trigger a cascade of inhibitory events leading to the disruption of GiCs stem-like and tumorigenic properties.

Cell Death and Differentiation advance online publication, 1 July 2011; doi:10.1038/cdd.2011.89

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common form of primary brain tumor in adults, with a median survival rate of 14 months.¹ GBM is a highly vascularized and infiltrating tumor that can develop lesions at sites distant from the primary tumor.^{2,3} Treatments for GBM consist of surgical resection combined with radiotherapy plus temozolomide, which has been found to significantly increase survival,¹ especially in patients exhibiting epigenetic silencing of the O-6 methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene.⁴ However, this approach remains largely ineffective and leads to tumor recurrences. Failure to cure GBM has been attributed to the extensive resistance of glioma-initiating cells (GICs) to conventional cytotoxic therapies. The 'GICs hypothesis' proposes that a minority of highly tumorigenic and selfrenewing cells in the tumor bulk, are responsible for tumor initiation and behavior.⁵ The concept of tumor stem cells, originally proposed for myeloid leukemia,⁶ was subsequently shown to be valid for solid tumors as well.⁷⁻⁹ A recent report showed that GICs become vulnerable to therapies, and more importantly lose their tumorigenic ability, when they are forced to mature into a more differentiated state.¹⁰ Therefore, the identification of ways to efficiently affect GICs properties may lead to the development of new therapeutic approaches for the treatment of malignant glioma. In this context, it is crucial to investigate the mechanisms involved in GICs plasticity, which is likely the result of a tight epigenetic control of gene expression. Micro-RNAs modulate gene expression levels by promoting either inhibition of translation or mRNAs degradation. Their involvement in self-renewal and stem cells plasticity is sustained by recent studies performed in human embryonic stem cells^{11,12}

In the present study, we show that the miR 302-367 cluster is rapidly and strongly induced in GiCs undergoing serummediated suppression of stemness. This miR cluster is undetectable in self-renewing GiCs; however, when stably and constitutively expressed, it is able to suppress the stemness gene signature, self-renewal, and cell infiltration through the inhibition of the CXCR4 pathway. In addition, we show that blockade of CXCR4 signaling leads to the disruption of the sonic hedgehog (SHH)-GLI-NANOG network, which is known to be responsible for self-renewal and expression of the ES-like genes signature in glioma cancer stem cells.¹³

Results

The miR-302-367 cluster contributes to serum-mediated loss of stemness. To identify miRNAs capable of

Keywords: miRNA; self-renewal; cancer stem cells; cxcr4; infiltration

¹INSERM U898/UNSA, Cellules Souches, Développement et Cancer, faculté de médecine, av valombrose, Nice, France; ²Service de Neurchirurgie, hôpital Pasteur, CHU de Nice, Nice, France; ³Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Geneva and Department of Genetic and Laboratory Medicine, Geneva Hospital, Geneva, Switzerland and ⁴U894 Inserm/Unversité Paris-Descartes, Plasticité Gliale, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris, France *Corresponding author: T Virolle, INSERM U898/UNSA, Cellules Souches, Développement et Cancer, faculté de médecine, av valombrose, Nice 06107, France. Tel: + 049 337 7620; Fax: + 049 337 7051; E-mail: virolle@unice.fr

Abbreviations: GBM, Glioblastoma multiforme; MGMT, O-6 methylguanine-DNA methyltransferase; GICS, glioma-initiating cells; miRNA, micro ribonucleic acid; SHH, sonic hedgehog; EGF, epidermal growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IPS, inducible pluripotent stem cells Received 14.12.10; revised 20.4.11; accepted 17.5.11; Edited by R De Maria

suppressing GiCs stemness properties, we used two previously characterized GiCs primary lines,14 TG1 and TG6, and took advantage of the ability of serum to induce stem cells differentiation.14 Self-renewing TG cells were forced into a more differentiated non-stem-like state, by substituting the growth factors EGF and bFGF with 0.5% serum. After 4 days, the glial proteins GFAP and Olig2 were upregulated (Figures 1a and b) while the cells exhibited low levels of the stemness markers Oct-4. Nanog. (Supplementary Figure 1A), and of SHH clearly established as a major player in GiCs self-renewal¹⁵ (Figures 1a and b). Consistent with SHH repression, serum treatment drastically reduced clonal proliferation (Figure 1b). These results confirmed that serum-treated TG cells are an ideal system to identify molecules involved in loss of stem-like properties. Hence, we compared the human miRNA signature of selfrenewing TG1 and TG6 cells with that of 4-day serumdifferentiated cells. Three independent experiments revealed about 60 miRNAs modulated at this time point. As our goal was to identify miRNAs able to promote loss of stemness, we took into account only the most upregulated miRNAs and focused on the miR-302-367 cluster (Figure 1c) whose members (miR-302a, b, c, d, and miR-367) were exclusively expressed in serum-differentiated cells (Supplementary Figure 1B). A time course analysis revealed the induction of this cluster at day 1, a maximal expression at day 3 (Figure 1d; Supplementary Figure 1C), which was maintained up to 15 days following serum addition. Similar results were obtained using two additional GiCs primary lines, GB1 and #1056 (Supplementary Figure 1D). In order to assess miR-302-367 cluster contribution in serum-mediated suppression of stemness, we transiently transfected TG1 cells with anti-miR-302a, anti-miR302b or anti-miR-367 (Figure 1e), or with a pool of these three anti-miRs (Figure 1f). After 24 h, the cells were treated with serum. Quantitative real-time PCR (QPCR) analysis revealed that the aforementioned anti-miRs were able to reduce the expression of each miR by 50%, whether they were used individually or as a pool (Supplementary Figures 2A and B). Although individual anti-miR did not affect the differentiation process (Figure 1e), the pool was able to significantly alter the expression of GFAP, Olig2, and SHH (Figure 1f), suggesting compensatory mechanisms. These results demonstrate a functional contribution of the miR-302-367 cluster in serum-mediated suppression of stemness.

The miR-302-367 cluster promotes suppression of stemness and contributes to GiCs glial commitment. To assess the capacity of the miR-302-367 cluster to suppress stemness in the absence of serum, we cloned the genomic region containing the whole miR-302-367 cluster into a lentiviral vector. We used this construct to generate the TG1 Cluster 302 and TG6 Cluster 302#1 cell lines, which stably expressed each miR-302-367 cluster member (Figures 2a and b). As control, we used TG1 and TG6 cells expressing a non-relevant small non-coding RNA (TG1 and TG6 Ctrl cells). To assess the miR-302-367 cluster ability to trigger differentiation in the absence of serum, we cultured TG Ctrl and TG Cluster 302 cells in a minimum defined medium deprived of EGF and bFGF (NS34–), for

4 days. This medium is sufficient to maintain a stem-like state while preventing spontaneous differentiation of control cells. In these conditions, TG1 and TG6 Ctrl cells grew as nonadherent neurospheres (Figures 2a and b), while TG1 and TG6 Cluster 302 cells grew adherent and exhibited a nonstem-like differentiated phenotype (Figures 2a and b). QPCR analysis showed an increased expression of GFAP and a reduced expression of SHH in the TG1 Cluster 302 and TG6 Cluster 302#1 as compared with the Ctrl cells (Figure 2c). We then studied the expression of stemness markers by immunofluorescence. Although SHH. Oct4. Nanog. and Sox1 were clearly expressed in TG1 Ctrl cells cultured in growing medium (NS34+) (Figure 3a), they were almost undetectable in TG1 Cluster 302 cells cultured under the same conditions (Figure 3a). When TG1 Cluster 302 cells were cultured in NS34-, GFAP was strongly expressed (Figure 3b) while, unlike cells treated with serum, neuronal markers such as NeuN remained undetectable (Figure 3b). Similar results were obtained using TG6 Cluster 302#1 cells (Supplementary Figures 3A, B and C). These results demonstrate that expression of the miR-302-367 cluster is sufficient, in a context favorable for GiCs self-renewal, to promote loss of stemness markers and to contribute, in quiescent conditions, to early tumor glial fate commitment.

The miR-302-367 cluster expression drastically inhibits GiCs self-renewal and infiltration properties. The loss of stemness markers mediated by miR-302-367 cluster strongly suggests an impairment of stem-like properties. We therefore evaluated the clonal efficiency of TG1 Cluster 302 cells compared with TG1 Ctrl cells. We seeded 10 cells/ well in a 96-wells plate and considered clonal efficiency to be 100% when, after 1 month, 10 neurospheres were counted in a well. Although 80% of single TG1 Ctrl cells were able to form neurospheres, less than 10% of TG1 Cluster 302 cells were able to do so (Figure 4a). Therefore, miR-302-367 cluster inhibited clonal proliferation of more than 80% (Figure 4a). Similar results were obtained using TG6 Cluster 302#1 and TG6 Ctrl cells (Supplementary Figure 3D). Importantly, the size of the neo-formed neurospheres in TG1 Cluster 302 cells was much smaller than the one observed in TG1 Ctrl cells (Figure 4a), suggesting a reduction of the proliferation rate. To compare the cell-cycle characteristics of TG1 Cluster 302 cells with those of TG1 Ctrl cells, we analyzed their cell-cycle profiles by FACS (Figure 4b). When compared with TG1 Ctrl cells, TG1 Cluster 302 cells exhibited an accumulation of cells in the G1 phase (59.49 versus 51.76%). The lower proliferation rate of TG1 Cluster 302 cells was confirmed using proliferation assays (Figure 4c). To further assess the impact of such a growth impairment on the development of an in vitro 3D tumor-like cellular mass, we seeded TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells, previously labeled with the red fluorescent protein, on separate nylon filters in a minimum medium and under air-liquid interface conditions. After 1 month, a cellular mass can be visualized. Our results showed that TG1 Ctrl cells developed into a thick and compact tissue, whereas TG1 Cluster 302 cells failed to do so and appeared as a thin monolayer (Figure 4d). To assess TG1 or TG6 Cluster 302 cells ability to infiltrate and





Figure 1 The miR-302-367 cluster contributes to serum-mediated suppression of GiCs stemness. (a) Immunofluorescence and (b, upper panel) QPCR were used to detect SHH and the glial markers GFAP and OLIG2 expression in self-renewing or serum-differentiated TG1 cells. The lower panel of (b) represents the clonal efficiency of self-renewing and serum-treated TG1 cells. (c) Measurement of miRNAs overexpressed after 4 days of serum-mediated differentiation, by Taqman low-density arrayTLDA. The circle highlights the miR-302-367 cluster. (d) QPCR analysis of the miR-302-367 cluster at different time points (1, 2, 3, 8, and 15 days) of serum-mediated differentiation. Self-renewing TG1 cells were cultured either in their defined medium or in 0.5% serum to induce differentiation. At each time point, total RNA was extracted and expression of miR-302a, b, c, d, and 367 was determined using Taqman probe as described in the Materials and Methods section. (e) Anti-miR-302a, anti-miR-302b, anti-miR-367, or (f) a pool of the three anti-miRs were used to transiently transfect TG1 cells to determine the importance of individual or simultaneous functional inhibition of these specific miR in serum-mediated differentiation (Diff). After 4 days of transfection, SHH, GFAP, and OLIG2 expression were assessed by QPCR. siLUC was used as control

proliferate within a cerebral tissue, we used *ex-vivo* organotypic cultures of thick mouse brain slices (MBSs) (Figure 4e). We seeded red fluorescent TG Ctrl or TG Cluster 302 cells on the surface of MBSs and allowed them to

grow for 3 weeks. Our results showed a strong ability of Ctrl cells to infiltrate and proliferate within the cerebral tissue, initiating the development of a tumor-like mass in the vicinity of individual migrating cells (Figure 4e and



Figure 2 miR-302-367 cluster expression promotes a phenotype similar to that of differentiated cells. Stable primary cell lines TG1 (a) and TG6 (b) expressing the miR-302-367 cluster (TG1 Cluster 302 and TG6 Cluster 302#1) or a non-relevant small non-coding RNA construct (TG1 Ctrl and TG6 Ctrl) were generated. Relative expression of each miRNA of the miR-302-367 cluster was assessed by QPCR using Taqman probes in TG1 Cluster 302, TG2 Cluster 302#1, and their respective control cells (lower panels). Upon EGF and bFGF removal, only TG1 Cluster 302 and TG2 Cluster 302#1 cells became adherent and exhibited a morphology typical of differentiated cell (pictures on the right), while TG1 and TG6 Ctrl cells remained unchanged. (c) Expression of GFAP and SHH, in TG Cluster 302 cells compared with TG Ctrl cells was assessed by QPCR after 4 days of culture in bFGF- and EGF-depleted medium. Error bars are derived from three independent experiments





TG1 Cluster 302 in NS34+





Figure 3 Stable miR-302-367 cluster expression induces loss of stemness and upregulation of glial markers. (a) Expression of stemness markers (SHH, Oct4, Nanog, and Sox1) was evaluated by immunofluorescence in TG1 Ctrl (upper panels) or TG1 Cluster 302 cells (lower panels). Cells were cultured in growing medium containing EGF and bFGF (NS34 +), which are required for GiCs proliferation and self-renewal. (b) Expression of glioneuronal markers (GFAP and NeuN) was evaluated by immunofluorescence in TG1 Cluster 302 cells cultured either in NS34 + (left panel) or in medium depleted of EGF and bFGF (NS34-) (day 1, middle panel; day 4 right panel). Nuclei were stained with DAPI

Supplementary Figure 3E). Conversely, TG Cluster 302 cells failed to penetrate the tissue and remained on the surface of the brain slice (Figure 4e and Supplementary Figure 3E). Under certain circumstances, lack of interaction with the brain tissue even led to loss of the cells (Figure 4e; Supplementary Figure 3E). To assess the tumorigenic potential of TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells in vivo, we performed intracranial xenografts in NOD/SCID mice using either TG1 Ctrl or TG1 Cluster 302 cells stably expressing a luciferase reporter gene. Before injection, the luciferase activity was assessed by an in vitro luciferase assay and was found to be equivalent in the two cell lines. Time course analysis following the xenograft showed that while TG1 Ctrl cells induced and maintained a tumor for at least 1 month, the TG1 Cluster 302 cells failed to do so (Figures 5a and b). These results demonstrate that miR-302-367 cluster expression is sufficient to inhibit clonal proliferation and infiltration, therefore compromising GiCs tumorigenic properties.

The miR-302-367 cluster expression leads to a drastic downregulation of CXCR4/SDF1. Overexpression of CXCR4, a tumorigenic and invasiveness marker, often characterizes neural cancer stem cells as well as many other cancer cells.¹⁶ In silico analysis (Miranda, pictar vert) indicated that the CXCR4 3' UTR end as well as the 3' UTR end of its ligand CXCL12/SDF1 might be directly targeted by miR-302a, b, c, and d (Figure 6a). To assess whether this putative regulation occurs in our system, we transiently transfected TG1 cells with the miR-302-367 cluster and compared CXCR4 and SDF1 mRNA levels with those of TG1 cells transfected with a non-relevant construct. Our results indicated a strong miR-302-367 cluster-mediated inhibition of CXCR4 and SDF1 expression (Figure 6b). Accordingly, CXCR4 protein level was significantly reduced in TG1 Cluster 302 cells when compared with TG1 Ctrl cells (Figure 6e). Functional inhibition of at least two cluster members (302a and 302b) was sufficient to partially rescue CXCR4 and SDF1 expression in TG1 Cluster 302 cells



Figure 4 The miR-302-367 cluster inhibits clonogenicity and infiltrative properties of TG1 GiCs. (a) TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells were seeded at a density of 10 cells/well in a 96-wells plate and allowed to grow. After 1 month, the neurospheres were counted; 10 neurospheres/well corresponded to a clonal efficiency of 100%. Error bars are derived from three independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test: **** corresponds to a *P*-value of 4.4 10⁻¹⁸ and indicates a highly signicant difference between the clonal efficiency of TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells. The pictures below the plot show the size difference between the neurospheres formed by TG1 Ctrl cells and those formed by TG1 Cluster 302 cells. (b) The DNA content of TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells was labeled with propidium iodide. Cell-cycle profile was assessed by FACS. (c) 80 000 TG1 Ctrl (solid line) and TG1 Cluster 302 (dashed line) cells were seeded in a 35-mm diameter culture dish. The cells were then counted at each indicated time point. Error bars are derived from three independent experiments. (d) TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells stably expressing the red fluorescent protein were seeded on a nylon filter under airliquid interface conditions as described in the Materials and Methods and allowed to grow. After 1 month, the filter was embedded in paraffin and sliced. The red fluorescent protein vere seeded on the top surface of a tumor-like tissue *in vitro* only in the case of TG1 Ctrl cells. (e) TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells stably expressing the red fluorescent. Block 1 and 2 represent two independent organotypic brain slice culture of mouse brain, as described in the Materials and Methods section. Block 1 and 2 represent two findependent organotypic culture was embedded in paraffin and sliced. Cell followers 302 cells stably expressing the red fluorescent TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells seeded on the top surface of the MBS (block 2). After 1 month, each organotypic culture was embed



Figure 5 The miR-302-367 cluster inhibits tumor development *in vivo*. TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells were orthotopically implanted into the striatum of male NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd mice. Tumors were visualized (a) and their growth was quantified (b) as described in the Materials and Methods section

(Figure 6c). Similar results were obtained using TG6 Ctrl and TG6 Cluster 302#1 cells (Supplementary Figures 4A and B). To assess whether the miR-302 directly mediates CXCR4 expression, we cloned the 3'UTR region of CXCR4 mRNA and fused it to a luciferase reporter gene; this construct was then transfected in 293T cells along with synthetic miR-302a or miR-23 (used as control non-relevant miR). Our results showed a strong repression of luciferase activity in the case of miR-302a (Figure 6d). This repression did not occur in the presence of miR-23 or when using a construct corresponding to the CXCR4 3'UTR lacking the miR-302a binding site. Therefore, these results argued for a direct role of miR-302 in the regulation of CXCR4 expression. Migration assays

performed using Boyden chambers (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) further confirmed CXCR4 inhibition in TG Cluster 302 cells, as no migration was observed in these cell lines (Figure 6f and Supplementary Figure 4C). Interestingly, cell migration resumed when CXCR4 expression was restored by stable expression of a CXCR4 construct lacking the 3'UTR region (Supplementary Figure 4D). These results demonstrate that the miR-302-367 cluster promotes strong functional inhibition of the CXCR4 pathway.

CXCR4 constitutes one of the major miR-302-367 cluster targets involved in the suppression of GiCs properties. To assess the effects of CXCR4 inhibition in

2					
a	TARGETS	miR-302a	miR-302b	miR-302c	miR-302d
	Seed positiion in CXCR4 3'UTR	392-398	392-398	392-398	392-398
	Seed positiion in SDF1 3'UTR	159-167	159-167 363-369	159-167 290-296	159-167



Figure 6 The miR-302-367 cluster promotes CXCR4 functional inhibition. (a) In silico analysis revealing the position of putative miR-302-367 cluster interactions on CXCR4 and SDF1 3'UTR. (b) TG1 cells were transiently transfected either with the miR-302-367 cluster construct (Cluster 302) or with a non-relevant small non-coding RNA as control (Ctrl). After 4 days transfection, total RNA was extracted and the level of expression of CXCR4 and SDF1 mRNA was assessed by QPCR. Results are represented as relative expression compared with the Ctrl. (c) TG1 Cluster 302 cells were transfected either with a non-relevant siRNA siLUC or with a pool of anti-miR specific for miR-302a and 302b (clear miR-302a/b). Total RNA was extracted and the level of expression of CXCR4 was assessed by QPCR. The results are expressed as relative expression compared with siLUC-transfected TG1 Ctrl cells. Error bars are derived from three independent experiments. (d) 293T cells were transiently transfected with a construct expressing the luciferase gene fused to the WT CXCR4 3'UTR or lacking the miR-302 binding site along with miR-302a or the non-relevant miR-23. (e) CXCR4 protein expression was assessed by immunofluorescence in both TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells. Nuclei were stained with DAPI. (f) Boyden chambers assays were performed using TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells in the presence or absence of the CXCR4 ligand SDF1

TG1 cells, we used the non-peptide antagonist AMD3100 or an anti-CXCR4-blocking antibody to prevent the binding of ligands. Treated and untreated TG1 cells were seeded on the surface of MBSs to evaluate their infiltrative properties. Although control untreated cells strongly and deeply interacted with the brain tissue, both TG1 Cluster 302 and TG1 cells deficient of functional CXCR4 did not, and remained as non-adherent spheres (Figure 7). Importantly, analysis of paraffin sections revealed that only the control TG1 cells were able to infiltrate and migrate into the cerebral tissue (Figure 7). The fact that similar results were obtained using TG1 cluster 302 cells or TG1 cells deficient of functional CXCR4 demonstrated that the miR-302-367 cluster-mediated CXCR4 inhibition was the main regulatory mechanism required to suppress GiCs infiltrative properties. As SDF1/CXCR4 has been described as a promoter of glioma cells proliferation,¹⁷ we reasoned that the reduced clonal proliferation of TG Cluster 302 cells (Figure 4a and Supplementary Figure 3D) might be the result of CXCR4 inhibition. Therefore, we performed clonal proliferation assays, using TG1 cells cultured either in their proliferation medium or in presence of anti-CXCR4-blocking antibody. Our results showed that inhibition of the CXCR4 pathway led to a drastic loss of clonal efficiency (Figure 8a). We then investigated the molecular mechanism behind the reduction of clonal proliferation induced by CXCR4 impairment. As



Figure 7 CXCR4 functional inhibition suppresses TG1 infiltration within a cerebral tissue. TG1 Ctrl cells were pre-incubated or not with the CXCR4 inhibitor AMD3100 or with anti-CXCR4-blocking antibody for 24 h. These cells, as well as TG1 Cluster 302 cells (Cluster 302), were then seeded on the surface of a MBS. The upper panels (surface of brain slice) show cell interactions with the surface of the brain slice. The lower panels (paraffin sections) represent paraffin sections showing cells infiltration only in the control condition (Ctrl). Dashed lines mark the neural tissue boundaries. Block1 and 2 show the section of two different MBSs. The white arrows indicate the surface on which the cells were seeded. The histogram represents a measurement of the fluorescence intensity quantified using the Image J software. The values were compared with the background fluorescence measured in the same conditions in unseeded MBSs

previous reports demonstrated that the SHH-GLI1-NANOG network is crucial for glioma cancer stem cells self-renewal and tumorigenic properties,^{13,15,18,19} we assessed the expression of this gene network in TG1 cells stably expressing the miR-302-367 cluster or grown in the presence of anti-CXCR4-blocking antibody or AMD3100. QPCR analysis revealed that stable expression of the miR-302-367 cluster or functional inhibition of CXCR4 caused reduction of both SHH and GLI1 expression (Figure 8b). Consistently, while SHH and NANOG were clearly detected in control cells by immunofluorescence, they were almost

undetectable in cells with impaired CXCR4 function and in cells stably expressing the miR-302-367 cluster (Figure 8c). Consistent with the drastic loss of clonal proliferation (Figure 8e), PBK/TOPK kinase and its substrate (the histone H3 ser10), which are expressed and phosphorylated in dividing cells, were also suppressed (Figure 8f). The restoration of CXCR4 expression by stable overexpression of a CXCR4 construct lacking the 3'UTR region, rescued both SHH and NANOG protein expression, the Hedgehog pathway, 50% of PBK/TOPK, and histone H3 ser10 expression, and therefore a part of TG1 Cluster 302



Figure 8 CXCR4 functional inhibition impairs the SHH-GLI1-NANOG network leading to a drastic loss of clonal proliferation. (a) TG1 cells were treated with anti-CXCR4blocking antibody (anti CXCR4) or not (Ctrl). A clonogenical assay was then performed by seeding 10 cells/well, as described in the Materials and Methods section. In all, 10 neurospheres/well corresponded to a clonal efficiency of 100%. Error bars are derived from three independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; **** corresponds to a *P*-value of 3.4×10^{-13} and indicates a highly signicant difference between the control and treated cells. (b) SHH and GL11 mRNA expression levels were assessed by QPCR using Taqman probes in cells treated with AMD3100 or anti-CXCR4 antibody, in control cells (Ctrl), and in TG1 cluster 302 cells in which CXCR4 expression was restored by a CXCR4 construct lacking the 3'UTR sequences. (c) SHH and NANOG expression at the protein level was assessed by immunofluorescence in TG1 cells treated with anti-CXCR4 on tot (Ctrl) and in TG1 Cluster 302 cells. (d) SHH and NANOG expression at the protein level was assessed in TG1 Cluster 302 cells in which CXCR4 expression was restored by a CXCR4 construct lacking the 3'UTR sequences. (e) TG1 cells treated with anti-CXCR4-blocking antibody (anti CXCR4) or not (Ctrl), and TG1 cluster 302 cells were grown in the presence or absence of recombinant SHH protein. A clonogenical assay was performed by seeding 10 cells/ well as described in the Materials and Methods section. In all, 10 neurospheres/well corresponded to a clonal efficiency of 100%. Error bars are derived for three independent treated cells. (f) Quantification of TG1 cells treated with anti-CXCR4 or not (Ctrl) and TG1 Cluster 302 cells positive for PBK/TOPK kinase or Histone H3Ser10. (g) E2F1, CyA, and CyD1 mRNA expression were assessed in TG1 cells treated or not with anti-CXCR4 and in TG1 Cluster 302 cells positive for PBK/TOPK kinase or Histone H3Ser10. (g) E2F1, CyA, and

10

cells clonal proliferation (Figures 8b, d, e, and f). These results revealed that a functional CXCR4 pathway is necessary to maintain the SHH-GLI1-NANOG network and self-renewal properties. In addition, they revealed the strong ability of the miR-302-367 cluster to disrupt the SHH-GLI1-NANOG network, in part through CXCR4 inhibition. We then restored SHH expression in TG1 cells either impaired for CXCR4 function or stably expressing the miR-302-367 cluster using an exogenous recombinant protein. Our results showed that exogenous recombinant SHH was able to increase clonal proliferation of cells lacking functional CXCR4 (Figure 8e), However, exogenous recombinant SHH failed to rescue clonal proliferation of TG1 cells stably expressing the miR-302-367 cluster (Figure 8e). Exogenous recombinant SHH was therefore sufficient to bypass CXCR4 inhibition, confirming the importance of this pathway in the control of self-renewal. The fact that recombinant SHH had no effect on cells stably expressing the miR-302-367 cluster suggests a strong ability of these miRs to inhibit multiple pathways involved in cell proliferation. A recent report and in silico analyses have identified various proteins involved in the regulation of cell-cycle progression - E2F1, cyclin A (CyA) and cyclin D1 (CyD1) - as direct targets of the miR-302-367 cluster.²⁰ Therefore, we assessed the expression of such proteins in TG1 lacking functional CXCR4 or stably expressing the miR-302-367 cluster. QPCR revealed that expression of the miR-302-367 cluster caused a drastic downregulation of E2F1, CyA, and CyD1 mRNA levels, whereas CXCR4 inhibition did not (Figure 8g). These results demonstrate that expression of the miR-302-367 cluster compromises both cell infiltration and self-renewal properties by inducing a cascade of inhibitory events leading to CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI1-NANOG network. In addition, they demonstrate that the miR-302-367 cluster is able to directly interfere with the expression of proteins of the cell-cycle machinery.

Discussion

GiCs represent an attractive target for the treatment of highgrade brain tumors such as GBM. A possible approach to target GiCs consists in forcing them into a more differentiated phenotype characteristic of the tumor bulk.¹⁰ We demonstrated the ability of the miR-302-367 cluster to compromise the maintenance of GiCs and to reduce their infiltration within a cerebral tissue. Stable expression of the miR-302-367 cluster was sufficient to strongly inhibit the clonogenicity of GiCs and to promote loss of stem-like proteins including Oct4 and Nanog,^{13,21} as well as Sox1 and SHH - known to be involved in adult normal neural stem cell and cancer stem cells self-renewal and maintenance.15,22-27 Consistent with our results, a previous report showed the importance of the miR-302-367 in cell differentiation by describing its role in the promotion of mesendodermal fate specification.²⁸ On the other hand, other reports described the miR-302-367 cluster as a stemness determinant in human embryonic stem cells (ESC)²⁹ and in inducible pluripotent stem cells (IPS) derived from human skin cancer cells.³⁰ In this context, the miR-302-367 promoter was transcriptionally regulated by the stemness transcription factors Oct4, Sox2, and Nanog; therefore, its expression in the ESC compartment and during early stages of mouse development was restricted.^{20,31} In GiCs, the expression of the miR-302-367 cluster occurs concomitantly with the suppression of Oct4 and Nanog, as well as with the loss of self-renewal. This suggests the existence of a mechanism distinct from that observed in pluripotent cells and particularly efficient in maintaining GiCs stem-like properties through the repression of these miRNAs. In addition, the drastic loss of the stem-like signature mediated by miR-302-367 cluster expression suggests drastic epigenetic changes, indicating that these miRNAs might exhibit powerful regulatory potential.

Our ex-vivo and in vivo models demonstrated that the miR-302-367 cluster is able to suppress GiCs infiltration and tumorigenicity. This is the most important aspect of the miR-302-367 cluster activity, as tumor glial cell infiltration represents one of the main causes of the short survival time observed in GBM. In this context, we showed that the miR-302-367 cluster affects migration and clonal proliferation through a drastic inhibition of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand SDF1. The binding of SDF1 to CXCR4 is known to trigger divergent signaling pathways such as PLC, PI3K/ AKT, and MAPK, resulting in a variety of physiological responses including gene transcription, motility, survival, and proliferation.³² Numerous studies reported that CXCR4 has a role in proliferation and motility, thereby contributing to the development of highly malignant human gliomas and to tumor aggressiveness. In addition, CXCR4 expression strongly correlates with poor survival.^{16,17,33} In GiCs, the network composed of SHH-GLI-NANOG proteins represents another important pathway involved in the regulation of proliferation, self-renewal, and expression of stemness genes.13,15,18,19 SHH-GLI signaling acts through positive regulators of proliferation such as the PBK/TOPK protein a PDZ-binding kinase involved in mitosis,³⁴ known to promote growth through the phosphorylation of histone H3 at Ser10.35,36 In this study, we demonstrated that impairment of CXCR4 function leads to the drastic repression of hedgehog signaling, therefore compromising NANOG, PBK/TOPK expression and histone H3 phosphorylation at Ser10, contributing to loss of clonal proliferation. The significant rescue of clonal proliferation mediated by exogenous recombinant SHH protein, confirms the involvement of the CXCR4 pathway in the positive regulation of the SHH-GLI1-NANOG network, and its contribution in self-renewal. These results emphasize the potential of CXCR4 functional inhibition as a therapeutic approach for GBM. Indeed, CXCR4 inhibition would prevent tumor regrowth by inhibiting vasculogenesis³⁷ while affecting GiCs stem-like and tumorigenic properties. In a context where novel strategies for GBM treatment are much needed, the miR-302-367 cluster appears therefore to be a promising therapeutic target, as it downregulates the CXCR4 pathway. This is sufficient to trigger a cascade of inhibitory events that leads to the disruption of the SHH-GLI1-NANOG network, the blockade of cell infiltration, and suppression of GiCs self-renewal and stem-like signature. Our data demonstrate that the miR-302-367 cluster is not only able to inhibit the CXCR4 pathway, but it may also directly repress the cell-cycle machinery by strongly inhibiting positive regulators such as E2F1, CyA, and CyD1, which were already described

as its putative targets.²⁰ Thus, the miR-302-367 cluster not only affects GiCs stem-like and infiltrative properties, but also specifically inhibits the cell-cycle machinery. The capacity of affecting different pathways involved in the promotion of cell proliferation diminishes the likelihood of cell adaptation and compensatory mechanisms, and therefore makes the miR-302-367 cluster an even more attractive therapeutic target.

Materials and Methods

Reagents and antibodies. Cell culture reagents, pENTR cloning kit (catalog number K2400-20), LR Clonase II (catalog number 11791-020), Superscript II reverse transcriptase (catalog number 18064-014), and Trizol were purchased from Invitrogen (Cergy Pontolse, France). Foetal calf serum was from Hyclone (Brebières, France). Hoechst 33342, U0126, TWS119, and anti-B3Tubulin antibody (catalog number CBL412-diluted 1/100°) were purchased from Sigma (Lyon, France). Anti-SHH (catalog number sc1194-diluted 1/50°) and anti-Oct4 (catalog number sc9081-diluted 1/50°) antibodies were purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Anti-Nanog (catalog number AF1997-5 µg/ml), anti-CXCR4-blocking antibody (catalog number MAB170-diluted 1/100°), anti-CXCR4 (catalog number MAB 173), and anti-Olig2 (catalog number AF2418, 10 µg/ml) antibodies were from R&D Systems. The CXCR4 chemical inhibitor AMD3100 (catalog number A5602) was purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Anti-GFAP (catalog number 2203PGF-1/200°) antibody was purchased from AbCys (Paris, France). Anti-CA (NCL-cyclin A-diluted 1/250°) was from Novocastra (Nanterre, France). Anti-NeuN (MAB377-diluted 1/150°) was from Chemicon (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Anti-PKB (ab59327diluted 1/100°) and anti-histone H3Ser10 (catalog number Ab 5176) were purchased from Abcam. Anti-species secondary antibodies coupled to Alexa 488 (diluted 1/500°) or Alexa 546 (diluted 1/500°) were purchased from Alexa (Dusseldorf, Germany). Gel/mount was purchased from Biomedia (Roskilde, Denmark). Tagman Reverse transcription microRNA kit (catalog number 4366596), Universal Taqman PCR Master Mix, Taqman low-density array (TLDA array), and Tagman probes were purchased from Applied Biosystems (Villebon sur Yvette, France). Enhanced chemiluminescence detection reagent was from BioRad (Marnes la Coquette, France).

Cell culture. The GiCs primary cell lines TG1, TG6, GB1, and #1056 were isolated from human glioblastoma.¹⁴ When kept as self-renewing GiCs, neurospheres were grown in NS34 + medium containing EGF and bFGF (DMEM-F12 1/1, glutamine 10 mM, Hepes 10 mM, Sodium bicarbonate 0.025%, N2, G5, and B27). The medium for cell differentiation (MFCS) was composed of DMEM-F12, glutamine 10 mM, Hepes 10 mM, Sodium bicarbonate 0.025%, and FCS 0.5%. In differentiation experiments, the neurospheres were dissociated and 500 000 single cells were cultured in MFCS. When necessary, the cells were incubated in NS34-minimum medium depleted of EGF and bFGF (DMEM-F12 1/1, glutamine 10 mM, Hepes 10 mM, Sodium bicarbonate 0.025%). When indicated, the cells were treated with anti-CXCR4 antibody (1–10 μ g/ml) or AMD3100 (10–100 nM).

Plasmid constructs and stable cell lines. The miR-302-367 cluster was amplified from genomic DNA by PCR (Forward primer: 5'-GGCTGAAGTCCCTG CCTTTTACCC-3'; Reverse primer: 5'-TGGCTTAACAATCCATCACCATTGC-3') and cloned into a pENTR commercial vector (Invitrogen, Life Technology, Cergy Pontoise, France). Subcloning in the 2K7 blasticidin lentiviral vector (2K7BSD) was realized by recombination in the presence of LR clonase II. Lentiviral particles were produced transfecting the 293T cell line with the 2K7BSD-Cluster mir302 or 2K7BSD-shLuc constructs along with the packaging vectors. After lentiviral infection, cell lines stably expressing the miR-302-367 cluster (TG1cluster 302 and TG6 cluster 302#1) or the control shLuc (TG1 Ctrl and TG6 Ctrl) were selected in appropriate blasticidin NBE medium (1 µg/mL) for at least 15 days. Two stable cell lines were developed from independent viral productions/infections and exhibited identical behaviors. Cells stably expressing the Red Fluorescent Protein (RFP) were obtained after 2K7BSD-RFP lentiviral particles infection. To restore CXCR4 expression, TG1 Cluster 302 and TG6 Cluster 302#1 cells were transduced with a commercially available CXCR4 lentivirus coding for a construct lacking the 3'UTR of the gene.

Immunofluorescence. Cells were grown on polylysine-coated glass slides in NBE, MFCS, or TG1-cluster-conditioned medium. At indicated time points, cells were washed twice with ice-cold PBS, fixed with methanol 5 min at -20 °C, and washed again. Blocking and hybridization were performed in PBS containing 10% FCS and 0.1% Triton X100 with the following primary antibodies: anti-SHH at 1/50° (N19), anti-Oct4 diluted 1/50° (H-134), anti-Nanog at 5 μ g/ml, anti-GFAP diluted 1/250°, anti-Olig2 at 10 μ g/ml, anti-B3tubulin diluted 1/100°, anti-CyA (1/250°), anti-PBK (diluted 1/150°), anti-CXCR4 (diluted 1/100°), or anti-NeuN (diluted 1/100°). After 1 h of incubation at room temperature, cells were washed three times with PBS and stained for 30 min at room temperature with species-specific fluorophore-coupled antibodies. At the same time, nuclei were stained with Hoechst 33 342 (1 μ g/ml). The slides were washed twice with PBS, once with distilled water, and finally mounted with gel/mount. Immunofluorescence and transmission light pictures were taken with a Nikon eclipse Ti microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France).

Clonogenical assay. Neurospheres were dissociated by gently pipeting up and down to obtain a single cell suspension. In all, 10 cells were seeded in each well of 96-wells plates in NBE/NS34 + medium containing, when indicated, anti-CXCR4-blocking antibody. After 1 month, each well was examined and the number of neurospheres/well was counted. Experiments were repeated three independent times.

Quantitative real-time RT-PCR. RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Invitrogen SARL BP 9695613). MicroRNA and mRNA expression levels were quantified by two step real-time RT-PCR. Reverse transcription steps were performed with Superscript II reverse transcriptase and Taqman Reverse transcription microRNA kit for mRNA and miRNA, respectively, following the manufacturer's instructions. Real time PCRs were performed using universal Taqman PCR Master Mix. U54 expression was used as internal control to determine the relative expression of each gene. Fold changes were estimated using the CT method. miRNA screening was performed using TAQMAN TLDA arrays (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. The results have been normalized using expression of small nucleolar RNA, according to the manufacturer's protocol. The fold changes were calculated and normalized using the CT method.

Orthotopic xenografts. TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells (2×10^5) were resuspended in 5 μ l of Hanks balanced salt solution (Invitrogen) and stereotactically implanted unilaterally into the striatum of male NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd mice (Harlan, rms.fr@harlan.com). The cells stably expressed a luciferase reporter gene, which allowed tumor detection in living animals. Two groups of five mice were injected. Cell survival and tumor growth were monitored and quantified in the living animals up to 30 days using the IVIS Lumina II system (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA).

Organotypic MBS culture. Brains were dissected from new-born mice, embedded in 4% agar-agar artificial cerebroSpinal fluid (NaCl 124 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 26 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 1.25 mM, glucose 10 mM), and cut in slices of 400 mm thickness using a vibratome. The slices were placed on a Millicell-CM (0.4μ m) culture plate, inserted and maintained under air-liquid interface conditions for more than 3 weeks without any necrosis.

Paraffin embedding. Organotypic cultures (brain slides) or tissues were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, then washed with PBS. Samples were subsequently dehydrated with the following sequence of incubations: ethanol 70% 15 min, twice; ethanol 90% 15 min; ethanol 95% 15 min; ethanol 100% 5 min, thrice; Roticlear 5 min.

Ex vivo tumorigenesis assay. About 10 neurospheres from TG1 Ctrl and TG1 Cluster 302 cells stably expressing the red fluorescent protein were seeded at the top surface of the MBS and cultured under air-liquid interface conditions for 3 weeks. Cell infiltration and growth was visualized by tracking the red fluorescent protein signal using a Nikon eclipse Ti microscope. When indicated, a drop of medium containing anti-CXCR4-blocking antibody or the chemical inhibitor AMD3100 was added to the brain slices every 4 days.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention 3161), Association Sauvons Laura, Agence Nationale pour la Recherche (ANR jeune chercheur), INSERM, UNSA, OSEO/VALORPACA. We thank Dr. Rassoulzadegan's lab (Inserm U636, F-06108 Nice, France) for their contribution in our organotypic culture model of mouse brain.

- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987–996.
- 2. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. N Engl J Med 2008; 359: 492-507.
- Shannon RP, Sayre JW, Sayre JJ. Patterns of care for adults with malignant glioma. Jama 2005; 293: 2469–2470; author reply 2470.
- Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S *et al.* Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1871–1874.
- Germano I, Swiss V, Casaccia P. Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? *Neuropharmacology* 2010; 58: 903–910.
- Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(Suppl 1): 11842–11849.
- Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. Nat Rev Cancer 2003; 3: 832–844.
- 8. Wu W 2010 Patents related to cancer stem cell research. Recent Pat DNA Gene Seq 4: 40-45.
- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 755–768.
- Piccirillo SG, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc* 2006; 5: 59–81.
- Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. Dev Biol 2004; 275: 269–286.
- Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2007; 39: 380–385.
- Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz IAA. NANOG regulates glioma stem cells and is essential *in vivo* acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *Embo J* 2010; 29: 2659–2674.
- Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J *et al.* CD133, CD15/ SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer* 2010; 10: 66.
- Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* 2007; 17: 165–172.
- Ehtesham M, Stevenson CB, Thompson RC. Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. *Neurosurgery* 2008; 63: E820; author reply E820.
- do Carmo A, Patricio I, Cruz MT, Carvalheiro H, Oliveira CR, Lopes MC. CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells. *Cancer Biol Ther* 2010; 9: 56–65.
- Shi Y, Sun G, Zhao C, Stewart R. Neural stem cell self-renewal. Crit Rev Oncol Hematol 2008; 65: 43–53.

- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. Nat Neurosci 2003; 6: 21–27.
- Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 6426–6438.
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A *et al.* An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008; 40: 499–507.
- Alcock J, Sottile V. Dynamic distribution and stem cell characteristics of Sox1-expressing cells in the cerebellar cortex. *Cell Res* 2009; 19: 1324–1333.
- Wegner M, Stolt CC. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci* 2005; 28: 583–588.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 2005; 132: 335–344.
- Elkouris M, Balaskas N, Poulou M, Politis PK, Panayiotou E, Malas S. *et al.* 2011 Sox1 maintains the undifferentiated state of cortical neural progenitor cells via the suppression of Prox1-mediated cell cycle exit and neurogenesis. *Stem Cells* 29: 89–98.
- Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, Dunbar E, Varticovski L. Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. Br J Cancer 2010; 102: 1636–1644.
- Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R10.
- Rosa A, Spagnoli FM, Brivanlou AH. The miR-430/427/302 family controls mesendodermal fate specification via species-specific target selection. *Dev Cell* 2009; 16: 517–527.
- Barroso-del Jesus A, Lucena-Aguilar G, Menendez P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle* 2009; 8: 394–398.
- Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DT, Chen DT *et al.* Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *Rna* 2008; 14: 2115–2124.
- Barroso-delJesus A, Romero-Lopez C, Lucena-Aguilar G, Melen GJ, Sanchez L, Ligero G et al. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 6609–6619.
- Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2927–2931.
- Ehtesham M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett* 2009; 274: 305–312.
- Dougherty JD, Garcia AD, Nakano I, Livingstone M, Norris B, Polakiewicz R et al. PBK/ TOPK, a proliferating neural progenitor-specific mitogen-activated protein kinase kinase. J Neurosci 2005; 25: 10773–10785.
- Park JH, Lin ML, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T. PDZ-binding kinase/T-LAK celloriginated protein kinase, a putative cancer/testis antigen with an oncogenic activity in breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 9186–9195.
- Hans F, Dimitrov S. Histone H3 phosphorylation and cell division. Oncogene 2001; 20: 3021–3027.
- Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. J Clin Invest 2010; 120: 694–705.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (http://www.nature.com/cdd)

Article n°7

"A DOCK4/beta-catenin/micro-RNA-302-367 regulatory circuitry drives glioblastoma intratumor heterogeneity by promoting cell differentiation"

D. Debruyne, L. Turchi, F. Burel-Vandenbos, S. Rekima, M. Fareh, F. Almairac, V.

Virolle, D. Figarella-Branger, N. Baeza-Kallee, P. Lagadec, P. Paquis, D. Fontaine, E. Van Obberghen-Schilling, MP. Junier, H. Chneiweiss, T. Virolle

En révision

Résumé

La compréhension des bases moléculaires de l'hétérogénéité tumorale des glioblastomes représente un enjeu important pour le développement de thérapies efficaces. Nous avons démontré dans cette étude que le cluster de miR-302-367 et l'expression de la protéine DOCK4 étaient la signature des territoires différenciés avec un indice de prolifération bas. Une forte expression de DOCK4 dans les glioblastomes humains semblait corrélée à une survie prolongée des patients. L'expression de DOCK4 et du cluster de miR-302-367 résultait d'un effet activateur inattendu de la GSK3-beta sur la beta-caténine nucléaire. Dans le noyau, beta-caténine induisait sa propre expression, ainsi que celle de DOCK4 et du cluster de miR-302-367. DOCK4 entretenait l'activité nucléaire de beta-caténine, et orchestrait ainsi une boucle activatrice de beta-caténine et du cluster de miR-302-367. La boucle DOCK4/beta-caténine/miR-302-367 joue un rôle essentiel dans la différenciation et la suppression de la tumorigénicité des CIG, et contribue ainsi à l'hétérogénéité tumorale.

A DOCK4/beta-catenin/micro-RNA-302-367 regulatory circuitry drives GBM intra-tumor heterogeneity by promoting cell differentiation

David Debruyne^{1,2,3}, Laurent Turchi^{1,2,3*}, Fanny Burel-Vandenbos^{1,2,3,4*}, Samah Rekima^{1,2,3}, Mohamed Fareh^{1,2,3}, Fabien Almairac^{1,2,3,5}, Virginie Virolle^{1,2,3}, Dominique Figarella-Branger^{6,7,8}, Nathalie Baeza-Kallee^{6,7}, Patricia Lagadec^{1,2,3}, Philippe Paquis^{1,2,3,5}, Denys Fontaine⁵, Ellen Van Obberghen-Schilling^{1,2,3}, Marie-Pierre Junier^{9,10,11*}, Hervé Chneiweiss^{9,10,11*} and Thierry Virolle^{1,2,3,12}

¹ University of Nice-Sophia Antipolis, UFR Sciences, Nice, F-06108

² CNRS, UMR7277, F-06108, France

³ Inserm, U1091, Nice, F-06108, France.

⁴ Service d'Anatomopathologie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 06107, France

⁵ Service de Neurchirurgie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 06107, France

⁶ Aix Marseille Université, Faculté de Médecine de la Timone, 13284 Marseille, France

⁷ CRO2, INSERM UMR 911, 13284 Marseille Cedex, France

⁸ Departement de Pathology, CHU de la Timone, 13385 Marseille Cedex 5, France

⁹ CNRS UMR8246 Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

¹⁰ Inserm U1130, Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

¹¹ University Pierre and Marie Curie UMCR18, Neuroscience Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard 75005 Paris France

* equal contribution

¹² correspondence should be addressed to TV: <u>Virolle@unice.fr</u>. iBV, Institut de Biologie Valrose, Université Nice Sophia Antipolis, Bâtiment Sciences Naturelles, UFR Sciences, Parc Valrose, 28, avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

Abstract

Understanding the molecular basis of intra-tumor heterogeneity in glioblastoma is a major challenge for the development of efficient therapies. We show that the miR-302-367 cluster and DOCK4 protein expression are features of differentiated tumor territories with low mitotic indexes. Their increased expression results from an unexpected stimulatory effect of GSK3-beta on nuclear beta-catenin localization. In the nucleus, beta-catenin induces its own expression as well as that of DOCK4 and the miR-302-367 cluster. DOCK4 is required for nuclear beta-catenin activity and thus orchestrates a feed-forward loop by driving nuclear beta-catenin activity and stable miR-302-367 expression, essential for cell differentiation and repression of tumorigenicity. This DOCK4 dependent signaling circuitry contributes to intra-tumor heterogeneity by maintaining the differentiated phenotype. Increased levels of DOCK4 in human glioblastomas correlates with improved patient survival thus illustrating its prognosis value for disease outcome.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common, highly aggressive and infiltrative form of primary brain tumors in adults¹, remaining incurable, and recurring inevitably². The aggressive behavior of GBM has been in part attributed to a subpopulation of stem-like cells ^{2,3} with long-term self-renewal and differentiation potential ^{4,5} which is thought to be responsible for the initiation, growth, recurrence and heterogeneity of tumors ⁶⁻⁸. One aspect of intra-tumor heterogeneity is the coexistence of mitotic clones, which harbor distinct patterns of genetic aberrations and gene expression ^{9,10}. Another aspect resides in the coexistence in variable proportions of populations of differentiated and undifferentiated tumor cells that are phenotypically and functionally different, and reside in either segregated or mixed territories. Such spatial and functional heterogeneities within individual tumors, complicate the diagnosis and the design of efficient anti-tumor therapies. Understanding how undifferentiated cells switch to a differentiated state is essential to better comprehend GBM biogenesis and plasticity. While extensive genomic studies have described the variability of genomic alterations in dividing cells ⁹⁻¹¹, the molecular mechanisms involved in the genesis of differentiated tumor territories remain to be elucidated.

We recently reported that micro-RNAs belonging to the miR-302-367 cluster were constitutively expressed in cultured differentiated GBM cells, whereas their expression is almost undetectable in self-renewing stem-like GBM cells ¹². These miRNAs commit primary stem-like GBM cells to a weakly proliferating and differentiated state, which impairs their ability to initiate tumors in vivo ¹². We postulated that the miR-302-367 cluster may contribute to intra-tumour heterogeneity by promoting a differentiated phenotype. We found that miR-302-367 expression was enriched in human GBM territories with low mitotic indexes. Using patient-derived GBM stem-like cells, we further deciphered the molecular mechanism driving miR-302-367 expression and subsequent acquisition of a differentiated phenotype. Our results reveal a novel, unexpected, feed-forward regulatory loop involving GSK3beta, beta-catenin and DOCK4.

RESULTS miR-302-367 cluster expression in human glioblastomas

Using neurosurgical samples of human GBM, we observed tumour territories enriched in differentiated tumour cells, characterized by an abundant cytoplasm, a strong expression of glial fibrillary protein (GFAP), and rarely expressing Ki67, a marker of the late phases of the cell cycle, or OLIG2 a marker of aggressive human glioma stem and progenitor cells ^{13,14} (Fig. 1a). These territories coexisted with tumour areas composed of undifferentiated mitotic cells, displaying a scant cytoplasm weakly positive for GFAP but rather frequently positive for OLIG2 (Fig. 1a). To better understand the molecular mechanism involved in such functional intra-tumor heterogeneity, we searched for a possible enrichment in miR-302-367 cluster expression in differentiated GBM territories, using a set of 14 hand-picked tumour samples from 13 distinct GBM. Seven samples exemplified undifferentiated territories harboring cells with weak GFAP expression but frequently positive for OLIG2 and KI67 (nearly 40% of KI67 and OLIG2 positive cells), while 7 others displayed robust GFAP staining as well as a low index of proliferation (average of 5% Ki67 and OLIG2 positive cells) (Fig. 1b, c and Table 1). QPCR and in situ hybridization analysis of miR-302-367 revealed similar expression pattern of these miR and elevated GFAP levels coupled to a weak proliferation index, while they were not or poorly expressed in undifferentiated territories characterized by mitotic and OLIG2 positive cells (Fig. 1d, e, f and Table 1). These data show that miR-302-367 expression is a feature of differentiated human GBM territories.

GSK3-beta and nuclear beta-catenin are required for miR-302-367 expression in differentiated glioblastoma cells

We have previously demonstrated that incubation of GBM stem-like cells (GSC) in 0.5% fetal calf serum-containing medium promotes the induction of a differentiated non-mitotic state characterized by elevated miR-302-367 and GFAP expression ^{12,15,16}, thus mimicking the biogenesis of differentiated GBM tumour territories. Using this experimental paradigm, we next determined whether GSK3-beta, an inhibitor of Wnt/beta-catenin pathway involved in promoting self-renewal of GBM stem-like cells ¹⁷, might be a trigger of miR-302-367 cluster expression in differentiated cells. Enhanced activation of GSK3-beta, as determined by phosphorylation on tyrosine residue 216 (p-Y216-GSK3-beta), was observed in committed GSC from different patients (TG6, TG1_and GB1 cells) (**Fig. 2a, b**), while the inactive form of the kinase (phosphorylated on serine 9) remained unchanged in these conditions (**not shown**). A well-known effect of GSK3-beta activity, in the context of the canonical Wnt/beta-

catenin pathway, is to trigger the degradation of beta-catenin. In contrast, we observed that increased activation of GSK3-beta, in the context of GBM cell differentiation, led to a 2-fold increase in beta-catenin transcriptional activity, confirmed by a strong increase of its nuclear localization (Fig. 2c, d, e, f, g). This increase of nuclear beta-catenin was abolished when activated GSK3-beta was functionally invalidated using either a chemical inhibitor (TWS119) or GSK3-beta specific siRNA (Fig. 2a, b, c, d, e, f, g). Taken together, these results reveal an unexpected effect of GSK3-beta on the stimulation of beta-catenin transcriptional activity during GBM cell differentiation. Most importantly, GSK3-beta and beta-catenin invalidation during differentiation strongly reduced miR-302a, b and miR-367 expression while the rescue of beta-catenin restored their expression (Fig. 3a-c). Similar results were obtained for miR-302c and d (not shown). GSK3-beta and nuclear beta-catenin activities are therefore required for miR-302-367 expression during GBM stem-like cell differentiation. In agreement with these results, stimulation of miR-302-367 promoter activity upon differentiation was inhibited when GSK3-beta or beta-catenin were invalidated, and resumed when beta-catenin expression was restored (Fig. 3d). Computational analysis of the miR-302-367 proximal promoter revealed a span of 80 bp containing canonical TCF/LEF binding sites. Deletion of these sequences (miR-302-prom DEL) was sufficient to totally repress the beta-cateninmediated promoter induction (Fig. 3e). Chromatin immunoprecipitation (ChIP-PCR) assays using antibodies against beta-catenin provided further evidence for binding of beta-catenin to the miR-302-367 promoter. A strong enrichment in miR-302-367 proximal promoter was observed only in conditions in which nuclear beta-catenin was abundant (Fig. 3f-h). Taken together, these results demonstrate that nuclear beta-catenin is crucial for the direct transcriptional induction of the miR-302-367 cluster.

GSK3-beta and nuclear beta-catenin activity are required for induction and maintenance of GBM stem-like cell differentiation

GBM stem-like cell differentiation results in profound morphological and functional changes, such as increased adhesion, growth arrest, repression of the stemness markers SOX2 and NANOG and induction of glial fibrillary acidic protein (GFAP) ^{12,15,16,18}. Inhibition of GSK3-beta or beta-catenin during serum-differentiation strongly affected the morphological changes (**Fig. 4a**), the repression of SOX2 and NANOG (**Fig. 4b, c**), GFAP induction (**Fig. 4d**) and the

arrest of mitosis (**Fig. 4e**). All of these typical features of cell differentiation were restored upon the rescue of beta-catenin expression (**Fig. 3a, b, c, d, e**).

We next explored the possibility that GSK3-beta/nuclear beta-catenin activity might account for maintenance of the differentiated state. Inhibition of GSK3-beta or nuclear beta-catenin activity after 8 days of differentiation was sufficient to repress miR-302-367 cluster expression (**Fig. 4f**). Remarkably, the adherent differentiated cells underwent significant morphological changes culminating in the formation of floating neurospheres (**Fig. 4g**) expressing NANOG and SOX2 (**Fig. 4h**). A drastic drop in GFAP expression further confirmed the loss of the differentiated phenotype (**Fig. 4i**). Our results demonstrate that GSK3-beta and nuclear beta-catenin activities do not only initiate GBM stem-like cell differentiation but also are crucial for the maintenance of the differentiated state.

Dock4 is required for beta-catenin transcriptional activity, miR-302-367 expression and GBM stem-like cell differentiation

To obtain further insights into the molecular mechanisms involved in maintaining nuclear beta-catenin activity in differentiated cells, we performed a transcriptome analysis of TG1 and TG6 cells differentiated, or not, in presence or absence of the GSK3-beta inhibitor TWS119. DOCK4, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Rac, was significantly upregulated during differentiation and repressed by GSK3-beta blockade (not shown). We focused on this gene since interaction of DOCK4 with GSK3-beta and the beta-catenin degradation complex has previously been shown to prevent beta-catenin degradation ¹⁹. The increase in DOCK4 mRNA levels in differentiated cells coincided with an increased expression of the protein, as compared to self-renewing cells in which it was barely detectable (Fig. 5a, **b**). As expected, either inhibition of GSK3-beta or of beta-catenin activity strongly repressed DOCK4 expression (Fig. 5a, b), and DOCK4 levels could be restored with exogenous betacatenin (Fig. 5a). Therefore, DOCK4 expression is intimately linked to GSK3-beta and nuclear beta-catenin activities. To determine whether DOCK4 affects nuclear beta-catenin activity in differentiated cells, we performed its depletion using two different siRNA sequences (Fig. 5a, b). DOCK4 silencing resulted in a drastic drop in beta-catenin mRNA expression, with a considerable loss of beta-catenin transcriptional activity (Fig. 5c, d). The fact that nuclear beta-catenin activity was required for both DOCK4 and its own expression, suggests the existence of a positive feedback loop. We assessed the ability of beta-catenin to bind to the 5' regulatory sequences of DOCK4 and beta-catenin genes chromatin by immunoprecipitation assays (ChIP). QPCR analysis using primers spanning putative TCF/LEF cis-acting elements of both promoters displayed significant enrichment in anti-beta-catenin immunoprecipitates, as compared to control IgG. This enrichment was further increased by the differentiation process (Fig 5e, f, g, h). This result demonstrates the recruitment of betacatenin to the DOCK4 promoter as well as to its own promoter. By enhancing nuclear betacatenin activity, DOCK4 represents a key component of this regulatory network. Indeed, silencing of DOCK4 impaired miR-302-367 cluster expression (Fig. 6a, b, c), which was restored by the rescue of beta-catenin expression. Accordingly, the differentiation process was also altered, as indicated by the persistence of NANOG and SOX2 expression, as well as the lack of GFAP induction in serum-treated cells (Fig. 6d, e, f) and the alteration of the adherent morphology of differentiated cells (Fig. 6g). In addition, the strong inhibition of cell proliferation, observed following serum-differentiation, was significantly impaired when DOCK4 was silenced (Fig. 6h). These findings confirm that DOCK4 is an important constituent of the GSK3-beta/beta-catenin signalling network, conferring a non-proliferating and differentiated phenotype to glioblastoma cells. To extend these results to the status of the original tumor, we isolated stem-like and differentiated cells from fresh GBM surgical resections (n=4) using a combination of three stem-cell markers CD133, CD15 and CD44. The negative and positive populations displayed an inverse correlation between GFAP and OLIG2 expression (Fig. 7a) confirming the enrichment in stem/progenitor or differentiated cells. According to our results, the CD133+/CD15+/CD44+ population expressed significantly less DOCK4, beta-catenin and miR-302-367 and displayed less nuclear beta-catenin activity as compared to the CD133-/CD15-/CD44- population (Fig. 7a and b). Importantly, GSK3-beta, beta-catenin and DOCK4 silencing in the negative population strongly impaired miR-302-367, DOCK4, GFAP and beta-catenin expression, as well as nuclear beta-catenin activity and conversely induced OLIG2 expression (Fig. 7c - f). Altogether these results demonstrate that DOCK4-dependent signaling is crucial for conferring a differentiated phenotype to GBM cells, and is instrumental in the genesis of intra-tumor heterogeneity.

DOCK4 protein is expressed in differentiated and weakly proliferating territories of GBMs

In order to provide insights into the effect of DOCK4 expression on the outcome of GBM progression, we forced its expression in self-renewing cells (Fig. 8a). In that context, DOCK4

expression impaired the formation of neurospheres and totally abrogated their clonal proliferation (Fig. 8b). Accordingly the DOCK4 expressing cells (GB1 DOCK4 or GB8 DOCK4) lost their tumorigeneic properties when injected in the brain of immunocompromised mice while their control counterparts (GB1 CTL or GB8 CTL) developed as infiltrating tumors within 3 months following injection (Fig. 8c, d, e, f). We next assessed the endogenous DOCK4 expression profile in the tumors arising from orthotopic injection of GB1 cells. Specific human vimentin staining allowed visualization of the large infiltrating tumors in mice brains (Fig. 8g). Consistent with our observations from human GBM samples, the intensity of GFAP staining defined two distinct territories, GFAP high and GFAP low, also characterized respectively by a higher proliferation index coupled to an enrichment in OLIG2 positive cells and a lower proliferation index coupled to fewer OLIG2 positive cells (Fig. 8h). According to its role in conferring a more differentiated and weakly proliferating phenotype to GBM cells, DOCK4 expression was localized to the tumor area characterized by high GFAP expression (Fig. 8h). In human GBM, DOCK4 expression was frequently observed (52% of GBM cases) as determined using a tissue microarray of 130 primary human GBM samples. Twenty-four tissue dots (19% of the total population) contained less than 10% DOCK4-positive cells (median=4%), while 43 (33% of the total population) contained more than 10% DOCK4 positive cells, with a median of 23% (supplemental Table 1). In addition DOCK4 expression was similar in classical, mesenchymal and proneural GBM subtypes ²⁰, while it remained slightly but significantly lower in the neural subtype (Fig. 9h). To gain further insights into DOCK4 localization within the tumor, we performed immunostaining on whole tissue sections from 5 different cases of GBM (Fig. 9a - g). Strong DOCK4 expression was observed only in territories containing a majority of cells with high cytoplasmic/nucleus ratio and intense GFAP staining (Fig. 10a - g). We next confirmed the tight correlation between DOCK4 expression and differentiated tumor cells on the 14 human GBM samples analyzed in Figure 1. DOCK4 expression clearly discriminated samples that displayed high GFAP expression and a low number of KI67 and OLIG2 positive cells (Fig. 9i, j). In addition and consistent with our in vitro results, analysis of the tumor samples clearly linked DOCK4 to the miR-302-367 cluster expression (Fig. 9k). To further demonstrate that DOCK4 was not or rarely expressed in undifferentiated cells, we analyzed DOCK4 and SOX2 as well as DOCK4 and OLIG2 coexpression by immunofluorescence staining of paraffin-embedded sections from 10 different GBM patients. Remarkably, positive DOCK4 cells were, in their vast majority, negative for SOX2 and OLIG2 staining (Fig. 9I and supplemental Table 2) indicating exclusion between DOCK4 expression and stemness features. In addition, identical exclusion between DOCK4 and the well-known mitosis marker histone H3p-S10 further demonstrated that DOCK4 positive cells in the tumor did not proliferate (Fig. 9I and supplemental Table 2). Accordingly, the median survival of patients displaying higher DOCK4 expression was significantly greater, with a gain of 3 months compared to patients having lower DOCK4 level (Fig. 9m).

DISCUSSION

The coexistence of functionally divergent cell populations within an individual tumor is likely one of the causes of therapy failure. Delineating the mechanisms involved in the emergence of tumor-differentiated cells is essential for a better comprehension of GBM biogenesis and the startling heterogeneity of these tumors. The results presented here provide evidence for a key role of DOCK4 in promoting and maintaining a non-proliferating, indolent, differentiated state in human GBM through nuclear beta-catenin activation and expression of the miR-302-367 cluster. We demonstrate that, in an environment non-permissive for promotion of stemness, increased GSK3-beta activity drives differentiation of GBM stem-like cells and most importantly is required to maintain the efficient repression of SOX2 and NANOG, two important stemness markers associated with tumor aggressiveness and poor prognosis ²¹⁻²³. This differentiation-promoting function of GSK3-beta in GBM cells is in apparent contrast with its previously described role in maintenance of survival and stemness integrity ^{24,25}. Indeed, we also observed GSK3-beta-dependence for clonal proliferation of self-renewing GBM neurospheres in serum-free stem cell medium (supplemental Table 3). However, such functional discrepancy is likely to be context dependent but is nevertheless linked to the increased of the phospho Y216 form of GSK3-beta. Thus, effects of GSK3-beta on cell fate most certainly rely on extrinsic signals within tumors that remain to be further elucidated.

GSK3-beta is widely described as an inhibitor of the canonical Wnt/beta-catenin pathway that is frequently associated with survival and proliferation of cancer stem cells ²⁶⁻²⁸. GSK3beta is known to phosphorylate beta-catenin thus promoting its degradation by the proteasome ²⁹. In contrast to this role in preventing accumulation of beta-catenin in the nucleus, we have discovered, in differentiated GBM stem cells, that GSK3-beta is responsible for increasing expression of nuclear beta-catenin and its subsequent transcriptional activity. In that context, we demonstrated that increased nuclear beta-catenin is necessary to commit GBM cells to a differentiated state, notably by efficiently promoting the transcriptional expression of the miR-302-367 cluster. We have therefore uncovered a novel molecular mechanism responsible for cell differentiation, which involves sequential activation of GSK3-beta, nuclear beta-catenin and the miR-302-367 cluster. The stability of nuclear beta-catenin appears crucial to constitutively activate the process. It has been previously shown that DOCK4 protein, a guanine nucleotide exchange factor for Rac, stabilizes cellular beta-catenin levels by interacting with the beta-catenin degradation complex composed of Adenomatosis Polyposis Coli (APC), Axin and GSK3-beta proteins ¹⁹. While DOCK4 expression has been correlated with preferential allelic amplification in GBM ³⁰, its regulation and its function in these tumors are still poorly described. Interestingly, we have shown here that in differentiated GBM cells, DOCK4 mRNA and protein expression are strongly dependent on both GSK3-beta activation and beta-catenin transcriptional activity. We further demonstrated that beta-catenin is able to directly bind not only to the 5' regulatory sequences of the DOCK4 gene, but also to its own regulatory sequences. We demonstrated that DOCK4 is necessary for beta-catenin expression and transcriptional activity. Consequently, loss of DOCK4 strongly impairs the differentiation process and consequent loss of proliferation while its expression blocks clonal proliferation, the ability to form non-adherent neurospheres and tumors in an orthotopic xenograft model. Thus by increasing DOCK4 levels, beta-catenin drives an efficient feed-forward loop that leads to increase and maintain its own constitutive nuclear activity. This GSK3-beta-dependent mechanism shares with the canonical WNT signalling the capacity to stabilize nuclear betacatenin. However, its functional consequences differ. As opposed to the pro-tumoral behaviour of beta-catenin in CSCs when stabilized by the WNT pathway ¹⁷, GSK3-beta/betacatenin signalling is essential for induction, through the miR-302-367 cluster, of a stable differentiated and non-proliferating phenotype.

As for other tumors, the degree of differentiation may be a valuable parameter for GBM prognosis but its accurate evaluation is challenged by intra-tumoral heterogeneity. In this context, we found in GBM samples that miR-302-367 and DOCK4 protein are promising biomarkers as their expression is restricted to differentiated cells. The interest of the prognosis value of DOCK4 expression on patient outcome is exemplified by a better survival

10

of patients displaying higher levels of DOCK4 expression. The DOCK4-dependent signaling network we describe in this study influences therefore GBM progression by generating intratumor heterogeneity. In addition to being tractable biomarkers, miR-302-367 and DOCK4 protein could provide a basis for novel therapeutic approaches to combat tumor progression no longer based on cytotoxicity, which can induce an aggressive phenotype ³¹, but rather on the promotion of differentiated indolent tumor cells.

METHODS

Cell culture

Primary culture of TG1, TG6, GB1, GB8 (isolated from surgical resection of human glioblastomas) has been performed in NS34+ medium (DM for defined medium) as described elsewhere ^{12,15,16}. For differentiation experiments, neurospheres were dissociated and 5×10⁵ cells were seeded in MFCS medium (DMEM-F12, Glutamine 10 mM, Hepes 10 mM, sodium bicarbonate 0.025%, FCS 0.5%). When indicated, cells were treated with either the chemical inhibitors TWS119 (5uM) (Merck Milipore # 361554) or PKF115-584 (1 uM) (kindly provided by Doctor Enzo Lalli). HEK cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS.

Where indicated, fresh GBM cells were dissociated from non-necrotic cores and the periphery of surgical resections as previously described ¹⁵ and separated using magnetic beads coupled to anti-CD15 (anti-CD15 MicroBeads human; 130-046-601), anti-CD133 (anti-CD133 MicroBeads human ref 130-050-801) and anti-CD44 (anti-CD44 MicroBeads (130-095-194), (Miltenyi Biotec GmbH Friedrich-Ebert-Straße 68 51429 Bergisch Gladbach, Germany). CD15+/CD44+/CD133+ and CD15-/CD44-/CD133- populations were lysed for gene expression analysis. Where indicated, the negative population was incubated in OPTIMEM (Invitrogen) and transfected with the appropriate siRNA for 24 hours. For experiments lasting 72h, the negative cells were placed in DMEM (Invitrogen) supplemented with 0.5% FCS.

Plasmid constructs

The promoter of the miR302 cluster was amplified from genomic DNA by PCR (Forward primer 5'-GGCTGAAGTCCCTGCCTTTTACCC-3'; Reverse primer 5'-TGGCTTAACAATCCATCACCATTGC-3'). This fragment was cloned into pENTR vector (Gateway Technology Invitrogen) to obtain pENTR-pmiR302 and finally cloned in the gateway adapted

11
pGl3 basic luciferase vector (Clontech) by LR recombination to yield the 302-prom luciferase construct. To generate the 302-prom-del construct, 87 bp spanning the TCF/LEF binding sites (position -588 to -501), were deleted using the Quick-Change technology from the 302-prom construct. The pBeta-cat plasmid (mYhBCATf) encoding a non-degrable form of beta-catenin was kindly provided by Dr Andreas Schedl. Subcloning of penter-DOCK4 (OriGene Technologies) in the 2K7 blasticidin lentiviral vector (2K7BSD) was performed by recombination in the presence of LR clonase II. Virus production and cell transductions have been carried out as previously described ^{12,16}.

Tissues

Following patient consent, 22 Glioblastoma samples from adult patients (>20 years old) were obtained from surgical resections (Neurosurgery Department, Pr P Paquis, CHU NICE Hospital, France). The tumors have been subjected to multisampling (Dr F Burel-Vandenbos, Pathology Department, Pr JF Michiels, CHU NICE Hospital). A cohort of 14 different samples has been thus established. Each sample was divided in two pieces, one was snap frozen and dedicated to gene expression analysis and the second was fixed in 10% formalin and paraffin-embedded in order to create a mirror block for immunohistochemistry and in situ hybridization.

Tissue microarrays (TMA) comprising 130 GBM were constructed from routinely processed formalin-fixed paraffin-embedded tumor material. Areas of viable and representative tumor following review of all blocks were marked by a pathologist (DFB) prior to inclusion in the TMA (3 x 0.6 mm cores for each tumor).

Immunohistochemistry

Morphologic examination was performed on Hematoxylin and Eosin stained sections (3-4 μ m). Immunolabeling was performed using a DAKO automat with the following primary antibodies: anti-DOCK4 (R6Y, Santa Cruz Biotechnology, Catalog number sc-100718) diluted 1/100, anti-MIB-1 (DAKO, Catalog number IR62661) prediluted, and anti-GFAP (DAKO, Catalog number Z033401) diluted 1/4000. Deparaffinization, rehydration and antigen retrieval were performed using the pretreatment module PTlink (Dako). Five μ m sections of formalin-fixed paraffin-embedded TMA were tested for the presence of DOCK4 ((R6Y, Santa Cruz Biotechnology, Catalog, using a Benchmark Ventana

autostainer (Ventana Medical Systems SA, Illkirch, France). All TMA slides were simultaneously immunostained in order to avoid inter-manipulation variability. Immunostaining was scored by a pathologist (DFB).

Immunofluorescence

Cells were seeded on polylysine-coated glass slides in NS34+ medium or MFCS. At the indicated time, cells were fixed with methanol 5min at –20°C. Blocking and hybridization were performed in PBS containing 10% FCS and 0.1% Triton X100 with the following primary antibodies : anti-Nanog (R&D Systems, Catalog number AF1997) diluted 1/50, anti-Sox2 (H-65, Santa Cruz Biotechnology, Catalog number sc-20088) diluted 1/50, anti-GFAP (AbCys, Catalog number 2203PGF) diluted 1/100 or anti-beta-catenin (Cell Signaling Technology, Catalog number #9562) diluted 1/100. Species-specific fluorophore-coupled antibodies were from Invitrogen (Alexa 488 or Alexa 546). Images were taken with a Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon) equipped with a Nikon Digital Sight camera.

miRNA in situ Hybridization

Experiments were carried out with the miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit (FFPE) as indicated by Exiqon (Exiqon A/S Skelstedet). Briefly, sections of paraffin-embedded glioma samples (selected from the database of the Department of Pathology, CHU-Nice) were deparaffinized in xylene, hydrated in successive ethanol baths (99% to 70%) and rinsed in PBS. Rehydrated sections were treated with proteinase K (15µg/ml) for 10 min at 37°C and washed with PBS. Slides were dehydrated in ethanol (70%-99%) and air dried. Slides were hybridized with hsa-miR-18a*miRCURY LNA detection probe (ref 38781-15, Exiqon) at a final concentration of 10nM at 55°C in a humidified chamber then washed by successive incubations with 5xSSC to 0.2xSSC. Slides were then incubated with anti-DIG antibody diluted at 1/800 in the blocking solution for 1 hour at room temperature then washed with 0.1% Tween PBS. Slides were then incubated with NBT-BCIP alkaline phosphate substrate containing 0.2 mM levamisol, for 1 hour at 37°C to reveal anti-DIG antibody and double DIG miRCURY LNA probe immuno-complexes. Nuclei were stained with Nuclear fast red then slides were dehydrated and mounted with mounting medium (Eukitt, Sigma-Aldrich).

Quantitative real time RT-PCR

RNAs were extracted using Trizol reagent. MicroRNA and mRNA expression levels were quantified by real-time two step RT-PCR. Reverse transcription steps were performed with Superscript II reverse transcriptase and Taqman Reverse transcription microRNA kit (ref 4366596, Invitrogen) for mRNA and miRNA, respectively, accordingly to the manufacturer's instructions. Real time PCR was performed with universal Taqman PCR Master Mix (Invitrogen). The expression of each gene was determined relative to U54 expression or GAPDH as internal control. The fold stimulation was calculated using the $\Delta\Delta$ CT method.

Western blot analysis

Total proteins were extracted from TG1, TG6, GB1 at the indicated times, culture conditions and treatment (buffer: 50 mM Tris-Hcl ph7.6, 150mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0,1% SDS). After migration on SDS–polyacrylamide gels, proteins were transferred to Immobilon P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and probed with primary anti-B-Cat (Cell Signaling Technology, Catalog number #9562) diluted 1/500, anti-total GSK3B (27C10, Cell Signaling Technology, Catalog number #9315) diluted 1/1000, anti-phospho Tyrosine p-GSK3B (Tyr 216) (Santa Cruz Biotechnology, Catalog number sc-135653) diluted 1/200, anti-DOCK4 (R6Y, Santa Cruz Biotechnology, Catalog number sc-100718) diluted 1/200, and anti-Actin (C-11, Santa Cruz Biotechnology, Catalog number sc-1615) diluted 1/1000. Signal acquisition was performed using the ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad). Quantification was determined using Image J software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Transient reporter assays

Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Catalog number 11668-019) was used for transfections, according to the manufacturer's instructions. Cells were seeded at a density of 10⁵ cells per well in a 24-well plate and co-transfected with 1uL of Lipofectamine 2000 for 0.4ug of total DNA, comprising 0.2ug of the vector of interest and 0.2ug of the TopFlash reporter plasmid expressing the Firefly luciferase gene fused to 7 TCF/LEF binding sites. Luciferase activities were standardized for transfection efficiency using Renilla luciferase activity (pRL-TK Renilla luciferase reporter plasmid, PROMEGA Catalog number E2241). Reporter gene assays were performed with the Dual-luciferase reporter assay system (Promega, Catalog number E1960), according to the manufacturer's instructions. Luminescence measurements were made on a Centro XS³ LB 960 (Berthold Technologies).

ChIP assay

Cells were seeded in defined or serum containing media at a density of 10⁷ cells per 100 mm-plate. At indicated times, cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 15 minutes at room temperature. After lysis, chromatin was sheared into 200-800 bp fragments using a Branson Sonifier 150D (Branson) for 15 seconds of sonification at an input power of 3V, followed by 30 seconds off 10 times. 10uL of each sample was removed and used as the input, and 400uL was incubated with 30uL of blocked Protein G Dynabeads and with either 20uL of anti-B-Cat antibody (Cell Signaling Technology, Catalog number #9562) or normal rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Catalog number #2729) overnight at 4°C. Immunoprecipitated fragments were then analysed by real time PCR (Fast SYBRGreen Master Mix, Applied Biosystems, Catalog number 4385612) using specific primers for beta-catenin, DOCK4 and miR302 Cluster promoters ordered from Invitrogen (sequences available upon request). The method used for data normalization is the "fold enrichment" method.

siRNA Transfection

Two different sequences of stealth siRNA specific to GSK3-beta, beta-catenin and DOCK4 (from Invitrogen) were transfected in defined medium with Lipofectamine 2000, according to the manufacturer's instructions, 24h prior serum-mediated differentiation. SiRNA sequences are available upon request.

Orthotopic xenografts

Self-renewing CTL or DOCK4 expressing GB1 or GB8 cells (5 x 10^3) were resuspended in 5 μ L of Hanks balanced salt solution (Invitrogen) and stereotactically implanted unilaterally into the striatum of male NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd mice (Harlan, rms.fr@harlan.com). 76 days following injection the brains were dissected, sliced and analyzed by immunohistochemistry. All animal procedures have been approved by the local ethics committee.

Clonogenic assay

Neurospheres were dissociated by pipeting gently up and down to obtain single cells. Cells were serially diluted and seeded in 96 well plates (1 cell per well; 10 cells per well or 100

cells per well) in NS34+ medium. When indicated the cells have been treated with either the GSK3-beta TWS119 (5uM) (Merck Milipore # 361554) or nuclear beta-catenin PKF115-584 (1 uM) chemical inhibitors. After three weeks, each plate was observed and the number of neurospheres was assessed and quantified. Each novel colonies were subjected to clonal dilution assays three subsequent time.

Statistical Analysis

Student's t test (two-tailed) was used to determine the significance of differences in the data. p < 0.05 was considered to be significant. For correlation analyses between IHC expression data regarding DOCK4 and Mib1 markers, continuous variables were compared using the Mann-Whitney U test. the Chi-square test (or Fischer's exact test when one subgroup was n<5) was used to compare variables when they were scored as positive (>0) and negative (<=0) for DOCK4 with a cut-off at 30% (median value) for Mib1. All statistical tests were two-sided and the threshold for statistical significance was p= 0.05. Analyses were conducted using PASWStatistics version 17.02 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

CONFLICT OF INTEREST

There are no competing financial interests in relation to this work.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention 3161), Association Sauvons Laura, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses, « GLIOMIRSTEM project »), Fondation de France, ARC projet (SFI20111203773), INCA PLBIO2012, INSERM, UNSA. We thank A. Borderie, S. Bestrée, C. Hagnere, F. Frassinetti for their technical assistance and C. Colin for the statistical analysis. We thank Doctor Enzo Lalli for providing the PKF115-584 inhibitor and Doctor Andreas Schedl for the mYhBCATf and the TopFlash reporter plasmid.

REFERENCES

- 1 Wen, P. Y. & Kesari, S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* **359**, 492-507 (2008).
- 2 Johannessen, T. C. & Bjerkvig, R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther* **12**, 635-642, doi:10.1586/era.12.37 (2012).

- Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760 (2006).
- 4 Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-5828 (2003).
- 5 Yuan, X. *et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**, 9392-9400 (2004).
- 6 Galli, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**, 7011-7021 (2004).
- 7 Germano, I., Swiss, V. & Casaccia, P. Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: Where is the link? *Neuropharmacology* (2010).
- 8 Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**, 755-768 (2008).
- 9 Snuderl, M. *et al.* Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* **20**, 810-817, doi:10.1016/j.ccr.2011.11.005 (2011).
- 10 Sottoriva, A. *et al.* Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4009-4014, doi:10.1073/pnas.1219747110 (2013).
- 11 Sottoriva, A., Spiteri, I., Shibata, D., Curtis, C. & Tavare, S. Single-molecule genomic data delineate patient-specific tumor profiles and cancer stem cell organization. *Cancer Res* **73**, 41-49, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2273 (2013).
- 12 Fareh, M. *et al.* The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell Death Differ* **19**, 232-244, doi:10.1038/cdd.2011.89 (2012).
- 13 Fan, X. *et al.* NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* **28**, 5-16, doi:10.1002/stem.254 (2010).
- 14 Ligon, K. L. *et al.* Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* **53**, 503-517, doi:10.1016/j.neuron.2007.01.009 (2007).
- 15 Patru, C. *et al.* CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumorinitiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer* **10**, 66 (2010).
- 16 Turchi, L. *et al.* Tumorigenic Potential of miR-18A* in Glioma Initiating Cells Requires NOTCH-1 Signaling. *Stem Cells* **Jul;31(7)**, 1252-1265, doi:10.1002/stem.1373 (2013).
- 17 Gong, A. & Huang, S. FoxM1 and Wnt/beta-catenin signaling in glioma stem cells. *Cancer Res* **72**, 5658-5662, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0953 (2012).
- 18 Piccirillo, S. G. & Vescovi, A. L. Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc* **5**, 59-81 (2006).
- 19 Upadhyay, G. *et al.* Molecular association between beta-catenin degradation complex and Rac guanine exchange factor DOCK4 is essential for Wnt/beta-catenin signaling. *Oncogene* **27**, 5845-5855, doi:10.1038/onc.2008.202 (2008).
- 20 Verhaak, R. G. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98-110, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020 (2010).
- 21 Lee, M. *et al.* Prognostic impact of the cancer stem cell-related marker NANOG in ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* **22**, 1489-1496,

doi:10.1097/IGJ.0b013e3182738307 (2012).

- 22 Meng, H. M. *et al.* Overexpression of nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer biology & therapy* **9** (2010).
- 23 Nagata, T. *et al.* Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer* **21**, 96-101, doi:10.1007/s12282-012-0357-y (2014).
- 24 Korur, S. *et al.* GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma. *PLoS One* **4**, e7443 (2009).
- 25 Kotliarova, S. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res* **68**, 6643-6651, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0850 (2008).
- Farhana, L. *et al.* Adamantyl Retinoid-Related Molecules Induce Apoptosis in
 Pancreatic Cancer Cells by Inhibiting IGF-1R and Wnt/beta-Catenin Pathways. *J Oncol* **2012**, 796729, doi:10.1155/2012/796729 (2012).
- 27 Hallett, R. M. *et al.* Small molecule antagonists of the Wnt/beta-catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer. *PLoS ONE* **7**, e33976, doi:10.1371/journal.pone.0033976 (2012).
- 28 Kleppe, M. & Levine, R. L. Targeting beta-catenin in CML: leukemia stem cells beware! *Cell Stem Cell* **10**, 351-353, doi:10.1016/j.stem.2012.03.006 (2012).
- 29 Mills, C. N., Nowsheen, S., Bonner, J. A. & Yang, E. S. Emerging roles of glycogen synthase kinase 3 in the treatment of brain tumors. *Front Mol Neurosci* **4**, 47, doi:10.3389/fnmol.2011.00047 (2011).
- 30 LaFramboise, T., Dewal, N., Wilkins, K., Pe'er, I. & Freedman, M. L. Allelic selection of amplicons in glioblastoma revealed by combining somatic and germline analysis. *PLoS Genet* **6**, doi:10.1371/journal.pgen.1001086 (2010).
- 31 Dahan, P. *et al.* Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis* **5**, e1543, doi:10.1038/cddis.2014.509 (2014).

FIGURE LEGENDS

Table 1 GFAP, OLIG2, miR-302a, b, c, d or miR-367 expression and number of KI67 positive cells in each tumour examined (14 samples, * based on the intensity of staining, ** based on the number of KI67 positive cells).

Figure 1 miR-302-367 cluster is a feature of non proliferative, differentiated tumor cells. (a) Example of immunohistochemical staining of GFAP, OLIG2, and KI67 in differentiated (1) or undifferentiated (2) territories of primary human GBM (HP11-3107). Scale bar = 50 μ m. (b) Characteristic staining of GFAP and KI67 in 4 different samples of a cohort representing homogenous differentiated (upper panel) or undifferentiated (lower panel) zones of GBM. Scale = 50 μ m. (c) Average numbers of KI67 and OLIG2 positive cells in differentiated and undifferentiated samples from a selected cohort. (d) Average level of miR-302-367 cluster expression, assessed using TAQMAN QPCR in differentiated and undifferentiated samples. (e) In situ hybridization of miR-302 in undifferentiated (undiff) and differentiated (diff) territories of GBM. (f) Expression of the miR-302-367 cluster (miR-302a, b and miR-367 average expression) relative to the number of Mib1-positive cells in each sample of GBM examined.

Figure 2

GSK3-beta induces nuclear beta-catenin activity and expression of miR-302-367 cluster. Active (pY216) and total GSK3-beta protein expression were assessed by western blotting in TG6, TG1, GB1 cells (a), undifferentiated or differentiated for 24 or 48 hours and treated or not with 5µM of TWS119 (TWS). The numbers above indicate the fold ratios of protein expression relative to undifferentiated cells after normalization to the total GSK3-beta. (b) GB1 cells were transfected with non-relevant (siluc) or GSK3-beta specific siRNA (siGSK3B1 and siGSK3B2). (c) Transcriptional beta-catenin activity was assessed using the TopFlash luciferase construct in self-renewing (ND) or differentiated TG6, TG1, GB1 cells (3 days). Cells were treated (TWS) or not (wo), or transfected with non-relevant (si sima) or GSK3-betaspecific siRNA (siGSK3B1 and siGSK3B2). Luciferase activities were normalized using Renilla luciferase values (dual light system). Error bars are derived from three separate experiments. (d) Subcellular fractionation showing beta-catenin localization in undifferentiated and differentiated TG6 cells. Histone H1X was used as a control for nucleus purification. (e - f) High magnification deconvoluted immunostaining images showing the intracellular localization of beta-catenin (beta-cat) in self-renewing TG6, TG1 (e) and GB1 (f) cells (ND), 3 day differentiated (diff) and 3 day differentiated treated with TWS119 (Diff + TWS). Nuclei were stained with DAPI. (g) High magnification confocal imaging of self-renewing (ND) and 3 days differentiated (DIFF) GB1 cells, transfected or not with GSK3-beta specific siRNA (siGSK3B1).

Figure 3 Beta-catenin directly regulates the miR-302-367 cluster promoter. (**a** - **c**) miR-302a (**a**) and miR-367 (**b**) miR-302b (**c**) expression assessed by QPCR in TG6, TG1, GB1 cells depleted or not for GSK3-beta or beta-catenin activities. When indicated, cells were treated with 5 μ M TWS119 (TWS), 1 μ M PKF115-584 (PKF), an inhibitor of TCF/beta-catenin binding, or transfected with specific GSK3-beta or beta-catenin siRNA or a non-relevant siRNA (siLuc).

19

Error bars are derived from three independent experiments. (d) The miR-302-367 cluster promoter was isolated and cloned into a luciferase reporter gene as described in Materials and methods to generate the 302-prom construct. The construct was transfected in TG6 cells, undifferentiated or differentiated 3 days. When indicated, cells were treated with TWS, PKF, or not (wo), or co- transfected with a non-relevant siRNA (sictl) or specific beta-catenin siRNA (sibcat1 and sibcat2). Knockdown of beta-catenin was rescued by the co-transfection of the mYhbCATf plasmid construct (sibcat1+pbcat and sibcat2+pbcat). Values are expressed as a ratio between differentiated and undifferentiated conditions. (e) 302-prom and a deleted construct lacking the 87 bp region containing canonical TCF/LEF binding sites (302prom-del) were co-transfected in HEK or in TG6 along with the mYhBCATf or pcDNA3 as control. Values are expressed as a ratio between mYhBCATf and pcDNA3. Error bars are derived from three independent experiments. (f - h) ChIP-PCR experiments were performed to assess the binding of beta-catenin to the endogenous miR-302-367 cluster promoter (302prom). TG6 cells were transfected with mYhBCATf construct (pbcat) or pcDNA3 as control (f) or differentiated 3 days (g). Similar experiments have been performed using TG1 and GB1 (h). The fold enrichment is expressed as the ratio of specific Ig beta-cat to non relevant IgG. The position of primers at the boundary of TCF/LEF binding sites in the miR-302-367 cluster proximal promoter is indicated below. Error bars are derived from two independent experiments.

Figure 4 GSK3-beta and Beta-catenin are required for GSC differentiation. Cells are undifferentiated (ND) or three days differentiated (Diff). Differentiated cells were transfected or not with a non-relevant siRNA (sictl) or specific siRNA to GSK3-beta or beta-catenin (siGSK3b1, siGSK3b2 and sibcat1, sibcat2 respectively). When indicated, the rescue of beta-catenin expression was performed by co-transfecting the mYhBCATf construct (sibcat1+pbcat). (a) Phase contrast images illustrating the differences of cell morphology (TG6). (b) NANOG expression assessed at protein level by immunofluorescence. The nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 50µm. Values represent the % of Nanog positive cells (5 independent fields). (d) GFAP expression assessed by QPCR in TG6, TG1 and GB1 cells invalidated or not for GSK3-beta or beta-catenin activities. When indicated the

cells were treated with 5µM of TWS119 (TWS), 1µM of an inhibitor of TCF/Beta-catenin binding PKF115-584 (PKF) or transfected with specific GSK3-beta (siGSK3B1, siGSK3B2) or beta-catenin (sibcat1, sibcat2) siRNA or a non relevant siRNA (siLuc). Where indicated, the rescue of beta-catenin expression was performed by co-transfecting the mYhBCATf construct (sibcat1+pbcat or sibacat2+pbcat). Error bars are derived from three independent experiments. (e) Percentage of cells in mitosis determined by the quantification of the number of Histone H3 phospho-ser-10 (H3PS10) positive cells. TG6, TG1, GB1 were either undifferentiated (ND) or differentiated 3 days. Where indicated, cells were treated with 5 μ M TWS119 (TWS), or untreated (wo). (f - i) TG6 and GB1 were differentiated for 8 days and then incubated with 5 μ M TWS119 (TWS) or 1 mM PKF115-584 (PKF). (f) miR-302a (left histogram) and miR-367 (right histogram) expression, assessed by QPCR in TG6. (g) Phase contrast images illustrating differences in cell morphology. (h) NANOG expression assessed at the protein level by immunofluorescence. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 50µm. Values represent the % of Nanog positive cells (5 independent fields). (i) GFAP expression was assessed by QPCR. Error bars are derived from three independent experiments.

Figure 5 DOCK4 expression is required for transcriptional beta-catenin activity, miR-302-367 expression and GSC differentiation. (a) DOCK4 mRNA level was detected by QPCR in TG6, TG1, GB1 cells differentiated 3 days, transfected with beta-catenin-targeting siRNA (sibetacat1, sibeta-cat2) or a non relevant siRNA (siLuc). Where indicated, the rescue of betacatenin expression was performed by co-transfecting the mYhBCATf construct (sibcat1+pbcat or sibacat2+pbcat). Error bars are derived from three independent experiments. (b) DOCK4 expression was assessed at protein level by western blotting, in TG6 and TG1 undifferentiated (ND) or differentiated with serum during 1, 3 or 5 days. When indicated the cells were treated with 5 μ M of TWS119 (TWS) or 1 μ M of PKF115-584 (PKF), or transfected with non-relevant siRNA (si sima) or two different siRNA specific to DOCK4 (siD4-1 and siD4-2). (c) beta-catenin mRNA level was assessed by QPCR in TG6, TG1, GB1, undifferentiated (ND) or differentiated 3 days. The cells were transfected with non-relevant siRNA (si sima or siLuc) or two different siRNA specific to DOCK4 (siD4-1 and siD4-2).. Error bars are derived from three separate experiments. (d) Transcriptional beta-catenin activity was assessed using the TopFlash luciferase construct in similar conditions. Luciferase activities were normalized using Renilla luciferase values (dual light system). Error bars are derived from three separate experiments. (**e** - **g**) ChIP-PCR experiments were performed to assess the binding of beta-catenin to the endogenous beta-catenin and DOCK4 proximal promoter in TG6 (**e**), TG1 (**f**), GB1 (**g**) undifferentiated (ND) or differentiated 3 days (diff 3 days). The fold enrichment corresponds to the ratio between specific beta-cat IgG and non-relevant IgG. (**h**) The position of primers at the boundary of TCF/LEF binding sites is indicated in the scheme. Error bars are derived from two independent experiments.

Figure 6 DOCK4 mediates miR-302-367 expression and cell differentiation. TG1, TG6, GB1 cells were transfected with non-relevant siRNA (siLuc) or two different siRNA specific to DOCK4 (siD4-1 and siD4-2). When indicated pBeta-cat plasmid has been transfected along with siD4 in order to restore beta-catenin expression. 24 hours later the cells were differentiated 3 days in serum. ($\mathbf{a} - \mathbf{c}$) Expression of miR-302-367 cluster was assessed by QPCR. Error bars are derived from three independent experiments. ($\mathbf{d} - \mathbf{e}$) SOX2 and NANOG expressions were assessed at protein level by immunofluorescence in TG1 (d) and GB1 (E) cells. The nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 50µm. Values represent the % of Nanog and SOX2 positive cells (5 independent fields). (f) GFAP expression assessed by QPCR in TG1, TG6, GB1 cells. Error bars are derived from 3 independent experiments. (g) Phase contrast images illustrating the differences of cell morphology (GB1) when DOCK4 was invalidated. (h) Percentage of cells in mitosis determined by the quantification of Histone H3 phosphoser-10 (H3PS10) positive cells. TG6, TG1 and GB1 were either undifferentiated (ND) or differentiated 3 days. Error bars are derived from 3 independent experiments. p value < 0.001 (***).

Figure 7 GSK3-beta/DOCK4/beta-catenin axis induces miR-302-367 cluster and GFAP expression but represses OLIG2 expression in freshly dissociated differentiated GBM cells. CD133+/CD15+/CD44+ and CD133-/CD15-/CD44- cell populations have been separated from fresh human GBM surgical resections (n=4). (a) The cells were lysed for RNA extraction and subjected to QPCR analysis. Error bars are derived from 3 independent experiments. Pvalue < 0.01 (**). (b) Transcriptional beta-catenin activity was assessed using the TopFlash luciferase construct in CD133+/CD15+/CD44+ or CD133-/CD15-/CD44-. Error bars are derived from 3 independent experiments are derived from 3 independent experiments. Pvalue < 0.001 (***). (c) CD133-/CD15-/CD44-

22

cells have been transfected with non-relevant (sLuc) or beta-catenin-specific siRNA (sibcat1). 24h latter, total RNA were extracted and subjected to QPCR analysis to assess miR-302-367 expression. Error bars are derived from 3 independent experiments. Pvalue < 0.001 (***). (d-f) CD133-/CD15-/CD44- cells have been transfected with non-relevant (sLuc), beta-catenin (sibcat1), GSK3-beta (siGSK3B) or DOCK4 specific siRNA (siD4). 72h latter, total RNA were extracted and subjected to QPCR analysis to assess miR-302-367 (d), GFAP, beta-catenin and DOCK4 expression (e). Error bars are derived from 3 independent experiments. Pvalue < 0.001 (***). (f) Transcriptional beta-catenin activity was assessed using the TopFlash luciferase construct. Error bars are derived from 3 independent experiments. Pvalue < 0.001 (***).

Figure 8 DOCK4 expression prevents clonal proliferation and correlates with strong GFAP expression in weakly proliferating and OLIG2 positive area of tumors in orthotopic xenografts. TG1, TG6, GB1, GB8 have been stably transduced with a lentivirus encoding the DOCK4 protein. (a) western blot analysis showing DOCK4 expression. (b) TG1, TG6, GB1 and GB8 cells stably over-expressing DOCK4 (DOCK4) or a non-relevant construct (CTL) were used for clonal proliferation assay as described in the method section. Values are the mean of three independent experiments. (c, d) 5X10³ GB1 and GB8 control cells (CTL) or (e, f) GB1 GB8 overexpressing DOCK4 (DOCK4) were orthotopically xenografted in and immunocompromised mice. The mice were sacrificed 76 days later. Tumor cells were revealed using a human-specific anti-vimentin antibody. (g - h) 2X10⁴ GB1 cells were orthotopically xenografted in immunocompromised mice. The mice were sacrificed three months later. (g - h) Tumor cells were revealed using a human-specific anti-vimentin antibody. Immunohistochemical analysis of GFAP, OLIG2 and DOCK4 expression in the tumor. The GFAP staining reveals zones of low (GFAP low) and high GFAP (GFAP high) staining.

Figure 9 DOCK4 expression constitutes a feature of differentiated tumor cells in human glioblastoma and correlates with better patient survival. (**a-b**) Immunohistochemical staining of DOCK4 expression in tissues composed of a majority of cells harbouring typical undifferentiated morphology with high nuclear : cytoplasmic ratio. (**c-d**) DOCK4 expression in tissues composed of a majority of cells harbouring typical differentiated morphology with

23

weak nuclear : cytoplasmic ratio. (e, f) DOCK4 expression in a human GBM samples harbouring differentiated (1) and undifferentiated (2) territories. Dash line separates the two territories. (g) GFAP expression in a human GBM samples harbouring differentiated (1) and undifferentiated (2) territories. Dash line separates the two territories. (h) relative DOCK4 mRNA expression in the four GBM subtypes of the TCGA data set. Pvalue < 0.05 (*). (i) Characteristic staining of GFAP, OLIG2 and DOCK4 proteins in 4 different samples of our cohort representing undifferentiated (ND) or differentiated (Diff) tumor zones. Scale = 50 μ m. (j) The number of DOCK4 positive cells plotted against of the number of KI67 positive cells (%) for each sample of the cohort (n=14). (k) Expression of the number of DOCK4 positive cells (%) plotted against the miR-302-367 cluster level (determined by the average between miR-302a,b and miR-367 expression) for each sample of the cohort (n=14). (I) Quantification of the percentage of mitosis (based on Histone H3-phospho-ser10 staining), SOX2 positive, OLIG2 positive and DOCK4 positive cells (based on strong intensity of staining) and percent of DOCK4 positive cells in mitosis and DOCK4/SOX2 and DOCK4/OLIG2 double positive cells, in 10 different GBM cases (500 to 800 cells have been counted). The markers have been revealed by immunofluorescence. (m) Kaplan-Meier survival curves. High and low DOCK4 expressions are defined respectively as above 2.0 and below 1.5 DOCK4 relative expression, according to the TCGA data set, n=142, Pvalue = 0,003.







HP11.7015

Debruyne et al Figure 1

HP10.642













Debruyne et al Figure 5



















silla

b



g











No SOLAX

olo mitosis

0 0,25

1

4

relative miR expression

16

Debruyne et al Figure 9

400

500

40%

20%

0% 0

100

200

days of survival

300

	GFAP *	KI67** (%)	OLIG2** (%)	miR-302a	miR-302b	miR-302c	miR-302d	miR-367	DOCK4*	DOCK4**
HP10-8078	+	31 (±2.5)	29 (±3.2)	-	-			-		0
HP11-3107	+	63.4 (±0.04)	58.7 (±2.4)	-	-			-	-	0
HP11-7015	-/+	30.6 (±4.5)	28.6 (±5.7)	-	-	-		-		o
HP11-8830	-/+	20.5 (±4.5)	24.1 (±3.4)	-	-/+	-	-	-	-	0
HP11-9890	-	43.8 (±0.27)	39.5 (±2.17)	-	-	-		-		o
HP09-9688	-/+	40.5 (±1.39)	39.7 (±2.6)	-	-			-	-	0
HP10-5785 1T2	-/+	63.7 (±0.8)	68.2 (±4.3)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+		0
HP10-642	++++	1.7 (±0.47)	4.1(±0.47)	++	++	+	+	++	++	50%
HP10-3801	+++	0	2.2(±0.23)	+++	+++	++	++	+++	++	40%
HP10-5785 2T2	++++	5.6 (±1.01)	3.4 (±1.08)	++	++	++	+	++	++	60%
HP10-7934	+++	11.8 (±0.42)	14.2 (±1.3)	++++	++++	+++	++	++++	+++	25%
HP10-11745	+++	9.45 (±0.9)	12.32 (±1.3)	++	+++	+	++	++	++++	60%
HP11-346	+++	5 (±0.4)	3.2 (±0.2)	++	+++	++	++	-/+	+++++	70%
HP11-2077	+++	4 (±1.22)	5.3(±1.4)	++++	+++	++	++	++++	++	50%

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table 1 Immunohistochemical staining of DOCK4 in 130 human GBM samples embedded in a Tissue MicroArray (TMA). The table shows the number of GBM cases expressing or not DOCK4 protein. The images show DOCK4 staining in two different tumor cores.

Supplemental Table 2 (a) Quantification of the percentage of mitosis (based on Histone H3phospho-ser10 staining), SOX2 positive, OLIG2 positive and DOCK4 positive cells (based on strong intensity of staining) and double poisitive DOCK4/SOX2 or DOCK4/OLIG2 in 10 different GBM cases (500 to 800 cells have been counted). (**b**, **c**) Representative staining of DOCK4, SOX2, OLIG2 and Histone H3-phospho-ser10 in 2 GBM cases. Nuclei were stained with DAPI. White arrows display SOX2, OLIG2 or H3-phospho-ser10 positive cells, which are negative for DOCK4.

Supplemental Table 3 GB1 cells treated or not with GSK3 inhibitor (GSK3 inhb) or betacatenin inhibitor (beta-cat inhb) were used for serial clonal proliferation assay as described in the method section. Round 1, 2 and 3 in the table correspond to three serial round of clonal proliferation.

	DOCK4 =0	DOCK4<10%	DOCK4>10%		
nbr of cases	63	24	43		
% of cases	48%	19%	33%		
Median					
% of + cells	0	4 ±1	23 ±15.5		
DOCK4<10% T	MA(1)	DOCK4>10% TMA(2)			

tumor ID	%mitosis	%SOX2*	%OLIG2*	%DOCK4*	%DOCK4* in mitosis	%DOCK4* /SOX2	%DOCK4* /OLIG2
HP10-318	7.3±3.2	5±1.2	10±1.8	19.3±1.6	0	0	0
HP11-6252	8.4±1.8	0.8±0.07	5.11±2.3	16.7±1.4	0	0	0
HP1050	15.7±3.2	25.3±3.2	34.5±1.8	8.8±1.2	0	0	1.7±0.8
HP11-11537	6.5±1.3	1.8±0.3	3.4±1.1	19.6±1.6	0	0	0
HP10-2132	6.11±2.8	1.8±0.6	7.7±1.3	16.4±0.3	0	0	0
HP10-2024	5.5±1.7	2.3±1.1	14.1±5.3	30.5±0.6	0	0	1.6±1.1
HP1024	17±3.1	11.2±2.1	27±3.4	7.6±0.8	0	0	0.3±0.1
HP11-9890	6.2±1.7	3.7±1.1	7.39±3.7	17.3±0.8	0	0	0
HP10-10112	11±2.1	7.2±1.4	21.8±2.9	10.5±1.7	0	0	1.5±0.1
HP10-12916	5±1.2	3.1±0.6	10.7±2.3	18±0.8	0	0	0.7±0.01

а



DAPI

Debruyne et al Supplemental Table 2

	Clonal proliferation efficiency (%)						
100 cells/well	round 1	round 2	round 3				
Ctl	64.33 (±2.8)	58.6 (±2.8)	55.33 (±1.7)				
GSK3-inhb	3.66 (±1.1)	0.33 (±0.4)	0				
beta-Cat-inhb	1 (±0.6)	0	0				
10 cells/well	round 1	round 2	round 3				
Ctl	61 (±5.3)	60.6 (±4.4)	58 (±3.3)				
GSK3-inhb	2.66 (±1.7)	0.6 (±0.5)	0				
beta-Cat-inhb	3 (±0.8)	0	0				
1 cells/well	round 1	round 2	round 3				
Ctl	59.6 (±4.4)	66.3 (±4.4)	62.3 (±3.7)				
GSK3-inhb	4.3 (±1.3)	0	0				
beta-Cat-inhb	3 (±1.1)	0	0				

PARTIE VII : REFERENCES

Références

- Addeo R, Caraglia M, De Santi MS, Montella L, Abbruzzese A, Parlato C, Vincenzi B, Carraturo M, Faiola V, Genovese M and others. (2011): A new schedule of fotemustine in temozolomide-pretreated patients with relapsing glioblastoma. J Neurooncol 102:417-24.
- Affronti ML, Heery CR, Herndon JE, 2nd, Rich JN, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS. (2009): Overall survival of newly diagnosed glioblastoma patients receiving carmustine wafers followed by radiation and concurrent temozolomide plus rotational multiagent chemotherapy. Cancer 115:3501-11.
- Aghili M, Zahedi F, Rafiee E. (2009): Hydroxyglutaric aciduria and malignant brain tumor: a case report and literature review. J Neurooncol 91:233-6.
- Ahmed N, Salsman VS, Kew Y, Shaffer D, Powell S, Zhang YJ, Grossman RG, Heslop HE, Gottschalk S. (2010): HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. Clin Cancer Res 16:474-85.
- Akiyama Y, Jung S, Salhia B, Lee S, Hubbard S, Taylor M, Mainprize T, Akaishi K, van Furth W, Rutka JT. (2001): Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. J Neurooncol 53:115-27.
- Almairac F, Frenay M, Paquis P. (2010): [Genetic diseases and glioblastomas]. Neurochirurgie 56:455-8.
- Almairac F, Herbet G, Moritz-Gasser S, Duffau H. (2014): Parietal network underlying movement control: disturbances during subcortical electrostimulation. Neurosurg Rev 37:513-6; discussion 516-7.
- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. (2002): Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Res Bull 57:751-8.
- Ampil FL, Nanda A, Willis BK, Apple S. (1998): Treatment in patients with glioblastoma multiforme and poor performance status: is it worthwhile? Radiat Med 16:109-12.
- Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, Rodon L, Folch G, Carmona MA, Prieto-Sanchez RM, Barba I, Martinez-Saez E, Prudkin L and others. (2010): TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. Cancer Cell 18:655-68.
- Ardon H, Van Gool SW, Verschuere T, Maes W, Fieuws S, Sciot R, Wilms G, Demaerel P, Goffin J, Van Calenbergh F and others. (2012): Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the standard of care treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma: results of the HGG-2006 phase I/II trial. Cancer Immunol Immunother 61:2033-44.
- Armulik A, Genove G, Betsholtz C. (2011): Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. Dev Cell 21:193-215.
- Arvold ND, Reardon DA. (2014): Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient. Clin Interv Aging 9:357-67.
- Asano K, Duntsch CD, Zhou Q, Weimar JD, Bordelon D, Robertson JH, Pourmotabbed T. (2004): Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. J Neurooncol 70:3-15.
- Auffinger B, Tobias AL, Han Y, Lee G, Guo D, Dey M, Lesniak MS, Ahmed AU. (2014): Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. Cell Death Differ 21:1119-31.
- Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, Chan SS, You MJ, Tang Y, DeFrances J, Stover E, Weissleder R and others. (2002): Epidermal growth factor receptor and

Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. Cancer Cell 1:269-77.

- Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. (2005): Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. Nat Rev Cancer 5:921-9.
- Bahr O, Hermisson M, Rona S, Rieger J, Nussbaum S, Kortvelyessy P, Franz K, Tatagiba M, Seifert V, Weller M and others. (2012): Intravenous and oral levetiracetam in patients with a suspected primary brain tumor and symptomatic seizures undergoing neurosurgery: the HELLO trial. Acta Neurochir (Wien) 154:229-35; discussion 235.
- Balbous A, Renoux B, Cortes U, Milin S, Guilloteau K, Legigan T, Rivet P, Boissonnade O, Martin S, Tripiana C and others. (2014): Selective release of a cyclopamine glucuronide prodrug toward stem-like cancer cell inhibition in glioblastoma. Mol Cancer Ther 13:2159-69.
- Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. (2010): [Epidemiology of glioblastoma]. Neurochirurgie 56:433-40.
- Bao S, Wu Q, Li Z, Sathornsumetee S, Wang H, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. (2008): Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. Cancer Res 68:6043-8.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. (2006): Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 444:756-60.
- Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A and others. (2007): Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. Stem Cells 25:2524-33.
- Barbarite E, Sick JT, Berchmans E, Bregy A, Shah AH, Elsayyad N, Komotar RJ. (2016): The role of brachytherapy in the treatment of glioblastoma multiforme. Neurosurg Rev.
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. (2006): Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature 439:682-7.
- Barone DG, Lawrie TA, Hart MG. (2014): Image guided surgery for the resection of brain tumours. Cochrane Database Syst Rev 1:CD009685.
- Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, Jhung S, Rhee D, Louis DN. (2004): Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. Clin Cancer Res 10:228-33.
- Bates S, Hickman ES, Vousden KH. (1999): Reversal of p53-induced cell-cycle arrest. Mol Carcinog 24:7-14.
- Bauchet L, Mathieu-Daude H, Fabbro-Peray P, Rigau V, Fabbro M, Chinot O, Pallusseau L, Carnin C, Laine K, Schlama A and others. (2010): Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004. Neuro Oncol 12:725-35.
- Bauchet L, Zouaoui S, Darlix A, Menjot de Champfleur N, Ferreira E, Fabbro M, Kerr C, Taillandier L. (2014): Assessment and treatment relevance in elderly glioblastoma patients. Neuro Oncol 16:1459-1468.
- Baylin SB, Jones PA. (2011): A decade of exploring the cancer epigenome biological and translational implications. Nat Rev Cancer 11:726-34.
- Beck B, Blanpain C. (2013): Unravelling cancer stem cell potential. Nat Rev Cancer 13:727-38.
- Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, Hau P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. (2008): CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. Brain Pathol 18:370-7.

- Belien AT, Paganetti PA, Schwab ME. (1999): Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. J Cell Biol 144:373-84.
- Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. (2004): Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. Int J Biochem Cell Biol 36:1046-69.
- Bellamkonda R, Aebischer P. (1994): Review: Tissue engineering in the nervous system. Biotechnol Bioeng 43:543-54.
- Bello L, Gallucci M, Fava M, Carrabba G, Giussani C, Acerbi F, Baratta P, Songa V, Conte V, Branca V and others. (2007): Intraoperative subcortical language tract mapping guides surgical removal of gliomas involving speech areas. Neurosurgery 60:67-80; discussion 80-2.
- Bello L, Riva M, Fava E, Ferpozzi V, Castellano A, Raneri F, Pessina F, Bizzi A, Falini A, Cerri G. (2014): Tailoring neurophysiological strategies with clinical context enhances resection and safety and expands indications in gliomas involving motor pathways. Neuro Oncol 16:1110-28.
- Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. (2008): The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. J Mol Med (Berl) 86:1025-32.
- Binder DC, Davis AA, Wainwright DA. (2016): Immunotherapy for cancer in the central nervous system: Current and future directions. Oncoimmunology 5:e1082027.
- Bloch O, Crane CA, Fuks Y, Kaur R, Aghi MK, Berger MS, Butowski NA, Chang SM, Clarke JL, McDermott MW and others. (2014): Heat-shock protein peptide complex-96 vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single-arm trial. Neuro Oncol 16:274-9.
- Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. (1994): Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A 91:2076-80.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG and others. (2005): Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 122:947-56.
- Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Benevento F, Scopece L, Mazzocchi V, Bacci A, Agati R, Calbucci F, Ermani M. (2009): Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. Cancer 115:3512-8.
- Brandes AA, Rigon A, Zampieri P, Ermani M, Carollo C, Altavilla G, Turazzi S, Chierichetti F, Florentino MV. (1998): Carboplatin and teniposide concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme: a phase II study. Cancer 82:355-61.
- Brandes AA, Tosoni A, Spagnolli F, Frezza G, Leonardi M, Calbucci F, Franceschi E. (2008): Disease progression or pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy treatment: pitfalls in neurooncology. Neuro Oncol 10:361-7.
- Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, Morozova O and others. (2015): Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. N Engl J Med 372:2481-98.
- Brell M, Ibanez J, Caral L, Ferrer E. (2000): Factors influencing surgical complications of intra-axial brain tumours. Acta Neurochir (Wien) 142:739-50.
- Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, Black K, Sisti M, Brem S, Mohr G and others. (1995): Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. Lancet 345:1008-12.

- Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, Pelicci G. (2013): CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. Stem Cells 31:857-69.
- Brescia P, Richichi C, Pelicci G. (2012): Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? J Oncol 2012:376894.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. (2002): Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Adv Drug Deliv Rev 54:631-51.
- Bronisz A, Godlewski J, Chiocca EA. (2016): Extracellular Vesicles and MicroRNAs: Their Role in Tumorigenicity and Therapy for Brain Tumors. Cell Mol Neurobiol 36:361-76.
- Brown M, Schrot R, Bauer K, Dodge J. (2009): Incidence of first primary central nervous system tumors in California, 2001-2005: children, adolescents and teens. J Neurooncol 94:263-73.
- Burel-Vandenbos F, Turchi L, Benchetrit M, Fontas E, Pedeutour Z, Rigau V, Almairac F, Ambrosetti D, Michiels JF, Virolle T. (2013): Cells with intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio are specific for infiltrative glioma: a useful marker in neuropathological practice. Neuro Oncol 15:1278-88.
- Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperierre N and others. (2006): Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. J Clin Oncol 24:2707-14.
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M and others. (2007): A perivascular niche for brain tumor stem cells. Cancer Cell 11:69-82.
- Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, Karachi C, Leclercq D, Lafon C, Chapelon JY and others. (2016): Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. Sci Transl Med 8:343re2.
- Carrabba G, Fava E, Giussani C, Acerbi F, Portaluri F, Songa V, Stocchetti N, Branca V, Gaini SM, Bello L. (2007): Cortical and subcortical motor mapping in rolandic and perirolandic glioma surgery: impact on postoperative morbidity and extent of resection. J Neurosurg Sci 51:45-51.
- Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D. (1993): Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90:7024-8.
- Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K and others. (2011): Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. Proc Natl Acad Sci U S A 108:7950-5.
- Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, Hernandez-Hermann M, Gomez L, Ye X, Weingart JD and others. (2014): Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. Neuro Oncol 16:113-22.
- Chaichana KL, Pinheiro L, Brem H. (2015): Delivery of local therapeutics to the brain: working toward advancing treatment for malignant gliomas. Ther Deliv 6:353-69.
- Chaichana KL, Zadnik P, Weingart JD, Olivi A, Gallia GL, Blakeley J, Lim M, Brem H, Quinones-Hinojosa A. (2013): Multiple resections for patients with glioblastoma: prolonging survival. J Neurosurg 118:812-20.
- Chamberlain MC, Johnston SK. (2010): Salvage therapy with single agent bevacizumab for recurrent glioblastoma. J Neurooncol 96:259-69.

- Chambless LB, Kistka HM, Parker SL, Hassam-Malani L, McGirt MJ, Thompson RC. (2015): The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. J Neurooncol 121:359-64.
- Chan TA, Weingart JD, Parisi M, Hughes MA, Olivi A, Borzillary S, Alahakone D, Detorie NA, Wharam MD, Kleinberg L. (2005): Treatment of recurrent glioblastoma multiforme with GliaSite brachytherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 62:1133-9.
- Chang SM, Parney IF, McDermott M, Barker FG, 2nd, Schmidt MH, Huang W, Laws ER, Jr., Lillehei KO, Bernstein M, Brem H and others. (2003): Perioperative complications and neurological outcomes of first and second craniotomies among patients enrolled in the Glioma Outcome Project. J Neurosurg 98:1175-81.
- Charles NA, Holland EC. (2010): TRRAP and the maintenance of stemness in gliomas. Cell Stem Cell 6:6-7.
- Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. (2012): The brain tumor microenvironment. Glia 60:502-14.
- Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. (2012): A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature 488:522-6.
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS and others. (2010): A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. Cancer Cell 17:362-75.
- Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD and others. (2013): Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. Cell 153:139-52.
- Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D and others. (2014): Bevacizumab plus radiotherapytemozolomide for newly diagnosed glioblastoma. N Engl J Med 370:709-22.
- Clarke JL, Molinaro AM, Phillips JJ, Butowski NA, Chang SM, Perry A, Costello JF, DeSilva AA, Rabbitt JE, Prados MD. (2014): A single-institution phase II trial of radiation, temozolomide, erlotinib, and bevacizumab for initial treatment of glioblastoma. Neuro Oncol 16:984-90.
- Clement V, Dutoit V, Marino D, Dietrich PY, Radovanovic I. (2009): Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. Int J Cancer 125:244-8.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F. (2014): Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. Neuron 82:545-59.
- Colin C, Voutsinos-Porche B, Nanni I, Fina F, Metellus P, Intagliata D, Baeza N, Bouvier C, Delfino C, Loundou A and others. (2009): High expression of cathepsin B and plasminogen activator inhibitor type-1 are strong predictors of survival in glioblastomas. Acta Neuropathol 118:745-54.
- Collins VP. (1999): Progression as exemplified by human astrocytic tumors. Semin Cancer Biol 9:267-76.
- Combs SE, Heeger S, Haselmann R, Edler L, Debus J, Schulz-Ertner D. (2006): Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. BMC Cancer 6:133.
- Coureau G, Bouvier G, Lebailly P, Fabbro-Peray P, Gruber A, Leffondre K, Guillamo JS, Loiseau H, Mathoulin-Pelissier S, Salamon R and others. (2014): Mobile phone use and brain tumours in the CERENAT case-control study. Occup Environ Med 71:514-22.
- Culver KW. (1993): Splice of life: genetic therapy comes of age. Sciences (New York) 33:18-24.

- Curran WJ, Jr., Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE and others. (1993): Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. J Natl Cancer Inst 85:704-10.
- Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, Lubrano V, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. (2014): Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. Cell Death Dis 5:e1543.
- Dammers R, Haitsma IK, Schouten JW, Kros JM, Avezaat CJ, Vincent AJ. (2008): Safety and efficacy of frameless and frame-based intracranial biopsy techniques. Acta Neurochir (Wien) 150:23-9.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC and others. (2009): Cancer-associated IDH1 mutations produce 2hydroxyglutarate. Nature 462:739-44.
- De Witt Hamer PC, Robles SG, Zwinderman AH, Duffau H, Berger MS. (2012): Impact of intraoperative stimulation brain mapping on glioma surgery outcome: a meta-analysis. J Clin Oncol 30:2559-65.
- Deltour I, Johansen C, Auvinen A, Feychting M, Klaeboe L, Schuz J. (2009): Time trends in brain tumor incidence rates in Denmark, Finland, Norway, and Sweden, 1974-2003. J Natl Cancer Inst 101:1721-4.
- Ding Y, Yu AQ, Wang XL, Guo XR, Yuan YH, Li DS. (2016): Forced expression of Nanog with mRNA synthesized in vitro to evaluate the malignancy of HeLa cells through acquiring cancer stem cell phenotypes. Oncol Rep 35:2643-50.
- Dirks PB, Hubbard SL, Murakami M, Rutka JT. (1997): Cyclin and cyclin-dependent kinase expression in human astrocytoma cell lines. J Neuropathol Exp Neurol 56:291-300.
- Dirks PB, Rutka JT. (1997): Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review. Neurosurgery 40:1000-13; discussion 1013-5.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999): Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 97:703-16.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2002): EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. Neuron 36:1021-34.
- Duffau H. (2008): The anatomo-functional connectivity of language revisited. New insights provided by electrostimulation and tractography. Neuropsychologia 46:927-34.
- Duffau H, Gatignol P, Mandonnet E, Peruzzi P, Tzourio-Mazoyer N, Capelle L. (2005): New insights into the anatomo-functional connectivity of the semantic system: a study using cortico-subcortical electrostimulations. Brain 128:797-810.
- Duffau H, Peggy Gatignol ST, Mandonnet E, Capelle L, Taillandier L. (2008): Intraoperative subcortical stimulation mapping of language pathways in a consecutive series of 115 patients with Grade II glioma in the left dominant hemisphere. J Neurosurg 109:461-71.
- Easaw JC, Mason WP, Perry J, Laperriere N, Eisenstat DD, Del Maestro R, Belanger K, Fulton D, Macdonald D. (2011): Canadian recommendations for the treatment of recurrent or progressive glioblastoma multiforme. Curr Oncol 18:e126-36.
- Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov IV and others. (2015): Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. N Engl J Med 372:2499-508.
- Emerich DF, Winn SR, Christenson L, Palmatier MA, Gentile FT, Sanberg PR. (1992): A novel approach to neural transplantation in Parkinson's disease: use of polymerencapsulated cell therapy. Neurosci Biobehav Rev 16:437-47.

- Emlet DR, Gupta P, Holgado-Madruga M, Del Vecchio CA, Mitra SS, Han SY, Li G, Jensen KC, Vogel H, Xu LW and others. (2014): Targeting a glioblastoma cancer stem-cell population defined by EGF receptor variant III. Cancer Res 74:1238-49.
- Esteller M, Herman JG. (2004): Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. Oncogene 23:1-8.
- Fabrini MG, Silvano G, Lolli I, Perrone F, Marsella A, Scotti V, Cionini L. (2009): A multiinstitutional phase II study on second-line Fotemustine chemotherapy in recurrent glioblastoma. J Neurooncol 92:79-86.
- Fael Al-Mayhani TM, Ball SL, Zhao JW, Fawcett J, Ichimura K, Collins PV, Watts C. (2009): An efficient method for derivation and propagation of glioblastoma cell lines that conserves the molecular profile of their original tumours. J Neurosci Methods 176:192-9.
- Fan F, Samuel S, Evans KW, Lu J, Xia L, Zhou Y, Sceusi E, Tozzi F, Ye XC, Mani SA and others. (2012): Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. Cancer Med 1:5-16.
- Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, Eberhart CG. (2006): Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. Cancer Res 66:7445-52.
- Fareh M, Turchi L, Virolle V, Debruyne D, Almairac F, de-la-Forest Divonne S, Paquis P, Preynat-Seauve O, Krause KH, Chneiweiss H and others. (2012): The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. Cell Death Differ 19:232-44.
- Favaro R, Appolloni I, Pellegatta S, Sanga AB, Pagella P, Gambini E, Pisati F, Ottolenghi S, Foti M, Finocchiaro G and others. (2014): Sox2 is required to maintain cancer stem cells in a mouse model of high-grade oligodendroglioma. Cancer Res 74:1833-44.
- Fecci PE, Ochiai H, Mitchell DA, Grossi PM, Sweeney AE, Archer GE, Cummings T, Allison JP, Bigner DD, Sampson JH. (2007): Systemic CTLA-4 blockade ameliorates glioma-induced changes to the CD4+ T cell compartment without affecting regulatory T-cell function. Clin Cancer Res 13:2158-67.
- Fenart L, Casanova A, Dehouck B, Duhem C, Slupek S, Cecchelli R, Betbeder D. (1999): Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. J Pharmacol Exp Ther 291:1017-22.
- Figarella-Branger D, Colin C, Tchoghandjian A, Baeza N, Bouvier C. (2010): [Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]. Neurochirurgie 56:441-8.
- Fogh SE, Andrews DW, Glass J, Curran W, Glass C, Champ C, Evans JJ, Hyslop T, Pequignot E, Downes B and others. (2010): Hypofractionated stereotactic radiation therapy: an effective therapy for recurrent high-grade gliomas. J Clin Oncol 28:3048-53.
- Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, Hoffman RM, Kerbel RS. (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.
- Fontaine D, Dormont D, Hasboun D, Clemenceau S, Valery C, Oppenheim C, Sahel M, Marsault C, Philippon J, Cornu P. (2000): Magnetic resonance-guided stereotactic biopsies: results in 100 consecutive cases. Acta Neurochir (Wien) 142:249-55; discussion 255-6.
- Fontaine D, Paquis P. (2010): [Glioblastoma: clinical, radiological and biological prognostic factors]. Neurochirurgie 56:467-76.
- Fontaine D, Vandenbos F, Lebrun C, Paquis V, Frenay M. (2008): [Diagnostic and prognostic values of 1p and 19q deletions in adult gliomas: critical review of the literature and implications in daily clinical practice]. Rev Neurol (Paris) 164:595-604.
- Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WK, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R and others. (2009): Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol 27:4733-40.
- Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM. (2012): Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. Science 338:1080-4.
- Friedmann-Morvinski D, Verma IM. (2014): Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. EMBO Rep 15:244-53.
- Fulci G, Labuhn M, Maier D, Lachat Y, Hausmann O, Hegi ME, Janzer RC, Merlo A, Van Meir EG. (2000): p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma. Oncogene 19:3816-22.
- Fung LK, Ewend MG, Sills A, Sipos EP, Thompson R, Watts M, Colvin OM, Brem H, Saltzman WM. (1998): Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. Cancer Res 58:672-84.
- Gabayan AJ, Green SB, Sanan A, Jenrette J, Schultz C, Papagikos M, Tatter SP, Patel A, Amin P, Lustig R and others. (2006): GliaSite brachytherapy for treatment of recurrent malignant gliomas: a retrospective multi-institutional analysis. Neurosurgery 58:701-9; discussion 701-9.
- Gal H, Pandi G, Kanner AA, Ram Z, Lithwick-Yanai G, Amariglio N, Rechavi G, Givol D. (2008): MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. Biochem Biophys Res Commun 376:86-90.
- Gallego Perez-Larraya J, Lahutte M, Petrirena G, Reyes-Botero G, Gonzalez-Aguilar A, Houillier C, Guillevin R, Sanson M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. (2012): Response assessment in recurrent glioblastoma treated with irinotecan-bevacizumab: comparative analysis of the Macdonald, RECIST, RANO, and RECIST + F criteria. Neuro Oncol 14:667-73.
- Gangemi RM, Griffero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G. (2009): SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. Stem Cells 27:40-8.
- Gerber NK, Goenka A, Turcan S, Reyngold M, Makarov V, Kannan K, Beal K, Omuro A, Yamada Y, Gutin P and others. (2014): Transcriptional diversity of long-term glioblastoma survivors. Neuro Oncol 16:1186-95.
- Gerber NK, Young RJ, Barker CA, Wolchok JD, Chan TA, Yamada Y, Friguglietti L, Beal K. (2015): Ipilimumab and whole brain radiation therapy for melanoma brain metastases. J Neurooncol 121:159-65.
- Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M and others. (2014): A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. N Engl J Med 370:699-708.
- Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S. (2008): Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. Cancer Res 68:9125-30.
- Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. (2011): Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. Brain Res Rev 67:147-56.

- Gonzalez DM, Medici D. (2014): Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. Sci Signal 7:re8.
- Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G. (2011): Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. Cancer Res 71:5346-56.
- Gras-Combe G, Moritz-Gasser S, Herbet G, Duffau H. (2012): Intraoperative subcortical electrical mapping of optic radiations in awake surgery for glioma involving visual pathways. J Neurosurg 117:466-73.
- Graus F, Bruna J, Pardo J, Escudero D, Vilas D, Barcelo I, Brell M, Pascual C, Crespo JA, Erro E and others. (2013): Patterns of care and outcome for patients with glioblastoma diagnosed during 2008-2010 in Spain. Neuro Oncol 15:797-805.
- Grosu AL, Weber WA, Franz M, Stark S, Piert M, Thamm R, Gumprecht H, Schwaiger M, Molls M, Nieder C. (2005): Reirradiation of recurrent high-grade gliomas using amino acid PET (SPECT)/CT/MRI image fusion to determine gross tumor volume for stereotactic fractionated radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 63:511-9.
- Guessous F, Zhang Y, Kofman A, Catania A, Li Y, Schiff D, Purow B, Abounader R. (2010): microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. Cell Cycle 9:1031-6.
- Guichet PO, Bieche I, Teigell M, Serguera C, Rothhut B, Rigau V, Scamps F, Ripoll C, Vacher S, Taviaux S and others. (2013): Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. Glia 61:225-39.
- Guichet PO, Guelfi S, Teigell M, Hoppe L, Bakalara N, Bauchet L, Duffau H, Lamszus K, Rothhut B, Hugnot JP. (2015): Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells. Stem Cells 33:21-34.
- Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, Zhang Y, Ling EA, Gao J, Hao A. (2011): Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. Histopathology 59:763-75.
- Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, Lander ES. (2011): Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. Cell 146:633-44.
- Hambardzumyan D, Squatrito M, Holland EC. (2006): Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. Cancer Cell 10:454-6.
- Happold C, Gorlia T, Chinot O, Gilbert MR, Nabors LB, Wick W, Pugh SL, Hegi M, Cloughesy T, Roth P and others. (2016): Does Valproic Acid or Levetiracetam Improve Survival in Glioblastoma? A Pooled Analysis of Prospective Clinical Trials in Newly Diagnosed Glioblastoma. J Clin Oncol 34:731-9.
- Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. (2009): The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. Cell Cycle 8:3274-84.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L and others. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med 352:997-1003.
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. (1999): Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. Blood 94:3791-9.

- Herbet G, Lafargue G, Bonnetblanc F, Moritz-Gasser S, Menjot de Champfleur N, Duffau H. (2014): Inferring a dual-stream model of mentalizing from associative white matter fibres disconnection. Brain 137:944-59.
- Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M. (1992): Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. Cancer Res 52:3213-9.
- Hill JR, Kuriyama N, Kuriyama H, Israel MA. (1999): Molecular genetics of brain tumors. Arch Neurol 56:439-41.
- Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD, McLendon R, Lindner D, Sloan A, Rich JN. (2011): Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. Cell Death Differ 18:829-40.
- Hochberg FH, Pruitt A. (1980): Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. Neurology 30:907-11.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC and others. (2010): Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med 363:711-23.
- Holdhoff M, Chamberlain MC. (2013): Controversies in the treatment of elderly patients with newly diagnosed glioblastoma. J Natl Compr Canc Netw 11:1165-72; quiz 1173.
- Hollier BG, Tinnirello AA, Werden SJ, Evans KW, Taube JH, Sarkar TR, Sphyris N, Shariati M, Kumar SV, Battula VL and others. (2013): FOXC2 expression links epithelialmesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer. Cancer Res 73:1981-92.
- Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M. (2006): Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. Cancer 106:2218-23.
- Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. (2000): Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. Cancer Res 60:6868-74.
- Jallouli Y, Paillard A, Chang J, Sevin E, Betbeder D. (2007): Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood-brain barrier in vitro. Int J Pharm 344:103-9.
- Jiao YP, Cui FZ. (2007): Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. Biomed Mater 2:R24-37.
- Jin X, Jung JE, Beck S, Kim H. (2013): Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. Biochem Biophys Res Commun 433:496-501.
- Johannesen TB, Angell-Andersen E, Tretli S, Langmark F, Lote K. (2004): Trends in incidence of brain and central nervous system tumors in Norway, 1970-1999. Neuroepidemiology 23:101-9.
- Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, Pilgaard L, Moos T, Duroux M. (2014): A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. Biochim Biophys Acta 1846:75-87.
- Johnson DR, O'Neill BP. (2012): Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. J Neurooncol 107:359-64.
- Johnson DR, Sawyer AM, Meyers CA, O'Neill BP, Wefel JS. (2012): Early measures of cognitive function predict survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. Neuro Oncol 14:808-16.
- Johnson LA, Scholler J, Ohkuri T, Kosaka A, Patel PR, McGettigan SE, Nace AK, Dentchev T, Thekkat P, Loew A and others. (2015): Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma. Sci Transl Med 7:275ra22.

- Jones C, Baker SJ. (2014): Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. Nat Rev Cancer 14.
- Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. (2008): Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Mol Cell 30:393-402.
- Kaluzova M, Bouras A, Machaidze R, Hadjipanayis CG. (2015): Targeted therapy of glioblastoma stem-like cells and tumor non-stem cells using cetuximab-conjugated iron-oxide nanoparticles. Oncotarget 6:8788-806.
- Katakowski M, Buller B, Zheng X, Lu Y, Rogers T, Osobamiro O, Shu W, Jiang F, Chopp M. (2013): Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. Cancer Lett 335:201-4.
- Kaveh K, Kohandel M, Sivaloganathan S. (2016): Replicator dynamics of cancer stem cell: Selection in the presence of differentiation and plasticity. Math Biosci 272:64-75.
- Kelly PJ, Daumas-Duport C, Kispert DB, Kall BA, Scheithauer BW, Illig JJ. (1987): Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms. J Neurosurg 66:865-74.
- Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. (2009): Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. Stem Cells 27:2614-23.
- Kim DH, Rossi JJ. (2007): Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat Rev Genet 8:173-84.
- Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. (2006): Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. J Biochem Mol Biol 39:339-45.
- Kowal J, Tkach M, Thery C. (2014): Biogenesis and secretion of exosomes. Curr Opin Cell Biol 29:116-25.
- Kraus JA, Bolln C, Wolf HK, Neumann J, Kindermann D, Fimmers R, Forster F, Baumann A, Schlegel U. (1994): TP53 alterations and clinical outcome in low grade astrocytomas. Genes Chromosomes Cancer 10:143-9.
- Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I, Garren N, Mackey M, Butman JA, Camphausen K and others. (2009): Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol 27:740-5.
- Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G and others. (2007): Long-term survival with glioblastoma multiforme. Brain 130:2596-606.
- Kroeger KM, Muhammad AK, Baker GJ, Assi H, Wibowo MK, Xiong W, Yagiz K, Candolfi M, Lowenstein PR, Castro MG. (2010): Gene therapy and virotherapy: novel therapeutic approaches for brain tumors. Discov Med 10:293-304.
- Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringner M, Morgelin M, Bourseau-Guilmain E, Bengzon J, Belting M. (2013): Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. Proc Natl Acad Sci U S A 110:7312-7.
- Kunwar S, Chang S, Westphal M, Vogelbaum M, Sampson J, Barnett G, Shaffrey M, Ram Z, Piepmeier J, Prados M and others. (2010): Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. Neuro Oncol 12:871-81.
- Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E and others. (2001): A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. J Neurosurg 95:190-8.

- Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, Pope WB, Solis OE, Selch M, Filka E, Yong WH, Mischel PS, Liau LM and others. (2011): Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. J Clin Oncol 29:142-8.
- Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. (2004): Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. Oncogene 23:4681-9.
- Lamano JB, Ampie L, Choy W, Kesavabhotla K, DiDomenico JD, Oyon DE, Parsa AT, Bloch O. (2016): Immunomonitoring in glioma immunotherapy: current status and future perspectives. J Neurooncol 127:1-13.
- Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. (2002): Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. Radiother Oncol 64:259-73.
- Laperriere NJ, Leung PM, McKenzie S, Milosevic M, Wong S, Glen J, Pintilie M, Bernstein M. (1998): Randomized study of brachytherapy in the initial management of patients with malignant astrocytoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 41:1005-11.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 367:645-8.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P and others. (2015): Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N Engl J Med 373:23-34.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60:585-95.
- Levin VA, Bidaut L, Hou P, Kumar AJ, Wefel JS, Bekele BN, Grewal J, Prabhu S, Loghin M, Gilbert MR and others. (2011): Randomized double-blind placebo-controlled trial of bevacizumab therapy for radiation necrosis of the central nervous system. Int J Radiat Oncol Biol Phys 79:1487-95.
- Li CC, Eaton SA, Young PE, Lee M, Shuttleworth R, Humphreys DT, Grau GE, Combes V, Bebawy M, Gong J and others. (2013): Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. RNA Biol 10:1333-44.
- Li J, Wang M, Won M, Shaw EG, Coughlin C, Curran WJ, Jr., Mehta MP. (2011): Validation and simplification of the Radiation Therapy Oncology Group recursive partitioning analysis classification for glioblastoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 81:623-30.
- Li W, Graeber MB. (2012): The molecular profile of microglia under the influence of glioma. Neuro Oncol 14:958-78.
- Liebelt BD, Shingu T, Zhou X, Ren J, Shin SA, Hu J. (2016): Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy. Stem Cells Int 2016:7849890.
- Lindberg N, Kastemar M, Olofsson T, Smits A, Uhrbom L. (2009): Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. Oncogene 28:2266-75.
- Linhart HG, Lin H, Yamada Y, Moran E, Steine EJ, Gokhale S, Lo G, Cantu E, Ehrich M, He T and others. (2007): Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. Genes Dev 21:3110-22.
- Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. (2007): Atopy and risk of brain tumors: a metaanalysis. J Natl Cancer Inst 99:1544-50.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. (2006): Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci 7:179-93.

- Loebinger MR, Kyrtatos PG, Turmaine M, Price AN, Pankhurst Q, Lythgoe MF, Janes SM. (2009): Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles. Cancer Res 69:8862-7.
- Lombardi G, Della Puppa A, Zustovich F, Pambuku A, Farina P, Fiduccia P, Roma A, Zagonel V. (2014): The combination of carmustine wafers and fotemustine in recurrent glioblastoma patients: a monoinstitutional experience. Biomed Res Int 2014:678191.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol 114:97-109.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol 131:803-20.
- Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, Reynolds BA. (2008): Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. Stem Cells 26:988-96.
- Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A and others. (2012): IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. Nature 483:474-8.
- Lv S, Teugels E, Sadones J, De Brakeleer S, Duerinck J, Du Four S, Michotte A, De Greve J, Neyns B. (2012): Correlation of EGFR, IDH1 and PTEN status with the outcome of patients with recurrent glioblastoma treated in a phase II clinical trial with the EGFRblocking monoclonal antibody cetuximab. Int J Oncol 41:1029-35.
- Mahesparan R, Read TA, Lund-Johansen M, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. (2003): Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. Acta Neuropathol 105:49-57.
- Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME and others. (2012): Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 13:916-26.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M and others. (2008): The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell 133:704-15.
- Manterola L, Guruceaga E, Gallego Perez-Larraya J, Gonzalez-Huarriz M, Jauregui P, Tejada S, Diez-Valle R, Segura V, Sampron N, Barrena C and others. (2014): A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. Neuro Oncol 16:520-7.
- Maramotti S, Paci M, Manzotti G, Rapicetta C, Gugnoni M, Galeone C, Cesario A, Lococo F. (2016): Soluble Epidermal Growth Factor Receptors (sEGFRs) in Cancer: Biological Aspects and Clinical Relevance. Int J Mol Sci 17.
- Matsukado Y, Maccarty CS, Kernohan JW. (1961): The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. J Neurosurg 18:636-44.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF and others. (2014): Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. N Engl J Med 371:1507-17.
- Maysinger D, Morinville A. (1997): Drug delivery to the nervous system. Trends Biotechnol 15:410-8.

- McGirt MJ, Than KD, Weingart JD, Chaichana KL, Attenello FJ, Olivi A, Laterra J, Kleinberg LR, Grossman SA, Brem H and others. (2009): Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme. J Neurosurg 110:583-8.
- McKinley BP, Michalek AM, Fenstermaker RA, Plunkett RJ. (2000): The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. J Neurosurg 93:932-9.
- McPherson CM, Warnick RE. (2004): Results of contemporary surgical management of radiation necrosis using frameless stereotaxis and intraoperative magnetic resonance imaging. J Neurooncol 68:41-7.
- Meacham CE, Morrison SJ. (2013): Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. Nature 501:328-37.
- Medema JP. (2013): Cancer stem cells: the challenges ahead. Nat Cell Biol 15:338-44.
- Menei P, Capelle L, Guyotat J, Fuentes S, Assaker R, Bataille B, Francois P, Dorwling-Carter D, Paquis P, Bauchet L and others. (2005): Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of malignant glioma: a randomized phase II trial. Neurosurgery 56:242-8; discussion 242-8.
- Menei P, Metellus P. (2010): [Surgical treatment of glioblastomas]. Neurochirurgie 56:477-82.
- Menei P, Metellus P, Parot-Schinkel E, Loiseau H, Capelle L, Jacquet G, Guyotat J. (2010): Biodegradable carmustine wafers (Gliadel) alone or in combination with chemoradiotherapy: the French experience. Ann Surg Oncol 17:1740-6.
- Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin SY, Koneru M, Mayer-Kuckuk P, Glod J, Banerjee D. (2007): Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. Stem Cells 25:520-8.
- Minniti G, De Sanctis V, Muni R, Filippone F, Bozzao A, Valeriani M, Osti MF, De Paula U, Lanzetta G, Tombolini V and others. (2008): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients. J Neurooncol 88:97-103.
- Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, Reni M, Brandes AA, Curschmann J, Villa S and others. (2006): Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. J Clin Oncol 24:2563-9.
- Moffat BA, Reddy GR, McConville P, Hall DE, Chenevert TL, Kopelman RR, Philbert M, Weissleder R, Rehemtulla A, Ross BD. (2003): A novel polyacrylamide magnetic nanoparticle contrast agent for molecular imaging using MRI. Mol Imaging 2:324-32.
- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. (2008): Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. PLoS One 3:e2888.
- Morrison SJ, Spradling AC. (2008): Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell 132:598-611.
- Muller RH, Keck CM. (2004): Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. J Biotechnol 113:151-70.
- Munoz JL, Bliss SA, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P. (2013): Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. Mol Ther Nucleic Acids 2:e126.
- Nabors LB, Fink KL, Mikkelsen T, Grujicic D, Tarnawski R, Nam do H, Mazurkiewicz M, Salacz M, Ashby L, Zagonel V and others. (2015): Two cilengitide regimens in

combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter: results of the open-label, controlled, randomized phase II CORE study. Neuro Oncol 17:708-17.

- Nakada M, Hayashi Y, Hamada J. (2011): Role of Eph/ephrin tyrosine kinase in malignant glioma. Neuro Oncol 13:1163-70.
- Nazzaro JM, Neuwelt EA. (1990): The role of surgery in the management of supratentorial intermediate and high-grade astrocytomas in adults. J Neurosurg 73:331-44.
- Newcomb EW, Alonso M, Sung T, Miller DC. (2000): Incidence of p14ARF gene deletion in high-grade adult and pediatric astrocytomas. Hum Pathol 31:115-9.
- Niu CS, Li DX, Liu YH, Fu XM, Tang SF, Li J. (2011): Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. Oncol Rep 26:593-601.
- Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. (2009): IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. Clin Cancer Res 15:6002-7.
- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP and others. (2010): Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. Cancer Cell 17:510-22.
- Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G, 2nd, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA. (2003): Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. Nat Med 9:439-47.
- Ohgaki H. (2005): Genetic pathways to glioblastomas. Neuropathology 25:1-7.
- Ohgaki H, Kleihues P. (2005): Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol 64:479-89.
- Ohgaki H, Kleihues P. (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol 170:1445-53.
- Olar A, Wani KM, Alfaro-Munoz KD, Heathcock LE, van Thuijl HF, Gilbert MR, Armstrong TS, Sulman EP, Cahill DP, Vera-Bolanos E and others. (2015): IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II-III diffuse gliomas. Acta Neuropathol 129:585-96.
- Oppenlander ME, Wolf AB, Snyder LA, Bina R, Wilson JR, Coons SW, Ashby LS, Brachman D, Nakaji P, Porter RW and others. (2014): An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity. J Neurosurg 120:846-53.
- Orringer D, Lau D, Khatri S, Zamora-Berridi GJ, Zhang K, Wu C, Chaudhary N, Sagher O. (2012): Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival. J Neurosurg 117:851-9.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. (2013): CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. Neuro Oncol 15 Suppl 2:ii1-56.
- Pallud J, Audureau E, Noel G, Corns R, Lechapt-Zalcman E, Duntze J, Pavlov V, Guyotat J, Hieu PD, Le Reste PJ and others. (2015): Long-term results of carmustine wafer implantation for newly diagnosed glioblastomas: a controlled propensity-matched analysis of a French multicenter cohort. Neuro Oncol 17:1609-19.
- Pallud J, Taillandier L, Capelle L, Fontaine D, Peyre M, Ducray F, Duffau H, Mandonnet E. (2012): Quantitative morphological magnetic resonance imaging follow-up of low-

grade glioma: a plea for systematic measurement of growth rates. Neurosurgery 71:729-39; discussion 739-40.

- Paquis P, Menei P. (2010): [Conclusions: glioblastomas. standards, options, recommendations]. Neurochirurgie 56:503-7.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL and others. (2008): An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 321:1807-12.
- Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. (2010): Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. J Immunol 184:5885-94.
- Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, Renault-Mihara F, Thirant C, Leonard N, Berhneim A and others. (2010): CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. BMC Cancer 10:66.
- Perry JR, Belanger K, Mason WP, Fulton D, Kavan P, Easaw J, Shields C, Kirby S, Macdonald DR, Eisenstat DD and others. (2010): Phase II trial of continuous doseintense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. J Clin Oncol 28:2051-7.
- Persano L, Pistollato F, Rampazzo E, Della Puppa A, Abbadi S, Frasson C, Volpin F, Indraccolo S, Scienza R, Basso G. (2012): BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1alpha stability and MGMT expression. Cell Death Dis 3:e412.
- Petit S, Garcion E, Benoit JP, Menei P. (2008): [Local chemotherapy of malignant glioma: from syringe injections to nanotechnology]. Rev Neurol (Paris) 164:547-53.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L and others. (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.
- Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. (2006): Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. Nature 444:761-5.
- Pietras A, Katz AM, Ekstrom EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL, Werbeck JL, Amankulor NM, Huse JT, Holland EC. (2014): Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. Cell Stem Cell 14:357-69.
- Piette C, Munaut C, Foidart JM, Deprez M. (2006): Treating gliomas with glucocorticoids: from bedside to bench. Acta Neuropathol 112:651-64.
- Prados MD, Chang SM, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H, Kabuubi P, Ayers-Ringler J, Rabbitt J, Page M and others. (2009): Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. J Clin Oncol 27:579-84.
- Prayson RA, Agamanolis DP, Cohen ML, Estes ML, Kleinschmidt-DeMasters BK, Abdul-Karim F, McClure SP, Sebek BA, Vinay R. (2000): Interobserver reproducibility among neuropathologists and surgical pathologists in fibrillary astrocytoma grading. J Neurol Sci 175:33-9.
- Preynat-Seauve O, Suter DM, Tirefort D, Turchi L, Virolle T, Chneiweiss H, Foti M, Lobrinus JA, Stoppini L, Feki A and others. (2009): Development of human nervous tissue upon differentiation of embryonic stem cells in three-dimensional culture. Stem Cells 27:509-20.

- Pulman J, Greenhalgh J, Marson AG. (2013): Antiepileptic drugs as prophylaxis for postcraniotomy seizures. Cochrane Database Syst Rev 2:CD007286.
- Qu S, Guan J, Liu Y. (2015): Identification of microRNAs as novel biomarkers for glioma detection: a meta-analysis based on 11 articles. J Neurol Sci 348:181-7.
- Quick J, Gessler F, Dutzmann S, Hattingen E, Harter PN, Weise LM, Franz K, Seifert V, Senft C. (2014): Benefit of tumor resection for recurrent glioblastoma. J Neurooncol 117:365-72.
- Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussiere M, Lesimple T, Chinot O, Wager M, Honnorat J, Saikali S and others. (2012): Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltranferase in a series of 100 glioblastoma patients. Cancer 118:4201-11.
- Raizer JJ, Grimm S, Chamberlain MC, Nicholas MK, Chandler JP, Muro K, Dubner S, Rademaker AW, Renfrow J, Bredel M. (2010): A phase 2 trial of single-agent bevacizumab given in an every-3-week schedule for patients with recurrent high-grade gliomas. Cancer 116:5297-305.
- Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, DeVroom HL, Otto E, Long Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM and others. (1997): Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. Nat Med 3:1354-61.
- Ransom DT, Ritland SR, Kimmel DW, Moertel CA, Dahl RJ, Scheithauer BW, Kelly PJ, Jenkins RB. (1992): Cytogenetic and loss of heterozygosity studies in ependymomas, pilocytic astrocytomas, and oligodendrogliomas. Genes Chromosomes Cancer 5:348-56.
- Rao RD, James CD. (2004): Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. Semin Oncol 31:595-604.
- Rasheed A, Herndon JE, Stenzel TT, Raetz JG, Kendelhardt J, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH, McLendon RE. (2002): Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. Cancer 94:2688-97.
- Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. (1999): Molecular pathogenesis of malignant gliomas. Curr Opin Oncol 11:162-7.
- Rasper M, Schafer A, Piontek G, Teufel J, Brockhoff G, Ringel F, Heindl S, Zimmer C, Schlegel J. (2010): Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. Neuro Oncol 12:1024-33.
- Read TA, Fogarty MP, Markant SL, McLendon RE, Wei Z, Ellison DW, Febbo PG, Wechsler-Reya RJ. (2009): Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. Cancer Cell 15:135-47.
- Reardon DA. (2012): Treatment of elderly patients with glioblastoma. Lancet Oncol 13:656-7.
- Reardon DA, Okada H. (2015): Re-defining response and treatment effects for neurooncology immunotherapy clinical trials. J Neurooncol 123:339-46.
- Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, Sahm F, Koelsche C, Korshunov A, Olar A and others. (2015): IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. Acta Neuropathol 129:867-73.
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH and others. (2012): EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. Cell 148:349-61.
- Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. (2012): Primary brain tumours in adults. Lancet 379:1984-96.

- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM and others. (2010): Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. Nature 468:824-8.
- Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. (2010): Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. Acta Neuropathol 120:567-84.
- Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne MC, Passirani C, Sindji L, Schiller P, Montero-Menei C, Menei P. (2010): Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. Biomaterials 31:8393-401.
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR and others. (2011): Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. Clin Cancer Res 17:4550-7.
- Roth P, Wischhusen J, Happold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, Weller M, Keller A. (2011): A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. J Neurochem 118:449-57.
- Ruben JD, Dally M, Bailey M, Smith R, McLean CA, Fedele P. (2006): Cerebral radiation necrosis: incidence, outcomes, and risk factors with emphasis on radiation parameters and chemotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 65:499-508.
- Ruder AM, Carreon T, Butler MA, Calvert GM, Davis-King KE, Waters MA, Schulte PA, Mandel JS, Morton RF, Reding DJ and others. (2009): Exposure to farm crops, livestock, and farm tasks and risk of glioma: the Upper Midwest Health Study. Am J Epidemiol 169:1479-91.
- Sacko O, Lauwers-Cances V, Brauge D, Sesay M, Brenner A, Roux FE. (2011): Awake craniotomy vs surgery under general anesthesia for resection of supratentorial lesions. Neurosurgery 68:1192-8; discussion 1198-9.
- Sahm F, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S, Jones DT, Pfister SM, Herold-Mende C, Wick W and others. (2014): Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. Acta Neuropathol 128:551-9.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. (2005): Neural stem cells and the origin of gliomas. N Engl J Med 353:811-22.
- Sanai N, Berger MS. (2008): Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. Neurosurgery 62:753-64; discussion 264-6.
- Sanai N, Mirzadeh Z, Berger MS. (2008): Functional outcome after language mapping for glioma resection. N Engl J Med 358:18-27.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM and others. (2011a): Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. Nature 478:382-6.
- Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. (2011b): An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. J Neurosurg 115:3-8.
- Sanghera P, Perry J, Sahgal A, Symons S, Aviv R, Morrison M, Lam K, Davey P, Tsao MN. (2010): Pseudoprogression following chemoradiotherapy for glioblastoma multiforme. Can J Neurol Sci 37:36-42.
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K and others. (2009): Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. J Clin Oncol 27:4150-4.
- Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, Hingtgen S, van de Water JA, Mohapatra G, Figueiredo JL, Martuza RL, Weissleder R, Shah K. (2009): Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 106:4822-7.

- Sawaya R, Hammoud M, Schoppa D, Hess KR, Wu SZ, Shi WM, Wildrick DM. (1998): Neurosurgical outcomes in a modern series of 400 craniotomies for treatment of parenchymal tumors. Neurosurgery 42:1044-55; discussion 1055-6.
- Schiera G, Proia P, Alberti C, Mineo M, Savettieri G, Di Liegro I. (2007): Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular vesicles. J Cell Mol Med 11:1384-94.
- Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Louis DN, Fimmers R, von Deimling A. (2002): Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. J Neuropathol Exp Neurol 61:321-8.
- Schucht P, Beck J, Abu-Isa J, Andereggen L, Murek M, Seidel K, Stieglitz L, Raabe A. (2012): Gross total resection rates in contemporary glioblastoma surgery: results of an institutional protocol combining 5-aminolevulinic acid intraoperative fluorescence imaging and brain mapping. Neurosurgery 71:927-35; discussion 935-6.
- Schucht P, Knittel S, Slotboom J, Seidel K, Murek M, Jilch A, Raabe A, Beck J. (2014): 5-ALA complete resections go beyond MR contrast enhancement: shift corrected volumetric analysis of the extent of resection in surgery for glioblastoma. Acta Neurochir (Wien) 156:305-12; discussion 312.
- Schuessler A, Smith C, Beagley L, Boyle GM, Rehan S, Matthews K, Jones L, Crough T, Dasari V, Klein K and others. (2014): Autologous T-cell therapy for cytomegalovirus as a consolidative treatment for recurrent glioblastoma. Cancer Res 74:3466-76.
- Schuster J, Lai RK, Recht LD, Reardon DA, Paleologos NA, Groves MD, Mrugala MM, Jensen R, Baehring JM, Sloan A and others. (2015): A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. Neuro Oncol 17:854-61.
- Scott AW, Tyler BM, Masi BC, Upadhyay UM, Patta YR, Grossman R, Basaldella L, Langer RS, Brem H, Cima MJ. (2011): Intracranial microcapsule drug delivery device for the treatment of an experimental gliosarcoma model. Biomaterials 32:2532-9.
- Scott JG, Bauchet L, Fraum TJ, Nayak L, Cooper AR, Chao ST, Suh JH, Vogelbaum MA, Peereboom DM, Zouaoui S and others. (2012): Recursive partitioning analysis of prognostic factors for glioblastoma patients aged 70 years or older. Cancer 118:5595-600.
- Selker RG, Shapiro WR, Burger P, Blackwood MS, Arena VC, Gilder JC, Malkin MG, Mealey JJ, Jr., Neal JH, Olson J and others. (2002): The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine. Neurosurgery 51:343-55; discussion 355-7.
- Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. (2011): Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. Lancet Oncol 12:997-1003.
- Seymour T, Nowak A, Kakulas F. (2015): Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. Front Oncol 5:159.
- Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, Leek R, Edelmann M, Kessler B, Sainson RC and others. (2010): New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. Blood 116:2385-94.
- Shi L, Wan Y, Sun G, Gu X, Qian C, Yan W, Zhang S, Pan T, Wang Z, You Y. (2012): Functional differences of miR-125b on the invasion of primary glioblastoma CD133negative cells and CD133-positive cells. Neuromolecular Med 14:303-16.

- Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J and others. (2003): Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. Cancer Res 63:6962-70.
- Shooman D, Belli A, Grundy PL. (2010): Image-guided frameless stereotactic biopsy without intraoperative neuropathological examination. J Neurosurg 113:170-8.
- Siebzehnrubl FA, Reynolds BA, Vescovi A, Steindler DA, Deleyrolle LP. (2011): The origins of glioma: E Pluribus Unum? Glia 59:1135-47.
- Sijben AE, McIntyre JB, Roldan GB, Easaw JC, Yan E, Forsyth PA, Parney IF, Magliocco AM, Bernsen H, Cairncross JG. (2008): Toxicity from chemoradiotherapy in older patients with glioblastoma multiforme. J Neurooncol 89:97-103.
- Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF and others. (2008): miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. BMC Med 6:14.
- Silver DJ, Steindler DA. (2009): Common astrocytic programs during brain development, injury and cancer. Trends Neurosci 32:303-11.
- Singh AK, Arya RK, Maheshwari S, Singh A, Meena S, Pandey P, Dormond O, Datta D. (2015): Tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: updates in concept, controversies and clinical relevance. Int J Cancer 136:1991-2000.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. (2003): Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 63:5821-8.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. (2004): Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 432:396-401.
- Smith JS, Jenkins RB. (2000): Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. Front Biosci 5:D213-31.
- Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW and others. (2000): Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. J Clin Oncol 18:636-45.
- Soda Y, Myskiw C, Rommel A, Verma IM. (2013): Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. J Mol Med (Berl) 91:439-48.
- Soehngen E, Schaefer A, Koeritzer J, Huelsmeyer V, Zimmer C, Ringel F, Gempt J, Schlegel J. (2014): Hypoxia upregulates aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1) expression and induces functional stem cell characteristics in human glioblastoma cells. Brain Tumor Pathol 31:247-56.
- Soffietti R, Baumert BG, Bello L, von Deimling A, Duffau H, Frenay M, Grisold W, Grant R, Graus F, Hoang-Xuan K and others. (2010): Guidelines on management of low-grade gliomas: report of an EFNS-EANO Task Force. Eur J Neurol 17:1124-33.
- Soffietti R, Trevisan E, Bertero L, Cassoni P, Morra I, Fabrini MG, Pasqualetti F, Lolli I, Castiglione A, Ciccone G and others. (2014): Bevacizumab and fotemustine for recurrent glioblastoma: a phase II study of AINO (Italian Association of Neuro-Oncology). J Neurooncol 116:533-41.
- Sonabend AM, Ulasov IV, Tyler MA, Rivera AA, Mathis JM, Lesniak MS. (2008): Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma. Stem Cells 26:831-41.
- Song S, Ewald AJ, Stallcup W, Werb Z, Bergers G. (2005): PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. Nat Cell Biol 7:870-9.

- Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavare S. (2013): Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A 110:4009-14.
- Stark AM, Stepper W, Mehdorn HM. (2010): Outcome evaluation in glioblastoma patients using different ranking scores: KPS, GOS, mRS and MRC. Eur J Cancer Care (Engl) 19:39-44.
- Stewart LA. (2002): Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and metaanalysis of individual patient data from 12 randomised trials. Lancet 359:1011-8.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. (2006): Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol 7:392-401.
- Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Oppel F, Turowski B, Woiciechowsky C and others. (2008): Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. Neurosurgery 62:564-76; discussion 564-76.
- Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, Aldape KD, Lhermitte B, Pietsch T, Grujicic D and others. (2014): Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, openlabel, phase 3 trial. Lancet Oncol 15:1100-8.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K and others. (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol 10:459-66.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U and others. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 352:987-96.
- Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, Taylor LP, Lieberman F, Silvani A, Fink KL and others. (2015): Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. JAMA 314:2535-43.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. (2007): In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. Cell Stem Cell 1:515-28.
- Sun JY, Xiao WZ, Wang F, Wang YQ, Zhu YH, Wu YF, Miao ZL, Lin YC. (2015): MicroRNA-320 inhibits cell proliferation in glioma by targeting E2F1. Mol Med Rep 12:2355-9.
- Sunayama J, Matsuda K, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A and others. (2010a): Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. Stem Cells 28:1930-9.
- Sunayama J, Sato A, Matsuda K, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A and others. (2010b): Dual blocking of mTor and PI3K elicits a prodifferentiation effect on glioblastoma stem-like cells. Neuro Oncol 12:1205-19.
- Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F and others. (2015): Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. Nat Genet 47:458-68.

- Szelenyi A, Senft C, Jardan M, Forster MT, Franz K, Seifert V, Vatter H. (2011): Intraoperative subcortical electrical stimulation: a comparison of two methods. Clin Neurophysiol 122:1470-5.
- Taal W, Brandsma D, de Bruin HG, Bromberg JE, Swaak-Kragten AT, Smitt PA, van Es CA, van den Bent MJ. (2008): Incidence of early pseudo-progression in a cohort of malignant glioma patients treated with chemoirradiation with temozolomide. Cancer 113:405-10.
- Taal W, Oosterkamp HM, Walenkamp AM, Dubbink HJ, Beerepoot LV, Hanse MC, Buter J, Honkoop AH, Boerman D, de Vos FY and others. (2014): Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. Lancet Oncol 15:943-53.
- Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MA and others. (2015): Strong therapeutic potential of gamma-secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells. J Neurooncol 121:239-50.
- Tchoghandjian A, Baeza N, Colin C, Cayre M, Metellus P, Beclin C, Ouafik L, Figarella-Branger D. (2010): A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. Brain Pathol 20:211-21.
- Telera S, Fabi A, Pace A, Vidiri A, Anelli V, Carapella CM, Marucci L, Crispo F, Sperduti I, Pompili A. (2013): Radionecrosis induced by stereotactic radiosurgery of brain metastases: results of surgery and outcome of disease. J Neurooncol 113:313-25.
- Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, Giese A, Kim E, Smolsky M, Kim RY, Saria MG, Pastorino S, Kesari S and others. (2012): MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. Neuro Oncol 14:689-700.
- Thiebaut de Schotten M, Urbanski M, Duffau H, Volle E, Levy R, Dubois B, Bartolomeo P. (2005): Direct evidence for a parietal-frontal pathway subserving spatial awareness in humans. Science 309:2226-8.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. (2009): Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell 139:871-90.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB and others. (2012): Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med 366:2443-54.
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. (1999): CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 96:8681-6.
- Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS and others. (2012): IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. Nature 483:479-83.
- Turchi L, Debruyne DN, Almairac F, Virolle V, Fareh M, Neirijnck Y, Burel-Vandenbos F, Paquis P, Junier MP, Van Obberghen-Schilling E and others. (2013): Tumorigenic potential of miR-18A* in glioma initiating cells requires NOTCH-1 signaling. Stem Cells 31:1252-65.
- Tye K, Engelhard HH, Slavin KV, Nicholas MK, Chmura SJ, Kwok Y, Ho DS, Weichselbaum RR, Koshy M. (2014): An analysis of radiation necrosis of the central nervous system treated with bevacizumab. J Neurooncol 117:321-7.
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. (2000): Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97:14720-5.

- Uhm JH, Ballman KV, Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC, James CD, Scheithauer BW, Behrens RJ, Flynn PJ and others. (2011): Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. Int J Radiat Oncol Biol Phys 80:347-53.
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. (2000): Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev 42:29-64.
- Unsgaard G, Gronningsaeter A, Ommedal S, Nagelhus Hernes TA. (2002): Brain operations guided by real-time two-dimensional ultrasound: new possibilities as a result of improved image quality. Neurosurgery 51:402-11; discussion 411-2.
- Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, Chomienne C, Ishikawa F, Schuringa JJ, Stassi G and others. (2012): Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. Nat Rev Cancer 12:767-75.
- van der Vos KE, Abels ER, Zhang X, Lai C, Carrizosa E, Oakley D, Prabhakar S, Mardini O, Crommentuijn MH, Skog J and others. (2016): Directly visualized glioblastomaderived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. Neuro Oncol 18:58-69.
- Varenika V, Dickinson P, Bringas J, LeCouteur R, Higgins R, Park J, Fiandaca M, Berger M, Sampson J, Bankiewicz K. (2008): Detection of infusate leakage in the brain using real-time imaging of convection-enhanced delivery. J Neurosurg 109:874-80.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP and others. (2010): Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell 17:98-110.
- Visvader JE. (2011): Cells of origin in cancer. Nature 469:314-22.
- Visvader JE, Lindeman GJ. (2008): Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 8:755-68.
- Vorster SJ, Barnett GH. (1998): A proposed preoperative grading scheme to assess risk for surgical resection of primary and secondary intraaxial supratentorial brain tumors. Neurosurg Focus 4:e2.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J and others. (2007): Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. J Clin Oncol 25:4722-9.
- Vuorinen V, Hinkka S, Farkkila M, Jaaskelainen J. (2003): Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people a randomised study. Acta Neurochir (Wien) 145:5-10.
- Wainwright DA, Chang AL, Dey M, Balyasnikova IV, Kim CK, Tobias A, Cheng Y, Kim JW, Qiao J, Zhang L and others. (2014): Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in mice with brain tumors. Clin Cancer Res 20:5290-301.
- Walsh KM, Wiencke JK, Lachance DH, Wiemels JL, Molinaro AM, Eckel-Passow JE, Jenkins RB, Wrensch MR. (2015): Telomere maintenance and the etiology of adult glioma. Neuro Oncol 17:1445-52.
- Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V. (2010): Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. Nature 468:829-33.
- Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Abbruzzese JL, Gallick GE, Sarkar FH. (2009): Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. Cancer Res 69:2400-7.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. (2009): IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. Am J Pathol 174:1149-53.

- Weller M, Gorlia T, Cairncross JG, van den Bent MJ, Mason W, Belanger K, Brandes AA, Bogdahn U, Macdonald DR, Forsyth P and others. (2011): Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma. Neurology 77:1156-64.
- Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C and others. (2014): EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. Lancet Oncol 15:e395-403.
- Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB and others. (2010): Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. J Clin Oncol 28:1963-72.
- Westphal M, Heese O, Steinbach JP, Schnell O, Schackert G, Mehdorn M, Schulz D, Simon M, Schlegel U, Senft C and others. (2015): A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. Eur J Cancer 51:522-32.
- Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jaaskelainen J, Ram Z. (2003): A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. Neuro Oncol 5:79-88.
- Wick A, Felsberg J, Steinbach JP, Herrlinger U, Platten M, Blaschke B, Meyermann R, Reifenberger G, Weller M, Wick W. (2007): Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. J Clin Oncol 25:3357-61.
- Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M and others. (2012): Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 13:707-15.
- Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, Plass C, Hegi M, Platten M, Reifenberger G. (2014): MGMT testing--the challenges for biomarkerbased glioma treatment. Nat Rev Neurol 10:372-85.
- Willems PW, Taphoorn MJ, Burger H, Berkelbach van der Sprenkel JW, Tulleken CA. (2006): Effectiveness of neuronavigation in resecting solitary intracerebral contrastenhancing tumors: a randomized controlled trial. J Neurosurg 104:360-8.
- Wohrer A, Waldhor T, Heinzl H, Hackl M, Feichtinger J, Gruber-Mosenbacher U, Kiefer A, Maier H, Motz R, Reiner-Concin A and others. (2009): The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. J Neurooncol 95:401-11.
- Woodworth GF, McGirt MJ, Samdani A, Garonzik I, Olivi A, Weingart JD. (2006): Frameless image-guided stereotactic brain biopsy procedure: diagnostic yield, surgical morbidity, and comparison with the frame-based technique. J Neurosurg 104:233-7.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ and others. (2009): IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med 360:765-73.
- Yan K, Wu Q, Yan DH, Lee CH, Rahim N, Tritschler I, DeVecchio J, Kalady MF, Hjelmeland AB, Rich JN. (2014): Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy. Genes Dev 28:1085-100.
- Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, Gao X, Aldape K, Lu Z. (2011): Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation. Nature 480:118-22.

- Yoshii Y. (2008): Pathological review of late cerebral radionecrosis. Brain Tumor Pathol 25:51-8.
- Young GS. (2007): Advanced MRI of adult brain tumors. Neurol Clin 25:947-73, viii.
- Yuan Y, Xiang W, Qing M, Yanhui L, Jiewen L, Yunhe M. (2014): Survival analysis for valproic acid use in adult glioblastoma multiforme: A meta-analysis of individual patient data and a systematic review. Seizure.
- Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. (2010): NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a crossfunctional network with GLI1 and p53. EMBO J 29:2659-74.
- Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC. (2008): Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. Clin Cancer Res 14:123-9.
- Zhang J, Jiao J. (2015): Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. Biomed Res Int 2015:727542.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. (2008): Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. Cell 132:645-60.
- Zhao J, He H, Zhou K, Ren Y, Shi Z, Wu Z, Wang Y, Lu Y, Jiao J. (2012): Neuronal transcription factors induce conversion of human glioma cells to neurons and inhibit tumorigenesis. PLoS One 7:e41506.
- Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y and others. (2009): Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. Science 324:261-5.
- Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, Wu L, Sloan AE, McLendon RE, Li X and others. (2015): Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. Nat Cell Biol 17:170-82.
- Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daude H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P, Bauchet F, Kerr C, Fabbro M, Figarella-Branger D and others. (2012): [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. Neurochirurgie 58:4-13.