



HAL
open science

Evaluation préclinique de l'impact des facteurs HAF et HIF-2 sur la croissance des glioblastomes et leur réponse à la radiothérapie

Gaëlle Lambert

► **To cite this version:**

Gaëlle Lambert. Evaluation préclinique de l'impact des facteurs HAF et HIF-2 sur la croissance des glioblastomes et leur réponse à la radiothérapie. Cancer. Normandie Université, 2018. Français. NNT: 2018NORMC421 . tel-01981772

HAL Id: tel-01981772

<https://theses.hal.science/tel-01981772>

Submitted on 15 Jan 2019

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Evaluation préclinique de l'impact des facteurs HAF et HIF-2 sur la croissance des glioblastomes et leur réponse à la radiothérapie.

**Présentée et soutenue par
Gaelle LAMBERT**

**Thèse soutenue publiquement le 11/12/2018
devant le jury composé de**

M. PHILIPPE MOREAU	Chercheur au CEA, IUH - Hôpital Saint Louis	Rapporteur du jury
M. FABRICE SONCIN	Directeur de recherche à l'INSERM, UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOG	Rapporteur du jury
Mme MYRIAM BERNAUDIN	Directeur de recherche au CNRS, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Président du jury
M. OLIVIER NICOLE	Chargé de recherche au CNRS, UNIVERSITE BORDEAUX 1 SCIENCES ET TECHNO	Membre du jury
Mme EDWIGE PETIT	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse

Thèse dirigée par EDWIGE PETIT, Imagerie et Stratégie Thérapeutiques de Pathologies Cérébrales et Tumorales



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



IMAGERIE & STRATÉGIES
THÉRAPEUTIQUES DES PATHOLOGIES
CÉRÉBRALES & TUMORALES

On m'avait dit au tout début de mon périple dans la Recherche, que les remerciements sont l'opportunité d'exprimer, de révéler finalement, la personne qui existe sous la blouse, je ne me suis donc pas mise de barrière pour ce qui suit ! Le format de ces remerciements s'inspire en partie de ceux « d'un p'tit gars en thèse », de mon acolyte de manip de la première heure, **Benjamin**. Soyons scientifique jusqu'au bout, pour la référence c'est : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01838279>.

Le commencement.

Mon histoire dans ce beau monde qu'est la Recherche a commencé et s'est poursuivie notamment grâce à deux personnes. **Vadim**, tu m'as encadré lors de mon stage de master 1 et m'as fait découvrir ton quotidien avec passion. Tu as permis à ce que mes premiers pas dans la Recherche se passent merveilleusement bien et, plus tard, quand ça a été mon tour d'avoir des stagiaires à encadrer, j'ai essayé de transmettre de la même façon, cette passion, cette vision de la Recherche que tu m'as communiqué. Tu as été un exemple pour moi, à la paillasse et plus encore, je me rappelle encore très bien de ta soutenance et de l'admiration que ça m'a suscité. **Pierrick**, tu es le premier à m'avoir fait confiance en acceptant de me prendre en stage, et grâce à ta pédagogie, ton encadrement, tes conseils et ton écoute tu m'as permise de gérer mon angoisse pour continuer. Tu ne m'as pas seulement encadrée pendant mes stages de master, tu as également été présent pendant ces trois ans de thèse, au détour d'un congrès, d'une soutenance de thèse rouennaise, d'une rencontre et tu as toujours su me rassurer, me féliciter, me tirer vers le haut en somme.

La confirmation.

Indubitablement, je ne peux continuer ces remerciements en passant outre ma bande de pingouins de MSA. « *Surnommés les pingouins – car se déplaçant en groupe et ayant la caractéristique de s'entraider en manip peu importe le jour et l'heure de la journée* (Merci **Benjamin**) », j'ai nommé **Benjamin**, **Jane**, **Pierre-Michaël**, **POG** et **Nico**. **Benjamin**, mon p'tit père, mon acolyte, mon BEN-JA-MIN, ta gentillesse, ta patience, tes blagues, toi, ton toi tout entier font que tu fais partie d'une des plus belles rencontres que j'ai pu faire jusque-là. Etre ton amie est un privilège. **Jane** et **Pierre**, chanteurs et danseurs émérites, votre bonne humeur invincible et communicative m'ont marqué à jamais. Vous m'avez prouvé de multiple fois qu'il était possible de travailler en riant et de produire un travail de qualité. **POG** et **Nico**,

j'ai encore en mémoire vos enseignements, vos explications, vos astuces de manips (et je les transmets !). Vous avez toujours été disponibles pour m'apprendre, pour répondre à mes questions qu'elles soient scientifiques ou non. Dessiner des pingouins (pardis !), inventer des farces bon enfant, chanter et rire à vos côtés, mes petits pingouins, ont rendu les manips et le travail plus facile. J'ai appris, grâce à vous, l'importance quotidienne de l'entraide et de la bonne humeur au travail. En plus de cela, les soirées au 3P, ses mojitos et maï-taï, les fous-rires associés, les conversations et débats qui s'y sont déroulés (oui **Nico**, je me rends maintenant compte que, la trentaine approchant, on n'a plus les mêmes capacités de récupération les lendemains de soirées tardives et trop arrosées ...) sont des souvenirs qui me sont chers. **Paul** et **Alexandre**, je n'ai malheureusement pas eu la chance de beaucoup partager les PSM avec vous, mais nos rencontres m'ont toujours fait plaisir. Je n'oublie évidemment pas les autres personnes (étudiants et enseignants) du labo et d'à côté avec qui j'ai échangé et passé de bons moments.

Et c'est ainsi qu'est arrivé ... la thèse !

Je voudrais commencer cette partie en remerciant notre super duo de secrétaires, **Carole L** et **Florence**. Vous m'avez toujours accueillie dans votre bureau avec le sourire et avez traité tous les problèmes que j'ai pu rencontrer avec rapidité, efficacité, à la perfection. Merci pour tout ce que vous faites « dans l'ombre » et qui nous simplifie grandement le travail.

Jérôme T et **Didier**, notre deuxième duo Cervoxien, je vous dois le bon déroulement de l'aspect *in vivo* de la thèse. Merci pour toutes les chirurgies, les sauvetages de pose de cathé, les perfusions, les IRM et soins des animaux effectués en mon absence. **Didier**, merci pour la maintenance et les réparations des microscopes et des chambres à hypoxie. Merci pour votre bonne humeur quotidienne et d'avoir toléré que votre bureau se transforme en bureau des pleurs ! Je te remercie aussi **Didier** pour ton bon goût (enfin, pour celui de ta femme), en matière de chemise, tu sais à quel point elles nous ravissent !

Elodie, tu as occupé une place importante dans le déroulement de cette thèse, que ce soit en manip ou pour la relecture de ce manuscrit. Je te suis reconnaissante pour le temps que tu as accordé à mes questions, à l'enseignement de certaines manips et méthodes d'analyse, et toujours dans la bonne humeur. J'ai beaucoup appris à tes côtés, et ces quelques mots ne sont pas à la hauteur de ce que tu m'as transmis.

Je remercie chaleureusement **Omar** pour les anecdotes scientifiques (ou non), j'ai toujours été impressionnée par tes connaissances qui semblent illimitées. **Nathalie**, je te remercie de t'être

souvent arrêtée pour me demander comment ça allait, comment j'avancais dans mes travaux. **Carole B**, je te remercie pour ta gentillesse et d'avoir échangé avec moi concernant ton parcours et ton expérience d'ingénieure. Merci également à **Palma** et **Laurent C** pour l'aide pour la rédaction de la saisine et pour les échanges au détour d'un couloir. Je remercie également **Romarc** pour les injections IV, ça n'a pas donné les résultats que j'attendais mais cela n'a pas été vain. Un grand merci à **Aurélien** pour l'apprentissage et dépannage des stats sous JMP.

Un grand merci à **Geoffrey** d'avoir toujours été super réactif en cas de problème informatique,

Karim, tu as été d'une grande aide lors de mon arrivée pour prendre mes marques et pour tes réponses concernant mes interrogations en biologie moléculaire. Tu as également été d'un grand soutien quand ça n'allait pas et je t'en suis reconnaissante. J'en profite pour remercier également **Carine**, **Yannick**, **Laurent**, **Ben** et **Isa** (pardonnez-moi, mais je ne suis pas à l'abri d'un oubli !) d'avoir toujours eu un mot gentil et/ou de m'avoir dépanné en manip'. J'associe bien évidemment à ces remerciements les étudiants, **Vincent** (bonjour **Vinceeeent**), **Barbara**, **Antoine** (tu as été géant en relisant mon manuscrit dans sa quasi intégralité !), **Anastasia-Madame**, **Elodie**, **Eugénie**, **Audrey**, **Mathieu** (perdu au milieu des filles de ton bureau), **Sara**, **Camille** et **Héloïse**. Vous avez rendu le quotidien dans les labos vraiment agréable et j'ai adoré les moments passés avec vous autour d'une bière ou d'une pipette. **Célia** et **Fanny**, fraîchement arrivées en thèse, j'espère que celles-ci se dérouleront pour le mieux.

J'ai également une pensée pour ceux qui sont allés voguer vers de nouveaux horizons, **Marine**, **Clément**, **Ararat** mais aussi **Camille**, **Mathilde** et **Antoine**. **Rozenn** et **Gwenn**, même si vous passez vos journées enfermées avec des marmousets ou des rats, vous côtoyer au quotidien a toujours été agréable. **Bertille**, ma petite poulette, tu nous as enchanté par ta présence, et tu une amie chère à mon cœur. **Clélia**, cela fait une petite dizaine d'année que tu es rentrée dans ma vie et je ne me rends sûrement pas compte de la chance que j'ai. Merci pour cette vie Universitaire que nous avons partagé, merci pour ton amitié, pour ta vision de la vie, de m'avoir permis de grandir, de m'avoir autant fait rire, de m'avoir consolé. Je ne serai sûrement pas arrivée ici si je ne t'avais pas connu. **Elisa**, les carottes, céleris et taboulés doivent être fiers du chemin que nous avons parcouru depuis nos stages de M1 ! Tu es une personne incroyable et je ne compte plus les moments où tu m'as épaulé, où tu as été là. **Yacine**, ne t'en déplaie, l'expression « faire une Yacine » est approuvée et actée. Merci de m'avoir fait autant rire et d'avoir toujours répondu présent ! **Audrey** et **Kelly**, je ne sais pas comment vous faites pour concilier votre vie de médecin et la thèse, franchement, chapeau ! Merci également aux

nouvelles-pas si nouvelles arrivées dans l'équipe, **Fatéméh**, **Nolwenn** et **Hayriye**, pour votre soutien et votre bonne humeur.

Je tiens à terminer les remerciements concernant « les gens du labo » par **Charlie** et **Aurélie**, les meilleurs stagiaires du monde ! Merci pour tout ce que vous m'avez apporté, merci de m'avoir autant aidé, merci de m'avoir nourri, merci de m'avoir dépanné, merci d'avoir pris soin de moi, merci d'avoir toléré mes chants, mes grimaces et excentricités, merci de ne m'avoir jamais dit que mes dessins explicatifs étaient moches. Je suis vraiment heureuse et me sens privilégiée de vous avoir eu un temps comme stagiaires. J'espère que vous ne profiterez pas de mon départ pour faire *n'importe quoi*.

Merci également à **Silène**, **Clém**, **Florian** et **Baptiste** pour la partie de ma vie hors labo, pour les bières du Trappist (oui, oui, je serai plus souvent présente à celle du dimanche-19h), pour les repas de Noël, pour les moments de décompression hors labo que vous avez permis. Profitons-en également pour remercier mon corps/mon organisme qui a tenu à peu près jusqu'au bout, à grand renfort de codéine, certes, mais quand même !

Le temps pour moi de rapprocher la boîte de mouchoir et on y va :

Je ne peux que remercier, humblement, chaleureusement, sincèrement, avec moult émotions, palpitations et tremblements, mes **parents**, mon **petit frère** et le reste de ma **famille**, pour leur soutien sans faille, pour leur amour, pour leur présence. Merci pour votre éducation, vos encouragements, d'avoir toujours su quoi faire pour me tirer vers le haut. Les moments passés à vos côtés m'ont permis de souffler, de me ressourcer, de me sortir la tête du guidon et ont été salvateur. De savoir que vous étiez présent était tellement rassurant, et je vous dois le courage, la pugnacité qui m'ont poussé à aller au bout.

Cela va sûrement paraître mélodramatique et cliché, mais je ne pourrais pas être la même personne si je n'avais pas grandi aux cotés de deux merveilleuses personnes, **Margaux** et **Emilie**. Cela fait plusieurs années maintenant que nos vies ont pris des chemins un peu différents et qu'un éloignement s'est doucement créé mais rien ne pourra effacer mes sentiments. Je chéris nos souvenirs, grandir avec vous a été un formidable privilège, et je n'échangerais ça pour rien au monde.

Rhéda, tu as bouleversé mon existence. Les mots m'échappent et ne peuvent retranscrire la réalité de mes sentiments et de ma reconnaissance. J'ai hâte qu'on puisse construire notre futur. Tu as encaissé le quotidien que je t'ai fait vivre en gardant foi en moi. Ton amour et ta confiance m'ont permis d'achever cette thèse. Je t'aime.

Sommaire

Sommaire

<u>LISTE DES ABREVIATIONS.....</u>	<u>7</u>
<u>LISTE DES FIGURES.....</u>	<u>9</u>
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	<u>13</u>
<u>AVANT-PROPOS</u>	<u>14</u>
<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>15</u>
I. GLIOMES ET GLIOBLASTOMES	15
I.1. LES GLIOMES	15
I.1.1. Épidémiologie	15
I.1.2. Évolution de la classification des gliomes	16
I.1.2.1. Classification histologique de l’Organisation Mondiale de la Santé	16
I.1.2.2. Classification de Sainte-Anne	17
I.2. LES GLIOBLASTOMES	18
I.2.1. Diagnostic et classification de l’Organisation Mondiale de la Santé.....	18
I.2.2. Classification génétiques et moléculaires des glioblastomes	19
I.2.2.1. Altérations des principales voies de signalisation.....	20
I.2.2.2. Altérations chromosomiques.....	21
I.2.2.3. Mutations IDH1 et IDH2	21
I.2.2.4. Modifications épigénétiques	23
I.2.2.4.1. Méthylation de l’ADN	24
I.2.2.4.2. Modification des histones	24
I.2.2.4.3. MicroARN	25
I.2.2.4.4. Régulation des voies de signalisation	25
I.2.3. Classification transcriptomique.....	26
II. PHYSIOPATHOLOGIE DES GLIOBLASTOMES.....	27
II.1. CELLULES TUMORALES	27
II.1.1. Origine et hétérogénéité.....	27
II.1.1.1. Cellules souches de glioblastome	29
II.1.1.2. Niches et cellules souches de glioblastome	30
II.1.2. Infiltration et invasion.....	31
II.1.3. Métabolisme des cellules tumorales	34
II.2. MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	35
II.2.1. Cellules du tissu sain cérébral.....	36

II.2.2. Compartiment vasculaire	36
II.2.2.1. Altération de la barrière hémato-encéphalique	36
II.2.2.2. Angiogenèse tumorale	37
II.2.2.2.1. Processus de formation des vaisseaux tumoraux	39
II.2.2.2.2. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des vaisseaux	41
II.2.2.2.3. Angiogenèse induite par l'hypoxie	41
II.2.2.2.4. Angiogenèse induite par les altérations moléculaires	43
II.2.2.2.5. Angiogenèse induite par le microenvironnement	43
II.2.3. Compartiment immunitaire/inflammatoire	44
II.2.3.1. Les lymphocytes	45
II.2.3.2. Microglie et macrophages.....	45
II.2.4. Propriétés physico-chimiques du microenvironnement.....	47
II.2.4.1. La pression interstitielle.....	47
II.2.4.2. L'acidose	47
II.2.4.3. L'hypoxie.....	49
II.2.4.3.1. Définition.....	49
II.2.4.3.2. Hypoxie dans les glioblastomes.....	51
III. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE	52
III.1. LES TRAITEMENTS CONVENTIONNELS ET LEURS LIMITES	52
III.1.1. La chirurgie	52
III.1.2. Protocoles standardisés de radio- et chimiothérapie.....	53
III.1.2.1. La radiothérapie : principe.....	53
III.1.2.1.1. Effets biologiques des rayonnements ionisants	54
III.1.2.1.2. Effet oxygène et espèces réactives de l'oxygène.....	55
III.1.2.1.3. Dommages macromoléculaires radio-induits	56
III.1.2.1.4. Réponses cellulaires aux dommages à l'ADN	58
III.1.2.1.5. Contrôle du cycle après l'irradiation	59
III.1.2.2. La chimiothérapie.....	61
III.1.2.2.1. Mode d'action du témozolomide.....	61
III.1.2.2.2. Réponses cellulaires au témozolomide.....	61
III.1.2.2.3. Rôle de l'hypoxie dans la résistance au témozolomide	61
III.1.3. Protocole de Stupp.....	62
III.2. LES NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES.....	62
III.2.1. Origines de la récurrence.....	63
III.2.2. Thérapies alternatives.....	63
III.2.2.1. Ciblage des cellules tumorales	63
III.2.2.1.1. La chirurgie	63

III.2.2.1.2. La radiothérapie.....	63
III.2.2.1.3. Les agents alkylants.....	64
III.2.2.2. Ciblage du microenvironnement	64
III.2.2.2.1. Les traitements anti-angiogéniques	64
III.2.2.2.2. L’immunothérapie.....	65
III.2.2.2.3. La réoxygénation des tumeurs.....	65
IV. HIFs ET GLIOBLASTOME	66
IV.1. HIFs : ACTEURS MOLECULAIRES MAJEURS DE L’HYPOXIE.....	66
IV.1.1. Structures des facteurs de transcription HIFs.....	67
IV.1.2. Rôle des différents domaines des HIFs	68
IV.1.3. Régulation des HIFs.....	69
IV.1.3.1. Régulation oxygène-dépendante	69
IV.1.3.1.1. Les Prolyl Hydroxylases	70
IV.1.3.1.2. Le Factor Inhibiting HIF	71
IV.1.3.1.3. Autres facteurs régulateurs dépendants de l’oxygène	72
IV.1.3.2. Régulation oxygène-indépendante	73
IV.1.4. Implications des HIFs dans la progression tumorale.....	75
IV.1.4.1. HIFs : des facteurs de mauvais pronostic dans les glioblastomes	78
IV.1.4.2. Rôles des HIFs dans la progression des glioblastomes	79
IV.1.5. HIFs et cellules tumorales.....	79
IV.1.5.1. Rôle de HIF dans les cellules souches de glioblastomes.....	79
IV.1.5.2. Rôle de HIF dans la survie des cellules de glioblastome	81
IV.1.5.2.1. HIF et prolifération cellulaire.....	81
IV.1.5.2.2. HIF et mort cellulaire	82
IV.1.5.3. Rôle de HIF dans l’immortalisation cellulaire	83
IV.1.5.4. Rôle de HIF dans la régulation du métabolisme cellulaire	83
IV.1.5.5. Rôle de HIF dans la régulation du pH.....	83
IV.1.5.6. Rôle de HIF dans l’invasion tumorale.....	85
IV.1.6. HIFs et microenvironnement.....	86
IV.1.6.1. Rôle de HIF dans l’angiogenèse et la vasculogenèse.....	86
IV.1.6.2. Rôle de HIF dans l’immunomodulation.....	88
IV.1.7. HIFs et traitements	89
IV.1.7.1. Rôle des HIFs dans la réponse à la radiothérapie.....	89
IV.1.7.1.1. Rôle de HIF-1 dans la réponse à la radiothérapie	90
IV.1.7.1.2. Rôle de HIF-2 dans la réponse à la radiothérapie	92
IV.2. HAF : UN HIF-MODULATEUR ?	92
IV.2.1. Découverte et structure de HAF.....	92

IV.2.2. Rôles de HAF	93
IV.2.2.1. HAF : un régulateur des HIFs	93
IV.2.2.2. Régulation de HAF	96
IV.2.2.3. Les autres rôles de HAF.....	96
IV.2.3. HAF et glioblastomes.....	97
<u>OBJECTIFS.....</u>	99
<u>MATERIEL ET METHODES.....</u>	101
I. METHODOLOGIE <i>IN VITRO</i>	101
I.1. CULTURE CELLULAIRE	101
I.1.1. Culture des lignées cellulaires humaines	101
I.1.2. Infection par des particules lentivirales.....	101
I.2. MODELES D'INVASION ET DE MIGRATION	102
I.2.1. Cultures organotypiques de cerveau de souris	102
I.2.2. Test de migration 2D.....	102
I.3. TRAITEMENT DES CELLULES	103
I.3.1. Hypoxie.....	103
I.3.2. Irradiation.....	103
I.4. ETUDE DE LA REPONSE CELLULAIRE AUX TRAITEMENTS.....	103
I.4.1. Etude de la réponse des cellules à l'irradiation par rayons X	103
I.4.1.1. Test de clonogénicité	103
I.4.1.2. Analyse des courbes de survie cellulaire	104
I.4.2. Etude de la survie cellulaire	104
I.4.3. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	105
I.4.4. Etude de l'apoptose par cytométrie en flux.....	105
II. METHODOLOGIE <i>IN VIVO</i>	106
II.1. MODELES D'ETUDES	106
II.1.1. Modèle orthotopique de glioblastome humain chez la souris.....	106
II.1.2. Modèle ectopique de glioblastome humain chez la souris.....	106
II.2. ETUDE LONGITUDINALE DE LA CROISSANCE TUMORALE INTRACEREBRALE PAR IRM	107
II.3. CARTES DE VOLUME SANGUIN CEREBRAL	107
III. METHODOLOGIE <i>EX VIVO</i>.....	108
III.1. COUPES HISTOLOGIQUES	108
IV. METHODOLOGIE GENERALE.....	108
IV.1. TECHNIQUES DES GENES RAPORTEURS.....	108
IV.1.1. Amplification d'ADN plasmidique.....	108

IV.1.2. Transfection par lipofection	109
IV.2. EXPRESSION TRANSCRIPTOMIQUE.....	109
IV.2.1. Extraction d'ARN cellulaire.....	109
IV.2.2. Transcription inverse.....	109
IV.2.3. PCR quantitative	109
IV.3. EXPRESSION PROTEIQUE.....	110
IV.3.1. Technique d'immuno-empreinte.....	110
IV.3.2. Immunomarquage	111
IV.4. TRAITEMENT DES DONNEES.....	111
IV.4.1. Analyse d'images	111
IV.4.2. Traitements statistiques.....	111

RESULTATS **113**

I. ETUDE DE L'EFFET DE L'EXTINCTION DE HAF SUR LA CROISSANCE DES GLIOBLASTOMES..... **113**

I.1. CARACTERISATION DU MODELE D'ETUDE.....	113
I.2. EXPRESSION DE HAF DANS LES GLIOBLASTOMES	115
I.3. VALIDATION DE L'EXTINCTION DE HAF DANS LES CELLULES U251 PAR ARN INTERFERENCE... 116	
I.4. ETUDE <i>IN VITRO</i> DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE HAF SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE.....	117
I.5. ETUDE <i>IN VITRO</i> DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE HAF SUR LA MIGRATION ET L'INVASION DES CELLULES DE GLIOBLASTOME	118
I.6. ETUDE <i>IN VIVO</i> DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE HAF SUR LA CROISSANCE TUMORALE ET LA SURVIE DES ANIMAUX.....	119
I.7. ETUDE <i>EX VIVO</i> DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE HAF SUR LES CELLULES DE GLIOBLASTOME	121
I.8. ETUDE DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE HAF SUR L'EXPRESSION TRANSCRIPTOMIQUE DE GENES CIBLES DES FACTEURS HIFs.....	124
I.9. CONCLUSION-DISCUSSION	125

II. IMPLICATION DE HIF-2 DANS LA PROGRESSION DES GLIOBLASTOMES..... **129**

II.1. EXPRESSION DE HIF-2 DANS LES CELLULES DE GLIOBLASTOME.....	129
II.2. VALIDATION DE L'EXTINCTION DE HIF-2 DANS LES CELLULES U251 PAR ARN INTERFERENCE	130
II.3. ETUDE <i>IN VITRO</i> DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE HIF-2	131
II.4. ETUDE <i>IN VIVO</i> DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE HIF-2	132
II.5. ETUDE <i>EX VIVO</i> DE L'EFFET DE L'EXTINCTION DE HIF-2 SUR LE COMPORTEMENT TUMORAL ET SON ENVIRONNEMENT.....	133
II.5.1. Modèle de tumeur orthotopique intracrânienne.....	133

II.5.1.1. Etude immunohistologique des tumeurs en début de croissance.....	133
II.5.1.2. Etude immunohistologique des tumeurs en fin de croissance	134
II.5.1.3. Etude du microenvironnement tumoral des xénogreffes intracérébrales.....	136
II.5.1.3.1. Caractérisation de la vascularisation.....	136
II.5.1.3.2. Caractérisation de l'inflammation	139
II.5.2. Modèle de tumeur sous-cutanée	141
II.6. CONCLUSION-DISCUSSION.....	142
III. EFFETS DE L'EXTINCTION DE HIF-2 OU HAF SUR LA RADIOSENSIBILITE DES CELLULES DE GLOBLASTOME.....	146
III.1. ETUDE DE LA SURVIE APRES IRRADIATION	146
III.2. ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE APRES IRRADIATION DES CELLULES	148
III.3. ETUDE DE LA MORT PAR APOPTOSE RADIO-INDUITE	150
III.4. ETUDE DES DOMMAGES A L'ADN RADIO-INDUITS.....	151
III.5. ETUDE DE L'EXPRESSION DES INTERMEDIAIRES MOLECULAIRES DES EFFETS RADIO-INDUITS ..	152
III.6. CONCLUSION-DISCUSSION	153
<u>DISCUSSION GENERALE-PERSPECTIVES.....</u>	156
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	162
<u>ANNEXE I : CURRICULUM VITAE</u>	185

Liste des abréviations

Liste des abréviations

[¹⁸ F]-	3-[¹⁸ F]-fluoro-1-(2-nitro-1-	FDA	<i>Food drug administration</i>
FMISO	imidazolyl)-2-propanol	FIH	<i>Factor-inhibiting HIF</i>
2-HG	2-Hydroxyglutarate	FLASH	<i>Fast low angle shot</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>	GB	Glioblastome
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>	G-CIMP	<i>Glioma CpG island methylator phenotype</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique	GLUT	Transporteur du glucose
ADNc	ADN complémentaire	Gy	Gray
AIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide	HAF	<i>Hypoxia-associated factor</i>
Ang1/2	Angiopoïétine 1/2	HDR	<i>Homology directed repair</i>
ARN	Acide ribonucléique	Hh-Gli	<i>Hedghog-Glioma-associated oncogene</i>
ARNi	ARN interférence	HIF-1	Complexe HIF-1 α /HIF-1 β
ARNm	Acide ribonucléique messenger	HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>	HIF-1 β	<i>Hypoxia-inducible factor 1-beta</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>	HIF-2	Complexe HIF-2 α /HIF-1 β
ATP	Adénosine TriPhosphate	HIF-2 α	<i>Hypoxia-inducible factor 2-alpha</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>	HK2	Hexokinase 2
BER	<i>Base excision repair</i>	HRE	<i>Hypoxia-response element</i>
BHE	Barrière hémato-encephalique	HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>	IDH 1/2	Isocitrate déshydrogénase 1/2
BMDC	<i>Bone marrow-derived dendritic cells</i>	IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
BSA	<i>Bovin serum albumin</i>	iNOS	Inducible nitric oxide synthase
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>	IP	Iodure de propidium
CAIX	Carbonic anhydrase 9	IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>	IRM	Imagerie par résonance magnétique
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States	KDM	<i>Histone lysine demethylase</i>
CDB	Cassure double brin	LB	Luria Broth
CO ₂	Dioxyde de carbone	LDHA	Lactate dehydrogenase A
Coll IV	Collagène IV	MCT	Transporteur de monocarboxylate
CSB	Cassure simple brin	MEC	Matrice extracellulaire
CSC	Cellule souche cancéreuse	MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
CSG	Cellule souche de glioblastome	mmHg	Millimètre de mercure
CSM	Cellule souche mésenchymateuse	MMP	Métalloprotéases matricielles
CSN	Cellule souche neurale	MMR	<i>Mismatch repair</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>	MTIC	Monométhyl triazénoimidazole carboxamide
CTLA-4	antigène-4 cytotoxique des lymphocytes T	N/C-TAD	<i>N/C-Terminal transactivation domain</i>
D37	Dose létale moyenne	N ₂ O	Protoxyde d'azote
DFX	Déferoxamine	NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>	NF1	Neurofibromatose 1
dNTP	Désoxyribonucléotide	NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	NHEJ	<i>Non-Homologous End-Joining</i>
EPO	Erythropoïétine	NLS	Signaux de localisation nucléaire
EPOR	Récepteur à l'érythropoïétine	NO	Oxyde d'azote
ERO	Espèce réactive de l'oxygène	O ₂	Dioxygène
ET	Ecart-type	ODDD	<i>Oxygen-dependant degradation domain</i>
ET-1	Endothéline-1	OER	<i>Oxygen enhancement ratio</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
		OPN	Ostéopontine

PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase	TR	Temps de répétition
PAS	Per-Arnt-Sim	TWIST1	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 1</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>	uPa	Urokinase
PCRq	<i>Polymerase chain reaction</i> quantitative	USPIO	<i>Ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death-1</i>	VBC	<i>von Hippel-Lindau-Elongin BC</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptors</i>	VEGFR-1/2	Recepteur VEGF 1/2
PDK1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1	VHL	von Hippel–Lindau
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>	VSC	Volume sangion cérébral
PDX	<i>Patient-derived xenograft</i>	VSCr	Volume sanguin cérébral relatif
PFA	Paraformaldéhyde	ZEB	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox</i>
PFK1	Phosphofructokinase-1	α -KG	Acide α -Ketoglutarique
PHD	<i>Prolyl hydroxylase</i>		
PIGF	<i>Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein</i>		
pO ₂	Pression partielle en O ₂		
PS	Pénicilline streptomycine		
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>		
RACK1	<i>Receptor For Activated C Kinase 1</i>		
RARE	<i>Rapid acquisition with relaxation enhancement</i>		
RBPJ	<i>Recombining binding protein suppressor of hairless</i>		
RECA	<i>Rat endothelial cell antigen</i>		
RI	Rayons ionisants		
ROI	Région d'intérêt		
RRP22	<i>Ras-related protein on chromosome 22</i>		
RT	Radiothérapie		
RT	<i>Reverse transcription</i>		
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase		
RX	Rayons-X		
SART1	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 1		
SDF1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>		
SF2	Fraction de survie à 2 Gy		
shARN	<i>Short hairpin ARN</i>		
SNC	Système nerveux central		
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>		
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>		
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>		
SVF	Serum de vœu fetal		
T2w	Imagerie en T2 pondérée		
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>		
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>		
TCA	Cycle de Krebs		
TCGA	The Cancer Genome Atlas		
TE	Temps d'écho		
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse		
TEP	Tomographie par émission de positons		
TERT	Telomerase reverse transcriptase		
TET	<i>Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase</i>		
TIL	<i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>		
TMZ	Témazolomide		

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Distribution des tumeurs primaires en France entre 2004 et 2009.....	15
Figure 2 : Diagnostic des gliomes selon la classification de Sainte-Anne.	17
Figure 3 : Caractéristiques morphologiques des cellules de GB après coloration à l'hématoxyline/éosine.....	18
Figure 4 : Caractéristiques histologiques des glioblastomes après coloration à l'hématoxyline/éosine.	19
Figure 5 : Principales altérations moléculaires observées dans les glioblastomes	20
Figure 6 : Conséquences des mutations IDH sur la progression tumorale.	23
Figure 7 : Classification moléculaire de Verhaak.	27
Figure 8 : Différenciation normale des cellules souches neurales et hypothèse de l'origine des glioblastomes... ..	29
Figure 9 : Composants cellulaires des niches périvasculaire, hypoxique et invasive dans les glioblastomes.	31
Figure 10 : Processus d'invasion des cellules de glioblastome dans le tissu cérébral sain.	33
Figure 11 : Les différentes voies de migration des cellules tumorales.....	34
Figure 12 : Représentation des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie.....	35
Figure 13 : Représentation du microenvironnement tumoral des glioblastomes.....	36
Figure 14 : Distance limite de diffusion de l'oxygène conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.	38
Figure 15 : Mise en évidence des structures vasculaires issues de l'angiogenèse tumorale.....	39
Figure 16 : Mise en évidence de mimétisme vasculaire dans un glioblastome humain et impact sur la survie des patients.	39
Figure 17 : Modes de formation des vaisseaux sanguins en conditions physiologiques et pathologiques.	40
Figure 18 : Imageries de la vascularisation cérébrale et tumorale.	41
Figure 19 : Modèle de développement tumoral par cooptation des vaisseaux hôtes par les cellules tumorales. ..	43
Figure 20 : Description des principaux acteurs responsables du processus angiogénique en condition pathologique.....	44
Figure 21 : Immunodétection des macrophages sur biopsies de patients et impact des phénotypes M1 et M2 sur la survie des patients souffrant de glioblastome.....	47
Figure 22 : Représentation des voies impliquées dans la régulation du pH intra- et extracellulaire.	48
Figure 23 : Mise en place du gradient d'oxygène au cours de la croissance tumorale par analyse <i>in silico</i>	50
Figure 24 : Illustration des niveaux d'oxygénation dans la tumeur en fonction de la distance et de la fonctionnalité des vaisseaux.....	50
Figure 25 : Détection des régions hypoxiques par imagerie TEP [18F]-FMISO chez un patient souffrant de glioblastome.....	51
Figure 26 : Courbes de survies des patients en fonction de l'intensité et du volume hypoxique.	52
Figure 27 : Représentation des propriétés infiltrantes des cellules de glioblastome en pré- et post-opératoire. ...	53
Figure 29 : Irradiation conformationnelle avec modulation d'intensité.	54
Figure 30 : Représentation des effets biologiques directs et indirects de l'irradiation ionisante.	55

Figure 31 : Représentation de l'effet oxygène en radiothérapie.....	56
Figure 32 : Dommages cellulaires radio-induits.	57
Figure 33 : Voies de transductions du signal cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN.....	58
Figure 34 : Mécanismes de réparation des dommages de l'ADN.	59
Figure 35 : Représentation des différents morts cellulaires radio-induites.....	60
Figure 28 : Prise en charge thérapeutique des patients selon le protocole standardisé de Stupp.....	62
Figure 36 : Structures des isoformes de HIF- α et HIF- β et formation du complexe HIF- α /HIF- β	67
Figure 37 : Régulation de gènes cibles de HIF-1 en fonction des domaines de transactivation N-TAD et C-TAD.	69
Figure 38 : Acteurs moléculaires de la régulation de HIF-1 α selon des voies de dégradation dépendante ou indépendante de l'oxygène.....	70
Figure 39 : Illustration de l'expression et de l'activité de HIF-1 en fonction des niveaux d'oxygène et du temps.	71
Figure 40 : Régulation de l'activité des prolyl hydroxylases et du Factor Inhibiting HIF en fonction de l'oxygénation.	72
Figure 41 : De nombreux mécanismes régulent différemment HIF-1 α et HIF-2 α	74
Figure 42 : Illustration des sites de fixation des régulateurs de HIF-1 α et HIF-2 α	74
Figure 43 : Exemple des processus biologiques régulés par HIF-1 α et/ou HIF-2 α	75
Figure 44 : L'expression et les fonctions des HIFs peuvent être rétroactivement régulées.	77
Figure 45 : Expression de HIF-1 α et HIF-2 α sur biopsie de glioblastome humain.....	78
Figure 46 : Représentation des processus régulés par l'hypoxie et l'expression des facteurs HIFs.....	79
Figure 47 : Illustration du maintien du phénotype des cellules souches de glioblastome par le couple OPN/CD44.....	80
Figure 48 : L'action de HIF-1 sur la prolifération et la survie cellulaire peut être médiée par la voie RTK/PI3K/Akt.	82
Figure 49 : Influence de HIF dans la régulation du métabolisme cellulaire.....	84
Figure 50 : Détection par immunomarquage de HIF-1 α et de CAIX chez des patients souffrant d'un glioblastome.....	84
Figure 51 : Régulation de la progression tumorale par HIF.....	85
Figure 52 : Schématisation de la transition épithélio-mésenchymateuse.	86
Figure 53 : Schématisation de l'infiltration des macrophages au cours de la croissance tumorale.....	88
Figure 54 : Distribution restreinte des chimiothérapies en lien avec l'hypoxie.	89
Figure 55 : Mécanismes impliqués dans l'augmentation de l'activité de HIF-1 et conséquences sur la tumeur après irradiation.	91
Figure 56 : Structure de HAF et sites de liaisons de HAF sur les facteurs HIFs.....	94
Figure 57 : HIF-1 α est régulé selon deux voies dépendantes ou non de l'oxygène.	95
Figure 58 : Modèle de régulation de l'activation de HIF-2 α par HAF.....	95
Figure 59 : HAF est responsable du <i>switch</i> d'expression HIF-1>HIF-2.....	96
Figure 60 : HAF a également un rôle dans l'intégrité du spliceosome et de l'épissage de la sororine.	97
Figure 61 : HAF, un facteur de mauvais pronostic dans les gliomes de bas grade.	98

Figure 62 : Stratégies expérimentales adoptées pour étudier l'impact de HIF-2 dans la croissance des glioblastomes.	100
Figure 63 : Analyse des statuts des gènes TP53, IDH1 et IDH2 des cellules U251.....	113
Figure 64 : Caractérisation du modèle orthotopique de cellules U251.	114
Figure 65 : Caractérisation de l'expression de HAF dans des tissus humains et dans les cellules U251 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	115
Figure 66 : Caractérisation de l'extinction de HAF sur les cellules U251.	116
Figure 67 : L'inhibition de HAF diminue la prolifération des cellules U251 <i>in vitro</i>	117
Figure 68 : L'inhibition de HAF ne modifie pas la migration ni l'invasion des cellules U251 <i>in vitro</i>	119
Figure 69 : L'inhibition de HAF retarde la croissance des cellules U251 implantées dans le striatum de souris.	120
Figure 70 : Caractérisation de la vascularisation de faible et fort volume.	122
Figure 71 : Caractérisation de l'inflammation de faible et fort volume.	123
Figure 72 : Effets de l'inhibition de HAF sur l'expression des ARNm de gènes cibles des facteurs HIF-1 et HIF-2.	124
Figure 73 : Effets de l'inhibition de HAF sur l'activité luciférase et la régulation de HIF-1 α et HIF-2 α	127
Figure 74 : Caractérisation de l'expression de HIF-2 α dans un glioblastome humain et dans les cellules U251 <i>in vitro</i>	129
Figure 75 : Caractérisation de l'extinction de HIF-2 α dans les cellules U251.	130
Figure 76 : L'inhibition de l'expression de HIF-2 α n'altère pas la prolifération cellulaire mais favorise la migration monodirectionnelle et l'invasion des cellules U251.	131
Figure 77 : L'inhibition de l'expression de HIF-2 α favorise la croissance des tumeurs issues de l'implantation intrastriatale des cellules chez la souris.....	132
Figure 78 : Etudes immunohistologiques de l'invasion, la vascularisation et de l'inflammation des tumeurs U251 de faible volume.....	133
Figure 79 : Etudes immunohistologiques du caractère hypoxique des tumeurs U251 de fort volume.....	135
Figure 80 : Etudes immunohistologiques de la densité cellulaire et de l'invasion des tumeurs U251 de fort volume.	136
Figure 81 : Etudes immunohistologiques de la vascularisation des tumeurs U251 de fort volume.	137
Figure 82 : Analyse de la composante vasculaire des tumeurs U251 de petit volume.....	138
Figure 83 : Analyse de l'inflammation des tumeurs U251 de fort volume.	140
Figure 84 : Analyse de la croissance tumorale et caractérisation immunohistologique des tumeurs U251 dans un modèle sous-cutané.	141
Figure 85 : Effet de l'inhibition de HIF-2 α sur l'activité luciférase et la régulation de HIF-1 α et HIF-2 α	144
Figure 86 : Effet de l'irradiation par RX sur la survie des U251-shScr, U251-shHAF et U251-shHIF2 en condition de normoxie et d'hypoxie.....	147
Figure 87 : Analyse de la survie cellulaire des cellules U251-shScr, U251-shHIF2 et U251-shHAF de 0 à 120 h après une irradiation (RX) des cellules à la dose de 8 Gy.....	149
Figure 88 : Analyse de la survie cellulaire des cellules U251-shScr, U251-shHAF et U251-shHIF2 après une irradiation (RX) des cellules à la dose de 8 Gy.	151

Figure 89 : Analyse de la réponse des dommages à l'ADN des cellules U251-shScr, U251-shHAF et U251-shHIF2 après une irradiation (RX) des cellules à la dose de 8 Gy.	152
Figure 90 : Immunomarquage de la cycline B1 et de la caspase 3 clivée dans les cellules U251-shScr et U251-shHIF2 après une irradiation (RX) des cellules à la dose de 8 Gy.	153
Figure 91 : Effets de l'inhibition de HIF-2 α sur la radiorésistance des cellules U251.....	154

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des gliomes selon l’OMS.	16
Tableau 2 : Définition des niveaux d’oxygénation.	49
Tableau 3 : Amorces utilisées en RT-qPCR.....	110
Tableau 4 : Anticorps utilisés en immunomarquage.	112

Avant-propos

Avant-propos

Les glioblastomes (GB) sont les tumeurs primitives malignes du système nerveux central (SNC) les plus fréquentes et les plus agressives chez l'adulte. Initialement qualifiés de multiforme, les GB constituent un groupe de tumeurs astrocytaires hétérogènes en raison de leur importante variabilité morphologique, cytologique et moléculaire. À l'heure actuelle, les GB ne bénéficient toujours pas d'une thérapeutique efficace, avec moins de 10 % de survie des patients cinq ans après le diagnostic. Il est désormais clairement démontré que l'hypoxie contribue à la progression de ces tumeurs mais aussi à leur résistance aux traitements de chimio- et radiothérapie et ce, en activant un ensemble de réponses adaptatives régulées majoritairement par HIF-1 α et HIF-2 α , les deux membres principaux de la famille des facteurs de transcription HIFs.

La majorité des travaux menés jusqu'à présent sur les GB illustre l'importance du facteur HIF-1 α dans la gliomagenèse et la résistance aux traitements de chimio- et radiothérapie. En revanche, les connaissances relatives à HIF-2 α sont beaucoup plus parcellaires et suggèrent que ce facteur serait impliqué dans la régulation de la tumorigénèse des cellules souches de GB (CSG). Cependant, des travaux antérieurs de l'équipe suggèrent que cette isoforme de HIF pourrait agir également sur les cellules de GB différenciées. C'est dans ce contexte que ces travaux de thèse ont été menés afin d'enrichir les données concernant le rôle de HIF-2 α dans la gliomagenèse et dans la réponse à la radiothérapie. Afin d'étayer le choix de notre démarche expérimentale, l'introduction de ce manuscrit a été organisée en quatre grandes parties.

La première partie de l'introduction s'intéresse à présenter les connaissances relatives aux caractéristiques cliniques des GB. La deuxième partie s'attache à décrire les différents événements de la physiopathologie de ces tumeurs cérébrales en prenant en compte leurs différents compartiments. La troisième partie se consacre à présenter les connaissances relatives à l'hypoxie ainsi qu'à la régulation des facteurs HIFs. Enfin, la dernière partie expose la contribution des HIFs dans la physiopathologie des GB et leur réponse à la radiothérapie.

Introduction

Introduction

I. Gliomes et Glioblastomes

I.1. Les gliomes

I.1.1. Épidémiologie

Les gliomes représentent 80 % des tumeurs malignes du Système Nerveux Central (SNC) (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Le terme « gliome » regroupe les tumeurs ayant pour origine une cellule gliale et comprend les astrocytomes, les oligodendrogliomes, les oligoastrocytomes et les tumeurs épendymaires (**Figure 1**). En France, la proportion des gliomes correspond à 42,4 % des tumeurs primitives du SNC (Zouaoui *et al.*, 2012).



Les symptômes présentés par le patient tels l'apparition d'intenses maux de têtes dus à une pression intracrânienne élevée, de déficits neurologiques, de perte de mémoire, conduisent à des examens complémentaires par imagerie. Le diagnostic établi par imagerie par résonance magnétique (IRM) avec injection d'un produit de contraste permet alors d'évaluer la taille, la localisation, l'évolution et l'aspect du gliome.

Bien que les examens par imagerie permettent d'orienter le diagnostic, seule l'analyse histologique permettra de déterminer le type et le grade de la tumeur. Ils seront établis à partir d'une biopsie stéréotaxique ou d'une pièce d'exérèse en fonction des critères anatomopathologiques définis par la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Louis *et al.*, 2016).

I.1.2. Évolution de la classification des gliomes

I.1.2.1. Classification histologique de l'Organisation Mondiale de la Santé

L'hétérogénéité histologique des gliomes a rendu complexe leur classification. Depuis 1926, différents auteurs ont successivement tenté de proposer une classification des gliomes. En 1949, Kernohan et Mabon proposèrent que les gliomes se développent à partir de cellules adultes susceptibles de se différencier, et introduisirent la notion de « grade » histologique de malignité (Kernohan & Mabon, 1949). C'est à la suite de ces travaux que la classification des gliomes s'est basée sur des critères anatomo-cytopathologiques, définissant ainsi des degrés de malignité croissants, et a servi à établir la classification de l'OMS en 1979. Celle-ci a subi plusieurs révisions depuis : 1993, 2000, 2007 et plus récemment en 2016.

Suivant la classification en vigueur en 2007, les gliomes ont été subdivisés en différents groupes sur la base de données anatomo-cytopathologiques : astrocytomes, oligodendrogliomes et oligoastrocytomes (**Tableau 1**) (Louis *et al.*, 2007). Un grade de malignité (grades I à IV) est ensuite attribué en fonction des critères suivants : l'augmentation de la densité cellulaire, les atypies cytonucléaires, la proportion de cellules mitotiques, l'hyperplasie vasculaire et la nécrose tissulaire (Figarella-Branger *et al.*, 2008). Ainsi, les gliomes de bas grade comprennent les grades I et II et les gliomes de haut grade incluent les grades III et IV.

Grade OMS	I	II	III	IV
Tumeurs astrocytaires				
Astrocytome à cellules géantes subependymaire	•			
Astrocytome pilocytique	•			
Astrocytome pilomyxoïde		•		
Astrocytome diffus		•		
Xanthoastrocytome pléomorphe		•		
Astrocytome anaplasique			•	
Glioblastome				•
Glioblastome à cellules géantes				•
Gliosarcome				•
Tumeurs oligodendrogiales				
Oligodendrogliome		•		
Oligodendrogliome anaplasique			•	
Tumeurs oligoastrocytaires				
Oligoastrocytome		•		
Oligoastrocytome anaplasique			•	

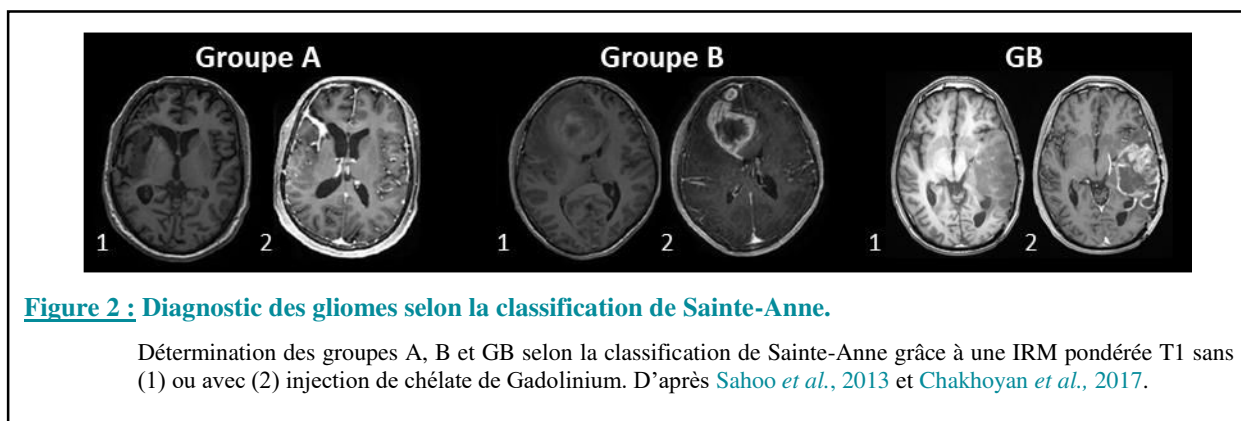
Tableau 1 : Classification des gliomes selon l'OMS.

Adapté Louis *et al.*, 2007.

À l'heure actuelle seule la classification de l'OMS est reconnue par la communauté scientifique internationale. Cependant, celle-ci est fortement dépendante de la qualité de la biopsie et de sa localisation qui peuvent être non représentatives de l'hétérogénéité et de l'infiltration tumorale dans le parenchyme sain (Ohgaki & Kleihues, 2007). En outre, le diagnostic pourra être également dépendant de l'analyse anatomopathologique et de son interprétation (van den Bent, 2010). C'est pourquoi, en 1997, des praticiens de l'hôpital de Sainte-Anne proposèrent d'améliorer cette classification en incorporant des données d'imagerie.

I.1.2.2. Classification de Sainte-Anne

La classification de Sainte-Anne définit un système de « *grading* », basé sur la prise de contraste (ou non) lors de l'IRM, associée à une prolifération microvasculaire (groupe A ou B). Le groupe A (Figure 2) correspond à l'absence de la prise de contraste, reflétant une absence d'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE), et à l'absence d'hyperplasie. Ce groupe est représentatif des gliomes de bas grade. Le groupe B (Figure 2) correspond à la prise de contraste traduisant une altération de la BHE et à une hyperplasie endothéliale. Il est représentatif des gliomes de haut grade et est de plus mauvais pronostic que le groupe A. Sur cette base, la classification de Sainte-Anne propose donc trois groupes de gliomes (Figure 2) : les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes du groupe A, les oligoastrocytomes de groupe B, et les GB (Daumas-Duport *et al.*, 1997; Sahoo *et al.*, 2013; Chakhoyan *et al.*, 2017).



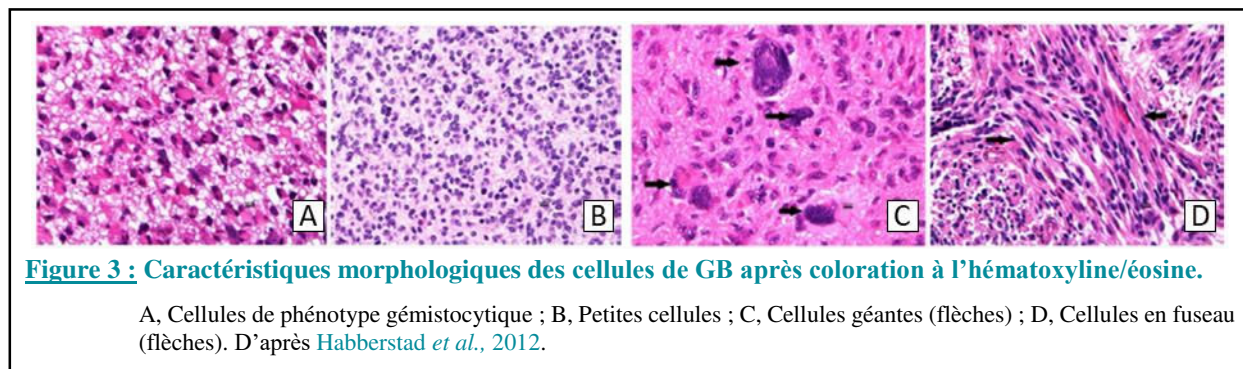
Toutefois, au regard des améliorations apportées par la classification de l'OMS de 2016, cette classification associant les données d'imagerie tend à être abandonnée en pratique et n'est pas reconnue par la communauté scientifique.

I.2. Les glioblastomes

I.2.1. Diagnostic et classification de l'Organisation Mondiale de la Santé

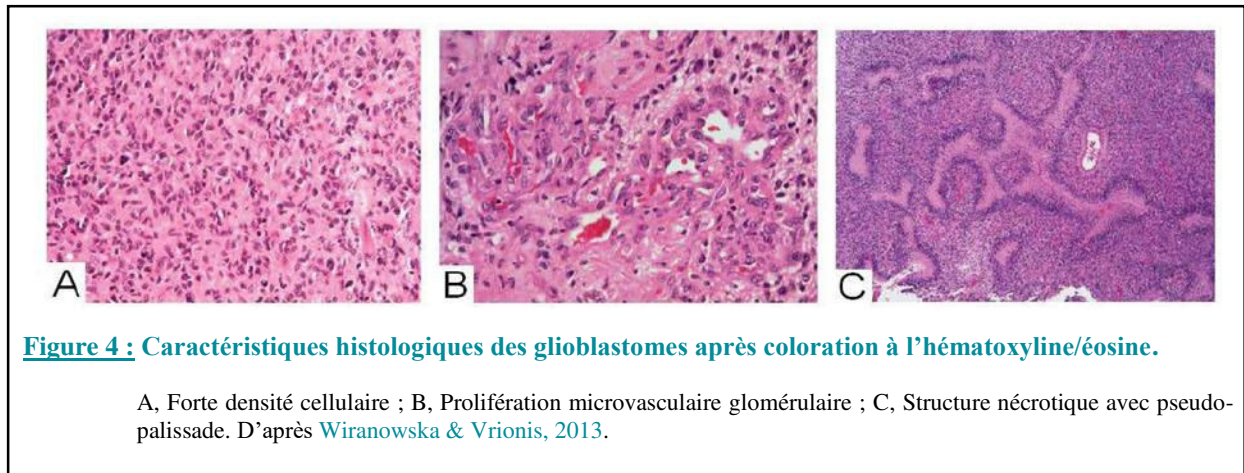
Selon le recensement national histologique des tumeurs primitives du SNC datant de 2012, les glioblastomes (GB) appartiennent aux tumeurs astrocytaires et correspondent à 52 % des gliomes (Zouaoui *et al.*, 2012). D'un point de vue épidémiologique, le sexe ratio homme/femme est de 1,4 (Zouaoui *et al.*, 2012) et l'âge médian de diagnostic est d'environ 63 ans. La compilation des registres européens (Wöhler *et al.*, 2009; Zouaoui *et al.*, 2012) et américains (Ostrom *et al.*, 2016) a permis d'évaluer l'incidence dans les pays occidentaux à environ 4 GB pour 100 000 habitants/an. Ces données sont similaires à celles obtenues par le CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*), le registre des USA recensant depuis 26 années des données épidémiologiques sur les cancers cérébraux. Les GB font partie des tumeurs les plus agressives du SNC. L'évolution de ces tumeurs est péjorative et la récurrence tumorale est inéluctable et, en dépit de l'arsenal thérapeutique lourd déployé, la médiane de survie ne dépasse pas 15 mois (Chinot *et al.*, 2014).

À l'échelle microscopique, les GB apparaissent comme étant hétérogènes à deux niveaux, tout d'abord d'un patient à un autre, et ensuite au sein d'une même tumeur. Par exemple, comme illustré sur la **Figure 3**, la morphologie des cellules tumorales ou leur densité peut varier selon la localisation intra-tumorale (Habberstad *et al.*, 2012).



Bien qu'il existe une hétérogénéité de la morphologie cellulaire et tissulaire, quatre critères retenus par la classification de l'OMS 2007 permettent d'établir un diagnostic des GB (Wiranowska & Vrionis, 2013) :

- une densité cellulaire élevée (**Figure 4 A**) ;
- une activité mitotique supérieure à 10 % ;
- une prolifération endothélio-capillaire (**Figure 4 B**) ;
- des plages de nécrose (**Figure 4 C**).



Selon cette classification, les GB appartiennent aux astrocytomes de grade IV ce qui permet de distinguer :

- les GB *de novo* ou GB primaires, les plus fréquents survenant chez des populations âgées (environ 62 ans) ;
- les GB secondaires qui se développent à partir d'un astrocytome de grade inférieur. Ils sont plutôt observés chez les jeunes patients (environ 45 ans) et sont minoritaires.

Toutefois, ces 2 sous-types ne se distinguent pas sur le plan histologique et ont été discriminés suite à l'évolution récente de la classification de l'OMS qui intègre désormais des paramètres génotypiques et moléculaires (Louis *et al.*, 2016). Ainsi, la recherche de mutation du gène de l'isocitrate déshydrogénase-1 (IDH1) est devenue systématique afin de distinguer, pour chaque type histologique de tumeur, deux groupes : les tumeurs IDH *wild-type* et les tumeurs IDH mutées.

Cette hétérogénéité histologique des GB a conduit à rechercher si elle n'était pas associée à des caractéristiques moléculaires.

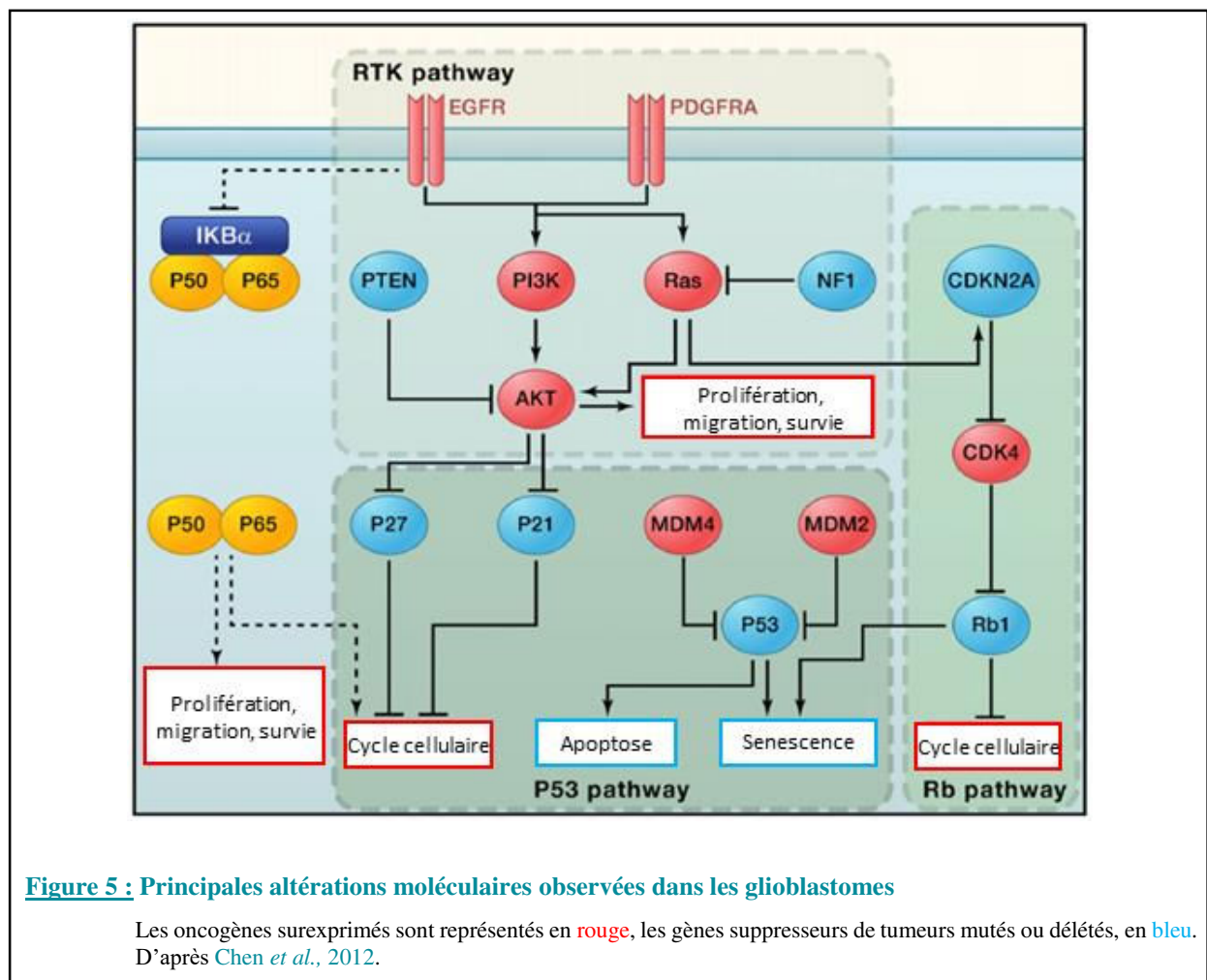
I.2.2. Classification génétiques et moléculaires des glioblastomes

Les altérations génétiques correspondent le plus souvent à des mutations « gain de fonction » des récepteurs à activité tyrosine-kinase, des mutations « perte de fonction » de gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que plusieurs types de délétions chromosomiques.

I.2.2.1. Altérations des principales voies de signalisation

Quatre voies de signalisation sont majoritairement modifiées dans les GB (**Figure 5**) (Parsons *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012) :

- La signalisation RTK/RAS/PI3K/AKT est altérée dans 88 % des cas et diminue l'apoptose, favorise la prolifération et l'invasion des cellules de GB. Cette voie de signalisation est modulée en amont par des récepteurs à tyrosine kinase dont l'EGFR. Ce dernier est retrouvé muté dans environ 50 % des GB.
- La signalisation p53 est affectée dans 87 % des cas et conduit principalement à des altérations du contrôle de l'apoptose, de la sénescence et du cycle cellulaire.
- La signalisation pRB est affectée dans 78 % des cas et induit la perte du contrôle du cycle cellulaire dans les cellules tumorales.
- L'activation aberrante de NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) va favoriser le maintien des cellules *stem-like*, un phénotype mésenchymateux et l'invasion, et aussi la résistance à la radiothérapie.



I.2.2.2. Altérations chromosomiques

L'hétérogénéité cytogénétique résultant de remaniements chromosomiques importants a été démontrée dans les GB par de multiples études.

La perte d'hétérozygotie la plus fréquente est celle du chromosome 10 qui a été identifiée dans 70 % des GB. Dans la majorité des cas, la perte complète du chromosome 10 est retrouvée dans les GB primaires alors que les GB secondaires sont plus touchés par la perte partielle ou totale du bras long du chromosome 10 (Fujisawa *et al.*, 2000). La perte du locus contenant le gène *PTEN*, un inhibiteur de l'axe RTK/AKT, est quant à elle détectée dans 25 % des cas (Crespo *et al.*, 2015). D'autres délétions ont été mises en évidence, comme celles des gènes *TP53*, *CDKN2A/B*, *RB1* et *NF1* (Chen *et al.*, 2012). À l'inverse, l'amplification chromosomique de locus de gènes oncogéniques est aussi fréquente : la plus commune, dans 97 % des cas, est l'amplification du chromosome 7 qui contient le locus codant pour l'*EGFR*. Les locus des gènes *PI3K*, *PDGFRA*, *CDK4*, *MDM2* sont aussi sujets à des amplifications chromosomiques (Beroukhim *et al.*, 2007).

Par conséquent, les GB primaires se caractérisent essentiellement par une amplification de l'*EGFR* (36 %), une délétion de p16INK4A (31 %), une mutation de *PTEN* (25 %), les mutations de *TP53* étant plus rares (30 %) (Watanabe *et al.*, 1996; Ohgaki & Kleihues, 2007). Au contraire, les GB secondaires se caractérisent principalement par des mutations de *TP53* (65 % des cas), l'amplification de l'*EGFR* étant plus rare (8 %) ainsi que la délétion de p16INK4 (19 %) et la mutation de *PTEN* (4 %).

I.2.2.3. Mutations IDH1 et IDH2

L'identification de mutation du gène codant IDH1 (isocitrate deshydrogénase) a eu de nombreuses répercussions à la fois sur la classification des gliomes, mais également sur le pronostic des patients (Parsons *et al.*, 2008).

IDH1 et IDH2 appartiennent à la famille des enzymes IDH localisées dans le cytoplasme (IDH1) et les mitochondries (IDH2). Ces enzymes, de structure très similaire, sont impliquées dans un certain nombre de processus cellulaires, dont la phosphorylation oxydative mais également dans le métabolisme de la glutamine, la lipogénèse, la régulation du statut redox de la cellule.

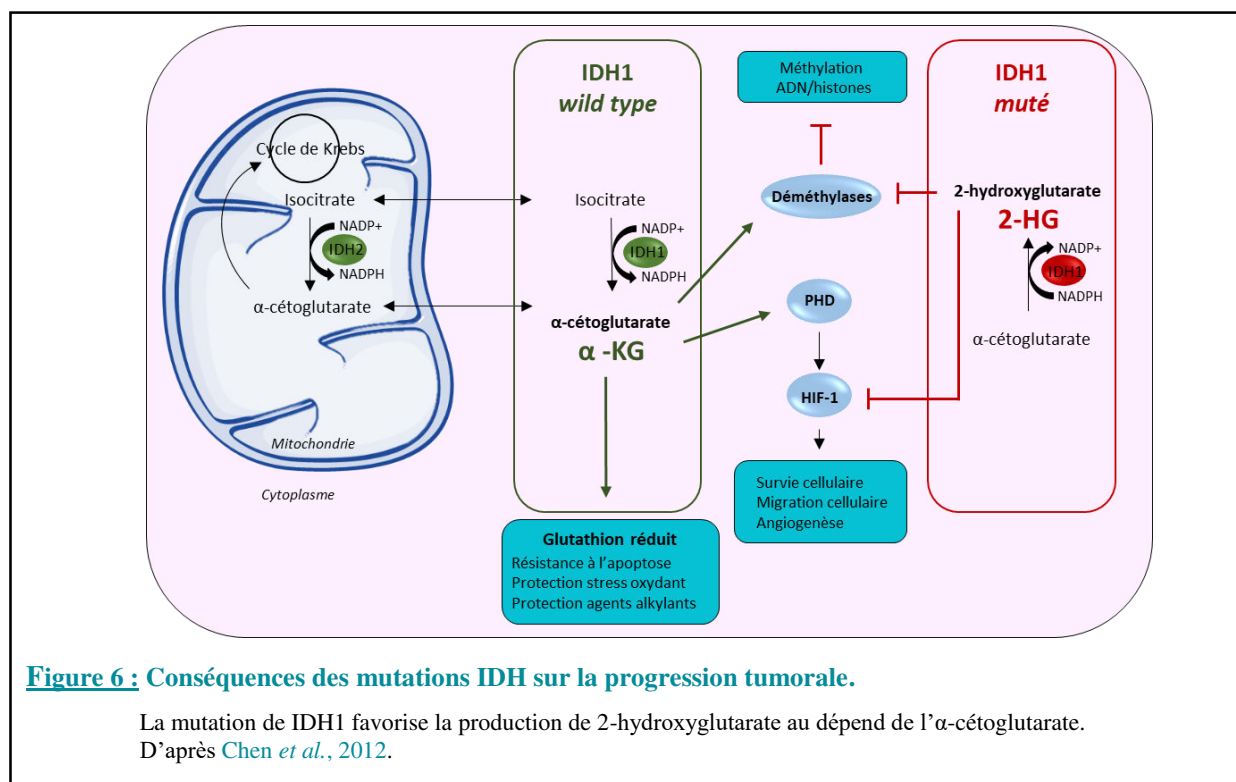
En conditions physiologiques, au cours du cycle de Krebs, IDH1 et IDH2, catalysent de façon réversible, la formation du NADP⁺ et ce par décarboxylation oxydative de l'isocitrate en alpha

cétoglutarate (α -KG) (**Figure 6**). Le NADPH produit est un agent réducteur essentiel aux processus de détoxification cellulaires par réduction du glutathion et des thiorédoxines et l'activation de la catalase, chacune de ces molécules étant impliquée dans la protection contre la toxicité des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ce glutathion réduit, en outre, limitera la mort par apoptose des cellules et assurera une protection de ces cellules vis-à-vis de certains agents alkylants.

Dans les gliomes, IDH1 et IDH2 sont toutes deux le siège de mutations. 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 de fait 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 -KG en faveur de celle du 2-hydroxyglutarate (2-HG) (**Figure 6**) et ce, de manière NADPH-dépendante (*Dang et al., 2009; Reitman et al., 2010*). Cette production de 2-HG peut atteindre des niveaux 50 à 100 fois plus élevé que dans les cellules normales. Le 2-HG ayant une structure moléculaire très proche de celle de l' α -KG, rentre en compétition avec celui-ci l'empêchant d'exercer ses rôles. Toutefois, le 2-HG étant un faible compétiteur, il ne pourra exercer ses effets que lorsque sa concentration intracellulaire sera élevée. La perturbation du métabolisme de l' α -KG au dépend du 2-HG aura plusieurs conséquences sur la progression tumorale. Ainsi, une des conséquences d'un statut en faveur du 2-HG sera de limiter au sein des cellules tumorales, la disponibilité des systèmes de protection contre les ERO précédemment cités (**Figure 6**). Par ailleurs, l' α -KG étant également décrit comme un cofacteur activateur de certaines di-oxygénases, celui-ci participe à différents processus comme la réponse à l'hypoxie (**Figure 6**), l'angiogenèse, et la régulation épigénétique. Suite à la mutation de IDH1, en agissant indirectement, sur les niveaux de NADPH, la production de 2-HG aurait un rôle protecteur des cellules tumorales en empêchant la dégradation du facteur HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α*), ce qui potentialiserait la croissance et l'angiogenèse tumorale (*Zhao et al., 2009*).

Le 2-HG serait impliqué également dans le remodelage du méthylome. A titre d'exemple, l'accumulation du 2-HG dans la cellule entraîne l'inhibition des *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase* (TET1 et TET2) donnant lieu à une modification épigénétique avec une hyperméthylation de l'ADN (*G-CpG Island Hypermethylated Phenotype*, G-CIMP) et des histones (*Koivunen et al., 2012*). Il faut noter que cette hyperméthylation concerne notamment la méthylation du gène MGMT qui nous intéressera en particulier dans le cas des GB.

Enfin, ces enzymes agissant sur de multiples substrats du métabolisme, les mutations IDH1/2 pourraient affecter d'autres processus cellulaires contribuant à la gliomagenèse (**Figure 6**).



Environ 75 % de gliomes de bas grade (grades II/III) possèdent des mutations de *IDH1* ou *IDH2* ([Yan et al., 2009](#)). En revanche, seuls 5 % des GB primaires en sont affectés, et plus de 80 % des GB secondaires ont une *IDH1* mutée ([Sanson et al., 2009](#); [Nobusawa et al., 2009](#)). Dans ces derniers, la mutation *IDH2* est également détectée mais de façon moins fréquente, alors qu'elle est absente dans les GB primaires ([Yan et al., 2009](#)).

Les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* sont considérées comme de bon pronostic puisqu'une mutation de *IDH1* provoque un arrêt du cycle cellulaire et une sensibilisation au témozolomide (TMZ) ([Wang et al., 2014](#)). De plus, ces mutations favorisent l'efficacité de la radiothérapie tout en diminuant la croissance et l'invasion cellulaires ([Li et al., 2016](#)). Tous ces résultats soulignent l'importance des mutations *IDH1/IDH2* dans le diagnostic, le pronostic et le traitement des GB et ont conduit à les intégrer dans la dernière classification de l'OMS.

I.2.2.4. Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques se définissent comme étant les changements stables, héréditaires et réversibles, d'expression des gènes sans altérer la séquence d'ADN. Ainsi,

l'activité du génome sera modulée sans changement de sa séquence. Les modifications épigénétiques incluent 4 principaux processus : la méthylation de l'ADN, les modifications d'histone, un remodelage de la chromatine, les miARN.

I.2.2.4.1. Méthylation de l'ADN

Les méthylations anormales de séquence promotrices est fréquente dans les cellules tumorales et conduit à une répression transcriptionnelle stable du gène cible. Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la modification épigénétique la plus importante dans les GB affecte l'expression du gène *MGMT* (*O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*). Cette enzyme est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN suite à l'alkylation des bases guanine. Dans les GB, une hyperméthylation du promoteur de la *MGMT* est fréquemment observé conduisant à une inhibition l'expression de l'enzyme, l'empêchant d'exercer son rôle protecteur des dommages à l'ADN (Esteller *et al.*, 2000). Il a été ainsi rapporté que cette méthylation du promoteur de la *MGMT* était corrélée à un meilleur pronostic et à une meilleure réponse thérapeutique au TMZ (Stupp *et al.*, 2005). Plus récemment, le consortium du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) a identifié un phénotype particulier caractérisé par une signature hyperméthylée de l'ADN au niveau d'îlots CpG, le G-CIMP (cf. page 22), associée positivement aux mutations des gènes *IDH* et donc lié à une meilleure survie (Reifenberger *et al.*, 2017). Ce phénotype est plus fréquemment observé dans les GB secondaires que primaires.

I.2.2.4.2. Modification des histones

Des altérations au niveau des histones peuvent également jouer un rôle dans la gliomagenèse. Les modifications post-traductionnelles des histones s'effectuent principalement en N-terminal de ces protéines et vont entraîner un remodelage de la chromatine. Ces régulateurs de la chromatine étant soit tumorigéniques soit suppresseurs de tumeurs sont impliqués dans de nombreux cancers. Il existe différentes catégories de modifications, l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation étant les plus connues.

Dans les GB, des mutations ont été retrouvées pour des histones déacétylases (HDAC2, HDAC9), des histones déméthylases (JMJD1A, JMJD1B), et des histones méthyltransférases (SET7, SETD7, MLL, MLL3, MLL4) (Kim, 2014). Certaines modulations d'expression de déacétylases telles HDAC1, HDAC2 et HDAC3, ont été également associées à la récurrence et à la progression des tumeurs gliales (HDAC1, HDAC2 et HDAC3). Enfin, des modifications d'histones conduisant à une perturbation de l'expression de certains gènes a été rapportée dans

plusieurs études. A titre d'exemple, la répression de l'expression du gène suppresseur de tumeur RRP22 (*Ras-related protein on chromosome 22*) et du régulateur du cycle cellulaire p21, combinée à une augmentation d'expression du facteur de transcription pro-prolifératif HOXA9, ont été incriminées à des modifications des histones (Schmidt *et al.*, 2012).

I.2.2.4.3. MicroARN

Les miARN sont des petits ARN non codants de 18 à 25 nucléotides régulant l'activité post-transcriptionnelle des gènes. Les miARN sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires régulatrices, certains exercent des effets oncogènes, on parle alors d'« oncomirs », d'autres sont qualifiés de suppresseurs de tumeur. De façon non exhaustive, les miARN peuvent notamment intervenir dans la régulation de la prolifération cellulaire (miR-137, miR-203, miR-21, miR-182 etc.), de l'invasion cellulaire (miR-7, miR-124, miR-655, miR-20a etc.) mais aussi de l'angiogenèse (miR-125b, miR-101, cluster miR-17-92, miR-93 etc.) alors que d'autres participeront à la résistance aux traitements alkylants (miR-145, miR-10, miR-195, miR-455) (Bronisz *et al.*, 2016; Ahir *et al.*, 2017).

Au vu de la dérégulation de ces miARN, ces derniers pourraient servir de biomarqueurs circulants pour le diagnostic des patients. Ainsi, la mise en évidence d'une augmentation du taux circulant de miR-128 et une diminution du miR-342-3p dans des échantillons de sang de patients souffrant de GB vient appuyer cette perspective (Roth *et al.*, 2011).

I.2.2.4.4. Régulation des voies de signalisation

Des voies de signalisation importantes dans la tumorigénèse des GB seraient également sujettes à des régulations épigénétiques. Ainsi, la levée de l'inhibition de la cascade de signalisation Wnt contrôlée par l'expression des gènes *DKK1*, *SFRP1* et *WIF1* via des méthylations de l'ADN et des modifications des histones a été démontrée dans les GB comparativement au tissu cérébral sain (Klaus & Birchmeier, 2008). De plus, la voie de signalisation *Hedgehog-Glioma-associated oncogene* (Hh-Gli) est également anormalement activée dans les GB et favorise à la fois la croissance tumorale ainsi que l'auto-renouvellement des CSG (Malatesta *et al.*, 2013). L'activation de cette voie requiert une histone acétyltransférase, la PCAF qui se lie directement sur Gli et qui permettent l'acétylation en H3K9 des promoteurs des gènes cibles de la voie Hh (Malatesta *et al.*, 2013).

I.2.3. Classification transcriptomique

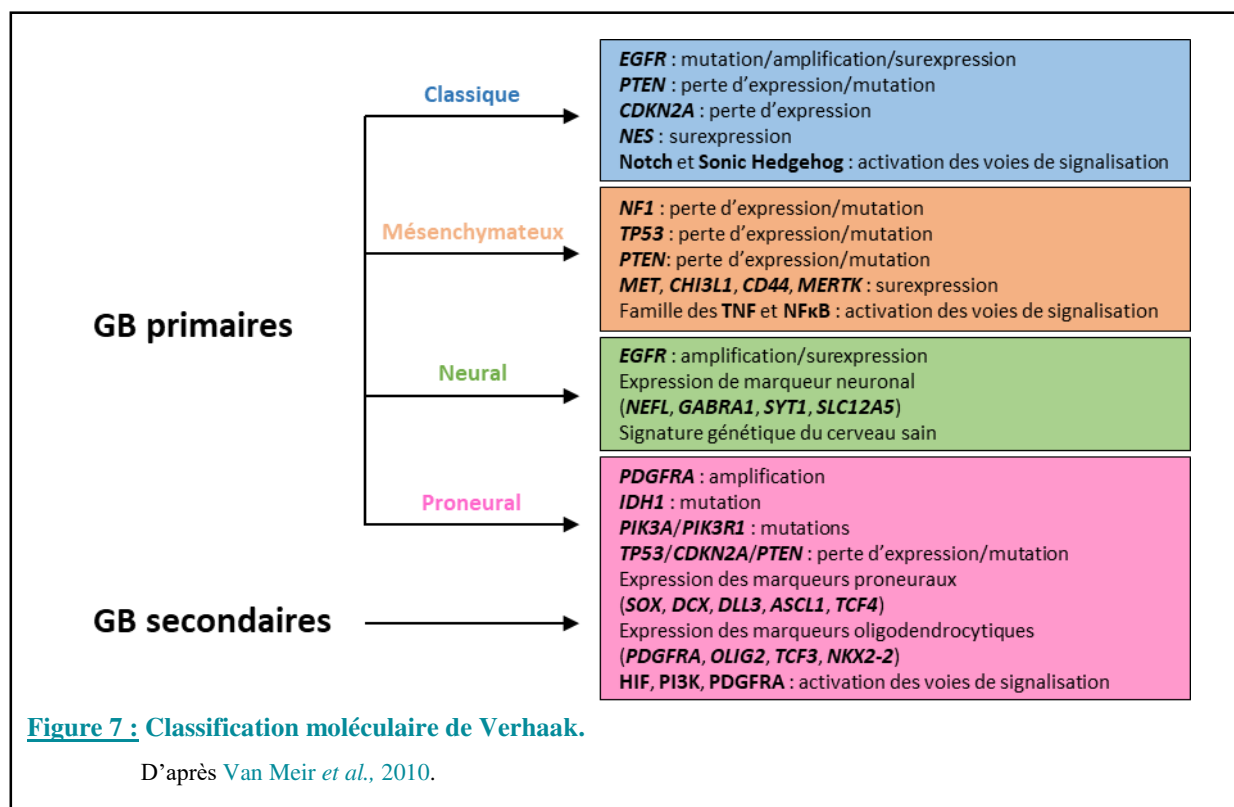
L'analyse de l'ensemble des données collectées et centralisées par le TCGA a permis à la communauté scientifique de mettre en évidence des signatures spécifiques des GB, ce qui a amené à proposer une classification en différents sous-types moléculaires. Cette classification a marqué un tournant important dans la compréhension de l'hétérogénéité des GB (Brennan *et al.*, 2013).

En 2006, Phillips *et al.*, ont proposé une classification des GB en 3 sous-groupes : les proneuraux, les prolifératifs et les mésenchymateux en associant à chaque signature cytogénétique, l'agressivité et la progression tumorale (Phillips *et al.*, 2006). En 2010, l'analyse de Verhaak, à partir des données collectées par le TCGA, a apporté des précisions moléculaires à la classification de Phillips (Verhaak *et al.*, 2010).

De ce fait, selon cette classification, les GB primaires se divisent en 4 sous-types caractérisés par des profils de mutations : les classiques, les mésenchymateux, les neuraux, et les proneuraux. Les GB secondaires appartiennent quant à eux, à la catégorie proneurale. Ainsi, le groupe classique présente des amplifications du gène codant pour l'EGFR et des pertes des locus portant les gènes *PTEN* et *CDKN2A* ; le groupe mésenchymateux des inactivations des gènes *NF1*, *TP53* et *PTEN* ; le groupe neural se définit par l'expression de marqueurs neuronaux comme *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* et *SLC12A5* ; et enfin, le groupe proneural par des amplifications des gènes codant PDGFRA et IDH1 (**Figure 7**) (Verhaak *et al.*, 2010; Van Meir *et al.*, 2010). Dans le cas de ces derniers, une subdivision en fonction du statut G-CIMP a été proposée et permet de raffiner le phénotype clinique et moléculaire (Noushmehr *et al.*, 2010).

Bien que des divergences ressortent d'autres études, notamment au regard des nomenclatures des différents sous-types, certaines données se recoupent. Ainsi, un consensus concernant les signatures proneurales et mesenchymateuses s'est dégagé et il est admis qu'elles correspondent à deux entités différentes d'un point de vue génomique, clinique et fonctionnel (Vitucci *et al.*, 2011).

Concernant la valeur diagnostique de ces profils moléculaires, elle n'est pas encore clairement établie. Cependant, les patients atteints d'une tumeur de signature proneurale ont une meilleure survie par rapport au type mésenchymateux qui se caractérise par une faible survie et une invasion/migration cellulaires élevée (Phillips *et al.*, 2006; Colman *et al.*, 2010). Toutefois, ces derniers répondraient mieux à la radio- et chimiothérapie (Chen *et al.*, 2012).



Ces nouveaux profils moléculaires constituent une base de données particulièrement prometteuse puisqu'en l'associant aux profils génique et histologique, elle pourrait amener à proposer des thérapies personnalisées en fonction de chaque patient. De plus, ces classifications moléculaires amènent à se poser des questions sur le plan de la recherche fondamentale. En effet, elles font apparaître différents sous-types qui pourraient être le reflet d'une diversité des cellules à l'origine des GB.

II. Physiopathologie des glioblastomes

II.1. Cellules tumorales

II.1.1. Origine et hétérogénéité

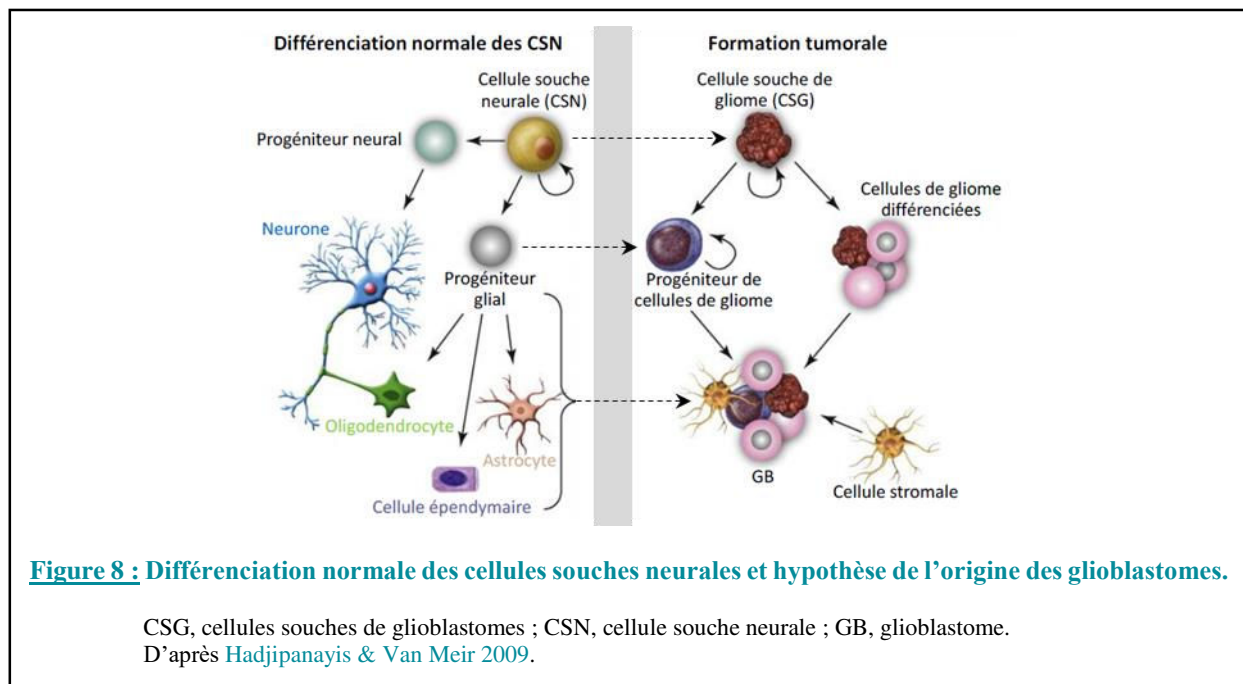
La première description de l'hétérogénéité intratumorale a été réalisée par Virchow au début du 19^e siècle. Depuis, les progrès technologiques ont pu mettre en lumière différentes populations cellulaires avec des altérations génétiques et épigénétiques distinctes. L'acquisition et l'accumulation de mutations oncogéniques dans une cellule normale va aboutir à l'obtention

d'un caractère néoplasique. Deux modèles principaux ont alors été proposés pour expliquer l'hétérogénéité intratumorale :

- Le premier modèle est dit stochastique et présuppose une évolution clonale. Ainsi, des mutations stochastiques apparaissent dans les cellules néoplasiques. Ce modèle repose sur l'acquisition d'altérations génétiques et épigénétiques au sein d'une cellule, quel que soit son stade de différenciation cellulaire. La pression de sélection provenant du microenvironnement ou des thérapies conférerait un avantage sélectif à la cellule d'origine, et la conduirait à produire un clone cellulaire. De ce fait, toutes les cellules tumorales issues de ce clone auraient un potentiel tumorigène similaire (Nowell, 1976).
- Le deuxième modèle est celui qui est privilégié actuellement. Il est appelé modèle hiérarchique et s'appuie sur l'existence d'une cellule unique ayant des capacités naturelles d'auto-renouvellement, de différenciation et de prolifération et au sein de laquelle surviendrait une série de mutations. Elle serait à l'origine à la fois d'un contingent tumoral minoritaire constitué de cellules souches cancéreuses (CSC) favorisant l'hétérogénéité intratumorale grâce à ses capacités de différenciation.
- Récemment un troisième modèle dit « du Big Bang » a été proposé (Sottoriva *et al.*, 2015). Celui-ci suggère une organisation hiérarchique avec l'existence de différentes sous-populations clonales. Ces clones, en plus des mutations communes héritées de la cellule originelle transformée/néoplasique, présenteraient des mutations et altérations partagées et/ou uniques. Ces dernières apparaîtraient de manière silencieuse et permissive au cours des réplifications, s'accumuleraient et finiraient par s'exprimer à un instant T donné variable selon les clones. Ce modèle permet de justifier l'existence de plusieurs sous-groupes moléculaires définis par la classification de Verhaak (cf. page 26) coexistant au sein d'une même tumeur. Il justifie également les variations de réponse aux traitements observées chez les patients, non pas par l'existence d'un clone cellulaire résistant, mais par la présence d'une population hétérogène de clones possédant différentes altérations génétiques leur conférant cette résistance aux traitements (Sottoriva *et al.*, 2013).
- Il a été également proposé que l'hétérogénéité intratumorale des GB impliquerait également son environnement. Des modifications épigénétiques interviendraient suite à des stimuli environnementaux, aboutissant à des cellules à caractère tumoral et résistantes à des facteurs externes tels que les traitements (Inda *et al.*, 2014).

II.1.1.1. Cellules souches de glioblastome

Dans le cas des GB, l'identité de la cellule à l'origine de la carcinogenèse est encore non élucidée. En effet, la cellule d'origine pourrait être un astrocyte, un progéniteur glial ou une cellule souche neurale. Jusqu'à la découverte des cellules souches neurales (CSN), le postulat était que les astrocytomes provenaient d'astrocytes qui se dédiffénciaient vers un état de progéniteur immature. Cette hypothèse est désormais de plus en plus controversée et des travaux plus récents suggèrent que des CSN seraient à l'origine de la gliomagenèse (**Figure 8**) (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).



Depuis les années 2000, plusieurs équipes ont réussi à isoler et cultiver des cellules souches de GB (CSG) à partir de tumeurs gliales corticales, de médulloblastome ou de GB pédiatrique et adulte (Ignatova *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2004). Ces travaux ont permis de mettre en évidence le pouvoir tumorigène des CSG et à identifier des marqueurs de surface discriminants, tels que CD133, A2B5, CD15 et CD44, des protéines intracellulaires comme la nestine ainsi que les facteurs de transcription SOX2, OLIG2, BMI1 et ASCL1 (Lathia *et al.*, 2015; Rennert *et al.*, 2016). Toutefois, des travaux récents suggèrent que les CSG sont également une population hétérogène de cellules, soulignant l'importance de conjuguer plusieurs marqueurs afin d'isoler ces cellules (Rennert *et al.*, 2016).

II.1.1.2. Niches et cellules souches de glioblastome

À l'instar des CSN, les CSG sont regroupées dans des niches spécialisées qui fournissent des signaux indispensables au maintien de leur phénotype souche et à leur capacité tumorigène (**Figure 9**). La découverte de ces microenvironnements particuliers a complexifié l'étude des CSG, que ce soit tant sur leur rôle au sein de la tumeur que sur leur régulation. Ainsi, trois niches ont été décrites dans les GB (niche périvasculaire / hypoxique / invasive), avec des composants majeurs et récurrents comme la vascularisation, la présence de cellules immunitaires, neuronales, gliales et tumorales ([Hambardzumyan & Bergers, 2015](#)). De plus, les phénomènes hypoxiques et nécrotiques sont déterminants pour assurer le maintien de l'intégrité de ces niches.

- La niche périvasculaire

Les niches périvasculaires sont le premier type de niche à avoir été décrit par Calabrese et ses collaborateurs ([Calabrese et al., 2007](#)). Ces auteurs ont démontré que les capacités tumorigène et d'auto-renouvellement des CSG sont étroitement dépendantes des capillaires tumoraux et émettent donc l'hypothèse que la microvasculature tumorale, *via* la sécrétion de facteurs, génère des microenvironnements spécifiques responsables de la formation et de la maintenance des CSG. Des études ultérieures ont ainsi pu identifier des facteurs sécrétés (comme le *Vascular Endothelial Growth Factor* ou VEGF) agissant à distance ou des molécules « de contact » cellule-cellule (comme les intégrines) ou cellule-matrice extracellulaire (MEC) comme étant capable de maintenir ces niches périvasculaires. Ainsi, les cellules endothéliales sont capables de moduler la voie Notch ou l'oxyde nitrique (NO), et de favoriser l'auto-renouvellement des CSG.

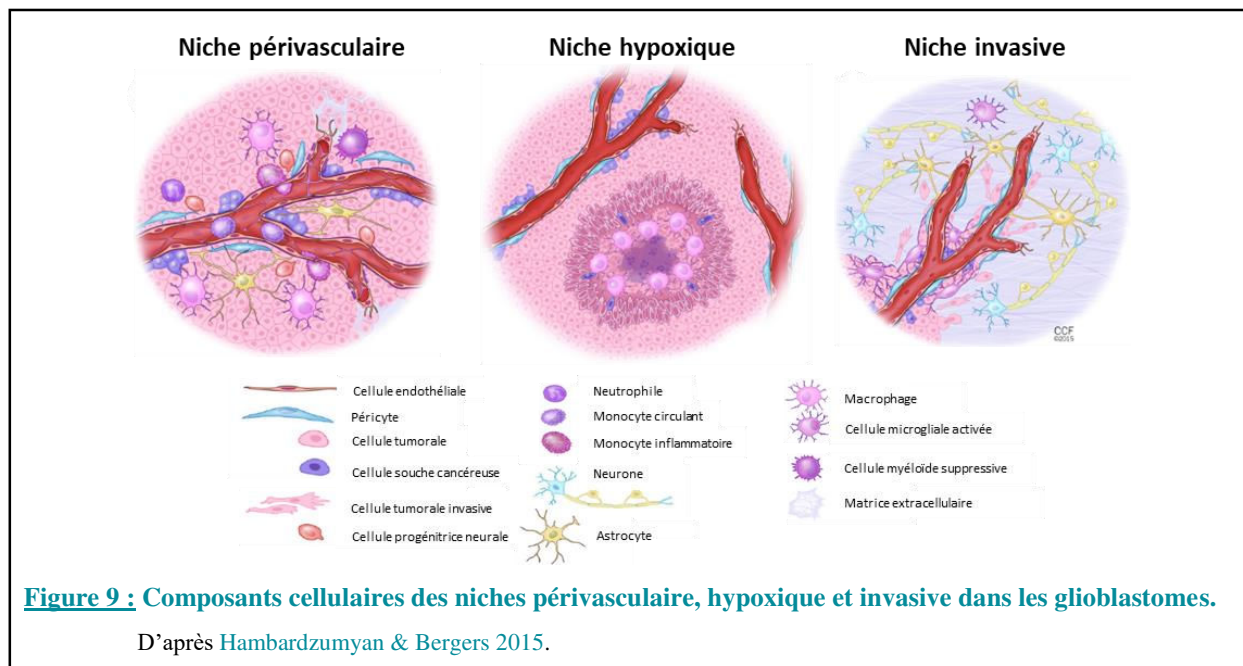
- La niche hypoxique

Comme pour les CSN, la déprivation en oxygène semble être un régulateur important de la survie cellulaire des CSG et surtout du maintien de leur caractère souche ([Soeda et al., 2009](#); [Seidel et al., 2010](#)). Les niches hypoxiques contribuent donc à la progression tumorale *via* notamment la stabilisation du facteur HIF-1 α qui permet l'expression de gènes favorisant l'angiogenèse, l'invasion et la survie. Ces niches se localisent aux abords des zones nécrotiques, au niveau des régions pseudopalissades où l'oxygénation est juste suffisante pour permettre la survie des cellules ([Seidel et al., 2010](#)). La mise en place de l'hypoxie est fortement dépendante

de l'état altéré/défectueux de la microvascularisation suggérant une relation étroite entre les niches périvasculaires et les niches hypoxiques.

- La niche invasive

L'hypoxie sévère, voire l'anoxie, au niveau des zones nécrotiques provoque la migration des cellules tumorales et plus particulièrement des cellules arborant un phénotype CSG (Hambardzumyan & Bergers, 2015). Celles-ci vont envahir le parenchyme environnant en s'appuyant sur le réseau vasculaire préexistant (**Figure 9**) et utilisera des mécanismes moléculaires et cellulaires similaires à ceux décrits ci-dessous pour les cellules différenciées. Les propriétés invasives favoriseraient l'agressivité des cellules tumorales, la dissémination des CSG, et semblent également liées aux niches hypoxiques et périvasculaires. Il pourrait être proposé qu'une seule et même niche assurerait différentes fonctions selon les besoins.



II.1.2. Infiltration et invasion

Contrairement aux tumeurs périphériques qui peuvent métastaser vers des organes distants *via* les systèmes lymphatique et sanguin, les GB ne métastasent que très rarement en dehors du SNC. Cependant, une des caractéristiques majeures de ces derniers est leur habilité à envahir le parenchyme cérébral, allant même jusqu'à atteindre l'hémisphère contralatéral. Cette invasion de cellules tumorales isolées dans le tissu cérébral sain contribue à leur échappement aux thérapies et serait en partie responsable de la récurrence systématique des GB.

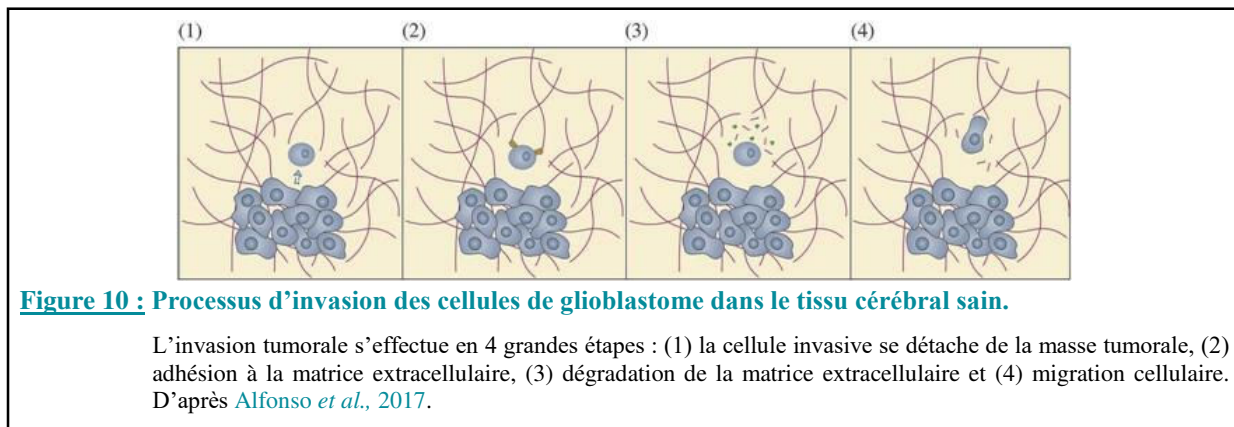
Pour envahir le tissu environnant, les cellules doivent à la fois dégrader les composants de la MEC mais aussi s'en servir comme point d'ancrage. Les principales molécules formant la MEC sont l'acide hyaluronique, la ténascine, et lecticans, les collagènes I et IV, la laminine, la fibronectine et la vitronectine (Ferrer *et al.*, 2018). De façon à pénétrer le parenchyme, il a été démontré que les cellules de GB sont capables de modifier et réorganiser la MEC, notamment en sécrétant un grand nombre de protéases (Ferrer *et al.*, 2018). Afin de renforcer ces effets, les cellules de GB peuvent également recruter les cellules présentes dans leur microenvironnement, telles que les cellules microgliales, les astrocytes et les cellules endothéliales qui sécrètent également des protéases.

Séquentiellement le processus d'invasion se déroule selon le schéma suivant (Figure 10) (Alfonso *et al.*, 2017) :

- Détachement de cellules invasives (Figure 10 (1)) de la masse tumorale avec la déstabilisation et la désorganisation des jonctions cadhérines dépendantes qui s'accompagne d'une diminution de l'expression de la connexine 43 (jonctions communicantes). Ces événements permettent une dédifférenciation des cellules tumorales. Celles-ci vont passer d'un état dit « polarisé » à un phénotype mésenchymateux où la perte de jonctions intercellulaires est associée à des capacités de migration et d'invasion. Ce processus réversible est appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Guarino *et al.*, 2007; Mani *et al.*, 2008; Polyak & Weinberg, 2009). Un des marqueurs de la TEM est la perte d'expression de l'E-cadhérine au profit de l'expression de la N-cadhérine permettant la perte de contact cellule-cellule (Kahlert *et al.*, 2013). Cependant, il a été montré que la majorité des GB n'expriment pas la E-cadhérine et que la transition mésenchymateuse se produirait de façon indépendante de la conversion de la E-cadhérine en N-cadhérine : on parle alors de « TEM-like » (Kahlert *et al.*, 2013). La TEM est régulée par des facteurs de transcription qui servent également de marqueur de cette transition, comme TWIST1, ZEB (ZEB1 et ZEB2) et SNAIL (SNAIL1 et SNAIL2). Ces facteurs sont connus pour participer au remodelage du cytosquelette et à la perte d'adhésion cellulaire. Enfin, la TEM peut être favorisée par certains facteurs environnementaux comme l'hypoxie (Guarino *et al.*, 2007).
- Adhésion à la MEC (Figure 10 (2)) via les intégrines en particulier les intégrine $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ qui interagissent avec les protéines de la MEC comme la fibronectine ou la vitronectine.
- Dégradation de la MEC par des enzymes protéolytiques (Figure 10 (3)) afin de créer un espace intracellulaire où les cellules peuvent migrer. Les protéases impliquées dans ces

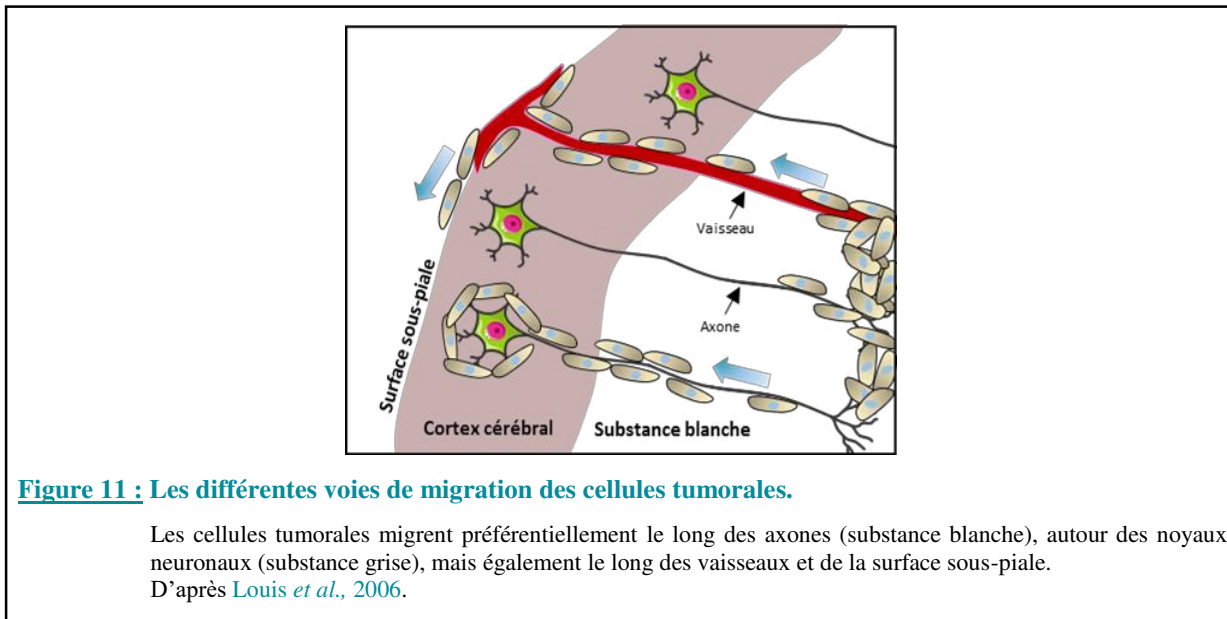
mécanismes incluent les MMPs (matrix metalloproteinases), les ADAM (A disintegrin and metalloproteinase), les activateurs du plasminogène (uPa, *urokinase-type plasminogen activator*) et les protéases à cystéines (cathépsine B). De nombreuses études ont mis en évidence que les MMP majoritairement impliquées dans l'invasion des GB sont les gélatinases MMP-2 et MMP-9 (Wild-Bode *et al.*, 2001; Bellail *et al.*, 2004).

- Motilité cellulaire (**Figure 10 (4)**) qui est similaire à la migration des cellules progénitrices neurales avec l'extension de processus cytoplasmiques suivie d'une « impulsion » du corps cellulaire. L'interaction des intégrines avec les composants de la MEC va permettre le remodelage du cytosquelette et favorise la « locomotion » des cellules tumorales. La FAK (*focal adhesion kinase*), protéine importante dans la transmission du signal relayée par les intégrines et l'EGFR, permet l'activation des points d'adhésion focaux.



Outre les intégrines et les MMPs, de nombreux facteurs jouent également un rôle dans l'invasion des cellules, notamment les chimiokines et plus particulièrement le couple chimiokine/récepteur CXCL12/CXCR4. L'hypoxie intervient également en favorisant au niveau des cellules tumorales, la production du récepteur CXCR4, ce qui stimule la migration des cellules en dehors de ces zones hypoxiques et contribuerait ainsi à l'envahissement des structures cérébrales voisines (Sciumè *et al.*, 2010).

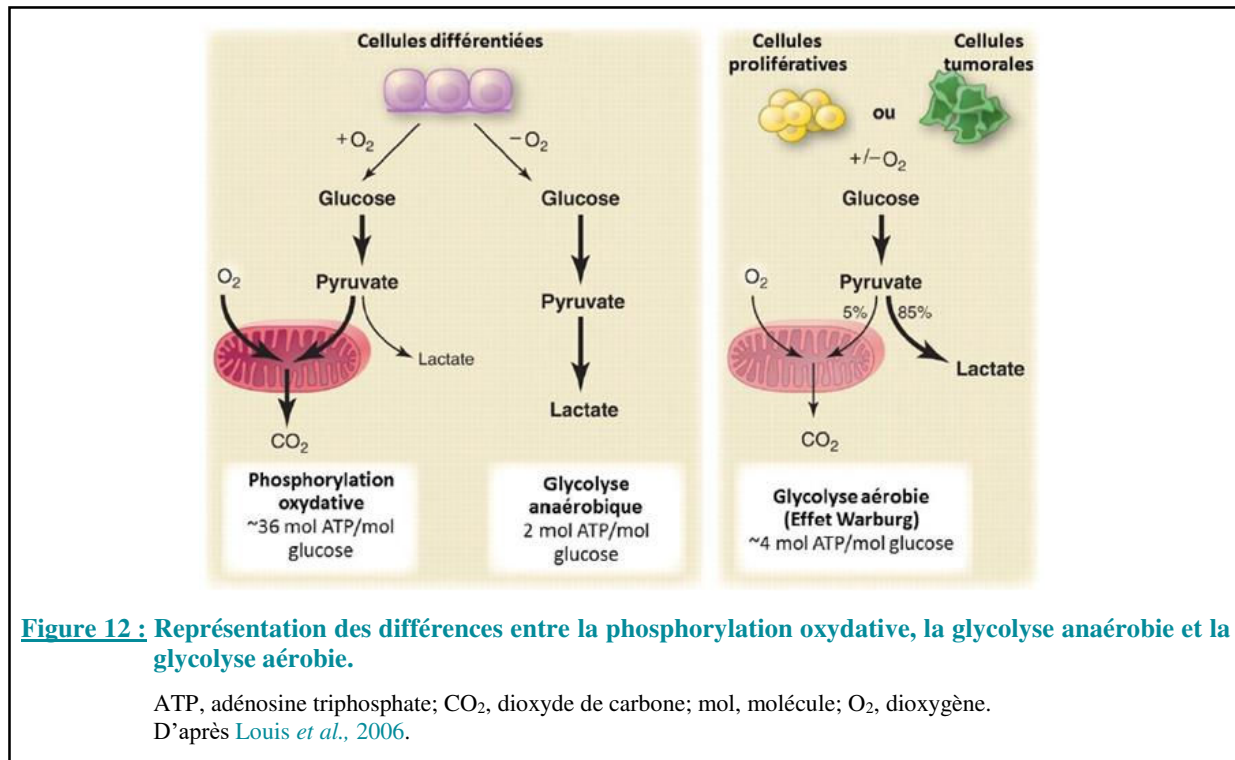
Par ailleurs, la grande majorité de cellules de GB suivent les vaisseaux sanguins pour envahir le parenchyme cérébral sain avoisinant. En conséquence, cela provoque une altération de la BHE, notamment en déplaçant les pieds astrocytaires qui entraîne, à terme, la perte des jonctions serrées et la dégradation de la lame basale périvasculaire. De manière générale, les cellules tumorales vont migrer préférentiellement le long des fibres de la substance blanche, des vaisseaux, de l'espace sous-piale et autour des noyaux de la substance grise (**Figure 11**), cela étant dû à l'absence d'acide hyaluronique dans la MEC (Louis, 2006).



II.1.3. Métabolisme des cellules tumorales

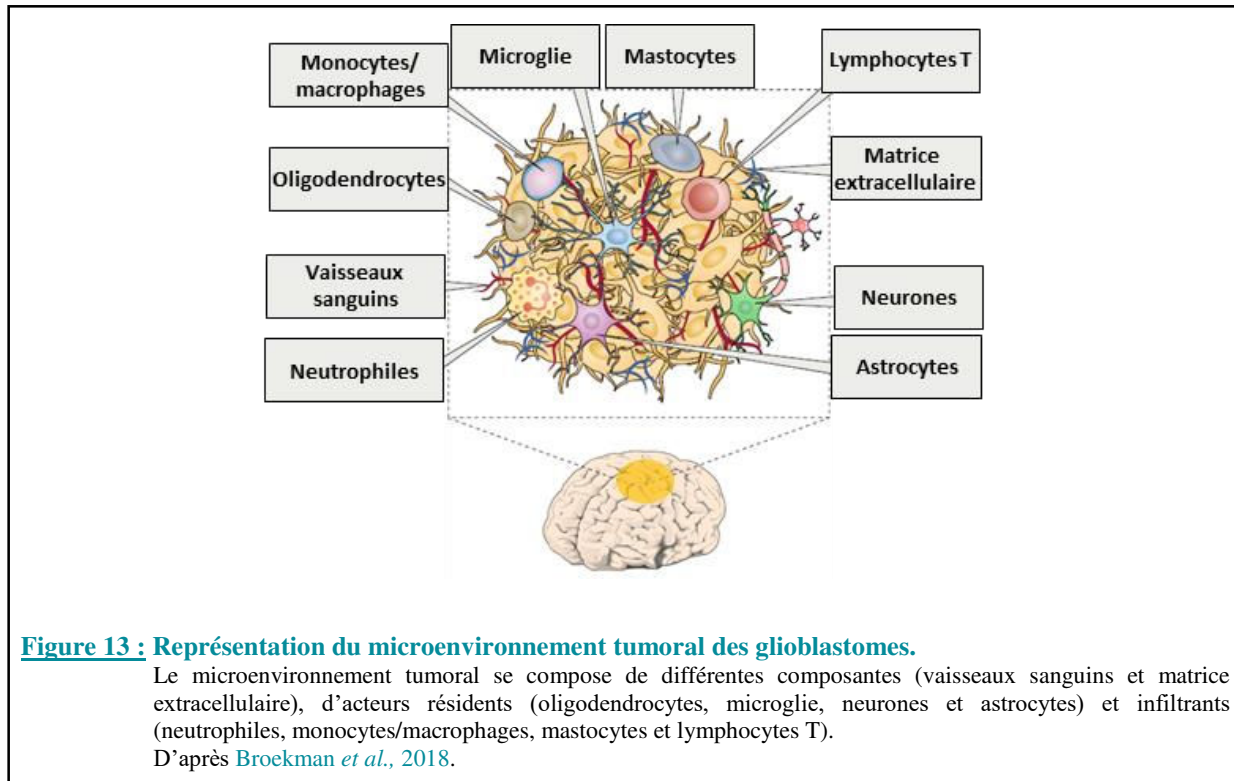
Le métabolisme des cellules tumorales diffère des cellules saines. Dans des conditions non-pathologiques, les cellules produisent de l'énergie en utilisant la phosphorylation oxydative en présence d'oxygène. Dans ces conditions, le pyruvate produit par la glycolyse est pris en charge au niveau du cycle de Krebs, puis est métabolisé dans la mitochondrie pour produire l'ATP (adénosine tri-phosphate). Ce processus aérobie aboutit *in fine* à la production de 36 molécules d'ATP. En absence d'oxygène, la phosphorylation oxydative ne peut fonctionner et le pyruvate présent dans le cytoplasme empruntera alors la voie de la fermentation lactique, aboutissant à un rendement énergétique moindre puisque seules 2 molécules d'ATP sont produites. Cette voie métabolique est dénommée la glycolyse anaérobie ou « effet Pasteur ».

Paradoxalement, les cellules tumorales, afin de répondre à leurs besoins en énergie ainsi qu'à leur besoin en biomasse nécessaire à leur division accrue, puisent leur énergie à travers la fermentation lactique, et ce même en présence d'oxygène et de mitochondries fonctionnelles. Ce phénomène dénommé « glycolyse aérobie » porte également le nom « effet Warburg » car observé dans les années 1950 par Otto Warburg. Les cellules tumorales compensent le mauvais rendement énergétique de la fermentation lactique en augmentant considérablement l'entrée de glucose dans la cellule. (**Figure 12**).



II.2. Microenvironnement tumoral

Depuis une quinzaine d'années, de nombreuses études ont mis en évidence que le développement néoplasique n'est pas seulement imputable à l'accumulation d'anomalies intrinsèques. En effet, le microenvironnement, qui se définit comme un ensemble cellulaire, moléculaire et mécanique entourant les cellules tumorales, joue un rôle majeur dans la progression tumorale (Swartz *et al.*, 2012). Le microenvironnement tumoral est un système complexe et dynamique qui inclue les vaisseaux sanguins, les cellules immunitaires, les fibroblastes, les composants de la MEC et les voies de signalisation (Broekman *et al.*, 2018) (Figure 13). Ces dernières se composent de différents types de jonctions, de facteurs sécrétés comme les hormones, les facteurs de croissance ou les chimiokines. La tumeur et le microenvironnement sont étroitement liés et en constante interaction. Ils s'influencent l'un et l'autre, par le biais de signaux extracellulaires, pour promouvoir l'angiogenèse et la tolérance immunitaire d'une part, et pour affecter la croissance et l'évolution des cellules cancéreuses d'autre part. Nous allons décrire dans ce document les principaux acteurs cellulaires et les propriétés physicochimiques du microenvironnement tumoral.



II.2.1. Cellules du tissu sain cérébral

Ce n'est que très récemment que des études ont démontré le rôle des cellules du tissu sain cérébral dans la croissance et l'invasion des GB, rôle qui peut être attribué tant aux neurones qu'aux cellules gliales. Des travaux ont en effet montré que l'activité neuronale favorise la prolifération des cellules de GB notamment par le biais du glutamate. Ce neurotransmetteur sécrété par les neurones mais également par les cellules de GB, potentialise la croissance tumorale (Takano *et al.*, 2001; Blecic *et al.*, 2013). Une étude sur des cellules provenant d'un GB pédiatrique a également montré que la neuroligine-3, une protéine qui intervient dans la plasticité cérébrale, stimule la prolifération cellulaire des GB (Venkatesh *et al.*, 2015). Par ailleurs, les astrocytes ont également un effet pro-tumoral grâce à l'augmentation de l'expression des MMPs, favorisant ainsi la dégradation de la MEC et contribue alors à l'invasion des cellules de GB (Le *et al.*, 2003).

II.2.2. Compartiment vasculaire

II.2.2.1. Altération de la barrière hémato-encéphalique

La progression tumorale s'accompagne de modifications des vaisseaux sanguins et d'une altération de l'intégrité de la BHE. Cette dernière est formée de cellules endothéliales, des

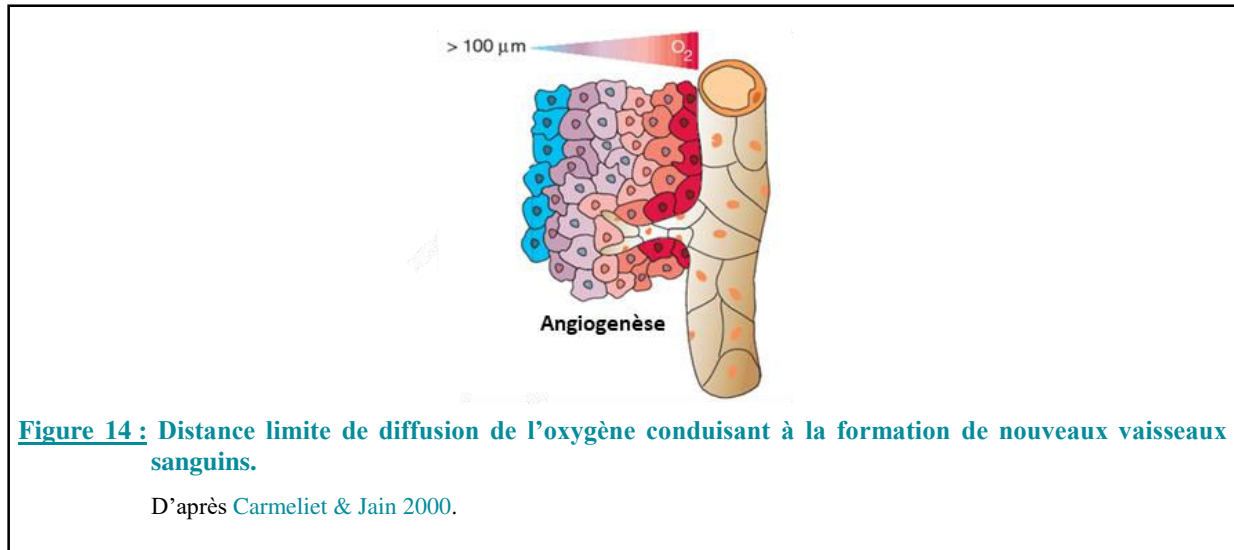
pieds astrocytaires, d'une lame basale et de péricytes. La BHE comporte un endothélium continu avec des jonctions serrées et une absence de fenestration, assurant ainsi une faible perméabilité, ce qui protège le cerveau des pathogènes, des toxines ou des hormones circulant dans les vaisseaux sanguins. Cette faible perméabilité implique la nécessité d'avoir de nombreux transporteurs spécifiques, comme GLUT1 pour le glucose ou LAT1 pour les acides aminés, afin d'apporter au parenchyme cérébral les nutriments essentiels à son métabolisme énergétique (Begley, 2004).

Dans les GB, l'angiogenèse tumorale induit des changements structuraux et fonctionnels de la BHE. De ce fait, la BHE sera altérée notamment à cause de l'ouverture des jonctions serrées par la perte de l'expression de la claudine 3 et de l'occludine, une fenestration des capillaires, une augmentation de la pinocytose et la perte de contact des pieds astrocytaires avec les vaisseaux (Wolburg & Lippoldt, 2002). La sécrétion de VEGF par les cellules tumorales et d'enzymes protéolytiques par les macrophages vont également augmenter la perméabilité endothéliale (Kaal & Vecht, 2004; Weiss *et al.*, 2009).

L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux est à l'origine de la formation d'œdèmes cérébraux vasogéniques péri-tumoraux (Papadopoulos *et al.*, 2004; Stummer, 2007). La conséquence principale de cet œdème est l'hypertension intracrânienne, un des signes cliniques menant au diagnostic du GB. Paradoxalement, le dysfonctionnement de la BHE peut être considéré comme un atout puisqu'il favorise l'accès des agents chimiothérapeutiques à la tumeur.

II.2.2.2. Angiogenèse tumorale

Dès les années 1971, Folkman avait mis en évidence que la croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse et que cette dernière est positivement corrélée avec l'agressivité, la malignité et la récurrence tumorale (Folkman, 1971). En effet, des tumeurs implantées dans des organes isolés et perfusés présentent une croissance anormale et une taille finale de quelques millimètres. En revanche, ces mêmes tumeurs réimplantées chez la souris, grâce à leur perfusion par le réseau vasculaire murin, se développent rapidement et entraînent la mort de l'animal. Ce concept de « dépendance angiogénique des tumeurs solides » est d'autant plus important que les cellules de GB nécessitent un apport en oxygène et en nutriments par les vaisseaux pour assurer leur survie. La diffusion de l'O₂ dans les tissus est limitée, les cellules tumorales doivent donc se situer à une distance maximale de 100 µm des vaisseaux (Carmeliet & Jain, 2000) (Figure 14).



Le GB est une tumeur fortement vascularisée, caractérisée par une prolifération importante des cellules endothéliales constituant un facteur de mauvais pronostic (Sharma *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2015). La microvascularisation tumorale est en constant remaniement avec des phénomènes très dynamiques de co-optation vasculaire, de régression, puis de formation de nouveaux vaisseaux, de régression etc. Ces phénomènes vont favoriser la formation de structures caractéristiques retrouvées chez les patients. Deux phénotypes vasculaires ont été détaillés : le premier est dit capillaire ou classique et le second glomérulaire (Sharma *et al.*, 2006). Ainsi, plusieurs structures peuvent être distinguées telles que :

- des microvaisseaux similaires à des capillaires classiques (**Figure 15 A et B**) ;
- des clusters vasculaires (**Figure 15 C**) correspondants à une agrégation de plus de 3 vaisseaux ;
- des guirlandes vasculaires (**Figure 15 D**) composées d'une agrégation de vaisseaux en forme de guirlandes. Elles seraient principalement retrouvées autour des zones de nécrose ;
- des glomérules vasculaires (**Figure 15 E**) définis par un amas de 3 vaisseaux ou plus complètement intégrés au stroma ;
- le mimétisme vasculaire ou « *vascular mimicry* » (**Figure 15 F et Figure 16 A**) qui correspond à des arrangements cellules tumorales-MEC de manière à former des parois vasculaires et une lumière centrale.

Ces observations cliniques ont amené à s'interroger sur les processus à l'origine de ces différentes structures vasculaires.

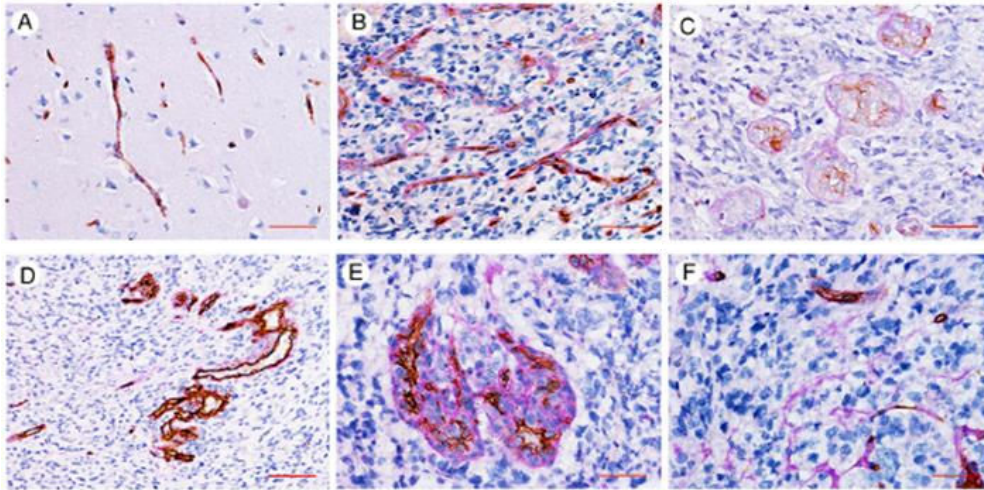


Figure 15 : Mise en évidence des structures vasculaires issues de l'angiogenèse tumorale.

Marquage des cellules progénitrices hématopoïétiques (CD34 en marron) et des polysaccharides (PAS en rouge).
Barre d'échelle (A-C, E, F) = 100 μm ; (D) = 200 μm .
D'après *Chen et al.*, 2015.

II.2.2.2.1. Processus de formation des vaisseaux tumoraux

Au cours de l'embryogenèse et dans certains rares cas physiologiques à l'âge adulte, les vaisseaux se forment par des phénomènes de vasculogenèse, bourgeonnement ou par intussusception principalement. Pour autant les processus observés en présence d'une tumeur sont distincts de ceux décrits précédemment (*Persson & Buschmann, 2011*). En effet, en condition tumorale les acteurs moléculaires et vasculaires sous-tendant l'angiogenèse sont soumis à une forte dérégulation de leur expression. De ce fait, de nouveaux mécanismes d'angiogenèse sont sollicités tels que la co-option de vaisseaux préexistants, le mimétisme vasculaire ou encore la trans-différenciation (*Takano, 2012; Jain & Carmeliet, 2012; Hardee & Zagzag, 2012*) (**Figure 17**).

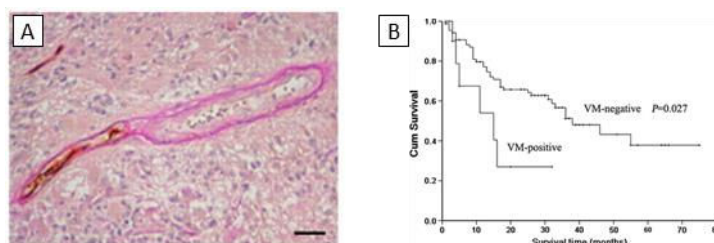


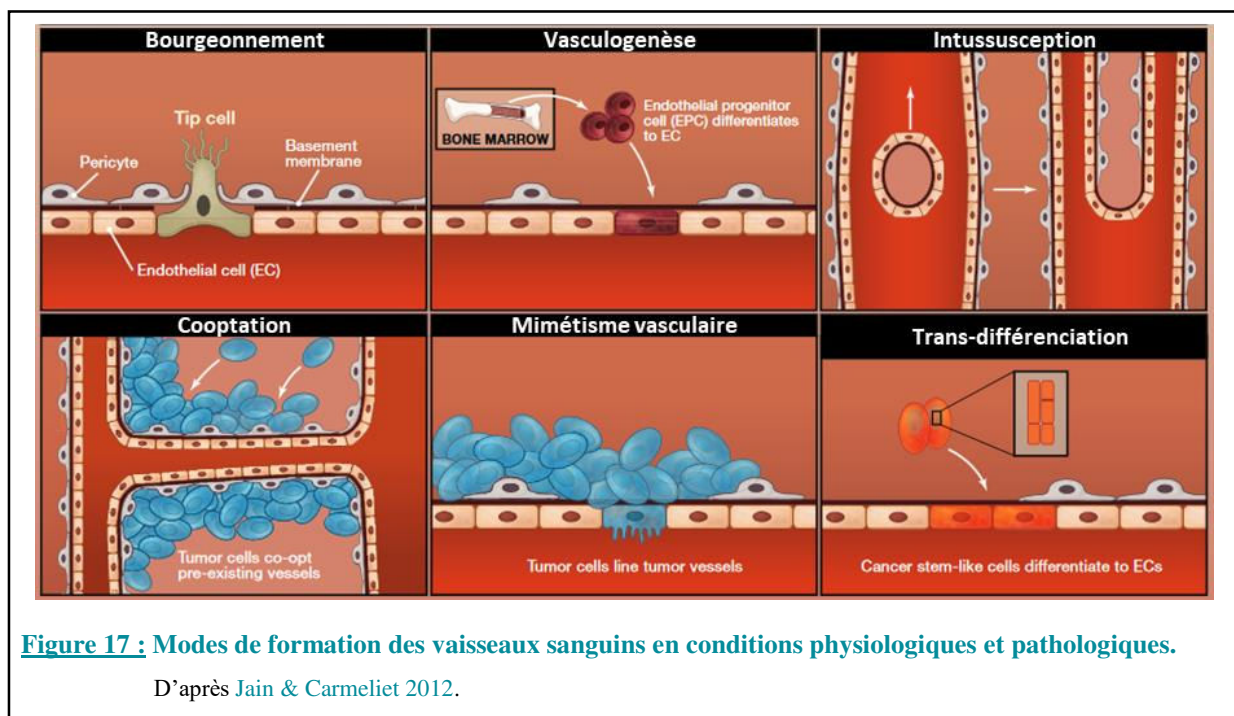
Figure 16 : Mise en évidence de mimétisme vasculaire dans un glioblastome humain et impact sur la survie des patients.

A. Marquage des cellules progénitrices hématopoïétiques (CD34 en marron) et des polysaccharides (PAS en rouge). Barre d'échelle : 50 μm . D'après *El Hallani et al.*, 2010.
B. Courbe de survie des patients porteurs de gliomes en fonction de la présence de mimétisme vasculaire (VM). D'après *Liu et al.*, 2011.

Les phénomènes de trans-différenciation et de mimétisme vasculaire sont principalement observés dans les GB (Takano, 2012).

Comme décrit précédemment, le mimétisme vasculaire caractérise des cellules tumorales qui s'organisent avec la MEC de façon à mimer la structure d'un vaisseau. Ainsi, les cellules formant ces structures n'expriment pas de marqueurs de cellules endothéliales (CD31, CD34), mais peuvent présenter des amplifications du gène de l'EGFR, une mutation courante des cellules de GB. Ces « *vascular mimicry* » semblent être connectés aux vaisseaux sanguins fonctionnels et, bien que perméables, permettraient d'augmenter l'apport en nutriments à la tumeur. Il est cependant clairement admis que les néovaisseaux formés présentent des structures et des fonctionnalités altérées (Baluk *et al.*, 2005). En outre, la détection de ces structures sur des biopsies de GB permet de les corrélérer à un mauvais pronostic des patients (Figure 16 B) (Liu *et al.*, 2011; El Hallani *et al.*, 2010).

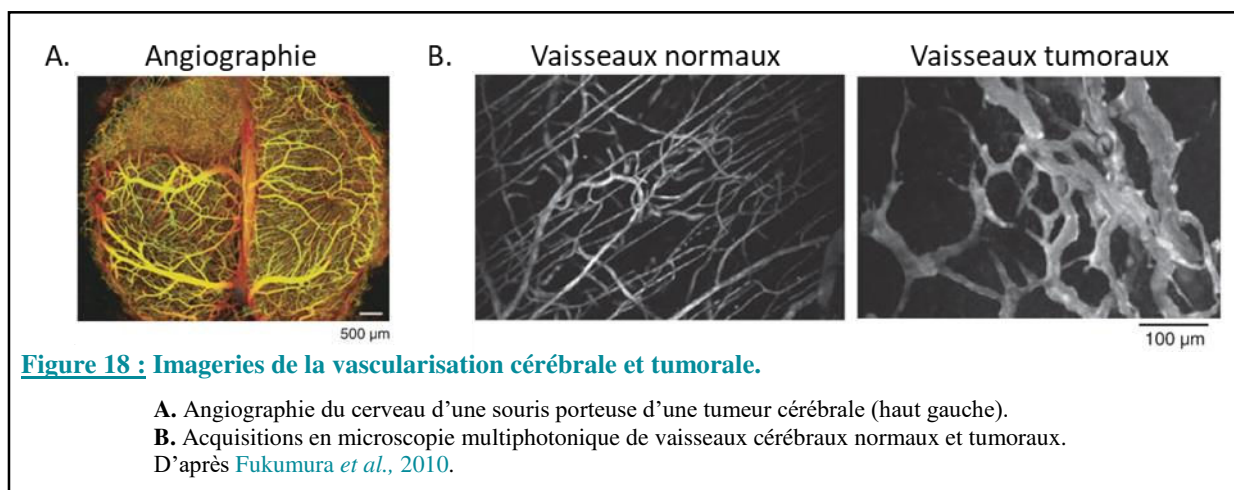
Le concept récent de trans-différenciation des cellules de GB « *stem cell-like* » suppose que les CSG soient capables de se trans-différencier en cellules endothéliales. Ce concept, basé sur l'observation de marqueurs CD133, CD34 et d'autres marqueurs tumorigènes au niveau des vaisseaux, est assez controversé puisqu'il n'a été que très rarement observé chez le patient (Rodriguez *et al.*, 2012).



II.2.2.2.2. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des vaisseaux

Les vaisseaux tumoraux sont structurellement et fonctionnellement anormaux. En effet, la vascularisation tumorale est hautement désorganisée et présente de nombreuses anomalies qui en sont l'origine telles (**Figure 18**) (Fukumura *et al.*, 2010) :

- une hyperplasie des cellules endothéliales (Stewart *et al.*, 1987; Schlageter *et al.*, 1999) ;
- une forte perméabilité vasculaire (Jain *et al.*, 2007) ;
- une diminution du nombre de péricytes en contact avec les cellules endothéliales (Benjamin *et al.*, 1999) ;
- une diminution de l'épaisseur de la lame basale (Stewart *et al.*, 1987; Schlageter *et al.*, 1999) ;
- une morphologie microvasculaire avec des vaisseaux tumoraux tortueux et sinusoïdaux de diamètres compris entre 3 et 40 μm , contre 3 à 5 μm pour les capillaires cérébraux sains.



II.2.2.2.3. Angiogenèse induite par l'hypoxie

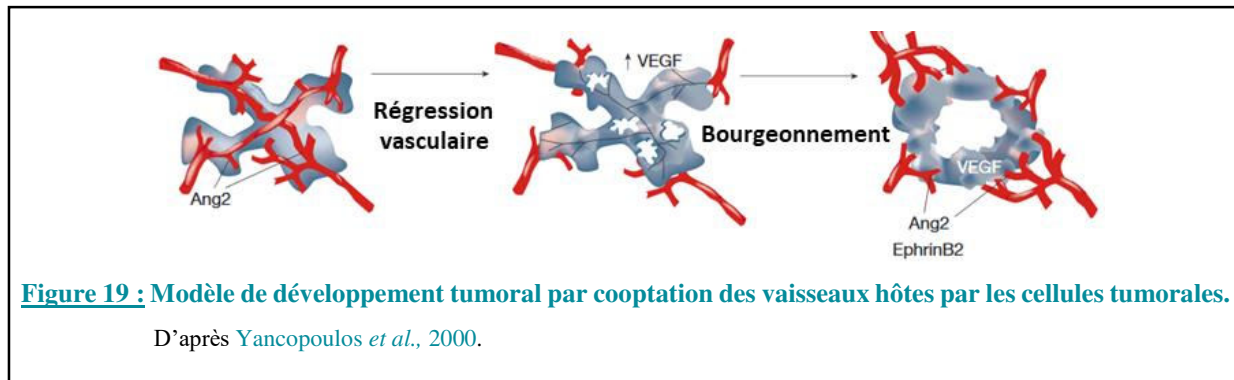
La prolifération cellulaire incontrôlée et anarchique est l'une des caractéristiques des tumeurs. L'augmentation rapide du nombre de cellules provoque une augmentation de la consommation en oxygène, or les apports en oxygène vont rapidement devenir insuffisants créant une zone d'hypoxie. De plus, comme décrit précédemment, la vascularisation tumorale est en constant remaniement aboutissant à des structures vasculaires anormales et non fonctionnelles dont résulte une masse tumorale avasculaire hypoxique. L'hypoxie tumorale représente un des facteurs environnementaux majeurs contrôlant l'angiogenèse tumorale.

Le microenvironnement hypoxique de la tumeur favorise les processus angiogéniques. En effet, en réponse à la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α induite par la diminution

en oxygène, les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-angiogéniques dont majoritairement le VEGF, les angiopoïétines et le PDGF (*platelet-derived growth factor*). Cette sécrétion dérégulée va engendrer un déséquilibre face aux facteurs anti-angiogéniques, phénomène qualifié de « *switch* angiogénique » (Fam *et al.*, 2003; Döme *et al.*, 2007).

Au sein de la famille des VEGFs, le VEGF-A est le facteur angiogénique quantitativement le plus synthétisé au cours de la progression des GB (Hatva *et al.*, 1995). En plus de son effet mitogène sur les cellules endothéliales, le VEGF-A favorise également la migration des cellules endothéliales, la perméabilité vasculaire et le caractère invasif, nécessaires à l'angiogenèse. Il est capable de diffuser au travers des tissus pour atteindre ses récepteurs spécifiques (VEGFR-1 et VEGFR-2) situés sur les cellules endothéliales. En réponse, ces dernières sécréteront des MMPs et l'activateur du plasminogène, induisant ainsi une dégradation de leur membrane basale. Le VEGF est un facteur important dans le processus de bourgeonnement. Brièvement, en réponse à une stimulation (VEGF), une cellule endothéliale dite « *tip cell* » va acquérir un phénotype migratoire. Elle sera suivie par des cellules endothéliales « *stalk cells* » selon un processus de migration collective. Les cellules endothéliales vont migrer en fonction du gradient des facteurs pro-angiogéniques, former une anastomose et ainsi amorcer le bourgeonnement du vaisseau mère (Hardee & Zagzag, 2012). Ce faisant, les cellules endothéliales vont former un tube qui sera stabilisé par le recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses (Welti *et al.*, 2013).

Une autre classe de facteurs angiogéniques, les angopoïétines Ang1 et Ang2, furent identifiées en 1996 comme les ligands physiologiques du récepteur Tie-2 mais dont l'un (Ang1) est agoniste et l'autre (Ang2) antagoniste (Davis *et al.*, 1996; Maisonpierre *et al.*, 1997). L'expression de ces deux Angs et de leur récepteur est particulièrement augmentée dans les GB, Ang1 étant exprimée par les cellules tumorales, alors que Ang2 et Tie-2 sont présents sur les vaisseaux de la tumeur et au niveau de sa région invasive. L'importance de ces protéines dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale a été confortée par les résultats de différentes études précliniques ciblant la signalisation Ang/Tie-2 (Yancopoulos *et al.*, 2000; Machein *et al.*, 2004; Valable *et al.*, 2009) (Figure 19).



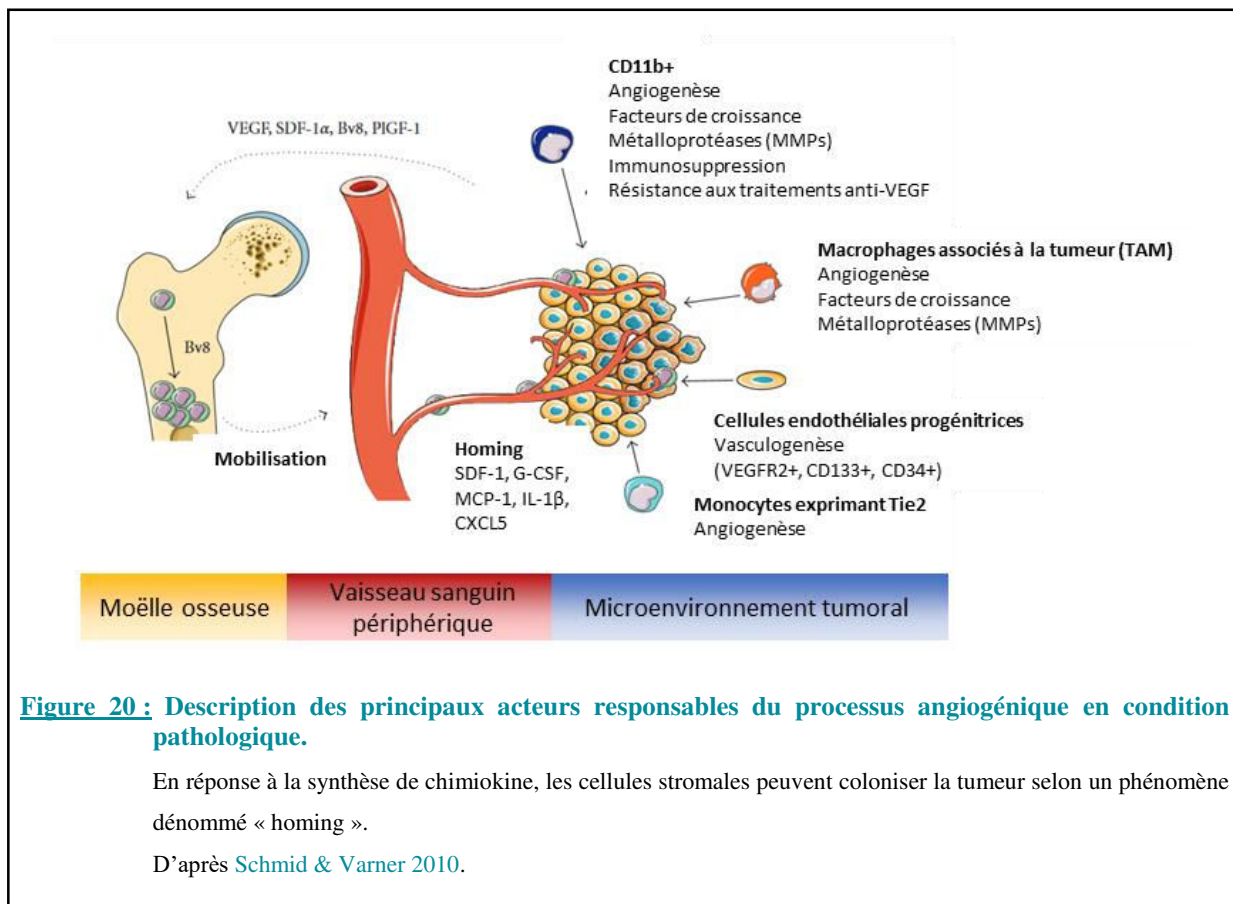
II.2.2.2.4. Angiogenèse induite par les altérations moléculaires

Comme vu précédemment, l'hypoxie et notamment la stabilisation de HIF-1 α sont des événements majeurs de l'angiogenèse tumorale. Toutefois, HIF-1 α peut également être stabilisé en normoxie par le biais de mutations touchant différents gènes dont celui du PDGFR (récepteur au PDGF), de l'EGR, de PTEN, de p53, de RB1 ou encore VHL (von Hippel-Lindau) et provoquer alors une surexpression des facteurs pro-angiogéniques (Hardee & Zagzag, 2012).

II.2.2.2.5. Angiogenèse induite par le microenvironnement

Outre les cellules tumorales, d'autres cellules peuvent déclencher et/ou entretenir le processus angiogénique *via* la stimulation par des facteurs de croissance ou par des cytokines. En effet, les cellules stromales telles que les cellules endothéliales progénitrices dérivées de la moelle osseuse (BMDCs pour *Bone Marrow-Derived Cells*), les macrophages ou encore les fibroblastes peuvent se différencier en cellules endothéliales ou synthétiser des facteurs pro-angiogéniques (Schmid & Varner, 2010; Takano, 2012) (Figure 20). Ainsi, les fibroblastes, dénommés CAF (*cancer-associated fibroblast*), sont capables de migrer dans la tumeur et de participer à sa progression en stimulant l'angiogenèse et l'invasion des cellules de GB (Clavreul *et al.*, 2014; Trylcova *et al.*, 2015).

De manière similaire, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent infiltrer la masse tumorale et sont associées à un mauvais pronostic (Yoon *et al.*, 2016). Enfin, les macrophages associés à la tumeur (TAMs pour *Tumor-associated macrophages*) sont majoritairement de phénotype « pro-tumoral » ou M2 et vont favoriser l'angiogenèse même s'ils sont responsables avant tout de l'immunosurveillance de la tumeur (Leblond *et al.*, 2015).



II.2.3. Compartiment immunitaire/inflammatoire

Le SNC a longtemps été considéré comme un organe « immuno-privilégié » grâce à la BHE qui limite les échanges entre le cerveau et le reste de l'organisme. La microglie, cellules immunitaires spécifiques du cerveau, assure une immunosurveillance du parenchyme. Depuis la découverte d'un système lymphatique cérébral (Louveau *et al.*, 2015) et de l'extravasation leucocytaire (certes en condition pathologique mais en présence d'une BHE intacte), ce principe est aujourd'hui remis en question (Engelhardt, 2006). En effet, les GB sont des tumeurs fortement inflammatoires avec une colonisation massive par les cellules immunitaires (Hussain *et al.*, 2006; Charles *et al.*, 2011). On va ainsi retrouver environ 46 % de macrophages/microglie, 30 % de lymphocytes, environ 12 % de cellules myéloïdes suppressives et 10 % de cellules dendritiques (Hussain *et al.*, 2006; Raychaudhuri *et al.*, 2011; Charles *et al.*, 2011).

Nous ne développerons ici que la contribution des macrophages/microglie et des lymphocytes dans la progression tumorale.

II.2.3.1. Les lymphocytes

Les lymphocytes infiltrants la tumeur (ou TIL pour *tumor-infiltrating lymphocytes*) sont des lymphocytes T dont :

- un tiers sont des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) exerçant une activité anti-tumorale envers les cellules de GB, leur nombre étant positivement corrélé à la survie des patients atteints de GB (Smyth *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2014; Jouanneau *et al.*, 2014).
- deux tiers sont des lymphocytes T auxiliaires (CD4+) au sein desquels sont principalement retrouvés des lymphocytes T régulateurs (CD4+/FoxP3+), induits notamment par le TGF- β , dont le rôle est d'inhiber les autres lymphocytes et ainsi favoriser l'échappement tumoral (Hussain *et al.*, 2006; Humphries *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; See *et al.*, 2015). La présence de ce type de lymphocyte est corrélée à un mauvais pronostic et à la récurrence tumorale (Sayour *et al.*, 2015).

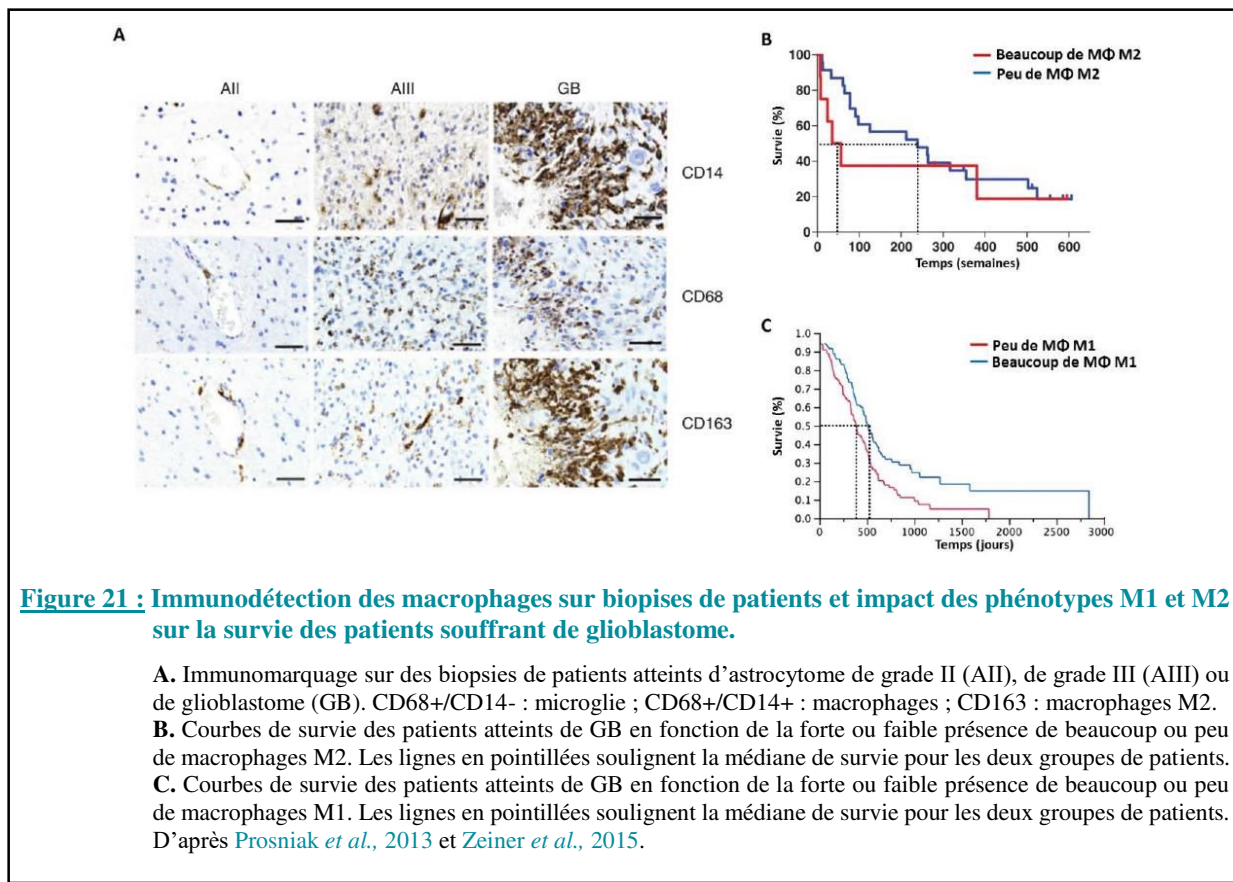
Les récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T que sont PD-1 (*Programmed Cell Death-1*) et CTLA-4 (antigène-4 cytotoxique des lymphocytes T) jouent un rôle majeur dans la tumorigénèse. Ces récepteurs font partie des checkpoints inhibiteurs nécessaires au contrôle de la réponse immunitaire. En revanche, dans un contexte tumoral, la présence de ces protéines va permettre à la tumeur d'échapper à la réponse immunitaire. Ainsi, dans les GB, la surexpression du CTLA-4 par les lymphocytes T CD4 et CD8 inhibe l'activation et la prolifération des lymphocytes T et est inversement corrélée à la survie des patients (Huang *et al.*, 2017). De même, le couple PD-1, exprimé par les lymphocytes T / PDL-1, exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes, exerce une activité immunosuppressive et diminue drastiquement les activités cytotoxiques des lymphocytes T et la production de cytokines inflammatoires. L'expression de PDL-1 est également associée à un mauvais pronostic dans les GB (Kim *et al.*, 2017).

II.2.3.2. Microglie et macrophages

Les macrophages/microglie sont les cellules immunitaires les plus abondantes retrouvées au niveau des GB (**Figure 21 A**) (Graeber *et al.*, 2002; da Fonseca & Badie, 2013). La microglie correspond aux macrophages résidents du SNC alors que les macrophages proviennent des monocytes recrutés au niveau sanguin (Franklin & Li, 2016).

Les cellules microgliales proviennent de l'hématopoïèse au cours du développement embryonnaire, colonisent le SNC et sont capables de proliférer en cas d'atteinte du parenchyme cérébral (Ginhoux & Prinz, 2015). En condition pathologique, la microglie va être stimulée par la sécrétion de différentes molécules, telles que les cytokines (Michell-Robinson *et al.*, 2015). La microglie peut présenter deux phénotypes différents nommés mi1 et mi2. Le phénotype microglial mi1 ou « cellule sentinelle » est impliqué dans la lutte contre les pathogènes alors que le phénotype mi2 a un rôle de réparation tissulaire et de remodelage (Hanisch, 2002; Li & Graeber, 2012). Au niveau des GB, la microglie est recrutée par la synthèse de chimiokines et de cytokines par la tumeur elle-même (Graeber *et al.*, 2002; Ku *et al.*, 2013). Cependant, les cellules microgliales seraient maintenues dans un état de repos et ne phagocyteraient pas les cellules tumorales à cause de la forte synthèse de ces dernières de TGF- β (Graeber *et al.*, 2002; Zhai *et al.*, 2011). De plus, plusieurs études ont montré que la microglie pouvait promouvoir la prolifération cellulaire des cellules de GB malgré le fait qu'elle acquiert difficilement un phénotype mi2 (Durafourt *et al.*, 2012).

Les macrophages sont des cellules hématopoïétiques douées d'une certaine plasticité cellulaire, leur permettant de répondre rapidement aux changements environnementaux et de se polariser. La polarisation est un processus par lequel les macrophages M0 acquièrent un phénotype actif spécialisé en fonction de l'environnement. Deux grands phénotypes sont associés à la polarisation des macrophages, les macrophages M1 et les macrophages M2 qui ont des effets opposés sur la progression tumorale (Mosser & Edwards, 2008; Mantovani *et al.*, 2013). Ainsi, le phénotype M1 est considéré comme anti-tumoral grâce notamment aux activités phagocytiques des cellules, alors que le phénotype M2 est considéré comme pro-tumoral en favorisant la prolifération et l'invasion cellulaire, l'angiogenèse et l'immunosuppression (Hussain *et al.*, 2006; Bloch *et al.*, 2012; Carvalho da Fonseca *et al.*, 2014). Enfin, des données cliniques suggèrent que les macrophages M2 sont de mauvais pronostic à l'inverse des macrophages M1 (**Figure 21 B et C**) (Komohara *et al.*, 2008; Prosniak *et al.*, 2013; Zeiner *et al.*, 2015).



II.2.4. Propriétés physico-chimiques du microenvironnement

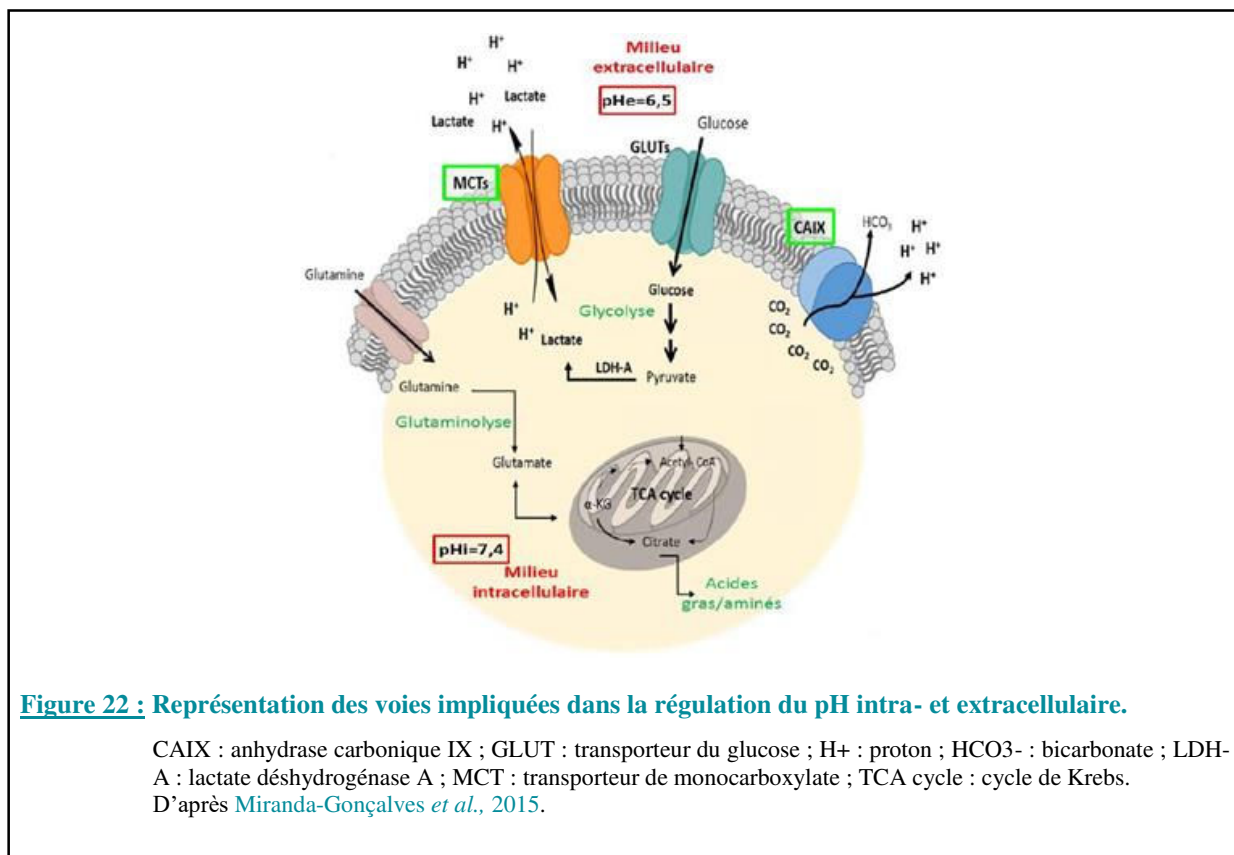
II.2.4.1. La pression interstitielle

L'altération de la microvascularisation et de la BHE va provoquer des épanchements de plasma dans le parenchyme cérébral, ce qui augmente la pression interstitielle au niveau des tissus et conduit alors à des phénomènes œdémateux. Ainsi, il va y avoir une différence de pression interstitielle entre le cœur tumoral et le tissu sain. Une étude de 2011 a démontré *in vitro* que les cellules de GB se polarisent et migrent en suivant la direction d'un fluide mimant des mouvements de convection ([Qazi et al., 2011](#)).

II.2.4.2. L'acidose

Du métabolisme élevé des cellules tumorales résulte la production d'ions hydrogène (H^+), d'acide lactique et d'acide carbonique. Un pH intracellulaire acide aboutit à l'apoptose des cellules ([Lagadic-Gossmann et al., 2004](#)). Ainsi, pour assurer un pH intracellulaire neutre (environ 7,4), ces composés vont être transportés dans l'espace extracellulaire *via* des échangeurs Na^+/H^+ , des échangeurs d'anions (Cl^-/HCO_3^-) et par des récepteurs comme les

MCTs et CAIX (**Figure 22**) (Miranda-Gonçalves *et al.*, 2016). Une fois dans le milieu extracellulaire, les différents ions et métabolites sont pris en charge par le réseau vasculaire. Or, dans les GB, de nombreuses altérations des vaisseaux sont présentes ce qui contribue à l'acidification du milieu extracellulaire avec des valeurs de pH oscillant entre 6,5 et 7,2 (Coman *et al.*, 2016). Les récepteurs MCT1/4 ainsi que CAIX sont surexprimés dans les GB en réponse à l'hypoxie, et plusieurs études ont montré que la surexpression de ces récepteurs est associée à une diminution de la survie cellulaire et à un phénotype agressif (McIntyre *et al.*, 2012; Proescholdt *et al.*, 2012). L'acidification du milieu va favoriser la prolifération cellulaire, l'immunosuppression, l'invasion, l'angiogenèse et la réponse aux chimiothérapies (Vaupel 2010; Reichert *et al.*, 2002). Ainsi dans les gliomes, l'acidose va induire l'expression du VEGF via les voies ERK/MAPK, ce qui *in fine*, augmente l'angiogenèse (Xu *et al.*, 2002). L'étude de Hjelmeland suggère que l'exposition à des valeurs faibles de pH privilégie le caractère malin des cellules, favorisant ainsi un phénotype souche (Hjelmeland *et al.*, 2011). Enfin, l'acidification du milieu extracellulaire permet également l'invasion des cellules tumorales en activant les protéases responsables de la digestion de la MEC (Harris, 2002).



II.2.4.3. L'hypoxie

II.2.4.3.1. Définition

L'hypoxie correspond à une inadéquation entre l'apport et la consommation d'oxygène (O_2). Cette inadéquation peut être causée par le métabolisme accru des cellules, leur prolifération rapide, et donc leur éloignement des vaisseaux, une pression interstitielle élevée, ou encore par une mauvaise perfusion des vaisseaux sanguins.

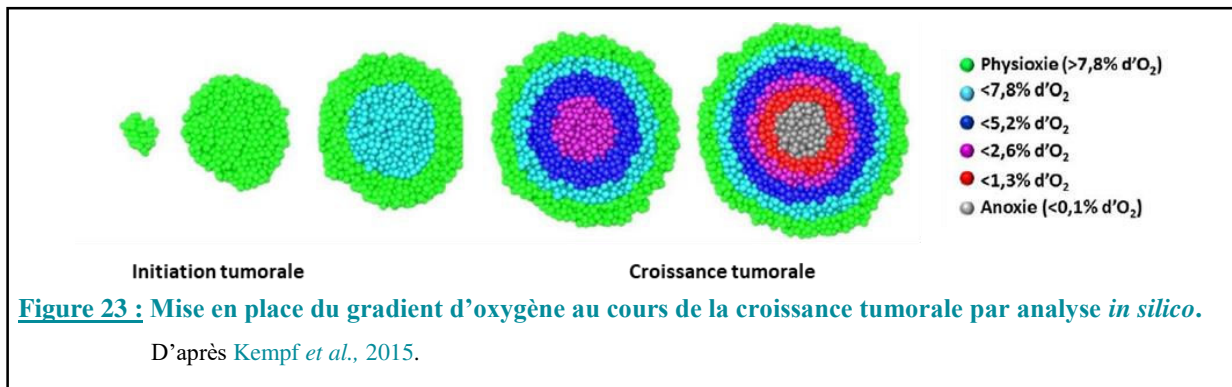
La pression partielle en O_2 (pO_2) varie selon les tissus. Elle est d'environ 160 mmHg dans l'atmosphère, passe à 100 mmHg dans le sang artériel pour finalement n'être que de 40 mmHg dans le cerveau. Différents termes sont utilisés afin de décrire ces variations de niveaux d'oxygène (**Tableau 2**) (Koh & Powis, 2012). Ainsi, la condition normoxie correspond à la valeur de pO_2 atmosphérique de 160 mmHg ce qui correspond à 21 % d' O_2 de l'air total. La physioxie correspond aux valeurs de pO_2 en situation physiologique au niveau tissulaire. Elle varie selon les organes mais se situe entre 15 et 68 mmHg ce qui correspond à une teneur en O_2 de 2-9 %. En deçà de ces valeurs, on parle d'hypoxie. Elle peut être modérée, de 8 à 38 mmHg (1-5 % d' O_2) ou sévère, < à 8 mmHg (<1 % d' O_2), et enfin, on parle d'anoxie en la quasi-absence d' O_2 .

Condition	pO_2 (mmHg)	% O_2
Normoxie	159	21
Physioxie	15-68	2-9
Hypoxie modérée	8-38	1-5
Hypoxie	<8	<1
Anoxie	<0,08	<0,1

Tableau 2 : Définition des niveaux d'oxygénation.

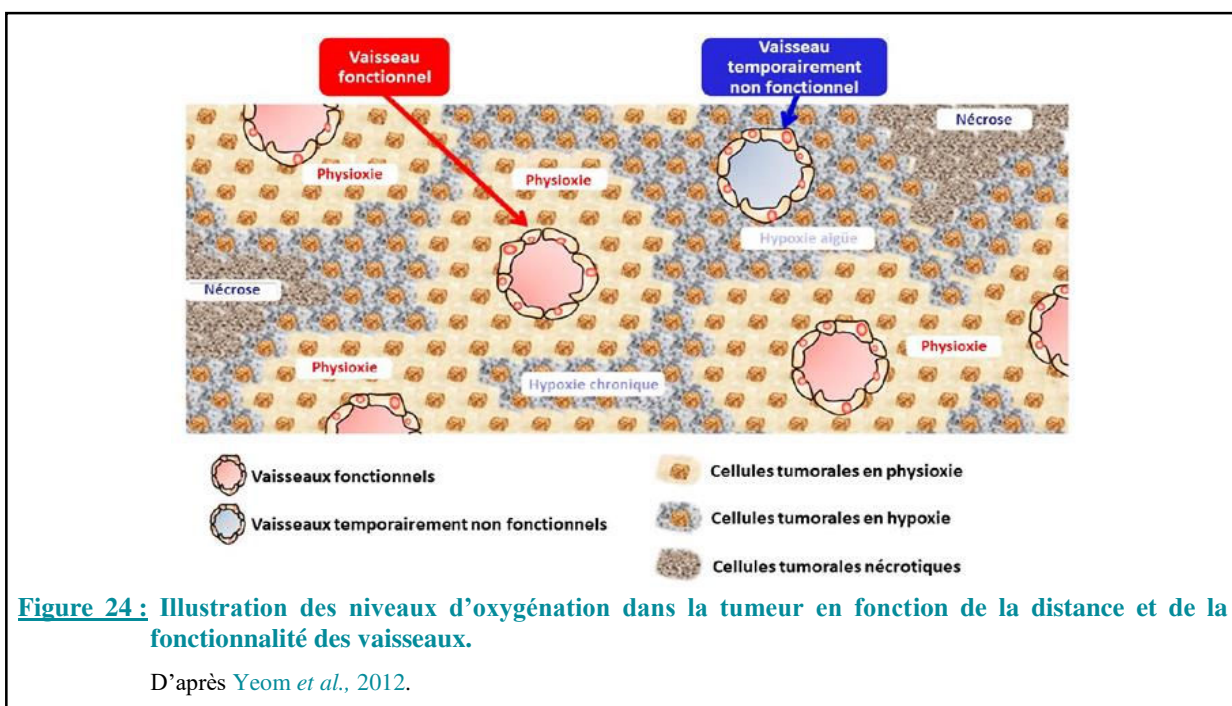
D'après Koh & Powis 2012.

Dans le tissu cérébral sain la pO_2 varie entre 30 et 40 mmHg (soit environ 5 % d' O_2). Au niveau des GB une pO_2 moyenne de 7,2 mmHg a été mesurée chez les patients, avec chez certains, une pO_2 intratumorale inférieure à 1 mmHg (Rampling *et al.*, 1994). Par ailleurs, au sein de la tumeur, l'hypoxie se met en place de manière progressive. Au début du développement tumoral les cellules sont en physioxie, puis au cours de sa croissance un gradient d' O_2 va se mettre en place pouvant donner lieu à l'apparition d'une nécrose centrale (**Figure 23**) (Kempf *et al.*, 2015).



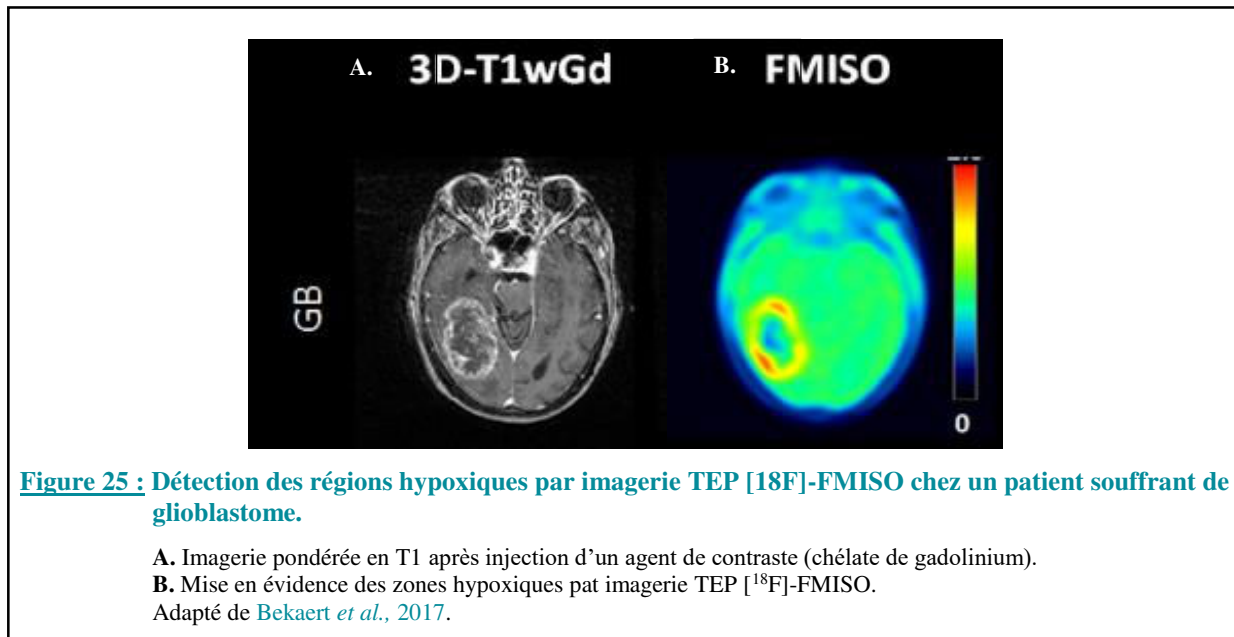
Par leurs origines et durées, trois types d'hypoxie sont définies (Figure 24) (Yeom *et al.*, 2012) :

- L'hypoxie aigue est causée par un apport d'O₂ transitoire imputable à des anomalies anatomique et fonctionnelle de la vascularisation tumorale. Les vaisseaux sont momentanément perfusés et occlus provoquant des phénomènes hypoxiques cycliques (Dewhirst, 2007).
- L'hypoxie chronique se met en place graduellement en fonction du développement de la tumeur et de l'éloignement des cellules des vaisseaux. La diffusion de l'O₂ dans les tissus est limitée à 100 µm, au-delà va se développer de l'anoxie et des plages nécrotiques. L'hypoxie chronique en tant que telle est retrouvée à 70-100 µm des vaisseaux où l'apport en O₂ est juste suffisant à la survie des cellules.
- L'hypoxie anémique est provoquée par la diminution de la capacité du sang à acheminer l'O₂. Elle peut être causée directement par la tumeur ou par les thérapies administrées.



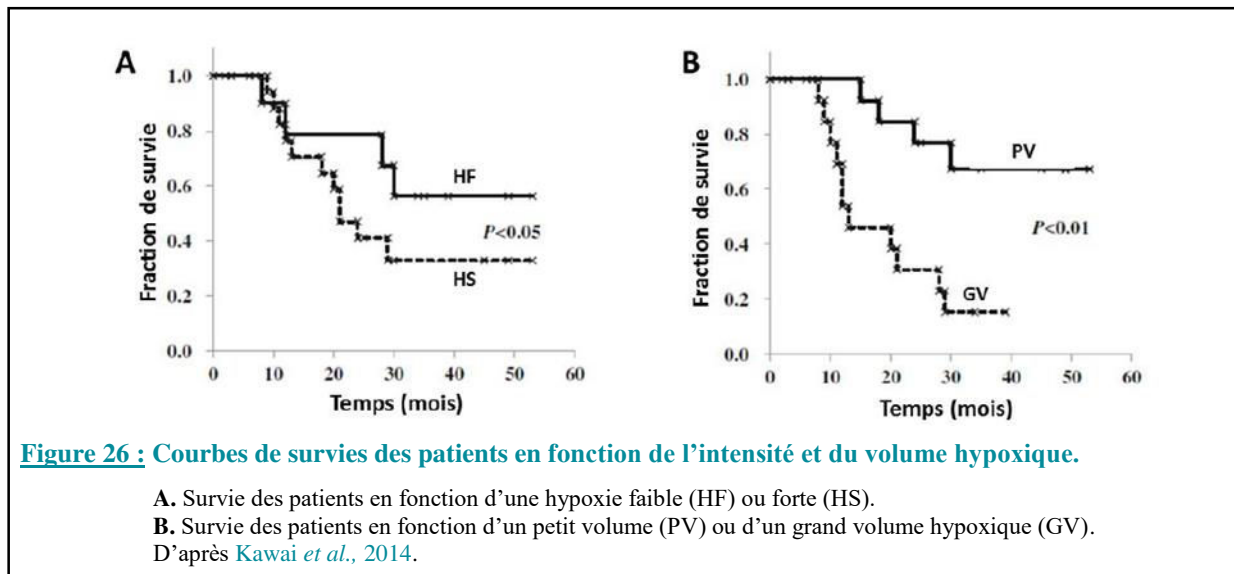
II.2.4.3.2. Hypoxie dans les glioblastomes

En clinique, l'hypoxie est détectée de manière non-invasive notamment grâce à des imageries par Tomographie par émission de positons (TEP). Ainsi, plusieurs radiotraceurs ont été développés pour la détection de l'hypoxie, tels que des dérivés nitro-imidazolés comme le [18F]-FMISO (**Figure 25**). Des études récentes ont démontré que le [18F]-FMISO pouvait permettre de discriminer les gliomes de grade III des GB, suggérant que son utilisation serait pertinente pour le diagnostic des GB (Kawai *et al.*, 2014; Bekaert *et al.*, 2017).



L'hypoxie est un facteur de mauvais pronostic

L'hypoxie est une des caractéristiques majeures des GB avec néanmoins des différences inter-patients en termes d'hétérogénéité régionales et de valeurs d'oxygénation et plusieurs études ont montré que l'hypoxie est un facteur de mauvais pronostic dans les GB (Evans *et al.*, 2010). Ainsi, il a pu être mis en évidence que les patients présentant des hypoxies sévères avaient un temps de survie sans progression plus faible que les patients présentant de faibles hypoxies (Spence *et al.*, 2008) (**Figure 26 A**). De plus, d'autres études suggèrent que des gros volumes d'hypoxie ainsi que des fortes intensités des marqueurs hypoxiques sont corrélés avec un mauvais pronostic et des faibles survies sans progression (Spence *et al.*, 2008; Kawai *et al.*, 2014) (**Figure 26 B**).



En réponse à ces variations de disponibilité de l'O₂, les cellules vont s'adapter et mettre en place des mécanismes moléculaires relayés notamment par les facteurs HIFs. Ces mécanismes vont favoriser la survie et la progression tumorale, ainsi que la résistance aux traitements conventionnels. Les mécanismes moléculaires induits par l'hypoxie *via* les activations des facteurs de transcription HIFs seront détaillés dans le chapitre IV (cf. page 66).

III. Prise en charge thérapeutique

III.1. Les traitements conventionnels et leurs limites

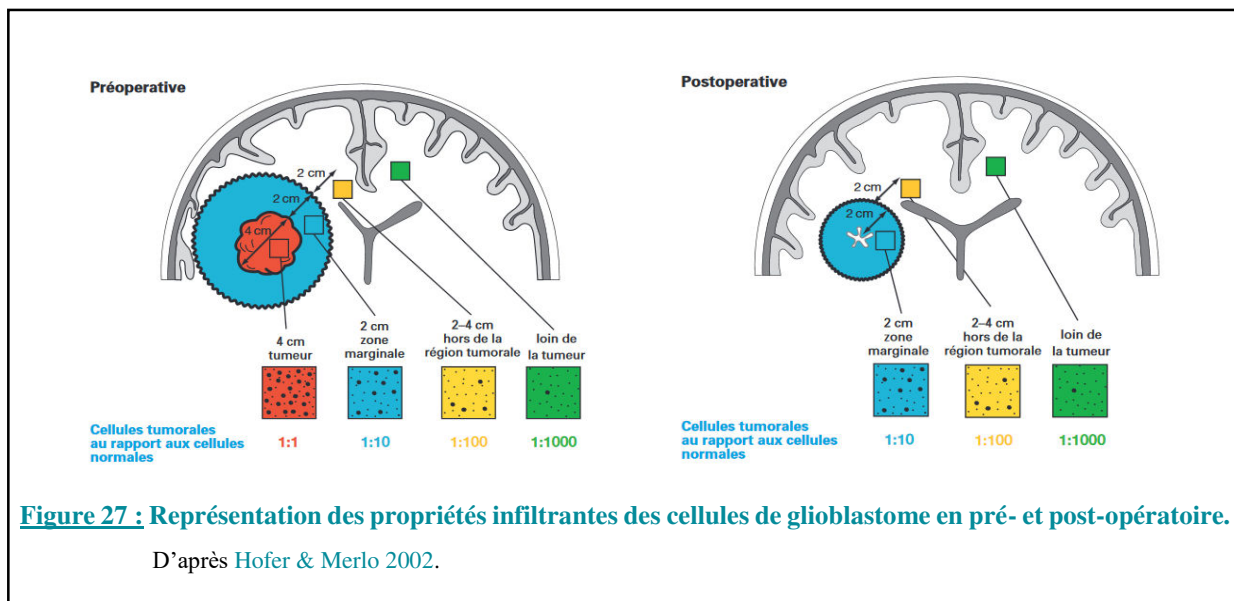
À l'heure actuelle, le traitement conventionnel pour les GB nouvellement diagnostiqués repose sur un protocole standardisé associant la chirurgie à une radio- et chimiothérapie.

III.1.1. La chirurgie

La première étape de la prise en charge thérapeutique est la chirurgie. L'exérèse est dépendante de la localisation de la tumeur et peut s'avérer délicate. En effet, si la tumeur se situe dans des zones fonctionnelles et/ou difficilement accessibles, seule une biopsie sera effectuée. Pourtant, la survie des patients dépend de la résection et une exérèse totale est de meilleure pronostic qu'une exérèse partielle (Lacroix *et al.*, 2001). Cependant, le caractère invasif des GB rend l'exérèse totale très difficile, exposant ainsi les patients à une récurrence tumorale. C'est pourquoi la chirurgie peut être guidée par l'administration d'acide

5-aminolévulinique qui va s'accumuler dans le tissu présentant une forte activité mitotique et émettre de la fluorescence.

Malgré une résection tumorale qui pourrait être considérée macroscopiquement complète, la récurrence est inévitable à cause du caractère invasif et diffus des cellules tumorales. Une étude de 2002 a démontré qu'après une exérèse « complète » de la masse tumorale, subsistait une zone de 2 cm initialement en bordure de tumeur où 1 cellule sur 10 est tumorale, puis, qu'1 cellule sur 100 était tumorale à 2-4 cm et enfin, à distance de la tumeur, 1 cellule sur 1000 est cancéreuse (**Figure 27**) (Hofer & Merlo, 2002).



De plus, les CSG sont principalement responsables de la récurrence et de l'agressivité tumorale.

Du fait du pouvoir infiltrant propre aux GB et de la récurrence tumorale qui est systématique, il est nécessaire d'associer à la chirurgie d'autres traitements tels que la chimiothérapie ou encore la radiothérapie.

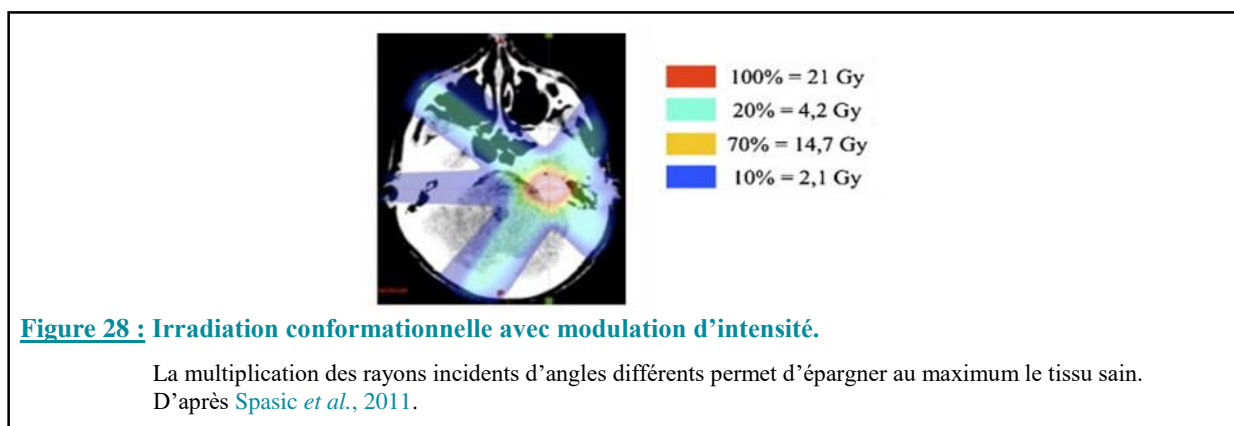
III.1.2. Protocoles standardisés de radio- et chimiothérapie

III.1.2.1. La radiothérapie : principe

Le traitement de radiothérapie (RT) des GB, est basé essentiellement sur l'utilisation des rayonnements X (RX). Les RX seuls ont un effet bénéfique sur la survie des patients puisque la médiane de survie des patients ayant reçu une RT (environ 9 mois) est supérieure à celle des patients non traités (environ 2 mois) (Weller *et al.*, 2009). Une limite de la RT est représentée

par la tolérance limitée du tissu sain vis-à-vis de l'irradiation. Toutefois, la dose maximale délivrée totale ne devant pas excéder 60 Gy, celle-ci n'est pas suffisante pour combattre la tumeur.

De nouvelles méthodes sont proposées afin d'augmenter la dose administrée à la tumeur tout en épargnant le tissu sain. C'est le cas par exemple de la RT conformationnelle avec modulation d'intensité qui consiste à moduler la dose déposée en fonction de la présence du tissu sain (**Figure 29**) (Spasic *et al.*, 2011). Ainsi, à l'aide de faisceaux d'angles incidents différents, une dose importante est déposée au centre de la tumeur alors que des doses plus faibles vont être administrées au tissu sain.



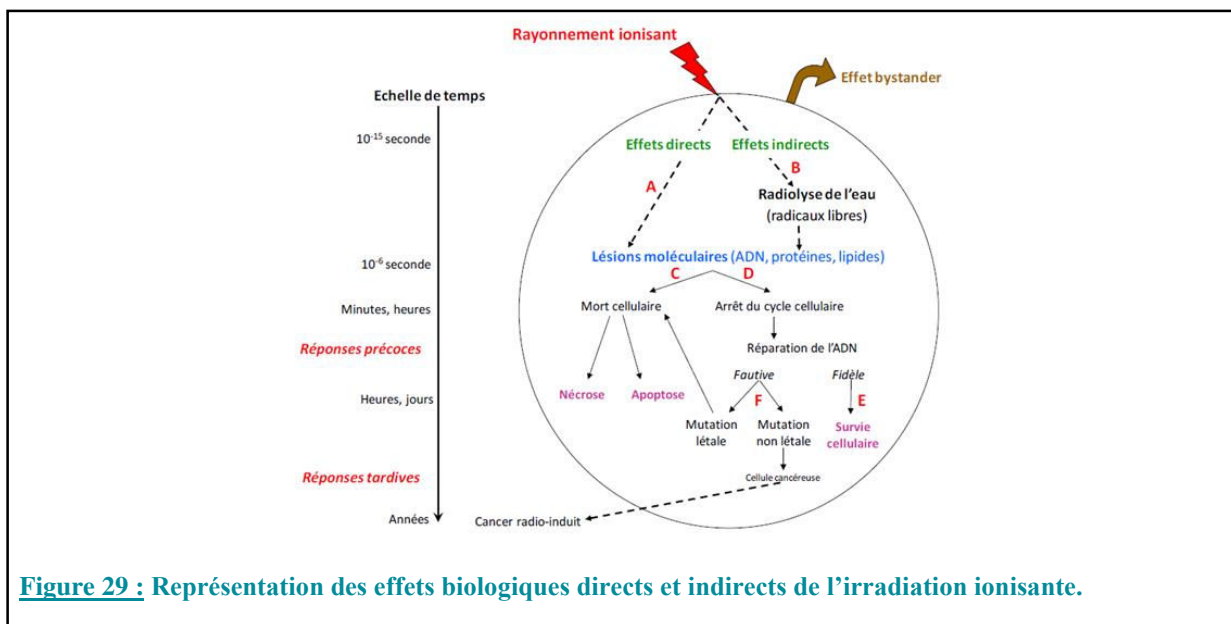
Une autre alternative à la RT conventionnelle est l'hadronthérapie. Cette technologie se base sur l'utilisation de faisceaux de particules, tels que les protons ou les ions carbone. L'intérêt de l'hadronthérapie est une efficacité biologique supérieure aux photons. En effet, les protons ou les ions carbone vont déposer au niveau de la tumeur, une grande quantité d'énergie de manière très concentrée, sous la forme d'un pic appelé « pic de Bragg », tout en épargnant au maximum le tissu sain environnant (Amaldi et Kraft, 2007). Toutefois, les ions carbonés vont avoir une efficacité biologique plus importante que les protons et les RX puisque ces particules vont induire plus de cassures de l'ADN.

III.1.2.1.1. Effets biologiques des rayonnements ionisants

Quand ils arrivent au contact du milieu biologique, les RX vont provoquer des transferts d'énergie conduisant, entre autres, à des ionisations (éjection d'électrons). Ces derniers vont rencontrer des atomes appartenant essentiellement aux molécules d'eau ou aux macromolécules membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires. De ce fait, les rayonnements ionisants (RI) vont

engendrer rapidement (10^{-15} seconde) des effets directs ou indirects qui diffèrent de par leurs réactions radiochimiques distinctes et qui aboutissent à des lésions moléculaires (**Figure 30**) :

- Effets directs (**Figure 30 A**) : les RI peuvent ioniser directement l'ADN, les protéines ou les lipides de la cellule et induisent des lésions moléculaires.
- Effets indirects (**Figure 30 B**) : les RI peuvent interagir avec les molécules d'eau ce qui va provoquer la radiolyse de l'eau, engendrer la formation de radicaux libres cytotoxiques et *in fine* induire des lésions moléculaires.

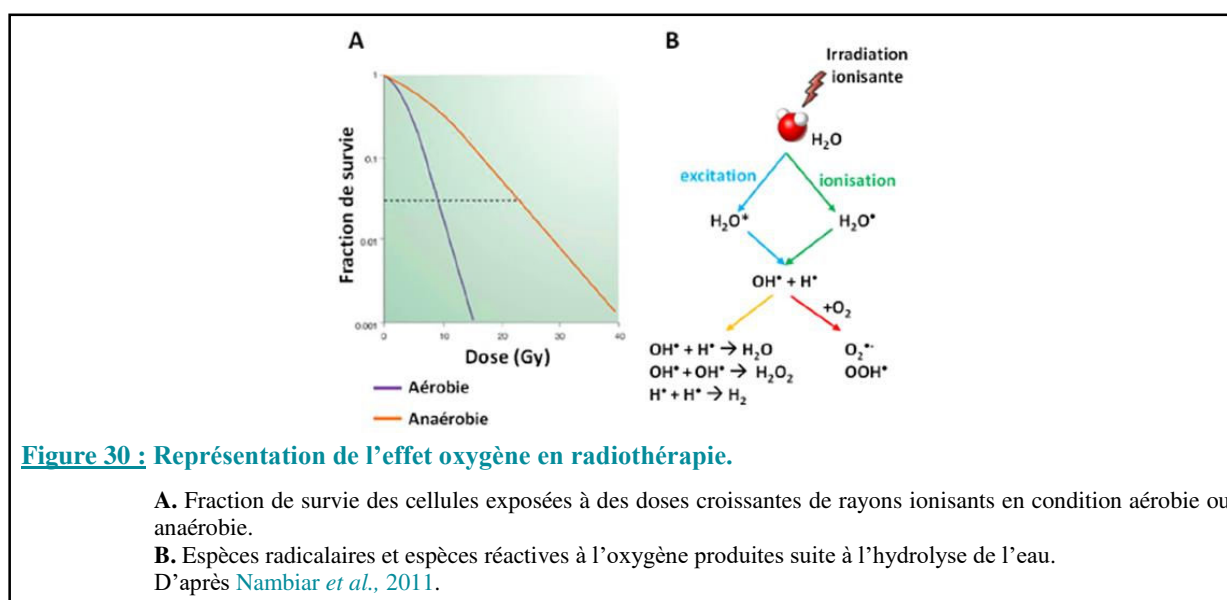


Quelle que soit l'origine des altérations moléculaires, celles-ci vont être détectées par la cellule et induire ensuite soit la mort cellulaire, soit des arrêts dans le cycle cellulaire pour permettre à la cellule de réparer ses dommages (**Figure 30 C et D**). Ces lésions de l'ADN peuvent être soit réparées correctement (réparation fidèle) soit être réparées de manière incorrecte (réparation fautive) : des mutations vont alors subsister (**Figure 30 E et F**). Ces réparations fautives de l'ADN peuvent alors induire des mutations létales conduisant à la mort cellulaire ou bien à des mutations non-létales qui pourront engendrer une radiorésistance tumorale ou encore, si ce sont des cellules saines qui ont été irradiées, provoquer plus tardivement le développement d'un cancer radio-induit.

III.1.2.1.2. Effet oxygène et espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont la résultante des effets indirects des rayonnements ionisants. Ces espèces radicalaires sont principalement produites lors de la radiolyse de l'eau et vont induire la majorité

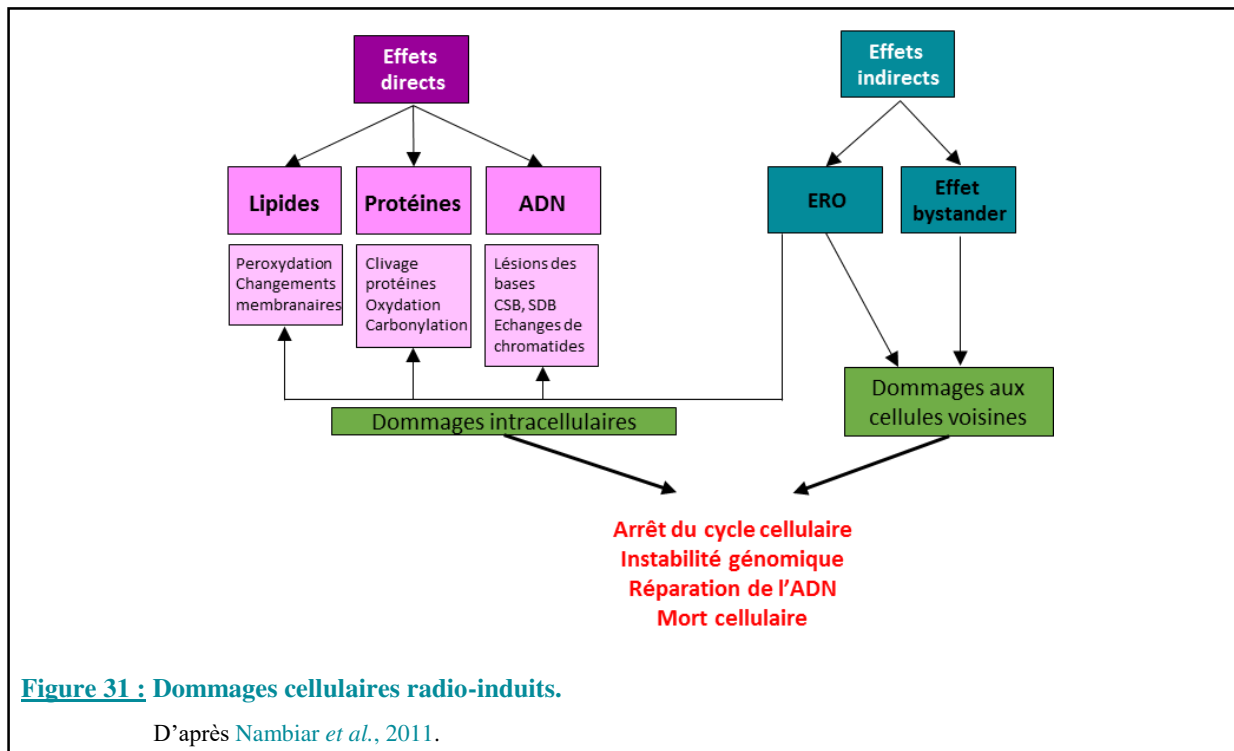
des lésions moléculaires. Les radicaux libres (OH° et H°) ont une demi-vie très courte et peuvent soit diffuser avant d'induire des lésions, soit se recombinaisonner et former de nouvelles espèces moléculaires. Parmi celles-ci, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est connu pour avoir un rôle important dans le stress oxydatif cellulaire. En présence d' O_2 , d'autres réactions chimiques peuvent se produire avec les radicaux libres et générer ainsi d'autres espèces radicalaires ainsi que des peroxydes (ROOH) : c'est l'effet oxygène (**Figure 31 B**) (Nambiar *et al.*, 2011). Les molécules ainsi formées sont particulièrement cytotoxiques ce qui illustre l'effet radiosensibilisant de l' O_2 en raison de sa capacité à augmenter la production d'ERO (**Figure 31 A**). Cependant, l'hypoxie diminue cet effet oxygène, limitant les effets indirects des RI, la radiolyse de l'eau, et donc les dommages à l'ADN. Ainsi, l'hypoxie est un facteur de radiorésistance, phénomène important dans les GB.



III.1.2.1.3. Dommages macromoléculaires radio-induits

Dès les premières secondes après l'irradiation, les RI provoquent des ruptures des liaisons covalentes ou bien des recombinaisons chimiques anormales touchant non seulement l'ADN, mais aussi les lipides et les protéines (**Figure 32**) (Nambiar *et al.*, 2011).

Néanmoins, les dommages les plus importants vont être ceux de l'ADN : les RI provoquent des cassures simple (CSB) ou double brin (CDB), des modifications de la structure chimique des bases, la formation de pontages inter- ou intra-brins ou la formation d'adduits (Averbeck, 2000; Nambiar *et al.*, 2011).



Les rayonnements ionisants peuvent également induire des effets à distance dits « effets *bystander* ». Ce phénomène correspond aux effets provoqués à distance par l'irradiation au niveau des cellules non irradiées. Cet effet *bystander* s'appuie sur la communication entre les cellules, qu'elle soit par contact direct avec les jonctions communicantes, ou indirect avec la production d'ERO, de facteurs de croissance ou de cytokines dans le milieu extracellulaire.

De manière intéressante, les effets *bystander* sont capables d'induire des dommages sur les macromolécules similaires à ceux induits par l'action directe de l'irradiation (Figure 32). Ces effets seraient également dépendants de la dose d'irradiation. En effet, des faibles doses d'irradiation vont provoquer, au niveau d'une cellule non irradiée, des échanges de chromatides sœurs, la formation de micronoyaux et l'apoptose.

Des altérations des tissus à distance de la zone irradiée sont désignées par le terme « d'effet ascopal ». Cet effet réfère aux altérations observées en clinique et médié par des facteurs circulants et par la réaction immunitaire associée (Tomita & Maeda, 2015).

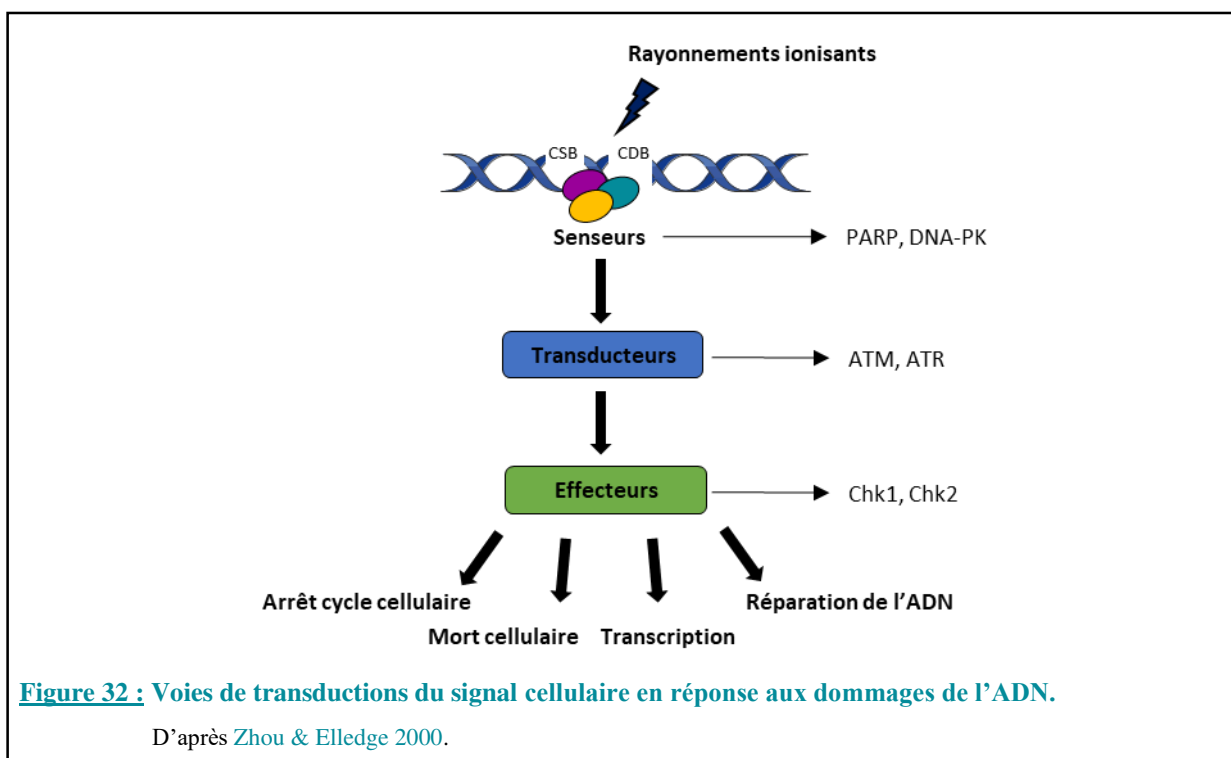
III.1.2.1.4. Réponses cellulaires aux dommages à l'ADN

Signalisation des dommages de l'ADN

Il est primordial pour la survie de la cellule que les lésions de l'ADN soient détectées pour pouvoir être réparées. Ainsi, les cellules possèdent différents points de contrôle qui vont permettre d'arrêter le cycle cellulaire pour que les mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place. Succinctement, en réponse aux dommages de l'ADN radio-induits, différentes cascades de signalisation vont être mises en œuvre avec l'intervention successive (**Figure 33**) (Zhou & Elledge, 2000) :

- de protéines senseurs telles que la PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase*) et la DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) ;
- de protéines de transduction des dommages telles qu'ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*ATM-and Rad3-related*) ;
- d'effecteurs terminaux tels que Chk1 et Chk2 qui permettront d'orienter le devenir de la cellule.

À l'issue de ces cascades, les effecteurs terminaux guideront les cellules vers un arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages de l'ADN ou la mort cellulaire (Zhou & Elledge, 2000; Nyberg *et al.*, 2002).



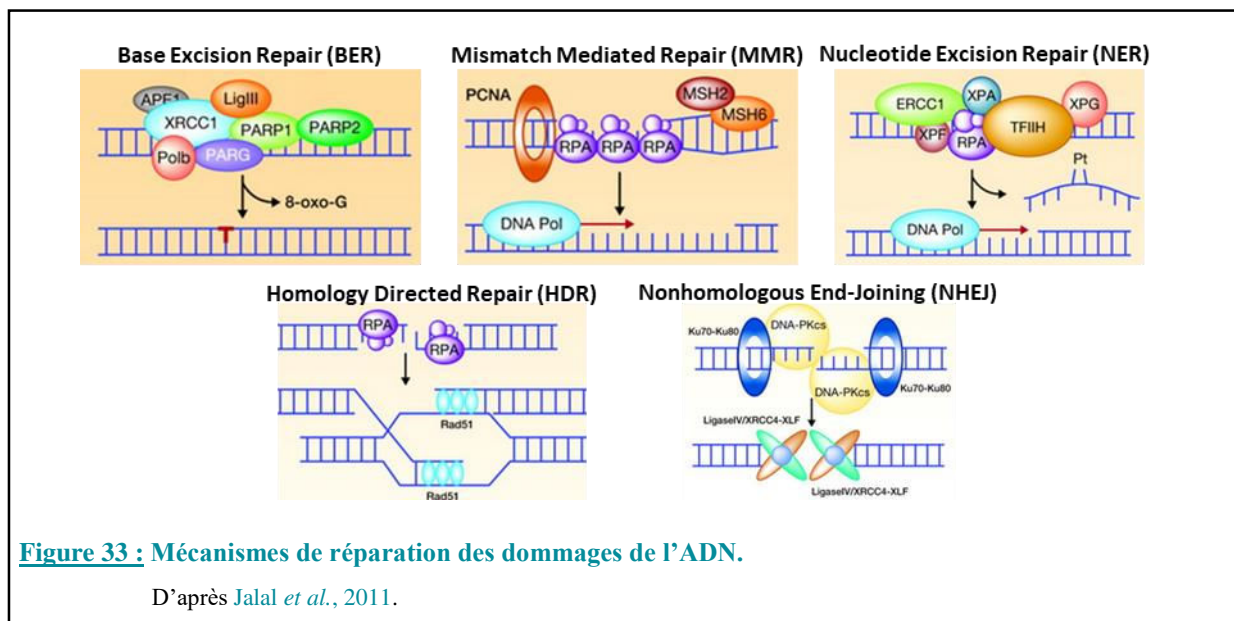
Un autre élément essentiel de la transduction des dommages de l'ADN est la protéine p53. Ce facteur de transcription intervient dans la régulation de l'expression de très nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et l'apoptose (Wang & Cho, 2004).

Ainsi, le facteur de transcription p53, activé par les RI, jouerait un double rôle : un rôle de protection des cellules contre les dommages radio-induits en favorisant la réparation de l'ADN ou un rôle de sensibilisation aux RI en augmentant l'apoptose.

Mécanismes de réparation des lésions de l'ADN

L'activation des voies de signalisation des dommages va activer différents systèmes de réparation de l'ADN. Il existe cinq grands mécanismes de réparation de fonctionnement complexe qui ont pour but de (Jalal *et al.*, 2011) (Figure 34) :

- réparer fidèlement les cassures simple brin (CSB) de l'ADN ainsi que les bases endommagées : les systèmes BER (*base excision repair*), MMR (*mismatch mediated repair*), NER (*nucleotide excision repair*) ;
- réparer les cassures double brin (CDB) de l'ADN : les systèmes HDR (*homology directed repair*) et NHEJ (*nonhomologous end-joining*).



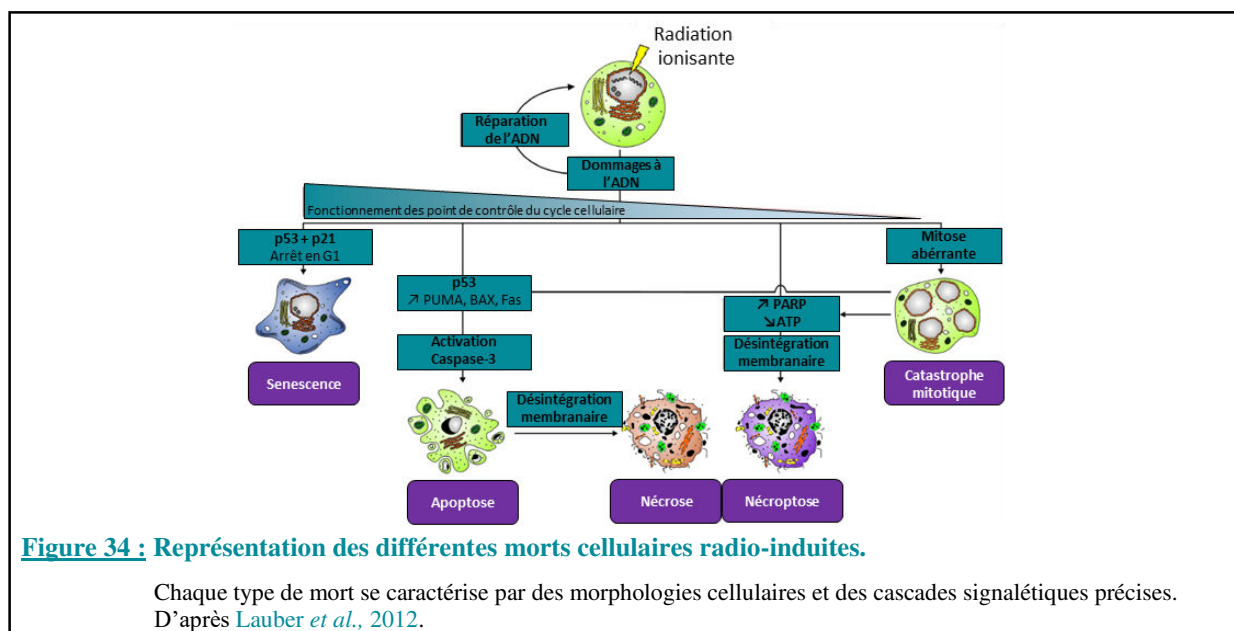
III.1.2.1.5. Contrôle du cycle après l'irradiation

En réponse aux dommages de l'ADN provoqués par l'irradiation, les cellules effectuent des arrêts du cycle à des points de contrôle précis (Hartwell & Kastan, 1994). Les arrêts les plus couramment observés s'effectuent lors de la transition G1/S pour permettre des réparations

avant la duplication du matériel génétique et lors de la transition G2/M pour éviter les aberrations chromosomiques. Le devenir de la cellule dépend de la phase du cycle dans laquelle elle se trouvait lors de l'irradiation. Ainsi, les cellules irradiées sont les plus radiosensibles en phase G2/M, le sont moins en phase G1 et encore moins en phase S (Pawlik & Keyomarsi, 2004). Ces points de contrôle sont induits par les voies de signalisation ATM-Chk2 et ATR-Chk1 et conduisent à l'activation de p53. Le retard radio-induit en phase G1 est en grande partie expliqué par le signal cellulaire transmis par la voie ATM-Chk2, alors que l'arrêt en phase G2/M peut être soit indépendant de la dose d'irradiation et sous la dépendance des protéines ATM et ATR, soit dépendant de la dose d'irradiation et ne passant par l'induction des protéines ATM et ATR, ce qui serait le reflet de l'accumulation des dommages de l'ADN non-réparé précédemment (Pawlik & Keyomarsi, 2004).

En résumé, l'exposition aux RI peut produire un large éventail de réponses cellulaires allant de la réparation des dommages à l'ADN et la reprise de la prolifération avec plus ou moins de mutations, jusqu'à la mort cellulaire.

Différents types de mort peuvent être induits par les RI. Les principaux sont l'apoptose, l'autophagie, la catastrophe mitotique, la nécrose ou la sénescence. Chaque type de mort est caractérisé par des morphologies cellulaires, des acteurs moléculaires et des cascades de signalisation distinctes et caractéristiques (Lauber *et al.*, 2012) (Figure 35).



Afin d'optimiser les effets de la RT, des approches suggèrent d'administrer certaines drogues pour induire l'arrêt des cellules tumorales en phase G2/M et ainsi potentialiser les effets de l'irradiation. Le témozolomide est de ce fait, un excellent candidat chimiothérapeutique.

III.1.2.2. La chimiothérapie

Avant les années 2000, les agents nitrosourées tels que la carmustine ou la lomustine étaient administrés de manière concomitante à la RT, ce qui permettait d'améliorer quelque peu la qualité de vie des patients ainsi que la médiane de survie de quelques mois (Hochberg, 1979; Stenning *et al.*, 1987; Fine *et al.*, 1993). Une autre molécule alkylante de la famille des triazène a depuis supplanté les agents nitrosourées dans les traitements de première intention, le TMZ. Celui-ci est administré par voie orale, présente une biodisponibilité proche de 100 %, passe la BHE et est très affiné des tissus tumoraux (Chinot *et al.*, 2010; Alifieris & Trafalis, 2015).

III.1.2.2.1. Mode d'action du témozolomide

Le TMZ est administré sous forme de prodrogue et est directement converti à pH physiologique en monométhyl triazénoïmidazole carboxamide (MTIC). Celui-ci est relativement instable et va être converti à son tour en un composé inactif, l'AIC (5-aminoimidazole-4-carboxamide), et en ions méthyldazonium. Ces cations vont provoquer des réactions d'alkylation de l'ADN grâce à l'ajout de groupements méthyles sur des résidus purines. La méthylation de l'ADN va provoquer des mésappariements lors de la réplication de l'ADN, entraînant ainsi un arrêt du cycle puis la mort cellulaire (Mrugala & Chamberlain, 2008).

III.1.2.2.2. Réponses cellulaires au témozolomide

Les méthylations des bases puriques vont être réparées par le système BER grâce notamment à l'action de l'enzyme MGMT. Ainsi, l'altération de l'activité de la MGMT va favoriser la mort cellulaire à cause d'un défaut de réparation de l'ADN. L'hyperméthylation du promoteur de la MGMT, une modification épigénétique fréquente dans les GB, permet de lever le rôle protecteur de cette dernière et induit une meilleure réponse à la chimiothérapie.

III.1.2.2.3. Rôle de l'hypoxie dans la résistance au témozolomide

L'hypoxie intra-tumorale, l'altération du réseau vasculaire ainsi que la mauvaise perfusion sanguine qui en découle représentent une des causes de chimiorésistance. De plus, l'éloignement des cellules tumorales des vaisseaux sanguins va non seulement limiter la diffusion de la chimiothérapie dans le tissu, mais l'hypoxie va également favoriser l'expression

de récepteurs ABC (*ATP-binding cassette*) permettant l'efflux des molécules de chimiothérapie (Begicevic & Falasca, 2017). D'autres freins à l'accès des molécules de chimiothérapie aux cellules tumorales sont représentés par la pression interstitielle élevée qui limite la diffusion dans le tissu, mais également par l'acidification du milieu extracellulaire qui peut compromettre les réactions chimiques des drogues administrées.

III.1.3. Protocole de Stupp

Depuis l'essai de phase III EORTC/NCIC (*European Organisation for the Research and Treatment of Cancer / National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*), le protocole thérapeutique clinique standardisé dit « protocole de Stupp » associe l'administration adjuvante et concomitante de TMZ à la radiothérapie. Ce protocole est proposé aux patients de moins de 70 ans et se décompose ainsi (Figure 28) (Weller *et al.*, 2009) :

- 60 Gy en tout répartis en 30 fractions de 2 Gy de radiothérapie 5 jours/semaine sur 6 semaines,
- TMZ quotidien à 75 mg/m² en concomitance de la radiothérapie,
- puis tous les 28 jours pendant 6 cycles : 5 jours de TMZ à 150-200 mg/m².

Le protocole de Stupp a permis d'améliorer considérablement la médiane de vie des patients à 15 mois environ. Cependant, au terme du traitement initial une récurrence est systématiquement observée ce qui nécessite d'améliorer les traitements.

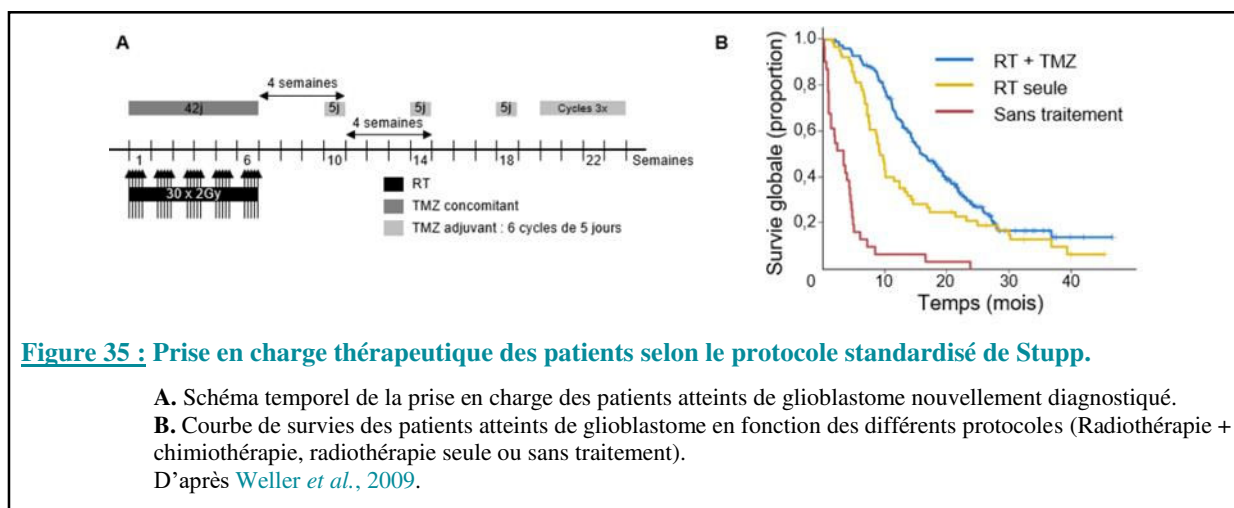


Figure 35 : Prise en charge thérapeutique des patients selon le protocole standardisé de Stupp.

A. Schéma temporel de la prise en charge des patients atteints de glioblastome nouvellement diagnostiqué.

B. Courbe de survies des patients atteints de glioblastome en fonction des différents protocoles (Radiothérapie + chimiothérapie, radiothérapie seule ou sans traitement).

D'après Weller *et al.*, 2009.

III.2. Les nouvelles approches thérapeutiques

Comme évoqué précédemment (cf. page 62), l'administration de la chimiothérapie avec le TMZ dans le cadre du protocole de Stupp permet d'améliorer la médiane de survie des patients

à 15 mois environ. Toutefois, une récurrence est inévitablement observée quelques mois après la fin du traitement et, dans un souci constant d'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients atteints de GB, d'autres stratégies sont en cours d'étude.

III.2.1. Origines de la récurrence

La première cause de la récurrence tumorale est liée à l'exérèse chirurgicale qui, bien que de nouveaux outils technologiques soient apportés pour l'améliorer, ne peut être complète. En effet, le fort pouvoir invasif des cellules de GB amène à une dissémination macroscopiquement invisible dans le parenchyme cérébral et qui échappent aux traitements. De plus, les CSG situées dans les niches hypoxiques sont également « protégées » des actions cytotoxiques des traitements par radio- et chimiothérapie, ce qui permet d'assurer un « pool de réserve » de cellules cancéreuses et la récurrence tumorale.

III.2.2. Thérapies alternatives

Les traitements de seconde ligne pour les GB sont encore limités et ne sont pas standardisés (Gallego, 2015; Steffens *et al.*, 2016). Deux grandes stratégies sont mises en œuvre : le traitement intrinsèque des cellules tumorales ou le ciblage des composants du microenvironnement.

III.2.2.1. Ciblage des cellules tumorales

III.2.2.1.1. La chirurgie

Bien que les interventions chirurgicales en deuxième intention ne permettent pas d'améliorer la survie des patients, celle-ci est tout de même bénéfique en réduisant la pression intracrânienne et en permettant l'administration de chimiothérapie locale, sous la forme d'implants de polymères biodégradables contenant de la carmustine, bénéfique pour les patients (Brem *et al.*, 1995; Attenello *et al.*, 2008; Gallego, 2015).

III.2.2.1.2. La radiothérapie

La ré-irradiation des patients n'était jusqu'à présent que très peu proposée, en raison des risques de comorbidité importants liés à l'altération du tissu sain cérébral. Les améliorations technologiques permettent de contourner ce problème mais la ré-irradiation reste tout de même

une option palliative avec une dose totale délivrée n'excédant pas 30 Gy (Weller *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2014).

III.2.2.1.3. Les agents alkylants

Les nitrosourées font l'objet de plusieurs essais cliniques pour le traitement des récurrences des patients atteints de GB (Seystahl *et al.*, 2016). De plus, le TMZ est également envisagé comme traitement lors des récurrences et permet d'atteindre une survie sans progression à 6 mois de 21 % contre 6 % pour la procarbazine (Brada *et al.*, 2010).

Toutefois, les cellules tumorales, notamment les CSG survivantes des traitements acquièrent des mutations les rendant insensibles aux traitements dits « classiques ». De ce fait, et grâce aux nouvelles connaissances des fonctions cellulaires et de l'identification des protéines impliquées dans la gliomagenèse, d'autres cibles thérapeutiques ont été envisagées comme les inhibiteurs de la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase. En effet, de nombreuses mutations des gènes de l'EGFR ou du PDGFRA sont retrouvées dans les GB ainsi que des gènes des effecteurs tels que la PI3K et NF1, lesquels potentialisent la prolifération, l'invasion et l'échappement à la mort des cellules tumorales. L'inhibition de ces voies de signalisation n'a malheureusement pas donné de résultats probants à ce jour.

III.2.2.2. Ciblage du microenvironnement

III.2.2.2.1. Les traitements anti-angiogéniques

Le but de ces stratégies est de priver la tumeur de ses apports en O₂ et nutriments en limitant l'angiogenèse (Weller *et al.*, 2013). Le médicament anti-angiogénique le plus avancé dans son évaluation pour le traitement des patients souffrant d'un GB est le bevacizumab. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le facteur de croissance VEGF-A. Utilisé en première intention en combinaison avec le traitement standard, il permet d'augmenter seulement la survie sans progression (Chinot *et al.*, 2014; Gilbert *et al.*, 2014). Le bevacizumab ne possède actuellement pas d'autorisation de mise sur le marché par l'agence européenne du médicament. Cependant, une étude de phase II sur les récurrences de GB suggère que son utilisation en combinaison avec la lomustine apporterait un bénéfice en termes de survie globale (Taal *et al.*, 2014).

III.2.2.2.2. L'immunothérapie

Une autre piste récente concerne l'immunothérapie. Ces thérapies se basent sur l'utilisation et/ou la stimulation du système immunitaire afin d'induire une réponse immunitaire contre la tumeur. Une étude clinique de phase III a étudié l'utilité du Rindopepimut, un vaccin ciblant l'EGFRvIII dans les GB porteurs de la mutation de l'EGFR. Malheureusement, l'administration de ce vaccin ne permet pas d'augmenter la survie ni d'améliorer la qualité de vie des patients (Weller *et al.*, 2017). Une autre modalité prometteuse a été entreprise avec l'utilisation de cellules dendritiques comme cellules présentatrices d'antigènes (Bregy *et al.*, 2013). Cette approche permet d'augmenter la médiane de survie ainsi que la survie sans progression des patients atteints de GB nouvellement diagnostiqués ou de GB récurrents.

Au vu des résultats encourageants obtenus dans le traitement de certains cancers, des stratégies ciblant spécifiquement les checkpoints immunologiques font également l'objet d'études cliniques de phase III pour les GB. Ainsi, dans les GB, l'évaluation de l'intérêt du blocage de la voie PD1 / PDL-1 avec l'utilisation du Nivolumab associé à la radiothérapie seule ou concomitante au TMZ, a été initiée dans deux essais cliniques (NCT02667587, NCT02617589). Cette stratégie permettrait de restaurer la fonction anti-tumorale des lymphocytes T. Par ailleurs, dans le cadre de GB récurrents, une étude clinique de phase III ciblant les deux checkpoints (CTLA-4 et PD-1) *via* l'administration de Nivolumab (PD-1) et de l'Ipilimumab (CTLA-4) vient d'achever sa phase de recrutement des patients (NCT02017717) (Romani *et al.*, 2018).

III.2.2.2.3. La réoxygénation des tumeurs

Comme détaillé précédemment dans le manuscrit (cf. page 89), l'hypoxie et les facteurs HIFs, lesquels étant dépendants du niveau d'O₂, constituent un frein à l'efficacité des thérapies. Des stratégies de réoxygénation tumorale afin de lever cette barrière ont donc été proposées comme l'oxygénothérapie hyperbare avec 100 % d'O₂ concomitante à l'irradiation. Cependant, des difficultés techniques ont limité les essais à grande échelle, lesquels étaient pourtant encourageants (Dische *et al.*, 1983). Une autre stratégie, l'hyperoxie associée au traitement standard (radiothérapie + chimiothérapie), a montré dans une étude de phase II un allongement de la survie des patients (Ogawa *et al.*, 2012). Enfin un composé vasodilatateur, le carbogène, a été testé dans le cadre d'un essai clinique (ARCON) en administration concomitante avec de la nicotinamide mais n'a pas présenté de réels bénéfices pour les GB alors que cette stratégie a été approuvée pour des tumeurs de la sphère ORL (Simon *et al.*, 2003). Plus récemment, une

étude menée au sein de l'équipe suggère que l'utilité du carbogène dans la réoxygénation tumorale, dépend de l'état de tonus et de réactivité vasculaire originel. Compte tenu de l'état très altéré de la vascularisation des GB, l'étude de Chakhoyan constitue une piste intéressante quant à l'explication de l'échec du carbogène dans la réoxygénation des GB (Chakhoyan *et al.*, 2017).

Ces stratégies n'abordent l'hypoxie que sous un aspect « général » sans tenir compte des acteurs moléculaires impliqués dans la réponse à la déprivation en O₂. Afin de proposer des stratégies plus sélectives, notamment contre les facteurs HIFs, il convient de comprendre les changements physiopathologiques régis par les facteurs HIFs et quelles sont les stratégies envisagées pour moduler leur action.

IV. HIFs et Glioblastome

IV.1. HIFs : acteurs moléculaires majeurs de l'hypoxie

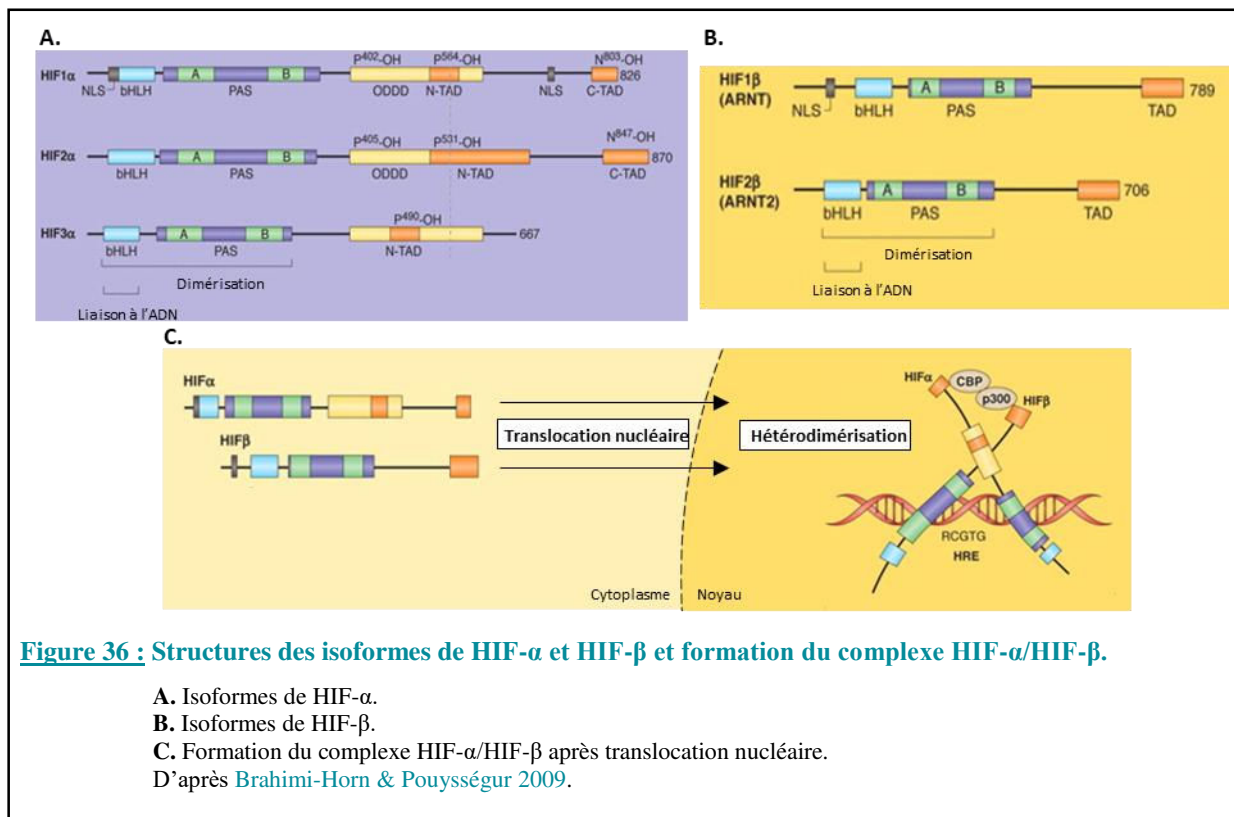
L'adaptation des cellules tumorales à l'environnement hypoxique est régulée majoritairement par la famille des facteurs de transcription HIF, dont HIF-1 α est le plus étudié. Identifié pour la première fois en 1992, HIF-1 α est un régulateur prépondérant de l'expression du gène de l'érythropoïétine (EPO) en réponse à une faible concentration en oxygène (Semenza et Wang 1992; Wang et Semenza 1993). Peu de temps après, cette même équipe a montré que HIF-1 α était capable d'induire la transcription de l'EPO (Wang & Semenza, 1995). Depuis, les facteurs HIFs se sont avérés comme ayant un rôle central et primordial dans la réponse cellulaire à l'hypoxie en induisant la transcription d'un large panel de gènes, une part qui est estimée à 1-2 % du génome (Keith *et al.*, 2012).

Les facteurs HIFs sont des hétérodimères appartenant à la superfamille des protéines à domaine bHLH/PAS (*basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-SIM*). Ils sont constitués d'une sous-unité HIF- α , labile avec l'oxygène, et d'une sous-unité HIF- β (également dénommée *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* ou ARNT) constitutive et stable.

Il existe trois isoformes de la sous-unité α (α 1, α 2, et α 3) (Figure 36 A) et deux isoformes de la sous-unité β (β 1 et β 2) (Figure 36 B) (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2009).

HIF-1 α est codé par le gène *HIF1A* qui se situe sur le chromosome 14q23.2 et comporte 15 exons. HIF-2 α , quant à lui, est codé par le gène *EPAS1* qui se situe sur le chromosome 2p21 et

comporte 16 exons. Enfin, HIF-3 α , qui existe sous plusieurs variants, est codé par le gène *HIF3A* se situant sur le chromosome 19q13.32 et comporte 19 exons.



IV.1.1. Structures des facteurs de transcription HIFs

Les 3 sous-unités α présentent quatre domaines communs (**Figure 36 A**) :

- le domaine basic *helix-loop-helix* (bHLH) permet la dimérisation avec la sous-unité β et la liaison à l'ADN ;
- le domaine Per-ARNT-Sim (PAS) est une deuxième région pour la dimérisation ;
- le domaine *oxygen-dependant degradation domain* (ODDD) confère l'instabilité de HIF- α en normoxie ;
- les domaines N- et C-TAD (*terminal transactivation domain*) pour l'interaction avec les co-activateurs et l'activation des gènes cibles.

HIF-2 α possède une homologie de séquence de 48 % avec HIF-1 α dont 85 % pour le domaine bHLH et 70 % pour les domaines PAS et ODDD ([Wiesener et al., 1998](#)). Alors qu'HIF-1 α est exprimé de façon ubiquitaire, l'expression de HIF-2 α est plus restreinte puisqu'il est retrouvé dans les cellules endothéliales, les cardiomyocytes, les cellules hépatiques, les cellules immunitaires mais aussi dans les cellules souches cancéreuses ([Talks et al., 2000](#);

Imtiyaz *et al.*, 2010). Enfin, HIF-3 α partage respectivement 57 % et 53 % d'homologie avec HIF-1 α et HIF-2 α (Gu *et al.*, 1998). En revanche, cette isoforme ne possède pas de domaine C-TAD, et, par conséquent, n'a pas d'activité transcriptionnelle. De plus, HIF-3 α contribuerait à la régulation de HIF-1 α puisque dans certaines cellules, elle exerce une action répressive sur l'hétérodimérisation de HIF-1 α avec HIF-1 β (Makino *et al.*, 2001).

IV.1.2. Rôle des différents domaines des HIFs

Les domaines bHLH/PAS et la reconnaissance de l'ADN (Figure 36 A)

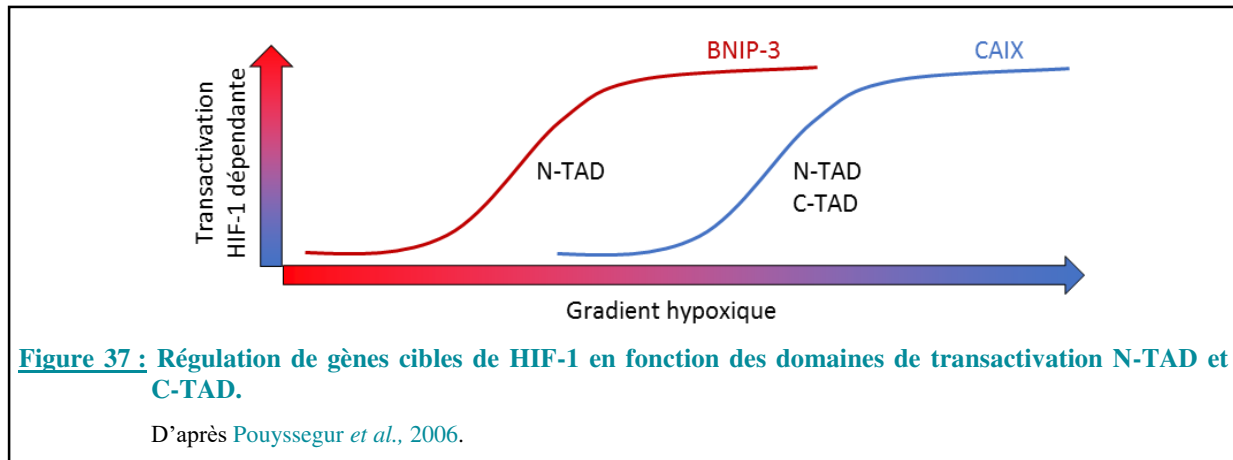
HIF- α et HIF- β possèdent, dans leurs régions N-terminales, deux domaines PAS (PAS-A et PAS-B), impliqués dans la dimérisation des sous-unités α et β . Les domaines bHLH, particulièrement riches en éléments basiques forment une structure tridimensionnelle de type hélice-boucle-hélice, permettant non seulement l'hétérodimérisation de HIF mais aussi sa fixation à l'ADN (Kewley *et al.*, 2004; Brahim-Horn & Pouyssegur, 2009). HIF se fixe à l'ADN sur un motif de reconnaissance appelé « *Hypoxia Response Element* » (HRE), dont la séquence consensus est RCGTG (pour laquelle R est une base purine, A ou G). Les HRE sont des « *enhancers* » et peuvent donc se retrouver dans la région promotrice (comme pour le *VEGF*) ou au niveau des régions régulatrices 3' UTR, comme pour l'*EPO* (Semenza *et al.*, 1991).

Deux cofacteurs sont nécessaires pour que HIF régule la transcription de ses gènes cibles : p300 et CBP (*CREB-binding protein*), lesquels sont recrutés au niveau des HRE (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2009).

Les domaines de transactivation (Figure 36 A)

Les domaines de transactivation (TAD) permettent le recrutement de l'ARN polymérase sur les gènes cibles et sont donc responsables de la fonction de facteur de transcription de HIF. Ces domaines de transactivation sont présents sur HIF- α et HIF- β . Toutefois ceux de HIF- β ne semblent pas être impliqués dans l'activité transcriptionnelle de HIF (Li *et al.*, 1996). En général, les facteurs de transcription ne possèdent qu'un domaine de transactivation. Or, HIF-1 α et HIF-2 α possèdent deux de ces domaines, laissant présager une activité subtile de HIF-1 et HIF-2. Le premier domaine de transactivation de HIF-1 α est situé dans sa partie N-terminale (N-TAD), alors que le second domaine est situé dans l'extrémité COOH (C-TAD). Le N-TAD et le C-TAD de HIF-1 α présentent une faible similarité (21,7 % d'identité chez l'homme) et il semblerait que chaque domaine soit responsable de la régulation par HIF-1 de deux répertoires

de gènes distincts : les gènes N-TAD sensibles et les gènes N+C-TAD sensibles (**Figure 37**) (Dayan *et al.*, 2006).



IV.1.3. Régulation des HIFs

IV.1.3.1. Régulation oxygène-dépendante

HIF est considéré comme le régulateur clé de l'homéostasie de l'O₂ au niveau cellulaire. Ce facteur de transcription possède un certain nombre de caractéristiques qui en font une protéine singulière dans la réponse aux variations de l'oxygénation. La régulation des protéines HIF- α correspond à une balance entre leur synthèse et leur dégradation. Toutefois, bien que la régulation post-traductionnelle soit la plus décrite, il existe également une régulation des ARNm de HIF- α qui permettrait une régulation de son expression selon les types cellulaires (Wada *et al.*, 2006).

Lors d'une diminution de la quantité d'O₂, la traduction de la majorité des protéines est diminuée mais cela ne s'applique pas aux protéines HIFs qui échapperaient à cette altération grâce à la présence de séquences *Internal ribosome entry site* (IRES). Bien que les protéines HIFs ne soient pas les seules à répondre aux variations de l'oxygénation telles que les protéines CREB et NF- κ B (Koong *et al.*, 1994; Beitner-Johnson *et al.*, 2000), elles se démarquent de ces facteurs par une régulation directe par l'O₂ permettant ainsi une réponse rapide. En effet, HIF-1 α est totalement dégradé en normoxie. Dans ces conditions, la demi-vie de HIF est de l'ordre de 5 minutes (Huang *et al.*, 1998) ; c'est cette demi-vie extrêmement courte qui lui confère sa labilité avec l'O₂. En revanche, HIF-1 α sera progressivement stabilisé quand le taux d'O₂ diminue. Une fois la sous-unité HIF-1 α stabilisée en hypoxie, elle est transloquée dans le noyau grâce aux signaux de localisation nucléaire (NLS) présents sur sa séquence (**Figure 36**). HIF-1 α se dimérise avec HIF-1 β dans le noyau, se lie alors aux séquences HRE présentes sur l'ADN,

et recrute ses cofacteurs (p300 et CBP) nécessaires à son activité transcriptionnelle. HIF-1 β étant constitutive, l'étape cruciale dans l'activation de HIF-1 est donc la stabilisation de HIF-1 α régulée par les prolyl hydroxylases (PHDs) et renforcée par l'activité de l'asparagine hydroxylase (FIH).

IV.1.3.1.1. Les Prolyl Hydroxylases

Les PHDs, qui appartiennent à la large famille des dioxygénases, sont des senseurs d'O₂. Elles exercent leur activité en normoxie et sont des enzymes dépendantes du 2-oxoglutarate et du fer (II). Elles modifient HIF-1 α de manière post-traductionnelle, par hydroxylation. Elles utilisent l'O₂ pour simultanément hydroxyler leur substrat (HIF-1 α ou HIF-2 α), et convertir le cofacteur 2-oxoglutarate en succinate et dioxyde de carbone. Quand le taux d'O₂ devient insuffisant, l'ion fer II (Fe²⁺) du site actif de la dioxygénase est chélaté par le cobalt II ou un autre métal de transition, et l'enzyme devient alors inactive.

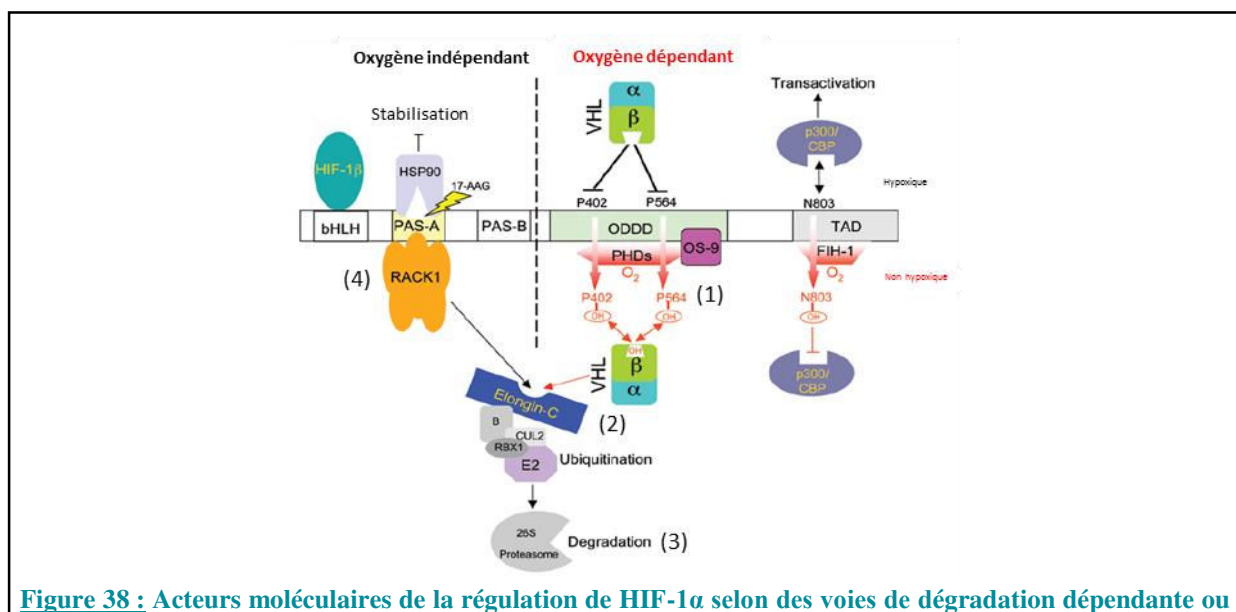


Figure 38 : Acteurs moléculaires de la régulation de HIF-1 α selon des voies de dégradation dépendante ou indépendante de l'oxygène.

La régulation oxygène-dépendante met en jeu l'hydroxylation des résidus proline 402 et 564 par les prolyl hydroxylases (PHDs) (1), permettant le recrutement du complexe VHL/Elongin B/Elongin C, l'ubiquitination des résidus lysine et enfin la dégradation par le protéasome (3).

La régulation oxygène indépendante est ici illustrée par la compétition entre HSP90 et RACK1 (4), ce dernier entraînant l'ubiquitination de HIF-1 et sa dégradation par le protéasome.

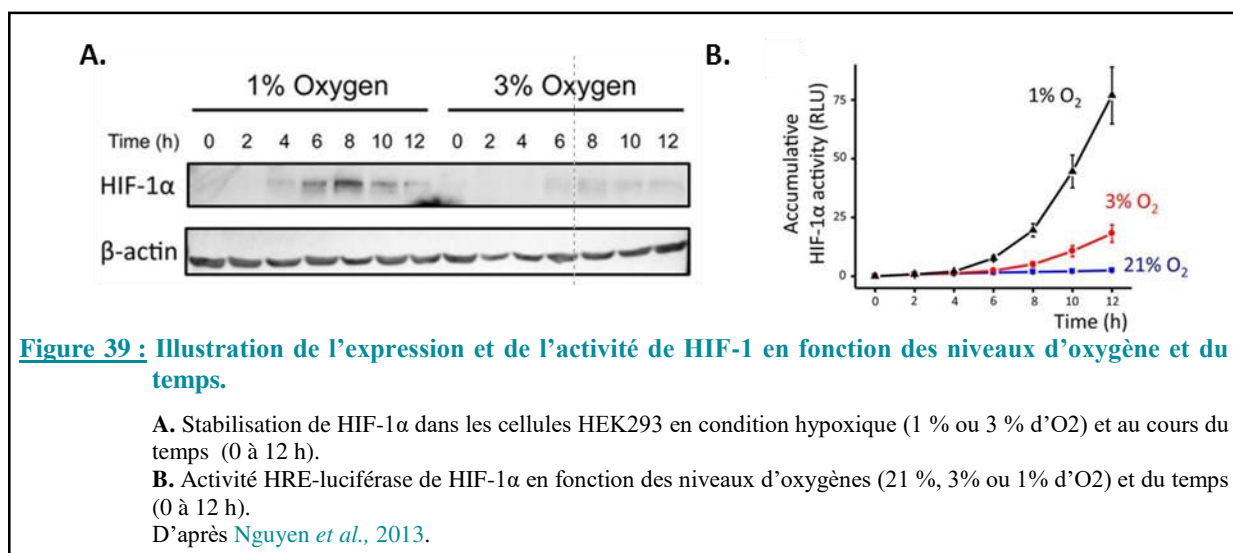
D'après Liu & Semenza 2007.

Il existe trois isoformes principales des PHDs (PHD1, PHD2, PHD3). Elles présentent toutes une distribution tissulaire, une régulation et une spécificité vis-à-vis des sites d'hydroxylation de HIF différentes (Jokilehto & Jaakkola, 2010).

En normoxie, les PHDs sont responsables de l'hydroxylation des résidus prolines 402 et 564, situés dans la partie ODD de HIF-1 α (**Figure 38**) (Liu & Semenza, 2007). Ces deux hydroxylations sont majoritairement catalysées par la PHD2. S'en suit alors l'interaction de HIF-1 α avec la protéine von Hippel-Lindau, associée au complexe VHL/Elongin B/Elongin C (VBC) (Min *et al.*, 2002). Par son activité E3 ubiquitine-ligase, le complexe VBC ajoute de façon covalente des groupements ubiquitine aux résidus lysine de HIF-1 α et favorise ainsi sa dégradation par le protéasome (**Figure 38**). L'association PHD/pVHL est aussi appelé « senseur de l'oxygène ».

En hypoxie, lorsque l'O₂ devient limitant, PHD2 est totalement inactivée : HIF-1 α est alors stabilisée. Il a été ainsi montré *in vitro* que son temps de demi-vie en hypoxie (1 % O₂) est alors de 45 minutes (Salceda *et al.*, 1997).

La rapidité et le maintien de la réponse de HIF seront cependant dépendants de la durée et de la sévérité de l'hypoxie ainsi que du type cellulaire (**Figure 39**) (Nguyen *et al.*, 2013).



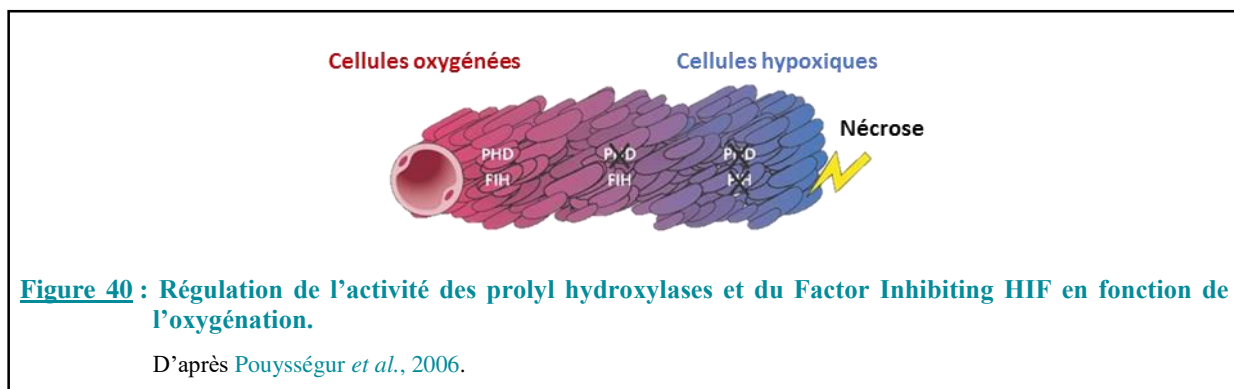
Les PHDs sont aussi capables d'hydroxyler les résidus proline 405 et 531 de HIF-2 α . Dans le contexte des gliomes, il a été montré que les PHD2 et PHD3 ciblent préférentiellement HIF-1 α et HIF-2 α , respectivement (Sun *et al.*, 2014).

IV.1.3.1.2. Le Factor Inhibiting HIF

Une autre voie de régulation de HIF est assurée par FIH (*factor inhibiting HIF*). Comme son nom l'indique, FIH peut catalyser l'hydroxylation de HIF- α au niveau d'un résidu asparagine (Asn 803 pour HIF-1 α et Asn 851 pour HIF-2 α ,) localisé sur le domaine C-TAD. Cette modification inhibe alors l'interaction de HIF- α avec ses coactivateurs p300 et CBP et

donc son activité (Stolze *et al.*, 2004; Pouysségur *et al.*, 2006; Brahimi-Horn & Pouysségur, 2009). Toutefois, il faut noter que FIH bloque spécifiquement le C-TAD de HIF- α , de ce fait, le N-TAD demeure intact.

Comme les PHDs, FIH appartient aux dioxygénases mais cette enzyme reste active pour des concentrations d'O₂ beaucoup plus faibles. Les PHDs peuvent donc être inactivées à un certain degré d'oxygénation où FIH ne l'est pas. Comme le propose l'équipe de Pouysségur, cette régulation oxygène dépendante mais spécifique à HIF et FIH pourrait être importante dans un contexte tumoral pour lequel un gradient d'O₂ peut être observé (**Figure 40**) (Pouysségur *et al.*, 2006).



Ces voies de dégradation et d'activation décrites majoritairement pour HIF-1 α pourront être différentes pour HIF-2 α selon le degré et la durée de l'hypoxie. HIF-2 α est également hydroxylé avec une efficacité beaucoup plus faible que HIF-1 α , à la fois par les PHDs et FIH-1, entraînant ainsi une stabilisation et une activation de HIF-2 α à un taux d'oxygène plus élevé que HIF-1 α (Koh & Powis, 2012).

Schématiquement, il semblerait que HIF-1 α soit stabilisé pour des conditions d'hypoxie aiguës et sévères (< à 1 % d'O₂) alors que HIF-2 α serait activé en condition d'hypoxie modérée (< à 5 % d'O₂) et chroniques (48-72 h) (Koh & Powis, 2012).

IV.1.3.1.3. Autres facteurs régulateurs dépendants de l'oxygène

Il existe bien d'autres mécanismes régulant HIF-1 α indépendamment de PHD et FIH. De façon non exhaustive et résumée : HIF-1 peut être activé par les ERO produites par les mitochondries et diffusant librement vers le cytosol où elles exerceraient un rôle de molécules de signalisation, en fonction de leur localisation, de leur concentration et de la durée de leur production (Ristow & Zarse, 2010). Collectivement, ces données montrent un premier niveau

de complexité quant à la régulation des HIF par les principaux acteurs de la régulation oxygène dépendante. Ces différents niveaux de régulation permettent de concevoir que celle-ci pourra varier selon les tissus et les cellules étudiés et que HIF-1 et HIF-2 n'induiront pas la transcription des mêmes gènes.

IV.1.3.2. Régulation oxygène-indépendante

Bien que la dégradation/stabilisation de HIF- α dépendante de l'O₂ soit la voie principale de sa régulation, d'autres voies dites « oxygène-indépendantes » sont susceptibles de modifier tant la synthèse des facteurs HIF- α que leur dégradation et ce, en condition de normoxie. Par exemple, certains facteurs de croissance et cytokines favorisent la traduction des ARNm de HIF-1, action relayée par les voies mTOR, PI3K, MAPK ou encore RAF-MEK-ERK (**Figure 41**) (Laughner *et al.*, 2001; Semenza, 2003; Keith *et al.*, 2012).

La perte de fonction de la protéine VHL observée dans certains contextes tumoraux, comme les carcinomes rénaux, peut également mener à une stabilisation des HIF- α et plus spécifiquement de HIF-2 α dans ce type de tumeurs.

À côté de ces deux mécanismes favorisant la synthèse et la stabilisation des protéines HIF- α , d'autres régulateurs agiront sur la voie de dégradation de ces facteurs. C'est ainsi le cas de la protéine RACK1 (*receptor of activated protein kinase 1*) qui entre en compétition avec la protéine HSP90 (*heat shock protein 90*) empêchant alors cette dernière d'ubiquitinyler HIF-1 le préservant ainsi de la dégradation (**Figure 42**) (Liu & Semenza, 2007).

Il existe également un grand nombre de modifications post-traductionnelles de HIF-1 (SUMOylation, nitrosation, acétylation, phosphorylation) qui peuvent modifier sa stabilité ou son activité (Brahimi-Horn *et al.*, 2005).

Enfin, d'autres régulateurs génétiques comme les miRNA (miR182, miR-210, miR3662), ou épigénétiques comme les sirtuines apportent une complexité supplémentaire à la régulation de HIF-1 α (Lim *et al.*, 2010; Puisségur *et al.*, 2011; Ahir *et al.*, 2017).

Récemment, l'équipe de Simon a proposé de résumer les principaux mécanismes impliqués dans la régulation différentielle de HIF-1 et HIF-2, de la transcription à la stabilisation de chacune de ces protéines (**Figure 41**) (Keith *et al.*, 2012).

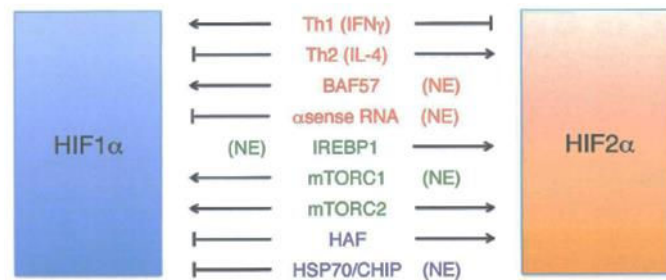


Figure 41 : De nombreux mécanismes régulent différemment HIF-1 α et HIF-2 α .

Sont indiqués en orange, les acteurs régulant les ARNm de HIF-1 α et HIF-2 α , en vert, ceux ciblant leur traduction et en violet, la stabilité des protéines HIF.

D'après Keith *et al.*, 2012.

Dernièrement, une autre protéine dénommée *hypoxia-associated factor* (HAF) a été décrite par l'équipe de Powis. Cette voie de régulation des HIF serait opérationnelle quelles que soient les conditions d'oxygénation. De façon intéressante, le facteur HAF a la capacité de se fixer sur HIF-1 α et HIF-2 α mais sur deux régions distinctes de ces facteurs de transcription (Koh & Powis, 2012) (Figure 42). Cette fixation entraînera la dégradation de HIF-1 mais également une transactivation de HIF-2. Cette régulation est décrite en détail dans le chapitre IV.2.2.1 (cf. page 93).

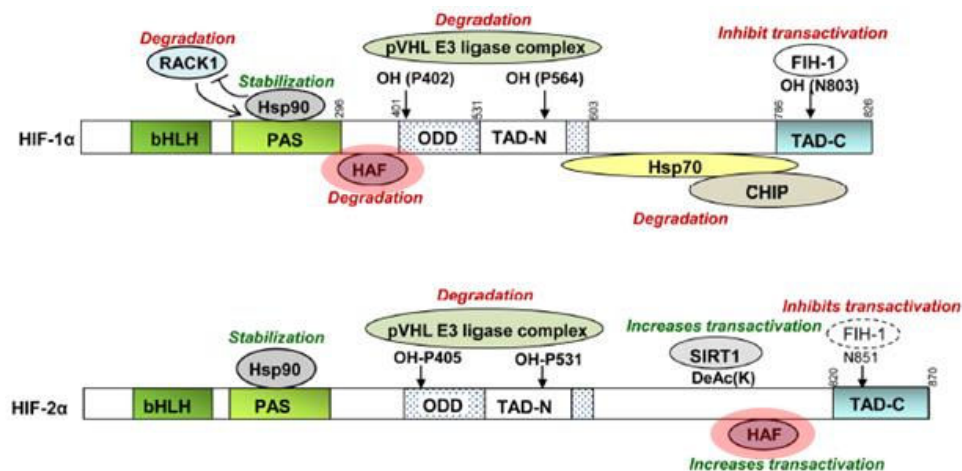


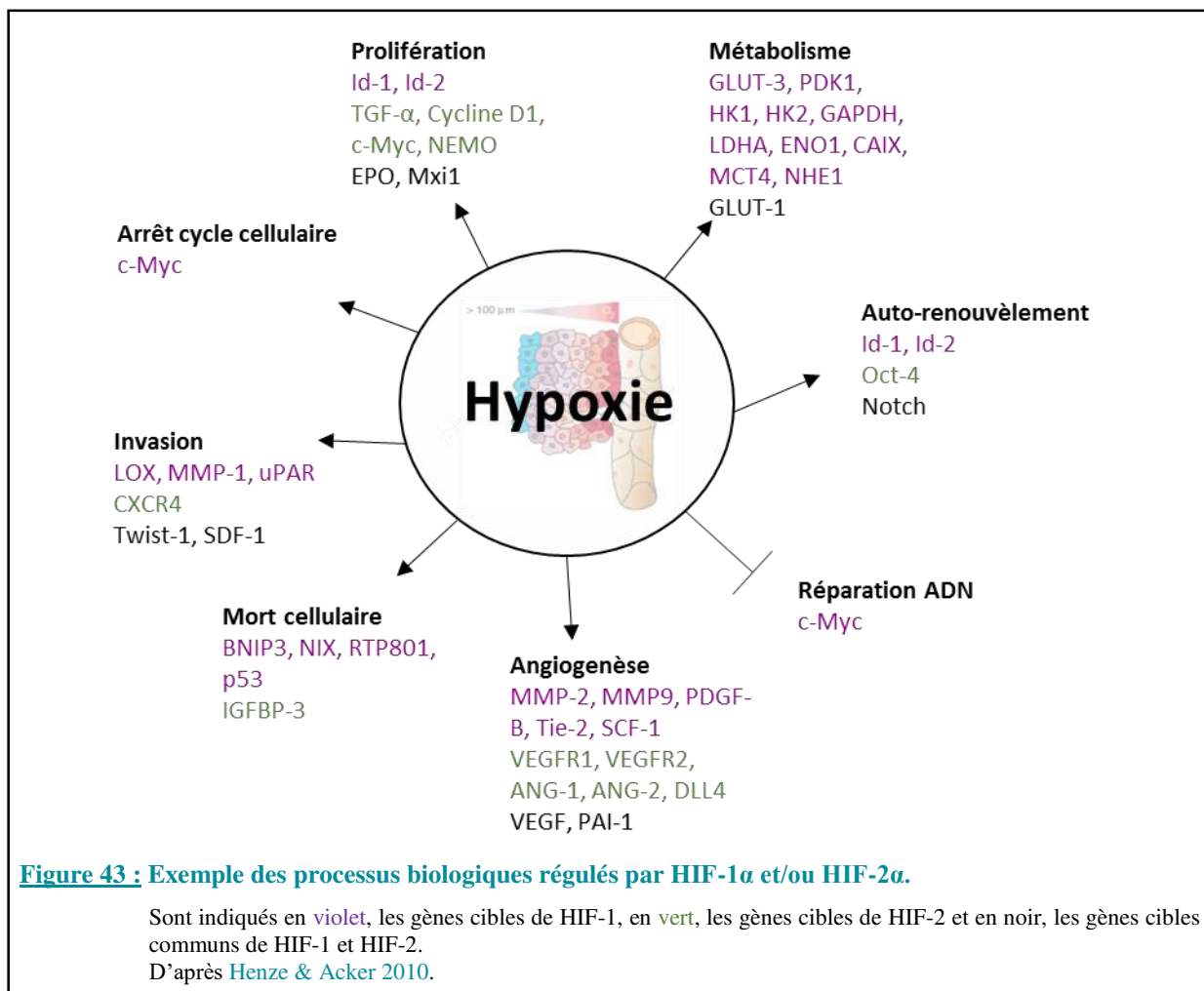
Figure 42 : Illustration des sites de fixation des régulateurs de HIF-1 α et HIF-2 α .

Sont indiqués en rouge, les interactions inhibitrices et en vert, les interactions activatrices.

D'après Koh & Powis 2012.

IV.1.4. Implications des HIFs dans la progression tumorale

Outre une activation de HIF par l'hypoxie, ce facteur de transcription peut être également activé par l'activation ou la répression d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs. De ce fait, les facteurs HIFs sont considérés comme des acteurs moléculaires importants du processus tumoral (**Figure 43**). En effet, HIF-1 conduit à l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes participant à différents processus, comme la prolifération et la survie des cellules tumorales, l'angiogenèse, l'invasion, l'instabilité génomique, la régulation du métabolisme et du pH cellulaire, l'échappement aux différents types de mort cellulaire, la récurrence tumorale mais aussi la radiorésistance et la chimiorésistance (**Figure 43**) (Vaupel, 2004; Henze & Acker, 2010; Monti & Gariboldi, 2011). HIF-2 quant à lui a plus un rôle dans le maintien du phénotype souche des cellules cancéreuses. Les HIFs seraient donc impliqués dans les mécanismes participant au développement des phénotypes tumoraux agressifs mais aussi dans la résistance aux traitements.



Comme nous l'avons évoqué précédemment, les régulations de l'expression de HIF-1 α et HIF-2 α ainsi que de leur gènes cibles diffèrent selon le type cellulaire ou le tissu étudié (Keith *et al.*, 2012). Pour autant, il est généralement considéré que HIF-1 va plutôt réguler des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme du glucose (telles que des enzymes du métabolisme du lactate, du pyruvate ainsi que les transporteurs de glucose) ou des protéines pro-apoptotiques (BNIP3, Bcl-xL). À l'inverse, HIF-2 va plutôt moduler l'expression de gènes impliqués dans l'invasion (MMPs) ou dans le caractère souche des cellules tumorales (OCT3/4, NANOG, SOX2). Certains auteurs ont en effet montré que la spécificité de réponse de HIF-2 à l'hypoxie serait adaptée au devenir des cellules souches au sein de ces niches qui doivent offrir aux cellules tumorales des signaux nécessaires tant pour le contrôle d'auto-renouvellement que pour leur différenciation (Henze & Acker, 2010). En effet, par rapport à HIF-1 α , HIF-2 α s'accumule à des concentrations d'oxygène plus élevées et plus proches de celles observées au sein de ces niches tumorales (Wiesener *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'expression de HIF-2 α est maintenue en hypoxie chronique alors que celle de HIF-1 α n'est augmentée que de façon transitoire (Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006). Enfin, HIF-2 α active les voies de signalisation impliquées dans le maintien des cellules souches, comme la voie Notch (Gustafsson *et al.*, 2005).

Ces observations suggèrent que dans un contexte tumoral, HIF-1 et HIF-2 exerceraient des rôles complémentaires et non redondants. Cependant, HIF-1 et HIF-2 ont également des cibles communes comme par exemple le VEGF-A, reconnu comme le facteur clé de l'angiogenèse tumorale indispensable à la croissance tumorale mais également au maintien des niches vasculaires.

Les facteurs HIFs peuvent également contrôler l'expression de certains gènes pas le biais de régulation épigénétiques. Ainsi, des protéines de la famille des KDM (*Histone lysine demethylase*) comme KDM3A (ou JMJD1A) et KDM4B sont des cibles de HIF-1 (Pollard *et al.*, 2008). A titre d'exemple, l'activité de KDM3A potentialise l'expression dépendante de l'hypoxie des gènes *ADM*, *HMOX1* et *SERPINE1*. En revanche, la perte d'expression de KDM3A réduit la transcription de ces gènes ainsi que la croissance tumorale (Krieg *et al.*, 2010). Une autre protéine de la famille des KDM, KDM4C, est capable de se lier à HIF-1 α , favorisant de ce fait sa liaison aux séquences HRE de gènes impliqués dans le métabolisme des cellules tumorales et la dissémination métastatique (Luo *et al.*, 2012).

HIF-1 α peut également moduler la prolifération cellulaire, l'invasion et l'apoptose de cellules de cancer du sein *via* son action sur la régulation de l'expression du miR-210 (Dang &

Myers, 2015). La présence de séquences HRE au niveau du promoteur du miR-155 suppose également que son expression est régulée par les facteurs HIFs (Bruning *et al.*, 2011).

Bien que les connaissances relatives à la régulation des facteurs HIFs ne cessent de s'enrichir, le rôle des HIFs dans les tumeurs demeure complexe et controversé. A titre d'exemple, HIF-1 peut à la fois potentialiser la croissance tumorale ou la réprimer et certains auteurs ont proposé que HIF-1, en favorisant l'expression de BNIP3, pourrait être un suppresseur de tumeur (Sowter *et al.*, 2001). Ainsi, la balance survie/mort de la cellule tumorale serait probablement dépendante du contexte tumoral, du degré et de la durée d'hypoxie, du rapport de l'activité de HIF-1 α / HIF-2 α ainsi que du rapport de concentration de HIF-1 α et HIF-2 α ; ces équilibres dépendants eux-mêmes d'un réseau complexe de régulateurs positifs et négatifs (Figure 44) (Henze & Acker, 2010).




	ARNm	Protéine	Activité transcriptionnelle
			
Régulateur positif		SIAH1,2 FGF2	Sirt1 JMJD1A
Régulateur négatif	aHIF miRNA	SAG PHD 1-3 FGF2 pVHL REDD1 RHY-1 iNOS	CITED2 Sirt6 IPAS Hey1,2

Figure 44 : L'expression et les fonctions des HIFs peuvent être rétroactivement régulées.
Les acteurs présentés ci-dessus sont régulés par l'hypoxie et vont avoir une rétroaction sur les protéines HIFs.
D'après Henze & Acker 2010.

La régulation de l'expression des PHDs illustre également la complexité de la réponse cellulaire à l'hypoxie. En effet, les isoformes PHD2/3, senseurs à l'oxygène majeurs à l'origine de la dégradation des HIFs, sont-elles mêmes des cibles de HIF (Aprelikova *et al.*, 2004; Marxsen *et al.*, 2004). En effet, l'hypoxie induit une augmentation d'expression de PHD2/3 via HIF-1 α , alors que, dans certaines cellules comme les cellules de gliomes (Henze *et al.*, 2010), PHD3 est en plus régulée par HIF-2 α . Cette régulation pourrait être un moyen de défense des cellules tumorales : en condition hypoxique, l'augmentation d'expression des PHDs limiterait la disponibilité de HIF et permettrait ainsi aux cellules tumorales de se protéger de la mort (Stiehl *et al.*, 2006; Henze *et al.*, 2010).

De façon à renforcer leurs mécanismes de défenses vis-à-vis de conditions hypoxiques, les cellules tumorales développent des mécanismes de compensation des facteurs HIF. En effet, en cas d'absence d'une isoforme des HIFs, des mécanismes se mettent en place de façon à ce que la seconde puisse « prendre le relais ». Par exemple, HIF-1 α pourra réguler l'expression de certaines MMPs et HIF-2 α l'expression d'enzymes glycolytiques.

Ces données non exhaustives reflètent la complexité de régulation des facteurs HIFs dans un contexte tumoral. C'est pourquoi, comme nous l'avons mentionné précédemment, les conséquences de l'activation de HIF-1 et de HIF-2 sur la progression tumorale seront dépendantes des caractéristiques physiopathologiques de cette tumeur. Nous allons nous attacher à décrire les rôles majeurs exercés par HIF-1 et HIF-2 dans les processus physiopathologiques des GB et leur réponse au traitement.

IV.1.4.1. HIFs : des facteurs de mauvais pronostic dans les glioblastomes

Au sein des gliomes, les GB sont des tumeurs qui expriment le plus fortement le facteur HIF-1 α . Toutefois, les deux isoformes HIF-1 α et HIF-2 α sont exprimées, mais chacune d'elles ont des spécificités de localisation. En effet, il a été montré que HIF-1 α est plutôt retrouvé dans les zones hypoxiques et nécrotiques (Bekaert *et al.*, 2017). Associé avec d'autres marqueurs tels que ceux dépendants de la voie Notch, HIF-1 α est un facteur de mauvais pronostic puisque corrélé négativement avec la survie des patients (Irshad *et al.*, 2015). HIF-2 α , quant à lui, est également exprimé au niveau de régions hypoxiques, mais aussi dans des régions d'hypoxie modérée (2-5 % d'O₂) et vascularisées (Figure 45) (Li *et al.*, 2009). Au sein de ces régions, HIF-2 est associé aux CSG et à ce titre est considéré comme de mauvais pronostic (Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006).

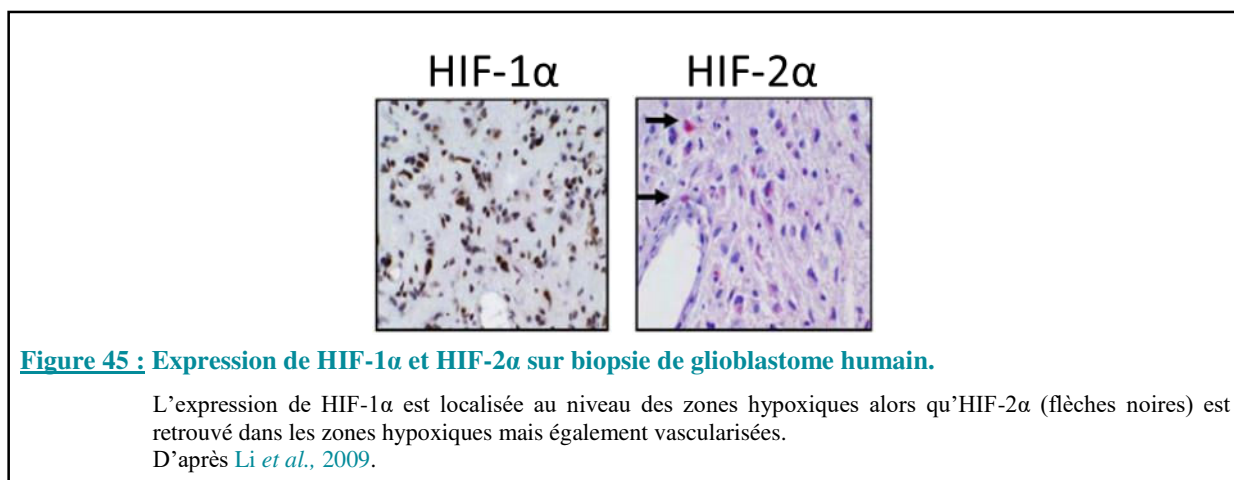
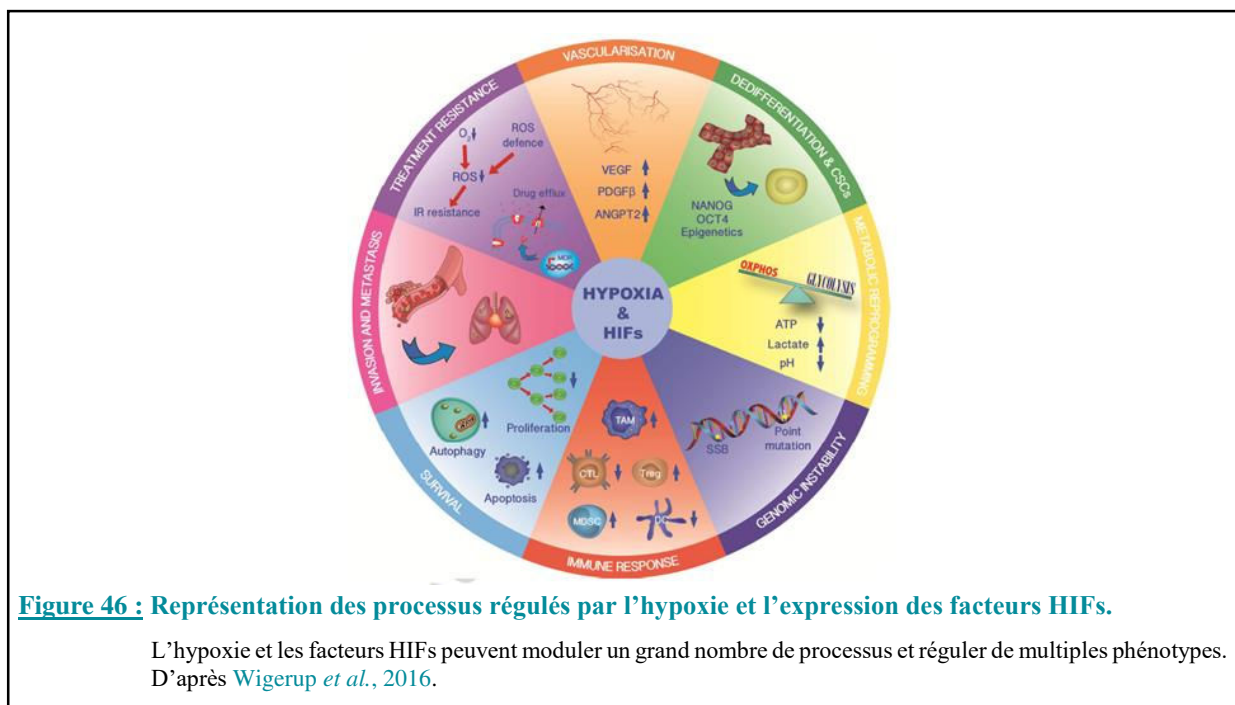


Figure 45 : Expression de HIF-1 α et HIF-2 α sur biopsie de glioblastome humain.

L'expression de HIF-1 α est localisée au niveau des zones hypoxiques alors qu'HIF-2 α (flèches noires) est retrouvé dans les zones hypoxiques mais également vascularisées.
D'après Li *et al.*, 2009.

IV.1.4.2. Rôles des HIFs dans la progression des glioblastomes

Tout comme pour les tumeurs solides périphériques, en réponse à l'hypoxie, les facteurs HIF- α régulent un grand nombre de processus qui participeront à la progression tumorale. Ces processus pourront toucher tant les cellules tumorales elles-mêmes que le microenvironnement. En effet, les facteurs HIF- α pourront contrôler l'état de différenciation des cellules tumorales, leur survie, leur métabolisme, leur capacité d'invasion mais également la vascularisation et la réponse inflammatoire de la tumeur (**Figure 46**) (Wigerup *et al.*, 2016).



IV.1.5. HIFs et cellules tumorales

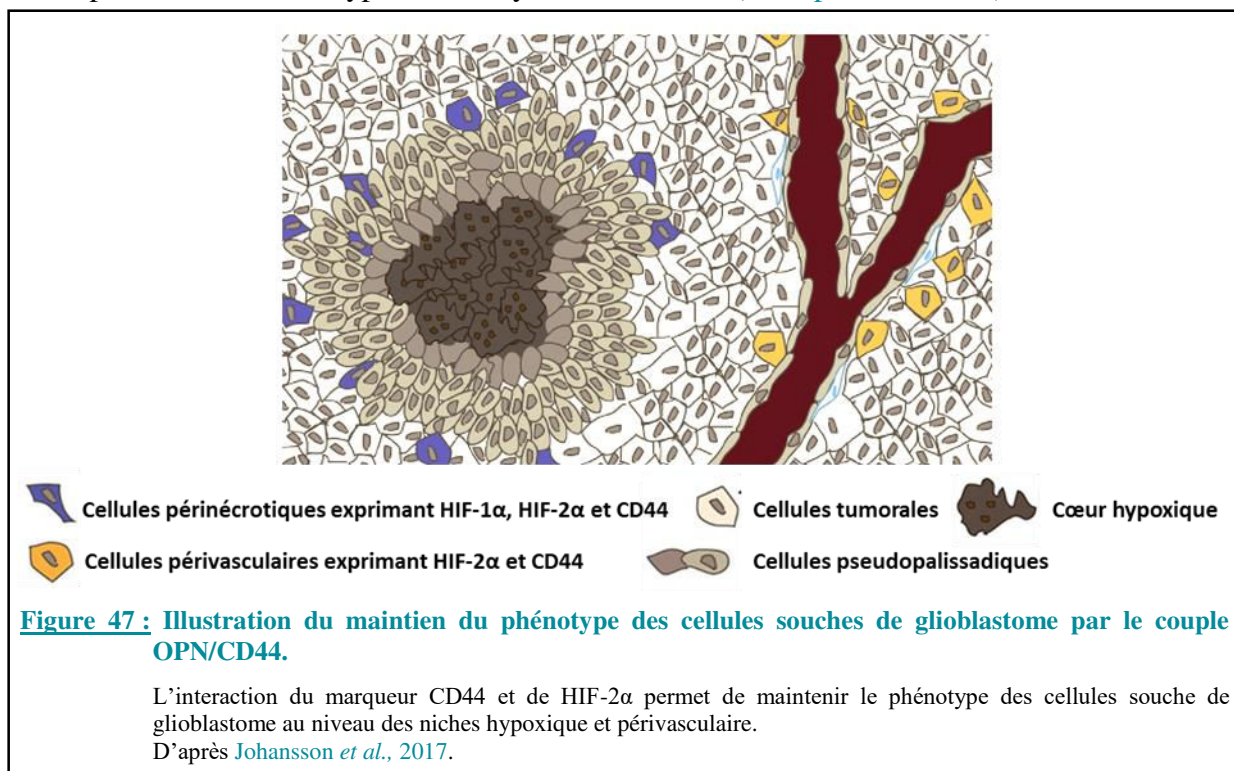
IV.1.5.1. Rôle de HIF dans les cellules souches de glioblastomes

Comme nous l'avons décrit dans la partie II.1.1. (cf. page 30), les CSG se situent préférentiellement au sein de niches spécialisées caractérisées par une faible pression partielle en oxygène. Cet environnement hypoxique induit une pression de sélection constante qui permet aux CSG de maintenir leur état de dédifférenciation (Jögi *et al.*, 2002). Les facteurs HIFs contrôlent plusieurs processus concernant les CSG. Par exemple, ils participent au maintien de l'état souche des cellules de GB notamment en activant la voie Notch (Lino *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces facteurs de transcription peuvent aussi contrôler la plasticité et reprogrammer les cellules non souches vers un état souche (Heddleston *et al.*, 2009). En

particulier, HIF-2 induit l'expression des gènes clés (OCT4, NANOG, c-MYC) impliqués dans le maintien de l'état de pluripotence des cellules souches à la fois dans les cellules différenciées et les CSG (Filatova *et al.*, 2013).

Tout comme HIF-2, HIF-1 participe également au devenir des CSG. Cependant, son rôle est moins spécifique puisqu'il ne contrôlerait pas le phénotype souche des cellules. En revanche, il favoriserait leur survie cellulaire. Toutefois, la contribution respective de HIF-1 et HIF-2 n'est pas clairement établie et assez controversée. En effet, certaines études suggèrent que HIF-1 favorise l'autorenouvellement et inhibe la capacité des cellules à se différencier (Li *et al.*, 2009; Soeda *et al.*, 2009). D'autres proposent que HIF-2, en induisant c-Myc, stimule la prolifération et la survie des CSG (Gordan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

Les niches hypoxiques où résident les CSG sont donc majeures pour entretenir un pool de cellules indifférenciées. Cet environnement hypoxique est également propice à l'expansion de niches dites périvasculaires. Cependant, au sein de ces niches, seul HIF-2 et non HIF-1 y exercerait un rôle notamment par le biais de la régulation de CD44. Associé au CD133, le CD44 est un marqueur membranaire également utilisé pour identifier les CSG (Anido *et al.*, 2010). L'équipe de Pietras a ainsi proposé que le statut souche des cellules de GB était maintenu au sein des niches périvasculaires via l'OPN, ligand du récepteur CD44 (Johansson *et al.*, 2017) (Figure 47). Cette voie de signalisation OPN/CD44, joue donc un rôle majeur dans l'agressivité et le maintien de ces cellules souches (Pietras *et al.*, 2014). En outre, CD44 est particulièrement surexprimé dans le sous-type mésenchymateux des GB (Phillips *et al.*, 2006).



Comme nous l'avons suggéré dans le chapitre II.1.1.2. (cf. page 31), les niches hypoxiques et périvasculaires ne pourraient en fait n'être qu'une seule entité ou pour le moins ces deux niches pourraient être interconnectées. En faveur de cette hypothèse, l'induction de HIF au sein de ces niches hypoxiques augmente la production de la chimiokine SDF-1 (*stromal-derived growth factor-1*) qui, par l'intermédiaire de son récepteur CXCR4 présent à la surface des CSGs et des cellules endothéliales, stimule la production de VEGF et ainsi permet la formation de nouveaux vaisseaux (Ping & Bian, 2011; Filatova *et al.*, 2013).

IV.1.5.2. Rôle de HIF dans la survie des cellules de glioblastome

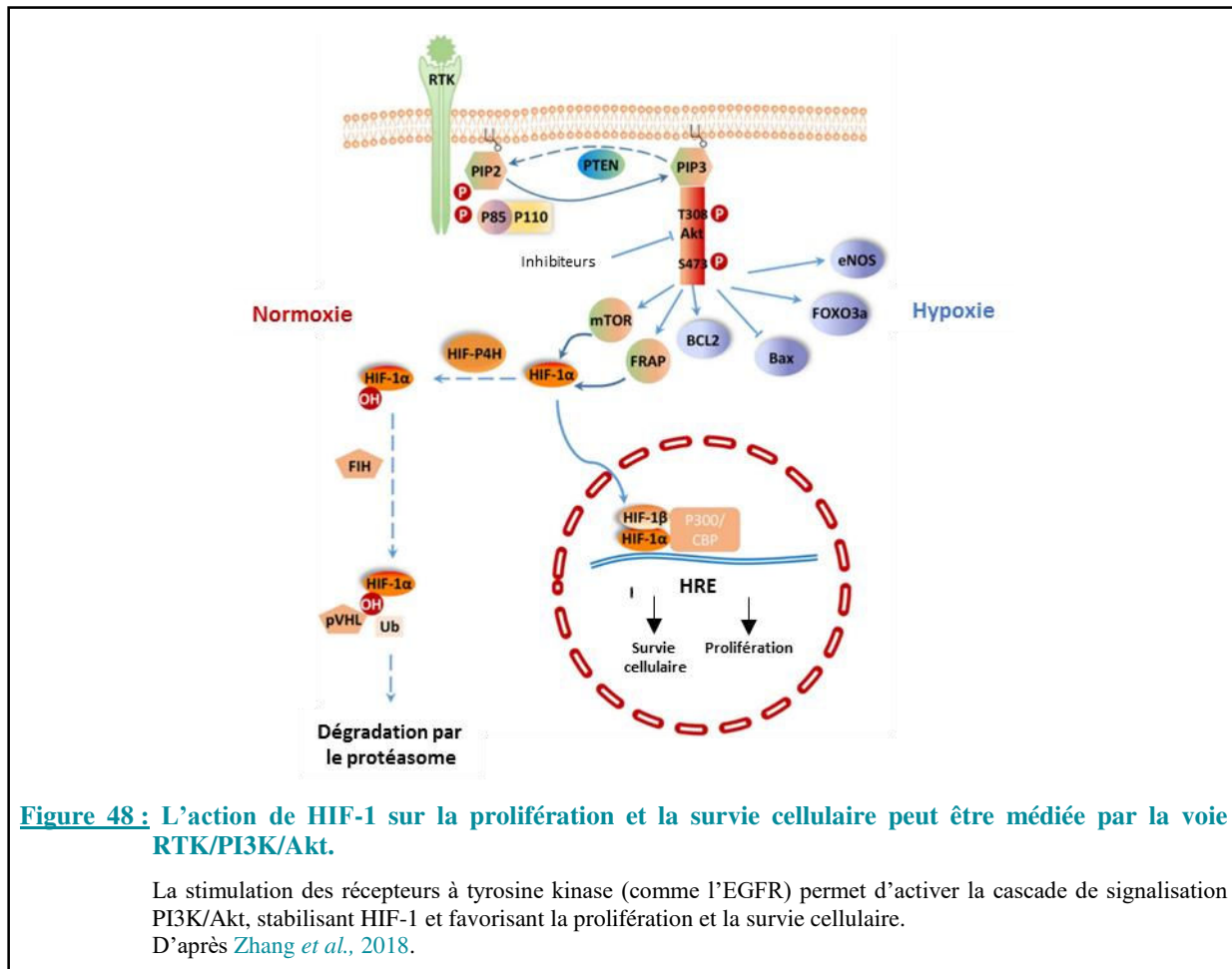
IV.1.5.2.1. HIF et prolifération cellulaire

La diminution de la pO₂ dans la tumeur a pour conséquence de contrôler le devenir des cellules tumorales dans le cycle cellulaire. Cet effet sera toutefois dépendant du degré d'hypoxie et pourra entraîner soit l'arrêt du cycle soit sa progression. Cet effet est principalement relayé par les protéines p21 et p27, cibles de HIF-1 (Goda *et al.*, 2003). En réponse à l'hypoxie, la stabilisation de ces protéines inhibe la cycline D1 indispensable à la progression de la phase G1 du cycle cellulaire (Box & Demetrick, 2004). Ainsi, l'hypoxie sévère (<1 % d'O₂) induit un arrêt de la prolifération des cellules tumorales en phase G1/S pouvant aboutir à une mort cellulaire par apoptose (Amellem & Pettersen, 1991).

Certains facteurs de croissance tels l'IGF (*insulin growth factor*), le PDGF sont surexprimés dans les GB et ce au regard du caractère hypoxique de ces tumeurs (Yoshida *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2011). Régulés par HIF-1, ces facteurs favoriseront la prolifération des cellules tumorales (Gariboldi *et al.*, 2010; Clara *et al.*, 2014).

De même, l'activation par l'hypoxie de la voie PI3K par des RTK permet également d'augmenter la prolifération cellulaire. La voie PI3K peut être inhibée par l'action de PTEN mais ce dernier est un gène muté dans 5-40% des GB ce qui favorise la stabilisation de HIF-1 (**Figure 48**) (Zhang *et al.*, 2018).

Parmi les gènes cibles de HIF, l'EPO est un facteur de croissance pléiotropique qui stimule la croissance et protège de nombreuses cellules et tissus en conditions physiologiques et pathologiques (Cervellini *et al.*, 2010). Des travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe ont notamment montré que l'EPO est exprimée dans les GB et qu'elle contribue à la progression tumorale (Pérès *et al.*, 2011).



IV.1.5.2.2. HIF et mort cellulaire

Dans grand nombre de tumeurs, HIF-1 régule également l'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire de type apoptotique ou autophagique (Mcl-1, Bcl-XL, survivine, BNIP3). Toutefois, au sein des GB, la mort par nécrose semble prépondérante par rapport à la mort par apoptose. Ceci pourrait être le reflet du développement par les cellules tumorales d'une résistance à ce type de mort *via* une régulation positive des protéines anti-apoptotiques mais aussi le reflet d'une sélection génétique des cellules tumorales présentant des défauts de la voie apoptotique. Cependant, peu d'études établissent un lien entre l'expression de HIF et ces médiateurs moléculaires anti-apoptotiques au cours de la croissance des GB. Dans ces tumeurs, l'autophagie, quant à elle, est plutôt décrite comme un processus de survie cellulaire et de résistance aux traitements en particulier en réponse aux traitements anti-angiogéniques (Hu *et al.*, 2012).

IV.1.5.3. Rôle de HIF dans l'immortalisation cellulaire

La transcriptase inverse (hTERT) et l'activité de la télomérase constituent des éléments essentiels pour l'immortalisation et la transformation des cellules tumorales. Dans les cellules de GB, il existe une relation complexe entre l'expression de HIF-1/HIF-2 et hTERT. En effet, si HIF-2 réprime la transcription de hTERT, HIF-1, en revanche, module positivement son activité (Lou *et al.*, 2007). Les conclusions de cette étude pourraient être à rapprocher de celles de Acker suggérant que HIF-2, en favorisant l'apoptose des cellules tumorales, pourrait exercer un rôle de suppresseur de tumeur dans les GB (Acker *et al.*, 2005). Il a été rapporté qu'une diminution de l'expression de hTERT entraîne une apoptose de cellules de gliome (Konnikova *et al.*, 2005). Ainsi, l'inhibition de l'expression de hTERT par HIF-2 pourrait contribuer indirectement à l'apoptose survenant dans les cellules de gliome surexprimant HIF-2 α .

IV.1.5.4. Rôle de HIF dans la régulation du métabolisme cellulaire

Comme nous l'avons décrit en première partie de l'introduction (cf. page 34), le GB privilégie la voie de la glycolyse aérobie pour son métabolisme énergétique, que ce soit en présence ou en absence d'O₂. Cet effet Warburg est renforcé en condition d'hypoxie par la stabilisation de HIF-1. En effet, au sein des cellules de GB, HIF-1 active la transcription des transporteurs de glucose (GLUT 1/3), les enzymes de la voie de la glycolyse (PFK1, l'aldolase, HK2) ainsi que la lactate déshydrogénase A (LDHA), enzyme impliquée dans la conversion du pyruvate en lactate. Parallèlement, l'inactivation de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) par HIF-1 empêche la formation d'acétyl-CoA et inhibe donc l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs (**Figure 49**) (Colwell *et al.*, 2017).

IV.1.5.5. Rôle de HIF dans la régulation du pH

L'accumulation de lactate issu du métabolisme énergétique de la cellule tumorale conduit alors à une acidification du compartiment intracellulaire. Les cellules tumorales libèrent les protons H⁺ dans l'espace extracellulaire grâce aux transporteurs membranaires de monocarboxylates, MCT-1 et MCT-4, dont l'expression est régulée par HIF-1 (**Figure 49**) (Colwell *et al.*, 2017). Plusieurs études ont montré que la surexpression de ces récepteurs est liée à la survie cellulaire et à un phénotype agressif (McIntyre *et al.*, 2012; Proescholdt *et al.*, 2012).

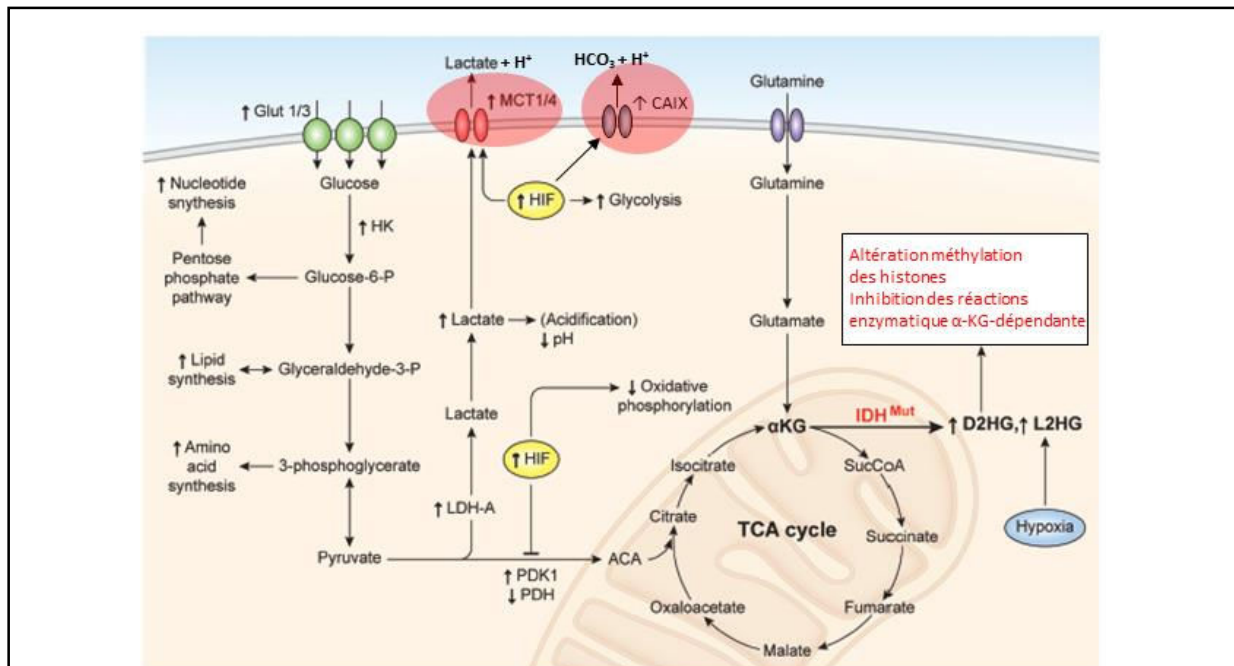


Figure 49 : Influence de HIF dans la régulation du métabolisme cellulaire.

HIF-1 va augmenter l'expression des récepteurs GLUT1/3 et des enzymes glycolytiques pour favoriser l'entrée de glucose dans la cellule ainsi que la glycolyse. Conjointement, HIF-1 diminue l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs.

D'après Colwell *et al.*, 2017.

L'acidification du milieu extracellulaire est également la conséquence d'une surexpression de la CAIX qui fait partie de la famille des gènes cibles de HIF (**Figure 49**). Cette protéine est souvent utilisée comme un marqueur d'hypoxie endogène qui identifie des tumeurs particulièrement agressives caractérisées par une prolifération rapide et une activité métabolique élevée (**Figure 50**) (Mayer *et al.*, 2012; Proescholdt *et al.*, 2012).

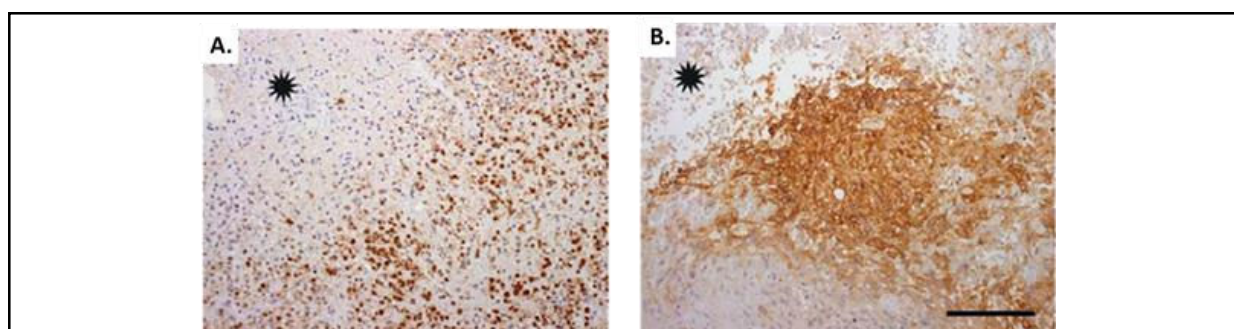


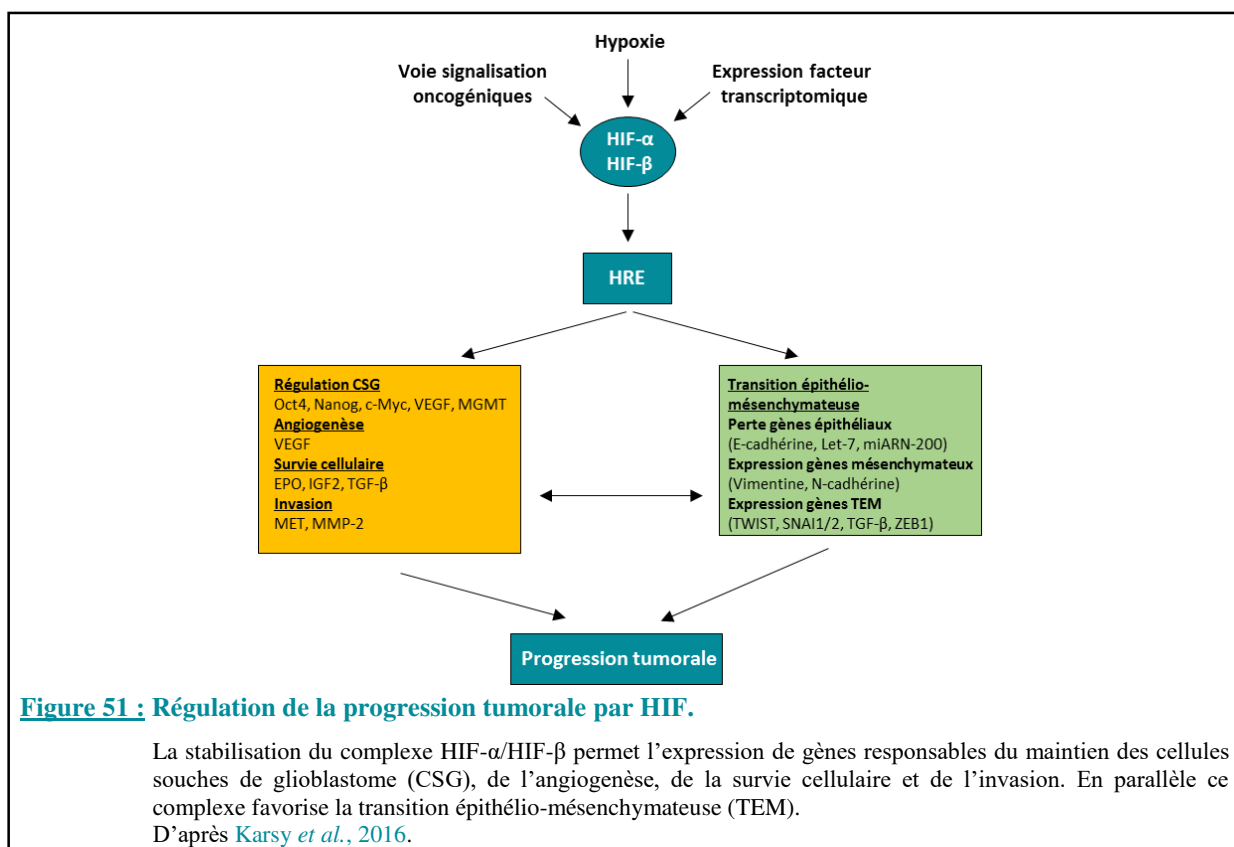
Figure 50 : Détection par immunomarquage de HIF-1 α et de CAIX chez des patients souffrant d'un glioblastome.

L'expression de HIF-1 α (A) et de CAIX (B) est détectée au niveau des zones hypoxique périnécrotique (étoile noire).

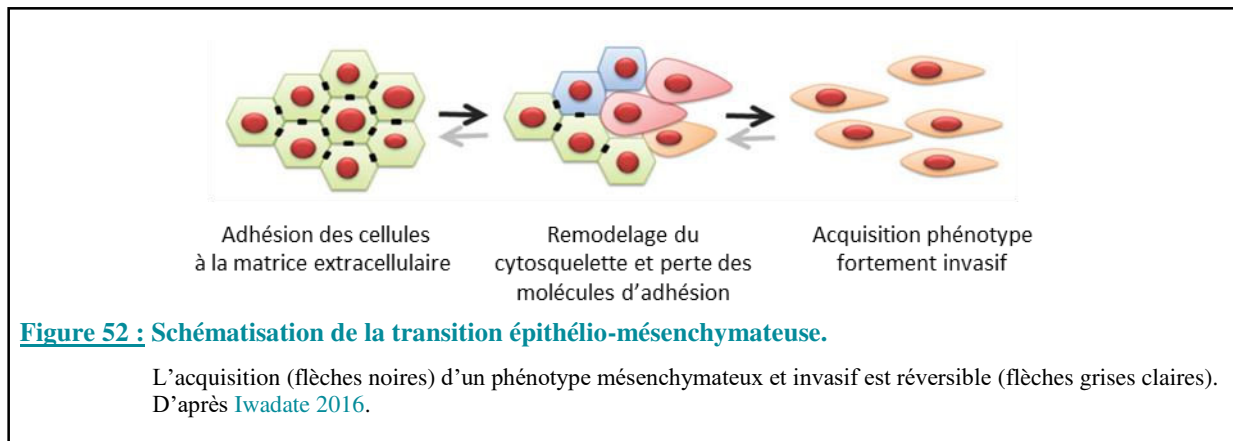
D'après Mayer *et al.*, 2012.

IV.1.5.6. Rôle de HIF dans l'invasion tumorale

HIF-1 est un intermédiaire majeur de la régulation de l'invasion puisqu'il régule l'expression d'un grand nombre de molécules impliquées tant dans le processus de détachement cellulaire que dans le processus d'invasion des cellules de GB. Par ailleurs, il a été démontré que HIF-1 pouvait être également à l'origine du recrutement des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ au niveau la membrane cellulaire des cellules GB de façon à favoriser ainsi leur processus d'invasion (Skuli *et al.*, 2009b). Parmi ces molécules, nous pouvons citer : la vimentine, la fibronectine, la MMP-2, la cathepsine D, l'uPA. HIF-1 induit également la perte d'expression de l'E-cadhérine, protéine clé de l'adhésion cellulaire et de la TEM. Parmi les facteurs de transcription à l'origine de l'induction de cette transition, certains sont directement ou indirectement induits par HIF-1 (Figure 51) (Karsy *et al.*, 2016). Ces facteurs, tels ZEB1 et TWIST1 contrôlent alors l'activité des promoteurs de la E-cadhérine, la vimentine ou de la N-cadhérine. Dans le GB, l'expression de ZEB1 et TWIST1 est particulièrement détectée au niveau des zones en pseudo-palissades hypoxiques (Monteiro *et al.*, 2017). D'autres voies stimulent également la TEM des cellules de GB. Ainsi, la voie de signalisation passant par Notch, puissant inducteur de la TEM, peut être régulée par la protéine RBPJ. Dans les GB, RBPJ est également fortement exprimée dans les zones de pseudo-palissades qui se caractérisent par de l'hypoxie et de l'invasion (Figure 51) (Maciaczyk *et al.*, 2017).



Enfin, certains récepteurs des chimiokines comme le CXCR4 dont l'expression est modulée en hypoxie par HIF-1 participent à la TEM. Cette surexpression des récepteurs va permettre la migration directionnelle des cellules en réponse à un gradient chimio-attractant (**Figure 52**) (Zagzag *et al.*, 2006; Iwadate, 2016).



IV.1.6. HIFs et microenvironnement

IV.1.6.1. Rôle de HIF dans l'angiogenèse et la vasculogenèse

Dans les GB, l'expression de HIF-1 est corrélée avec le grade de gliome et la densité vasculaire, ce qui souligne son rôle dans la progression des tumeurs cérébrales et l'angiogenèse (Zagzag *et al.*, 2000). Cette réponse adaptative déclenchée permet d'initier une angiogenèse robuste dans les régions en déficit d'O₂, notamment par une synthèse de facteurs angiogéniques.

En effet, en réponse à l'hypoxie l'expression du VEGF est augmentée par deux mécanismes : l'un médié par la liaison de HIF-1 aux séquences HRE du promoteur *VEGF* qui conduira à une augmentation de la transcription du gène, le second favorise la stabilité des ARNm du VEGF. Cet effet est induit par la région 3' non traduite de l'ARNm du VEGF (Onesto *et al.*, 2004). Outre le VEGF, HIF-1 contrôle l'expression de nombreux autres facteurs angiogéniques, tels que le PlGF (*placenta-like growth factor*), le PDGF, l'Ang-2 ; l'adrénomédulline, endothéline-1, l'EPO, le TGF α , le TGF β , PAI-1, la iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) (Kelly *et al.*, 2003; Sharp & Bernaudin, 2004; Kaur *et al.*, 2005). Les taux élevés de VEGF produits autour des zones de nécrose en pseudo-palissades seraient responsables de la prolifération microvasculaire des glomérules caractéristiques des GB (Brat & Van Meir, 2001). L'importance de la néo-angiogenèse tumorale et la forte expression intra-tumorale du VEGF qui caractérisent les GB ont été à l'origine du développement d'approches thérapeutiques de blocage de la voie du VEGF. De ce fait, dès 1993, les premiers travaux

précliniques de Kim *et al.*, avaient démontré un rôle anti-tumoral majeur du blocage du VEGF dans un modèle de GB humain transplanté chez la souris (Kim *et al.*, 1993).

Les angiopoïétines représentent une seconde classe de facteurs angiogéniques modulées par HIF-1 et qui contrôlent le processus d'angiogenèse en coopération avec le VEGF (Lee *et al.*, 2007). À l'heure actuelle, plusieurs études attribuent la résistance au traitement par le bevacizumab (anticorps anti-VEGF) au rebond des cellules immunitaires innées susceptibles de favoriser la croissance tumorale (Shojaei *et al.*, 2007). Il a été proposé que la surexpression d'Ang2 observée pourrait contribuer à cet échappement et ceci car, au-delà de son rôle de facteur angiogénique, Ang2 participe également au recrutement des cellules inflammatoires (Scholz *et al.*, 2011).

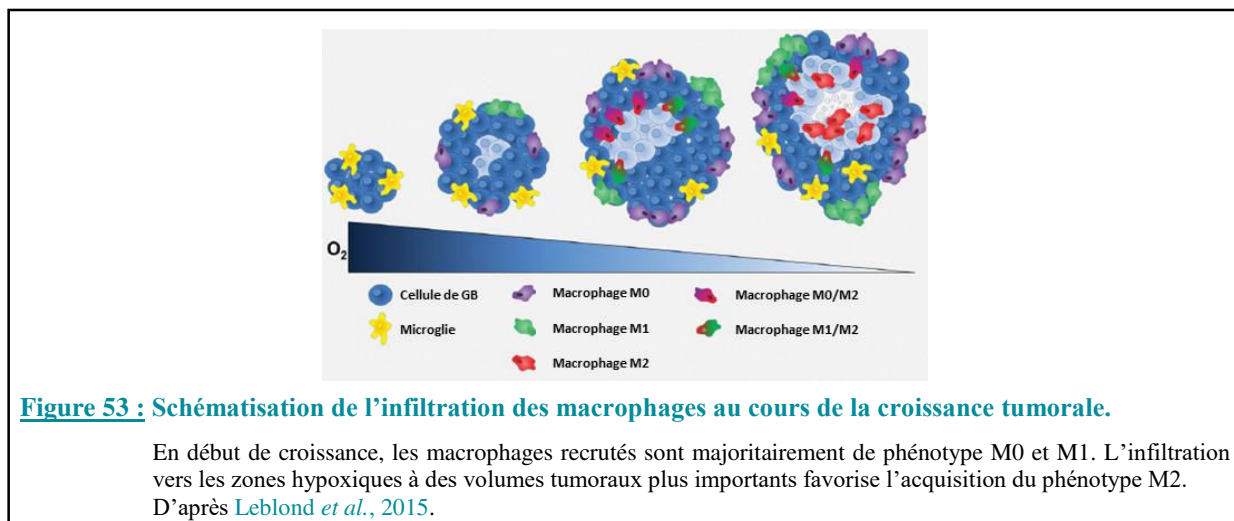
L'effet bénéfique attendu des stratégies anti-angiogéniques pour les GB était que ce traitement devait certes léser le réseau vasculaire tumoral, mais aussi indirectement atteindre les CSG de la niche périvasculaire. Or, sur le long terme, de façon inattendue, l'utilisation du bévacizumab a conduit à un effet rebond de tumeurs plus invasives ; le blocage du VEGF provoquant sur les cellules de GB, un *switch* d'expression de la T-cadhérine vers la N-cadhérine et une motilité des cellules plus importante, caractéristiques de la TEM (Lu *et al.*, 2012).

La vasculogenèse est un mécanisme alternatif conduisant à la formation de vaisseaux sanguins qui est également observé dans les GB. Les cellules progénitrices endothéliales dérivées de la moelle osseuse quittent la circulation systémique le long d'un gradient de chémokine tel le SDF-1. Il a été démontré que les CSG sont responsables de la sécrétion de SDF-1 et ce en réponse à l'activation de HIF-1, qui par ailleurs augmente l'expression de CXCR4 sur les cellules myéloïdes (Du *et al.*, 2008).

Jusqu'à présent, le rôle de HIF-2 dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale ne lui a été attribué qu'au regard de son rôle dans le maintien des niches périvasculaires (Pietras *et al.*, 2010). Toutefois, il peut être noté que HIF-2 est, tout comme HIF-1, très impliqué dans le développement de l'arbre vasculaire au cours du développement embryonnaire. HIF-1 serait impliqué dans les phases de vasculogenèse et HIF-2 serait nécessaire aux phases de remodelage et de maturation des néovaisseaux. Ce *switch* d'intervention des deux isoformes pourrait être dû aux modifications du niveau d'oxygénation au cours du développement d'une vascularisation fonctionnelle (Koh & Powis, 2012). Cette intervention séquentielle de HIF-1 et HIF-2 observée en conditions physiologiques ne semble donc pas retrouvée en conditions pathologiques au cours de la progression tumorale.

IV.1.6.2. Rôle de HIF dans l'immunomodulation

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent (cf. page 44), les GB sont des tumeurs très inflammatoires. Parmi les molécules chimioattractantes, certaines ont été déjà précédemment citées comme des gènes cibles de HIF, tel est le cas du VEGF, des endothélines (ET-1) et le SDF-1. Tout comme les progéniteurs endothéliaux, les monocytes peuvent migrer dans les régions hypoxiques en suivant un gradient chimioattractant généré par le signal hypoxique (Murdoch *et al.*, 2004) et les TAM s'accumulent dans les régions hypoxiques nécrotiques. Les travaux de l'équipe ont renforcé ces connaissances en montrant sur un modèle de GB que l'hypoxie favorise certes la migration des macrophages mais aussi leur polarisation vers le phénotype pro-tumoral M2 (Figure 53) (Leblond *et al.*, 2015).



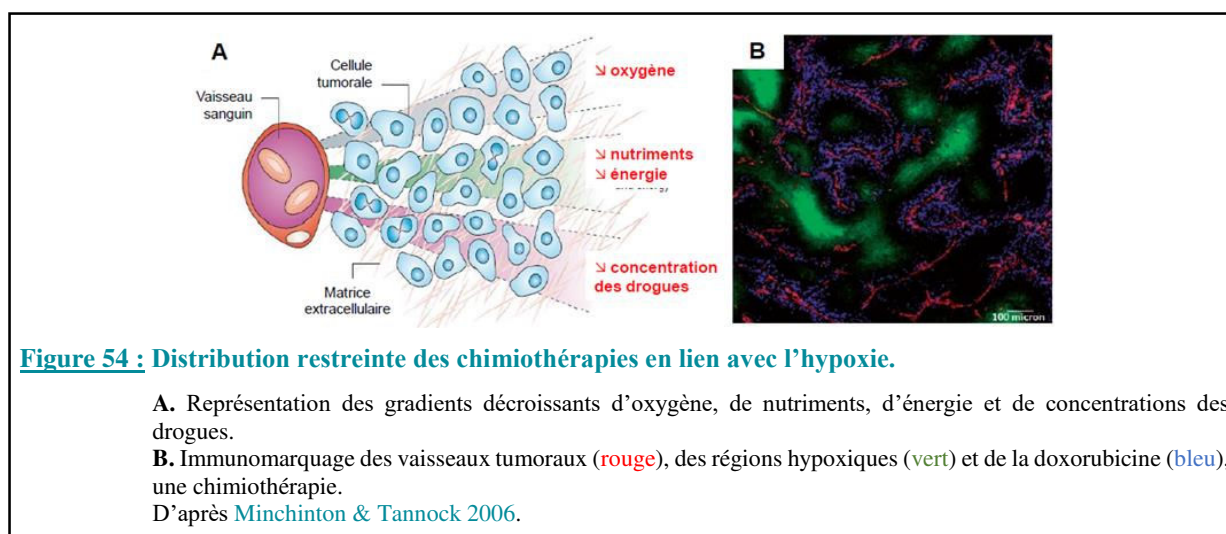
L'influence de l'activation des facteurs HIF- α dans la polarisation des macrophages est cependant plus discutée. Bien que controversées, des études menées *in silico*, ont proposé que HIF-1 α serait responsable de la mise en place d'un phénotype M1 (via la transcription de l'iNOS) alors que HIF-2 α serait impliqué dans le phénotype M2 (par l'induction de la transcription de l'Arginase-1) (Imtiyaz *et al.*, 2010; Egner *et al.*, 2016). Toutefois, seul le promoteur du gène de l'iNOS, et non celui de l'Arg1, possède une séquence HRE (Matrone *et al.*, 2004; Mi *et al.*, 2008). Certaines études montrent que l'inhibition de HIF-1 α dans les macrophages induisent une augmentation des marqueurs M2 alors que d'autres observent une diminution de ceux-ci (Werno *et al.*, 2010; Doedens *et al.*, 2010). De plus, l'inhibition de HIF-2 α semble diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires et augmenter les cytokines anti-inflammatoires synthétisées par les macrophages (Imtiyaz *et al.*, 2010).

Au sein des GB, d'autres mécanismes d'échappement aux réponses immunitaires ont été décrits. Par exemple, les cellules tumorales expriment à leur surface des molécules inhibitrices comme PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand 1*) et FasL qui induisent l'apoptose des cellules T (Simonelli *et al.*, 2018). D'autres études rapportent des altérations d'expression des molécules HLA de classe 1 mais aussi de HLA-G, cette dernière ayant été identifiée comme un gène cible de HIF-1 (Yaghi *et al.*, 2016).

IV.1.7. HIFs et traitements

IV.1.7.1. Rôle des HIFs dans la réponse à la radiothérapie

Les caractéristiques du tissu tumoral des GB sont à l'origine de la faible pénétration et/ou efficacité des traitements de chimio et radiothérapie. Ainsi, comme illustré par la **Figure 54**, les anomalies morphologiques et fonctionnelles du réseau vasculaire péri et intratumoral, la pression interstitielle de ce tissu et la présence de régions hypoxiques limiteront l'accessibilité des traitements de chimiothérapie (Minchinton & Tannock, 2006).



Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1 de cette introduction (cf. page 55), l'hypoxie est également à l'origine d'une radiorésistance puisque la RT requiert une quantité d'oxygène intra-tumorale suffisante pour avoir un effet cytotoxique maximal, la perte de l'effet oxygène favorisant les phénomènes de radiorésistance. Toutefois, l'hypoxie peut conduire également indirectement à la résistance aux traitements conventionnels par l'activation de HIF-1 à l'origine d'altérations au niveau de la cinétique de prolifération, de la position des cellules dans le cycle cellulaire, le nombre de cellules quiescentes en phase G0 du cycle cellulaire ; ces différents paramètres limitant la réponse des cellules aux traitements de chimio et radiothérapie.

Nous ne décrivons dans la suite de ce document que le rôle des HIFs dans la radiorésistance des GB.

IV.1.7.1.1. Rôle de HIF-1 dans la réponse à la radiothérapie

Plusieurs études *in vitro* ont confirmé sur un large spectre de lignées tumorales que l'expression protéique de HIF-1 α était corrélée avec la radiorésistance induite par l'hypoxie (Vordermark *et al.*, 2004). Depuis, d'autres études réalisées sur différentes lignées tumorales et utilisant des stratégies d'inhibition ou de stabilisation de l'expression de HIF-1 α ont confirmé que HIF-1 était un médiateur majeur de la radiorésistance tumorale et ce en conditions de normoxie ou d'hypoxie (Kessler *et al.*, 2010; Ströfer *et al.*, 2011). Bien que les mécanismes à l'origine de la radiorésistance soient complexes et cellulaires dépendants, trois mécanismes majeurs peuvent être dégagés quant au rôle de HIF-1: celui-ci module l'apoptose, augmente les capacités de réparer l'ADN et induit des perturbations du métabolisme cellulaire. Plus récemment, il a été proposé que la mort mitotique est un processus également développé par les cellules radiorésistantes grâce à l'expression de HIF-1 α (Lanvin *et al.*, 2013).

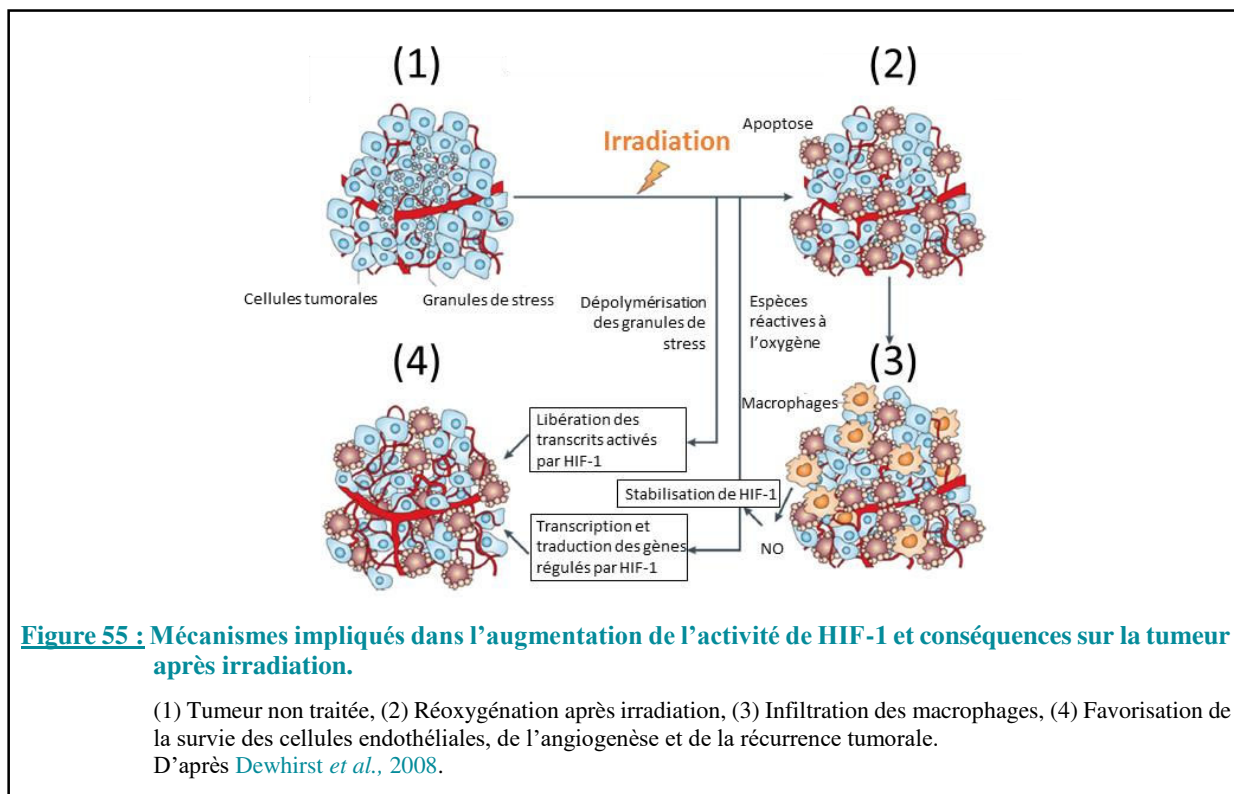
Les données issues des cellules de GB sont beaucoup plus fragmentaires et les arguments en faveur d'un rôle de HIF dans la radiorésistance sont indirects. Ainsi, l'équipe de Jonathan-Mohal propose que la mort mitotique post-irradiation des cellules de GB serait due à une surexpression de survivine en réponse à l'activation de HIF-1 α (Lanvin *et al.*, 2013). Les travaux de notre équipe ont également rapporté que le blocage de la signalisation EPO/EPOR radiosensibilise les cellules de GB en les arrêtant en phase G2/M du cycle cellulaire, en favorisant la sénescence de ces cellules et en induisant une instabilité génomique robuste conduisant à une mort mitotique dépendante de la caspase-3 (Pérès *et al.*, 2015). *In vivo*, l'irisquinone, en diminuant l'expression de HIF-1 α , exerce un effet de radiosensibilisant sur un modèle de GB (Wang *et al.*, 2016).

Il est important de noter que l'irradiation elle-même peut moduler l'activité de HIF-1 α . Ainsi, dans la phase précoce de réoxygénation suivant l'irradiation, l'expression de HIF-1 α diminue pour ensuite augmenter ; l'activité de HIF-1 α atteignant son maximum entre 24 et 48 heures post-irradiation. Cette cinétique d'expression biphasique a été retrouvée sur différents types de cellules tumorales même si les durées des phases dépendent à la fois de la dose d'irradiation et du type cellulaire étudié (Moeller & Dewhirst, 2004; Harada *et al.*, 2009).

Deux mécanismes indépendants seraient à l'origine de l'augmentation d'activité de HIF-1 α post-irradiation. Il a été proposé que, durant la phase de réoxygénation, la formation excessive d'ERO entraîne une stabilisation de HIF-1 α , provoquant ainsi une augmentation de l'activité de HIF-1 (Dewhirst *et al.*, 2008).

Le second mécanisme de stabilisation de HIF-1 α serait lié à la présence de granules de stress (Figure 55). Ces granules de stress ont été observés, *in vitro* et *in vivo*. Ceux-ci se forment durant la phase d'hypoxie suivie, lors de la réoxygénation, d'une désagrégation de ces complexes libérant ainsi les transcrits de HIF-1 α ainsi que les protéines dont l'expression est régulée par HIF-1 (Moeller & Dewhirst, 2004; Gottschald *et al.*, 2010).

Plus récemment, un autre pic d'activité de HIF a été décrit pour des phases post-irradiation plus tardives suggérant qu'il puisse exister un troisième mécanisme à l'origine de cette stabilisation de HIF-1 α . En effet, HIF-1 α est de nouveau stabilisé 6 à 7 jours après l'irradiation, période qui coïncide avec l'infiltration des macrophages dans la tumeur (Figure 55). L'hypothèse retenue serait que la production de NO, induite par l'infiltration des macrophages, permettrait de stabiliser à nouveau HIF-1 α et ainsi augmenterait l'expression de HIF-1 et de ses gènes cibles, pouvant ainsi protéger les cellules tumorales des effets cytotoxiques de l'irradiation (Chi *et al.*, 2012).



IV.1.7.1.2. Rôle de HIF-2 dans la réponse à la radiothérapie

Le rôle de HIF-2 dans la radiorésistance des cellules tumorales n'est suspecté que depuis peu (Zhao *et al.*, 2015). Les premières études ont été réalisées sur des carcinomes rénaux, tumeurs qui, suite à une mutation de pVHL, surexpriment HIF-2 α et sont particulièrement radiorésistantes. L'extinction de l'expression de HIF-2 α dans ces cellules tumorales a permis d'apporter une des premières preuves expérimentales en faveur d'un rôle de cette isoforme de HIF dans la radiorésistance (Bhatt *et al.*, 2008). Pour les GB, le rôle de HIF-2 dans la radiorésistance a été relié au statut souche des cellules tumorales. Il est désormais clairement admis que les CSG, au sein de leurs niches hypoxiques, sont particulièrement résistantes à la radiothérapie. Toutefois, les mécanismes à l'origine de cette radiorésistance ne sont pas totalement établis. L'équipe de Pietras propose que la voie de signalisation OPN/CD44 impliquée dans le statut des CSG est également à l'origine de la radiorésistance de ces cellules (Pietras *et al.*, 2014).

Ces données non exhaustives illustrent le rôle majeur exercé par HIF-1 et HIF-2 dans la gliomagenèse, la progression tumorale et la résistance au traitement de radiothérapie mais soutendus par des mécanismes distincts. Bien que ce volet ne soit pas abordé dans cette introduction, il faut également évoquer le fait que la stabilisation de HIF-1 α et de HIF-2 α sera également un frein à l'efficacité de la chimiothérapie.

Au regard de ces rôles majeurs de ces facteurs de transcription dans la physiopathologie du GB, et en raison des échecs thérapeutiques actuels, différentes stratégies ont été envisagées afin d'apporter des preuves expérimentales solides en faveur de l'intérêt d'inhiber l'expression des HIF. Actuellement, dans les tumeurs solides, ces stratégies sont classées en trois catégories en fonction de leurs modes d'action : (1) inhiber la synthèse de HIF-1 α ou HIF-2 α , (2) cibler directement HIF-1 α ou HIF-2 α et diminuer leur activité et/ou leur stabilité, ou (3) cibler les voies aval correspondantes de HIF-1 ou HIF-2 (Zhao *et al.*, 2015; Semenza 2006).

IV.2. HAF : un HIF-modulateur ?

IV.2.1. Découverte et structure de HAF

C'est en cherchant à identifier de nouveaux peptides antigéniques tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques, qu'une équipe Japonaise a découvert, à partir de prélèvement de carcinomes épidermoïdes, un gène bicistronique de 2506 paires de bases nommé *Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 1* (SART1) (Shichijo *et al.*, 1998). Le gène *SART1*, situé sur le chromosome 11q13.1, code deux protéines SART1₈₀₀ (125 kDa) et SART1₂₅₉

(43 kDa) ; la forme de 259 acides aminés étant obtenue par un décalage de -1 du cadre de lecture. Ces auteurs ont distingué des localisations cellulaires pour les deux formes de SART1. SART1₈₀₀ serait exprimée dans le noyau des cellules en prolifération, SART1₂₅₉ serait, quant à elle, restreinte dans le cytosol de certaines cellules telles celles des carcinomes épidermoïdes.

La séquence nucléotidique de SART1 est assez conservée et partage 86 et 84 % d'homologie avec les formes retrouvées respectivement chez la souris et le rat (Gotoh *et al.*, 1998). L'homologue murin est défini par l'acronyme HAF. Cet acronyme est également souvent utilisé pour désigner la forme humaine de SART1₈₀₀, comme nous le ferons dans la suite de ce manuscrit.

Bien que la structure protéique de HAF ne soit pas encore totalement connue, deux domaines principaux ont été identifiés (**Figure 56**) :

- le premier domaine, situé en N-terminal, correspond à un domaine à motif leucine-zipper qui permet la fixation de HAF sur l'ADN ;
- le second domaine, situé en C-terminal, entre les acides aminés 654 à 800, est un domaine à activité E3 ligase qui peut ubiquitinyler des protéines cibles et entraîner leur dégradation par le protéasome (Koh *et al.*, 2008). La séquence peptidique entre les acides aminés 450 et 600 serait particulièrement riche en glutamine et faciliterait également des liaisons de SART1 à d'autres protéines (Makarova *et al.*, 2001).

Depuis l'identification de ce facteur, chacune des formes de SART1 a été retrouvée exprimée dans certains tissus sains y compris le cerveau, mais également dans des contextes tumoraux (Shichijo *et al.*, 1998).

IV.2.2. Rôles de HAF

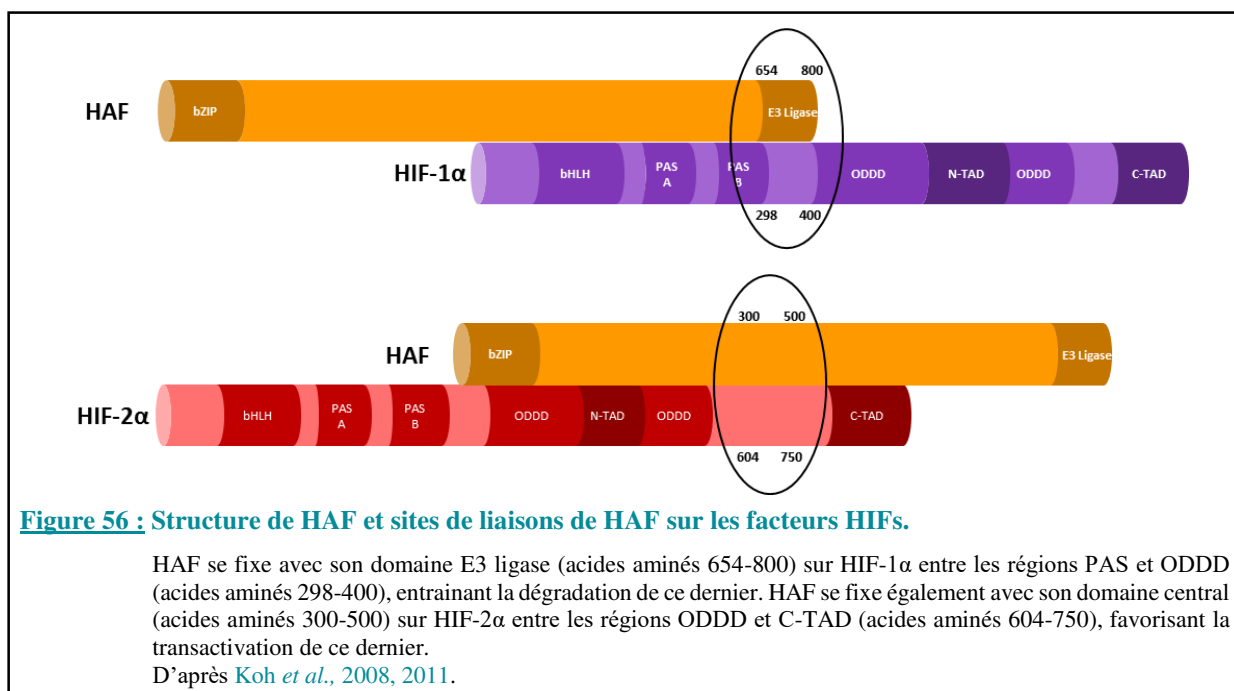
IV.2.2.1. HAF : un régulateur des HIFs

En 2000, HAF a tout d'abord été décrit comme étant un facteur capable de moduler l'expression hypoxique de l'*EPO*, gène cible des facteurs HIF- α (Gupta *et al.*, 2000).

Par son domaine contenant le motif leucine zipper, HAF se fixe à une séquence de 17 paires de bases au niveau du promoteur du gène de l'*EPO* à proximité de la séquence HRE. Cette coopération entre ces deux régions conduit à une induction maximale de ce gène. Cette même étude a permis également de montrer qu'au-delà de l'*EPO*, HAF est aussi capable de se fixer en 5'UTR du gène du *VEGF* et de potentialiser son expression en hypoxie. Depuis, d'autres gènes ont été identifiés comme étant une cible de HAF tel que *OCT-4* (Koh *et al.*, 2015). La

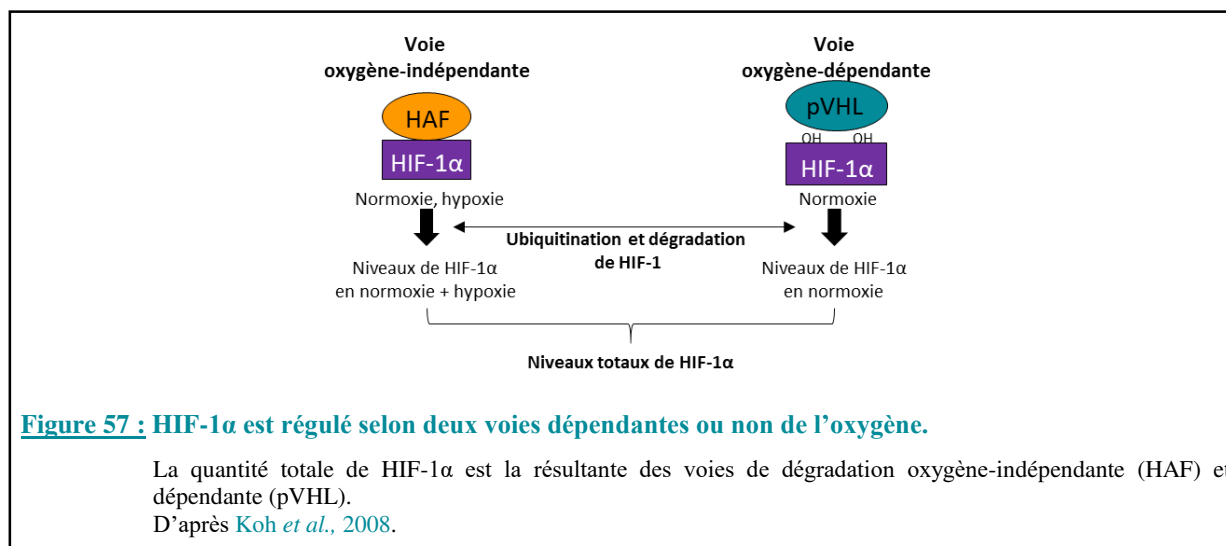
comparaison des séquences de fixation de HAF sur les promoteurs de ces gènes cibles permet de suggérer une séquence consensus pour la fixation de HAF : CCCCWSCCCC (où W peut être remplacé par A ou T et S peut être remplacé par C ou G) (Gupta *et al.*, 2000; Koh *et al.*, 2015). Les gènes modulés par HAF étant majoritairement des gènes cibles de HIF-1 ou HIF-2, un rôle de HAF dans la régulation de ces facteurs a été suspecté. Les connaissances actuelles proposent que HAF ait des effets diamétralement opposés vis-à-vis de HIF-1 α et HIF-2 α : HAF dégrade HIF-1 α alors qu'il permet la transactivation de HIF-2 α . Cette différence de régulation serait due au fait que HAF se fixe sur chacune de ces isoformes par l'intermédiaire de domaines distincts (Figure 56) :

- HAF se fixe sur HIF-1 α par son domaine E3 ligase (entre les acides aminés 654-800) au niveau du domaine PAS B (entre les acides aminés 298-400) de HIF-1 α . Cette fixation favorise alors l'ubiquitinylation de ce dernier et entraîne sa dégradation par le protéasome (Koh *et al.*, 2008).
- HAF se fixe sur HIF-2 α par son domaine central (entre les acides aminés 300 et 500). En se fixant entre les domaines ODDD et C-TAD (de 604 à 750 acides aminés) de HIF-2 α , HAF favorise sa transactivation et l'expression de ses gènes cibles (Koh *et al.*, 2011).

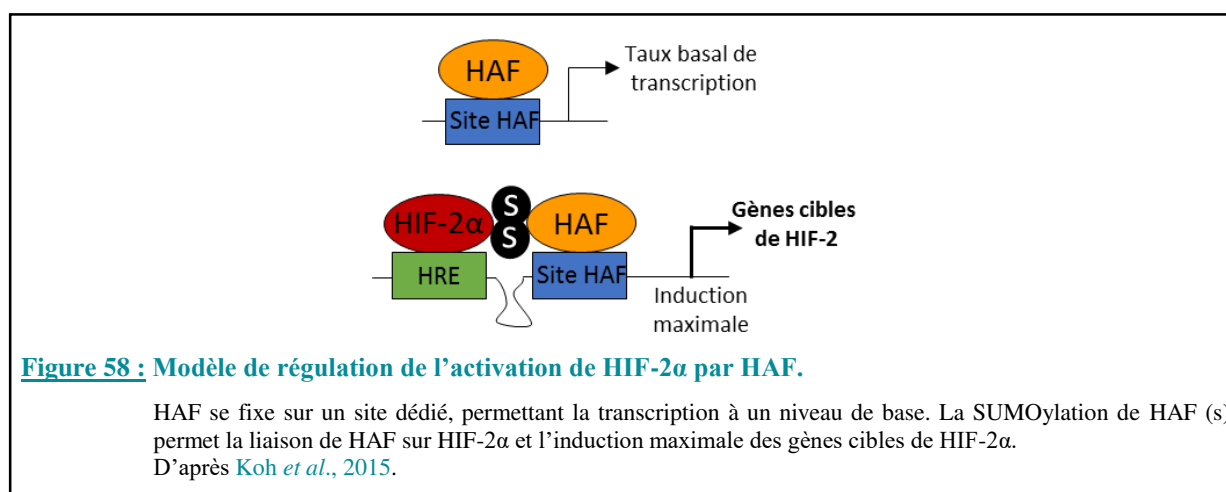


Comme nous l'avons introduit précédemment dans ce manuscrit, HAF fait partie des régulateurs oxygène-indépendants des facteurs HIFs (cf. page 74). Ce mécanisme vient donc s'ajouter aux autres mécanismes de régulation de ces facteurs de transcription (Figure 42). Ainsi, au sein de la cellule, la quantité totale de HIF-1 α dépendra donc de l'action des deux

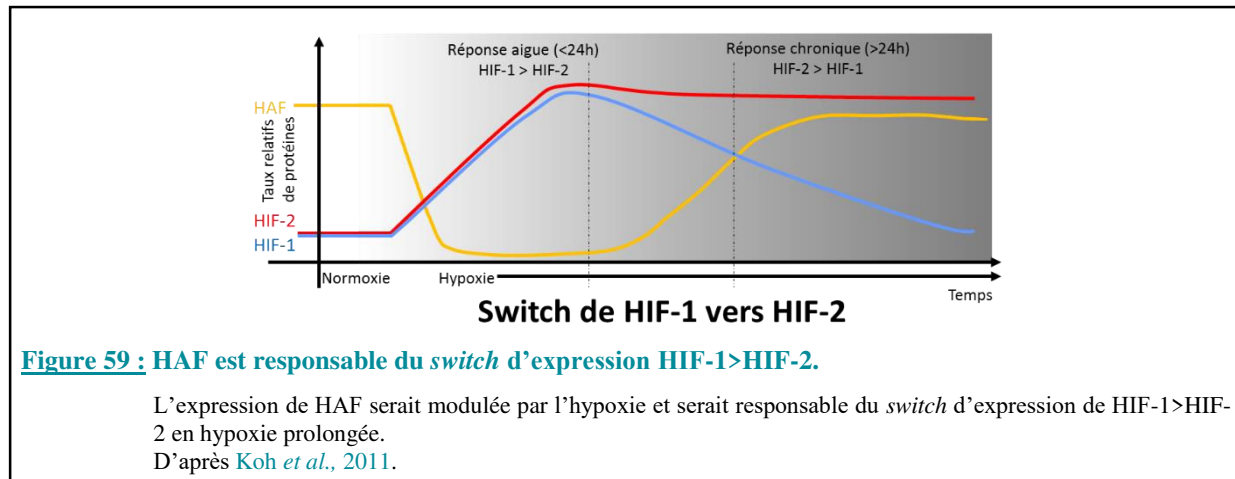
voies de régulation, la voie oxygène-indépendante passant par HAF et la voie oxygène-dépendante passant par les pVHL (**Figure 57**) (Koh *et al.*, 2008).



Concernant HIF-2α, la régulation HAF-dépendante, en favorisant sa transactivation, viendra renforcer son activité en hypoxie mais aussi en normoxie. Récemment, il a été proposé qu'en hypoxie, la transactivation de HIF-2α par HAF nécessitait au préalable que celui-ci soit SUMOylé pour pouvoir se lier à HIF-2α et provoquer une induction maximale des gènes cibles de HIF-2 (**Figure 58**) (Koh *et al.*, 2015). Parmi les trois isoformes de SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifiers*), seules les SUMO-1 et SUMO-2 sont capables de se conjuguer à HAF ; SUMO-2 se fixant sur les Lys⁹⁴ et Lys¹⁴¹ de HIF-2α (Vertegaal *et al.*, 2006; Schimmel *et al.*, 2010).



En outre, l'expression de HAF pourrait également être elle-même modulée par l'hypoxie (Koh *et al.*, 2011). De ces connaissances, il a été proposé que HAF soit à l'origine d'un *switch* de HIF-1 α vers HIF-2 α en condition d'hypoxie prolongée (Figure 59).



IV.2.2.2. Régulation de HAF

Contrairement aux facteurs HIFs, HAF exerce son activité indépendamment de la disponibilité en oxygène. En effet, il a été montré qu'il est capable de dégrader HIF-1 α aussi bien en condition de normoxie qu'en hypoxie (Koh *et al.*, 2011). Cependant, selon cette même étude, l'expression de HAF serait modulée par une hypoxie sévère (0,5 % d'O₂) et prolongée (48 h) (Figure 59).

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'activité de HAF est également modulée de manière post-traductionnelle par SUMOylation dans sa région N-terminale. De façon intéressante, l'inhibition de la SUMOylation de HAF potentialise la dégradation de HIF-1 α tout en prévenant la transactivation de HIF-2 α . Ces données suggèrent que la SUMOylation de HAF contribuerait à maintenir une régulation fine de la balance entre l'expression et l'activité des isoformes de HIF- α (Koh *et al.*, 2015).

IV.2.2.3. Les autres rôles de HAF

D'autres rôles indépendants des facteurs HIFs ont été attribués à HAF. Ce facteur serait notamment impliqué dans la formation du spliceosome et la régulation de la mitose (Kittler *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2006). En effet, HAF interagit avec la sous-unité UBL5 qui participe au maintien de l'intégrité du spliceosome (Makarova *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2006; Oka *et al.*, 2014; Sundaramoorthy *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015). Par ailleurs, des inhibitions d'UBL5 ou de HAF provoquent des défauts d'épissage de la sororine, protéine

impliquée dans la cohésion des chromatides se traduisant par un défaut de séparation de celles-ci lors de la mitose (**Figure 60**) (Laetsch *et al.*, 2014; Sundaramoorthy *et al.*, 2014).

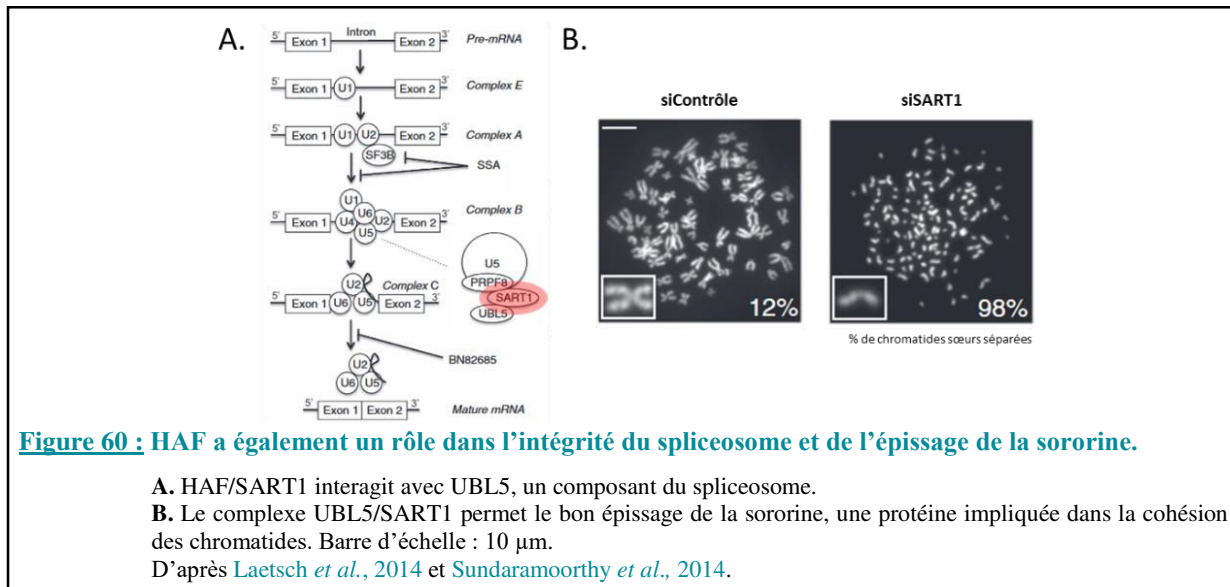


Figure 60 : HAF a également un rôle dans l'intégrité du spliceosome et de l'épissage de la sororine.

A. HAF/SART1 interagit avec UBL5, un composant du spliceosome.

B. Le complexe UBL5/SART1 permet le bon épissage de la sororine, une protéine impliquée dans la cohésion des chromatides. Barre d'échelle : 10 μ m.

D'après Laetsch *et al.*, 2014 et Sundaramoorthy *et al.*, 2014.

D'autres études proposent que HAF serait nécessaire au bon fonctionnement du fuseau mitotique ou induirait l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Kittler *et al.*, 2004; Hosokawa *et al.*, 2005). Enfin, HAF pourrait également participer à la réponse immunitaire. Bien que cette fonction soit plus décrite pour la forme 259, les deux formes de SART1 présentent des antigènes de rejet de tumeur (Matsunaga *et al.*, 1999). Ces données ont été décrites pour un certain nombre de tumeurs dont les GB (Zhang *et al.*, 2007).

HAF étant considéré comme un régulateur des facteurs HIFs et de leurs gènes cibles et identifié dans les cellules en prolifération, celui-ci a fait l'objet de recherches dans le domaine de l'oncologie. Il a été ainsi établi que l'expression de HAF est de mauvais pronostic pour les patients souffrant de cancer rénaux (Koh *et al.*, 2015). À la fin des années 1990, HAF avait été détecté dans les biopsies issues de patients souffrant de GB, quelques études ont été entreprises pour identifier son rôle dans ce contexte tumoral (Imaizumi *et al.*, 1999).

IV.2.3. HAF et glioblastomes

Depuis les travaux d'Imaizumi, une seule étude préclinique a été entreprise afin de rechercher si le facteur HAF pouvait participer à la gliomagenèse (Imaizumi *et al.*, 1999; Koh *et al.*, 2011). De cette étude menée *in vitro* et *in vivo*, il a été proposé qu'une surexpression de HAF dans les cellules issues d'une lignée humaine de GB (U87) favorise l'acquisition d'un phénotype souche de ces cellules et augmente leur agressivité. Ces effets ont été attribués au

switch d'expression de HIF-1 α vers HIF-2 α entraînant alors l'expression de gènes cibles de HIF-2 α tels qu'*OCT-3/4*, *NANOG* et *MMP-9*. *In vivo*, ces cellules surexprimant HAF induisent des tumeurs plus agressives. En accord avec ces données précliniques, une étude de séquençage des SNPs (*single-nucleotide polymorphism*) menée à partir de plusieurs échantillons issus de biopsies de GB humains a permis de mettre en évidence certains SNPs situés sur le gène codant HAF et qui pourraient renseigner sur le caractère agressif de ces tumeurs (Keller *et al.*, 2011).

Plus récemment, une équipe française a proposé que l'expression de HAF serait un facteur de mauvais pronostic dans des gliomes de bas grade (Figure 61) et que l'expression de HAF pourrait réguler l'expression de SOX2 indépendamment de HIF-2 (Tchoghandjian *et al.*, 2016).

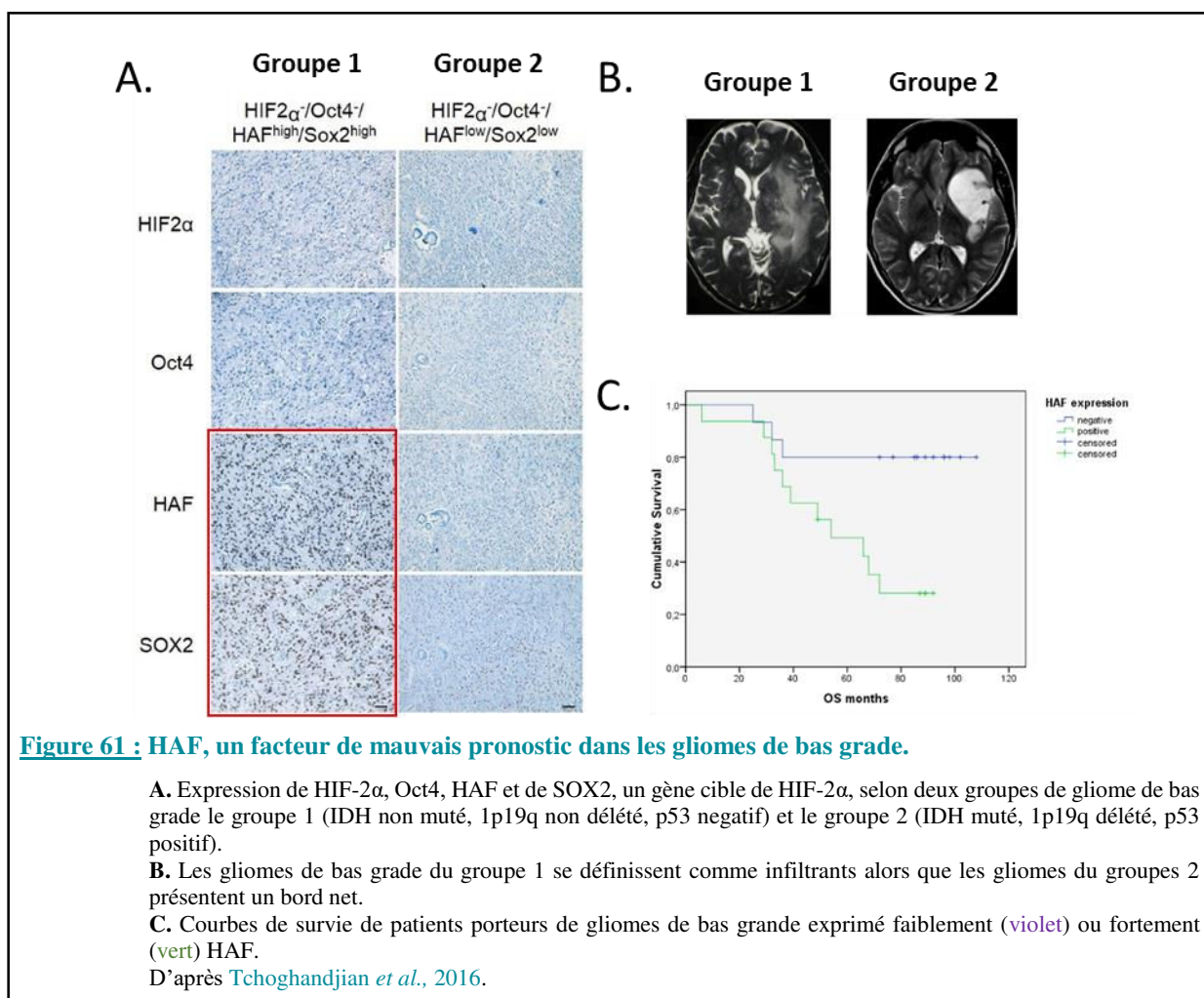


Figure 61 : HAF, un facteur de mauvais pronostic dans les gliomes de bas grade.

A. Expression de HIF-2 α , Oct4, HAF et de SOX2, un gène cible de HIF-2 α , selon deux groupes de gliome de bas grade le groupe 1 (IDH non muté, 1p19q non délété, p53 négatif) et le groupe 2 (IDH muté, 1p19q délété, p53 positif).

B. Les gliomes de bas grade du groupe 1 se définissent comme infiltrants alors que les gliomes du groupes 2 présentent un bord net.

C. Courbes de survie de patients porteurs de gliomes de bas grade exprimé faiblement (violet) ou fortement (vert) HAF.

D'après Tchoghandjian *et al.*, 2016.

Ainsi, de ces quelques données cliniques et précliniques, il apparaît que le rôle de HAF dans les GB n'est pas encore clairement établi et que celui-ci mérite d'être consolidé.

Objectifs

Objectifs

Les glioblastomes (GB) sont les tumeurs cérébrales primitives les plus dévastatrices du système nerveux central chez l'adulte, et ce, en raison de la faible efficacité des thérapies conventionnelles actuelles. Ces tumeurs particulièrement invasives et agressives sont extrêmement hétérogènes à l'échelle intra-tumorale comme en témoigne les profils moléculaires proposés plus récemment pour améliorer la classification des GB. Une des caractéristiques majeures de ces tumeurs réside dans la présence de régions hypoxiques, qui elles aussi peuvent présenter une hétérogénéité inter-individuelle et intra-tumorale. La présence de cellules souches de GB (CSG) ajoute un niveau de complexité à la compréhension de l'hétérogénéité des GB. L'ensemble de ces différentes caractéristiques sont probablement en partie à l'origine de la faible efficacité des thérapeutiques actuelles.

Comme nous l'avons décrit en introduction de ce manuscrit, les facteurs de transcription HIFs jouent un rôle clé dans l'existence de ces différentes caractéristiques. Un certain nombre de données relate l'importance du facteur HIF-1 α dans la gliomagenèse et la résistance au traitement de chimio- et radiothérapie. Ainsi, les travaux menés au sein de l'équipe CERVOxy ont montré que certains des gènes cibles de HIF-1 α , dont le *VEGF* et l'*EPO* participaient à la progression des GB et à leur résistance à la chimio- et radiothérapie (Corroyer-Dulmont *et al.*, 2013; Pérès *et al.*, 2015).

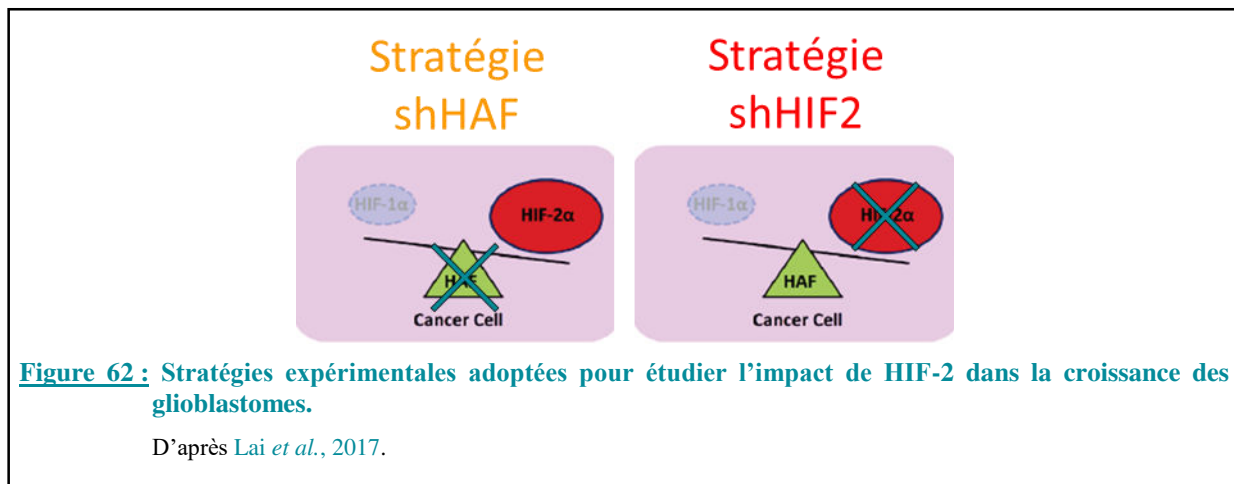
Les données concernant HIF-2 α dans les GB sont beaucoup plus fragmentaires. Le peu d'études cliniques qui se sont intéressées à ce facteur (Li *et al.*, 2009; Renfrow *et al.*, 2018) suggèrent que HIF-2 α régule la capacité tumorigénique des CSG. Toutefois, des travaux antérieurs de l'équipe ont également montré que la β III-tubuline, surexprimée dans les GB, est un gène cible spécifique de HIF-2 α , suggérant que cette isoforme de HIF puisse agir également sur les cellules de GB différenciées (Bordji *et al.*, 2014).

Bien que les régulations des facteurs HIFs diffèrent selon le type cellulaire, schématiquement, il est proposé que HIF-1 α module la réponse aigue à l'hypoxie (< 24 heures) et HIF-2, la réponse chronique (> 24 heures). De plus, HIF-2 α pourrait être activé dans des conditions d'hypoxie plus modérée que HIF-1 α (1 %-5 % d'O₂), voire même en normoxie. Ainsi, l'hétérogénéité intra-tumorale des régions hypoxiques des GB pourrait être à l'origine d'une activation régionalisée et différentielle des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α , ce phénomène n'étant pas facilement identifiable à partir des biopsies de patients.

Afin de renforcer les connaissances quant à la contribution de HIF-2 α dans les GB, l'objectif de ce travail mené à l'échelle préclinique était double :

- déterminer si HIF-2 α peut moduler la capacité tumorigénique des cellules de GB différenciées.

Nous avons recherché *in vitro* et *in vivo*, l'impact de HIF-2 α sur la croissance des GB en utilisant deux approches d'ARN interférence : une approche ciblant HAF, facteur impliqué dans le *switch* de HIF-1 α vers HIF-2 α et l'autre HIF-2 α (**Figure 62**).



- identifier la contribution de HIF-2 α et HAF dans l'efficacité de la radiothérapie.

Des études *in vitro* ont été réalisées afin d'évaluer l'implication de HIF-2 α ou HAF dans la radiosensibilité des cellules de GB aux rayons X.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Méthodologie *in vitro*

I.1. Culture cellulaire

I.1.1. Culture des lignées cellulaires humaines

La lignée cellulaire utilisée dans ces études est la lignée humaine de glioblastome U251-MG. Elle a été établie à partir d'un explant tumoral de glioblastome humain et caractérisée dans les années 80 (Westermarck *et al.*, 1973). Ces cellules sont maintenues en culture dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* 1 g/L de glucose supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF), 50 U/mL de pénicilline/streptomycine (PS) et 2 mM de glutamine. Les cellules sont incubées dans une atmosphère humide gazée (95 % air, 5 % CO₂, 37°C) jusqu'à l'obtention de 90 % de confluence. Après élimination du milieu et rinçage au PBS (*Phosphate buffer saline*), les cellules sont décollées à l'aide d'un mélange trypsine-EDTA (5 min, 37°C), re-suspendues dans du milieu de culture additionné de SVF afin d'inhiber la réaction enzymatique puis centrifugées (5 min, 300 g). La suspension cellulaire est diluée au 1/10^{ème} et réensemencée sur le support adapté aux expériences.

I.1.2. Infection par des particules lentivirales

Une stratégie d'infection par des particules lentivirales a été employée afin d'obtenir une répression stable de l'expression transcriptomique de HAF, HIF-1 α ou HIF-2 α dans la lignée cellulaire U251. Suite à l'intégration du vecteur dans le génome hôte, des ARN interférents sont exprimés, empêchant ou diminuant la traduction de l'ARNm de HAF, HIF-1 α ou HIF-2 α .

Les particules lentivirales sont commercialisées par la société Sigma-Aldrich et permettent l'expression d'un vecteur plasmidique (pLKO.1) ayant une résistance à un antibiotique de cellules eucaryotes (puromycine) et codant pour un shARN de HAF, HIF-1 α ou HIF-2 α . Le fournisseur propose 5 séquences de shARN différentes pour chaque gène et assure qu'au moins une séquence proposée aura une efficacité de répression de l'expression génique supérieure à 70 %.

Ainsi les séquences ayant été retenues sont :

HAF : CCGG-GCGGAAGAAGAAGCCTGACTA-CTCGAG-TAGTCAGGCTTCTTCTCCGC-TTTTTG

HIF-1 α : CCGG-GTGATGAAAGAATTACCGAAT-CTCGAG-ATTCGGTAATTCTTTCATCAC-TTTTT

HIF-2 α : CCGG-CAGTACCCAGACGGATTTCAA-CTCGAG-TTGAAATCCGTCTGGGTACTG-TTTTT

Afin d'avoir un contrôle positif de l'infection, une lignée contrôle « *scrambled* » a été obtenue par un traitement similaire grâce à l'infection avec un shARN dont la structure ne reconnaît aucun ARNm humain connu.

Après sélection et amplification des cellules infectées par l'ajout de puromycine (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), l'expression génique des cellules est caractérisée par RT-qPCR pour permettre le choix du clone assurant la plus forte répression du gène cible.

I.2. Modèles d'invasion et de migration

I.2.1. Cultures organotypiques de cerveau de souris

Le cerveau de souriceaux de 4-5 jours est rapidement extrait de la boîte crânienne et découpé à l'aide d'un *tissue chopper* afin de réaliser des tranches de 400 μm allant des bulbes olfactifs au striatum. Elles sont ensuite déposées sur une membrane poreuse (Millicell-CM) dont la face inférieure est en contact avec du milieu composé de *Minimum Essential Medium Hanks' balanced salts* ; 1 g/L D-glucose ; 10 % SVF ; 1 % PS ; 25 mM HEPES ; 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ triiodothyronine ; 1 % de complément N2, 10 % BSA (*bovin serum albumin*). Après trois jours, les cellules sont injectées lentement (0,025 $\mu\text{L}/15$ sec) à raison de 50 000 cellules/ μL sous 0,1 μL . Sept jours après l'implantation, les tranches sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% (4 h, 4°C), rincées au PBS et conservées en PBS.

I.2.2. Test de migration 2D

Les cellules sontensemencées (300 000 cellules/ mL , 400 μL) dans des puits de plaque 24 puits préalablement coatées au collagène IV. Une fois à confluence, le tapis cellulaire est lésé à l'aide d'un cône, rincé au PBS et du milieu de culture est ajouté. Le suivi au cours du temps du comblement de la blessure, est réalisé à l'aide du microscope Leica DM6000B équipé d'une chambre climatique. Celle-ci permet d'ajuster les paramètres gazeux (O_2 et CO_2) ainsi que l'hygrométrie, permettant des acquisitions (4 photos par puits) des mêmes champs aux temps 0, 4, 8, 12, 16 et 23 h. Trois mesures de la distance entre chaque bord de la blessure sont effectuées à l'aide du logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

I.3. Traitement des cellules

I.3.1. Hypoxie

Les cellules sontensemencées entre 18 h et 24 h avant le placement en hypoxie (1 % O₂) dans une chambre à hypoxie InvivoO₂ 500, assurant une atmosphère humide (5 % CO₂, 37°C). Les cellules sont placées dans la chambre à hypoxie 6 h avant le début des expériences sauf pour les études de cinétique (ARN ou protéines) pour lesquels le milieu cellulaire est équilibré au préalable à la condition hypoxique et mis sur le tapis cellulaire. Dans certaines expériences, de façon à mimer l'activation des HIF par l'hypoxie, les cellules ont été incubées en présence de déferoxamine (100 ou 150 µM), pendant 24 h (Bernaudin *et al.*, 2000).

I.3.2. Irradiation

Les cellules sont irradiées avec un irradiateur X-RAD 225Cx (obtenu dans le cadre du projet Rec-Hadron ; Equipex 2012 inclus dans le projet Archade ; plateforme CYCERON). L'énergie utilisée lors des irradiations est de 225 keV avec une intensité du champ électrique de 9,5 mA permettant un débit de dose de 2 Gy/min.

I.4. Etude de la réponse cellulaire aux traitements

I.4.1. Etude de la réponse des cellules à l'irradiation par rayons X

I.4.1.1. Test de clonogénicité

Le test de clonogénicité est le test de référence en radiobiologie pour étudier la sensibilité des cellules à l'irradiation. Les cellulesensemencées à faible densité (500 cellules/mL) et résistantes à l'irradiation par rayons X (RX) vont être capables de se multiplier et de former des colonies. Ce test est réalisé en normoxie (21 % O₂) ou en hypoxie (1 % O₂) pendant 7 jours. À la fin de l'expérience, les cellules sont rincées au PBS puis incubées dans une solution de crystal violet (30 min, température ambiante) afin de visualiser les colonies. Les boîtes sont rincées à l'eau courante puis mises à sécher à température ambiante avant d'être numérisées. Les colonies contenant au moins 50 cellules ainsi marquées, sont dénombrées à l'aide du plugin *counter cell* sur le logiciel ImageJ.

I.4.1.2. Analyse des courbes de survie cellulaire

A partir du nombre de colonies dénombrées, il est alors possible d'établir des courbes de survie en fonction de la dose d'irradiation appliquée aux cellules. Ainsi, le premier paramètre déterminé pour les cellules non exposées aux RX est le *plating efficiency* (qui reflète la capacité des cellules à adhérer au support). La formule utilisée est la suivante :

$$PE = \text{nombre de colonies formées à 0 Gy} / \text{nombre total de cellulesensemencées.}$$

Ce calcul de PE permet de calculer la fraction de survie pour chaque dose d'irradiation grâce à la formule :

$$SF = \text{nombre de colonies formées après irradiation} / (\text{nombre de cellulesensemencées} \times PE)$$

Les courbes de survie représentant en abscisse, les différentes doses d'irradiation, et en ordonnée, les valeurs de SF sur une échelle logarithmique, permettent de déterminer différents paramètres de radiobiologie tels que :

- La D37 ou dose létale moyenne, correspond à la dose (en Gy) pour laquelle la SF est de 37 %
- La SF2 correspond à la fraction de survie à 2 Gy
- L'OER (*oxygen enhancement ratio*) correspond à l'effet radiosensibilisant de l'oxygène est obtenu par le calcul : $OER = D37(\text{hypoxie}) / D37(\text{normoxie})$. Si le résultat est supérieur à 1, cela signifie que les cellules présentent une radiorésistance en hypoxie.

Ces courbes de survie obtenues après une irradiation aux RX, suivent l'équation du modèle linéaire quadratique et traduisent l'événement létal subit par la cellule. En effet on distingue deux coefficients, chacun reflétant la nature de l'événement létal.

L'équation de la courbe de survie correspond à : $SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ où

- le coefficient α est la pente de la partie linéaire de la courbe. Il correspond à la probabilité que la cellule rencontre un événement directement létal.
- le coefficient β est la pente de la partie quadratique de la courbe. Il correspond à la probabilité que la cellule rencontre un événement sublétal.

I.4.2. Etude de la survie cellulaire

Les cellules sontensemencées en triplicat (10 000 cellules/mL, 400 μ L) et incubées en normoxie (21 % O_2) ou en hypoxie (1 % O_2). Le comptage cellulaire s'effectue de J1 à J4 en normoxie et de J2 à J4 en hypoxie. Pour chaque temps, les cellules sont fixées au PFA 4 %

(10 min, température ambiante), rincées puis incubées avec une solution de Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 30 min pour marquer les noyaux en épifluorescence. Quatre champs par puits sont photographiés et le dénombrement automatique des noyaux est effectué à l'aide d'une macro développée pour le logiciel ImageJ par l'équipe CERVOxy.

I.4.3. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les études de répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire ont été réalisées sur le cytomètre en flux GalliosTM (Beckman Coulter SAS, France) et analysées avec le logiciel Kaluza[®] (Beckman Coulter SAS, France) ; ces équipements étant mis à disposition par la plateforme SFR ICORE (Interactions Cellules-Organismes-Environnement) de l'Université de Caen.

Après la collecte du surnageant et rinçage au PBS du tapis cellulaire, les cellules sont décollées par l'action de la trypsine. L'ensemble est centrifugé (300 g, 5 min) puis le culot est rincé au PBS, centrifugé de nouveau et les cellules sont fixées avec de l'éthanol à 70 % froid puis conservées à 4°C. Après élimination de l'éthanol et rinçages au PBS, les cellules sont marquées à l'iodure de propidium (IP). L'IP étant un intercalant de l'ADN fluorescent ($\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$), le cytomètre en flux peut alors déterminer les proportions de cellules en phase G0/G1 (2n quantité d'ADN), en phase G2/M (4n quantité d'ADN), sub-G1 (ayant moins de 2n quantité d'ADN) et sub-G2 (ayant plus de 4n quantité d'ADN).

I.4.4. Etude de l'apoptose par cytométrie en flux

L'analyse de l'apoptose par cytométrie en flux est réalisée en utilisant un kit *Annexin V-FITC*. Le principe de la détection repose sur les propriétés de liaison de l'Annexine V-FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) sur les phosphatidylsérines (exposées à la surface des membranes cellulaires lors de l'apoptose) et par marquage à l'IP. Brièvement, après collecte des surnageants et trypsinisation, les cellules sont centrifugées (300 g, 5 min) puis re-suspendues avec du *binding buffer* (100 μL) et gardées sur glace. L'ajout de 1 μL d'Annexin V-FITC et de 5 μL d'IP est suivi par une incubation de 15 min à l'obscurité et sur glace. Enfin, 400 μL de *binding buffer* sont ajoutés et la suspension est analysée par le cytomètre en flux. L'analyse des marquages permet de déterminer 4 populations : les cellules vivantes (Annexine⁻ et IP⁻), les cellules en apoptose précoce (Annexine⁺ et IP⁻), les cellules en apoptose tardive (Annexine⁺ et IP⁺) et les cellules en nécrose (Annexine⁻ et IP⁺).

II. Méthodologie *in vivo*

L'ensemble des expériences menées *in vivo* ont fait l'objet d'une saisine (numéro #8027, validée par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation) et sont exécutées dans le respect du bien-être de l'animal et en accord avec la réglementation.

II.1. Modèles d'études

II.1.1. Modèle orthotopique de glioblastome humain chez la souris

Les cellules U251-shScr, U251-shHAF, ou U251-shHIF2 sont décollées comme décrit précédemment puis re-suspendues dans une solution de PBS-Glutamine 2 mM à raison de 5.10^4 cellules sous 3 μ L pour l'implantation dans le striatum droit de souris swiss *nude* (mâles de 9 semaines). Les souris sont anesthésiées avec un mélange d'isoflurane (5 % en O₂/N₂O (30 %/70 %)) puis maintenues sous isoflurane (2,5 % en O₂/N₂O (30 %/70 %)) pendant la chirurgie. Après avoir placé l'animal dans un cadre stéréotaxique, une craniotomie est réalisée et les cellules sont injectées (2 mm en latéral et 4 mm en profondeur) avec une aiguille dentaire (30 G) à un débit de 0,5 μ L/min pendant 6 min. L'aiguille est laissée en place pendant 5 min pour éviter le reflux des cellules. L'animal est suturé et une anesthésie locale est appliquée (xylocaïne 2 %). En péri-opératoire, l'analgésie est assurée par injection de buprénorphine (Buprecare® 0,05 mg/kg) 15 min avant le réveil de l'animal et 12-24 h en post-chirurgie.

II.1.2. Modèle ectopique de glioblastome humain chez la souris

Les cellules U251-shScr, U251-shHAF, ou U251-shHIF2 sont décollées comme décrit précédemment puis re-suspendues dans une solution de PBS-Glutamine 2 mM à raison de 3.10^6 cellules sous 100 μ L pour l'implantation dans le flanc droit de souris swiss *nude* (mâles de 7 semaines). Les souris sont anesthésiées avec un mélange d'isoflurane (5 % en O₂/N₂O (30 %/70 %)) puis maintenues sous isoflurane (2,5 % en O₂/N₂O (30 %/70 %)) pendant la chirurgie. La suspension de cellules est injectée de manière sous-cutanée à l'aide d'une seringue à insuline stérile Myjector. Tous les deux jours le développement du bourgeon tumoral est suivi par mesure à l'aide d'un pied à coulisse numérique après contention. Le volume tumoral (V) est déterminé comme suit : $V = (1/2) a \times b^2$ (a et b, longueur et largeur de la masse tumorale apparente, respectivement).

II.2. Etude longitudinale de la croissance tumorale intracérébrale par IRM

L'animal est anesthésié pendant le protocole d'imagerie sous isoflurane (2,5 % en O₂/N₂O (30 %/70 %)) et sa respiration (~ 60 respirations/min) est monitorée à l'aide d'un ballonnet placé sous son abdomen.

L'imagerie par IRM est réalisée sur un système Pharmascan® (Bruker) présent sur la plateforme d'imagerie CYCERON. Le système Pharmascan est un imageur à résonance magnétique de haut champ (7 Tesla). Spécialement conçu pour les petits animaux, il est composé d'un berceau, d'une antenne d'émission et d'antennes de récupération du signal adaptées à la tête de la souris. L'acquisition des données est faite grâce au logiciel Paravision 6.

Une séquence FLASH [*Fast Low Angle Shot*; TR (temps de répétition) / TE (temps d'écho) = 100/3,1 msec] est réalisée pour tous les pré réglages et pour percevoir le positionnement de l'animal afin de délimiter la zone où réaliser les coupes anatomiques (de la fin des bulbes olfactifs au début du cervelet).

L'imagerie anatomique est ensuite réalisée par une séquence T2w [RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) dont les paramètres sont : facteur d'accélération de 8 ; TR/TEeffectif = 4000/60 msec ; nombre d'expériences (NEX) = 2 ; 20 coupes de 0,5 mm ; résolution = 0,15 x 0,15 x 0,75 mm³ ; temps d'acquisition : 4 min]. Le champ de vue est de 20 mm pour les souris. Les régions d'intérêts sont délimitées manuellement sur les coupes T2w sur le logiciel ImageJ et le volume tumoral est ensuite déterminé en multipliant la surface tumorale par l'épaisseur de coupe.

II.3. Cartes de volume sanguin cérébral

À l'issue de la séquence FLASH, et avant l'injection de l'agent de contraste, 5 images T2*-w (TR=15 000 ms, NEX=3, 50 coupes, résolution = 0,25x0,25x0,25 mm) et 4 images T2-w-EPI (TR=20 000 ms, NEX=3) sont acquises avec différents temps d'écho (TE pour le T2*-w=12, 15, 18, 21 et 24 ms et pour le T2-w=40, 60, 80 et 100 ms). Une injection intraveineuse de P904® (200 µmol/kg, Guerbet Research) est ensuite réalisée suivie des acquisitions d'images T2*-w (TE= 12 ms). L'analyse des images et l'obtention des cartes de volumes sanguins sont réalisées sur le logiciel ImageJ à l'aide de macros développées au sein du laboratoire (Chakhoyan *et al.*, 2016).

III. Méthodologie *ex vivo*

III.1. Coupes histologiques

Après perfusion intracardiaque de serum physiologie hépariné puis de PFA 4 %, le cerveau extrait de la boîte crânienne, est placé 24 h dans une solution de PBS - PFA 4 % puis dans une solution de PBS-sucrose 30 % jusqu'à ce que les tissus soient imprégnés. Des coupes au *freezing* microtome de 30 µm sont réalisées en plaçant les cerveaux enrobés de sucrose 30 % sur une plaque froide (-25°C) et les coupes flottantes sont conservées à -20°C dans du cryoconservateur (50 % PBS ; 30 % éthylène glycol ; 20 % glycérol).

IV. Méthodologie générale

IV.1. Techniques des gènes rapporteurs

IV.1.1. Amplification d'ADN plasmidique

Afin d'amplifier les plasmides d'intérêts (généreusement donnés par le Professeur Soubrier (Coulet *et al.*, 2003)) HRE-pGL3SV40-luciférase (comportant 4 séquences HRE en amont du promoteur SV40), pGL3SV40-luciférase (correspondant au vecteur vide) et pRL-TK, des bactéries chimiocompétentes (50 µL, One Shot™ TOP10 *E. coli*) sont incubées individuellement avec les plasmides sur glace (500 ng sous 3 µL, 30 min). Le choc thermique est réalisé à l'aide d'un thermocycleur (42°C, 30-45 sec) suivi d'une incubation sur glace pendant 30 min. Ensuite, 250 µL de milieu enrichi SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) chaud sont ajoutés et le mélange est incubé sous agitation pendant 2 h à 37°C. La suspension bactérienne est étalée (50 µL) sur des boîtes de gélose (Luria Broth Base-Agar) supplémentée avec l'antibiotique de sélection (100 µg/mL d'ampicilline) puis laissées toute la nuit à 37°C. Le lendemain, un clone est prélevé et ensemencé dans 200 mL de milieu Luria Broth supplémenté de l'antibiotique (100 µg/mL d'ampicilline).

Après 24 h sous agitation (180 tours/minutes, 37°C), la suspension bactérienne est centrifugée (4500 g, 30 min, 4°C) et les plasmides extraits selon les instructions du kit NucleoBond® Xtra Midi Plus (Macherey Nagel). La pureté des ADN extraits et leur concentration sont ensuite déterminées par une lecture de la densité optique à 260 et 280 nm.

IV.1.2. Transfection par lipofection

Les cellules sont co-transfectées par lipofection à l'aide de la *lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific). Brièvement, les cellulesensemencées la veille (400 μ L d'une suspension à 30 000 cellules/mL), sont mises en contact avec un mélange composé de 500 ng de plasmide HRE-pGL3SV40-luciférase ou de plasmide pGL3SV40-luciférase (comprenant la séquence du gène rapporteur Luciférase Firefly) ; de 500 ng de plasmide pRL-TK (comprenant la séquence du gène rapporteur Luciférase Renilla) ; de 1 μ L de lipofectamine et complété à 100 μ L avec la solution d'opti-MEM. Seize heures après transfection, les cellules sont traitées à la deferoxamine (100 μ M) pendant 24 h, rincées au PBS puis lysées par ajout de tampon de lyse (15 min). Enfin l'activité des luciférases est mesurée avec un Luminomètre Centro XS3 LB 960 (Plateforme SFR ICORE). L'activité luciférase relative est calculée selon la formule : signal luciférase firefly / signal luciferase renilla.

IV.2. Expression transcriptomique

IV.2.1. Extraction d'ARN cellulaire

Les ARN totaux des cellules sont extraits à l'aide du kit Nucleospin RNA Plus suivant les instructions du fournisseur (Macherey Nagel). À l'issue de l'extraction, la pureté des ARN extraits et leur concentration sont déterminées par une lecture de la densité optique à 260 et 280 nm.

IV.2.2. Transcription inverse

Les ARN extraits sont convertis en ADN complémentaire (ADNc) en dénaturant pendant 10 min à 65°C, 1 μ g d'ARN dans 10 μ L d'eau. Un mélange réactionnel (mix) composé de 4 μ L de tampon, 50 mM de chlorure de magnésium, 10 nM de désoxyribonucléotides (dNTP), 0,5 mg/ml d'oligoDT, 0,5 μ l de RNAsine et 0,5 μ L d'AMV-RT est ajouté et l'ADNc est synthétisé pendant 1 h à 42°C.

IV.2.3. PCR quantitative

Les ADNc sont amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne quantitative (PCRq) en temps réel sous un volume final de 20 μ L. L'amplification et la mesure de l'intensité de fluorescence est mesurée par le QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole suivant : 3 min à 95°C puis 40 cycles de 3 sec à 95°C et 20 sec à

60°C. L'expression d'un gène étudié est exprimée par rapport à un gène de ménage (Cyclophiline A) et déterminé par la méthode des ΔC_t (*Cycle threshold*). Les amorces utilisées sont dans le **tableau 3**.

Gène	Amorce sens 5'→3'	Amorce antisens 5'→3'
BNIP3	TCCAGCCTCGGTTTCTATTT	AGCTCTTGGAGCTACTCCGT
EPAS1/HIF-2 α	GCATGGACATGAAGTTCACCTAC	CCACTTACTACCTGACCCTTG
PPIA/Cyclophiline A	TATTCCAGGATTCATGTGCCAGG	ACAAGATGCCAGGACCTGTATGC
SART1/HAF	GACAAGTACAGCCGGAGG	CCGTCTCATCCAGTATTCG
SERPINE1/PAI1	AAGACTCCCTTCCCCGACTC	GGCGTGGTGAACCTAGTATAGTT
SOX2	TTGCTGCCTCTTAAGACTAGGA	CTGGGGCTCAAACCTCTCTC
TUBB3/TUJ1	GACCGCATCATGAACACCTTCAG	AGTAGGTCTCATCCGTGTTCTCC
VEGFA	ACTGCCATCCAATCGAGACC	GATGGCTTGAAGATGTACTCGATCT
VIM/Vimentine	GGGAGAAATTGCAGGAGGAG	ATTCCACTTTGCGTTCAAGG

Tableau 3 : Amorces utilisées en RT-qPCR.

IV.3. Expression protéique

IV.3.1. Technique d'immuno-empreinte

Les protéines totales sont extraites dans un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM sodium chloride, 1 % Igepal CA-630 (NP-40), 0,5 % sodium, deoxycholate, 0,1 % sodium dodecyl sulfate, pH 8,0) supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (1 μ g/mL). Après centrifugation (10 000 g, 30 min), les surnageants sont collectés puis dosés à l'aide du kit *BCATM Protein Assay Kit* selon le protocole du fournisseur.

Après ajout de tampon de charge (tampon Laemmli) et dénaturation (95°C, 5 min), les protéines sont séparées par électrophorèse (SDS-*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) en conditions dénaturantes (125 V, 90 min) selon leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide à 8 ou 10 %. Les protéines sont transférées (90 min, 4°C, 400 mA) sur une membrane de polyvinylidène (PVDF) en milieu humide (Tris 24 mM, glycine 192 mM, méthanol 20 %). La membrane est ensuite incubée dans une solution de T-TBS-Régilait 5 % (*Tween Tris Buffered Saline*, Tris 10 mM, NaCl 200 mM, Tween 0,1 %- régilait 5 %, pH 7,4) pendant 1 h puis incubée la nuit à 4°C dans la solution de l'anticorps primaire dilué en T-TBS-Régilait 5 %. Après rinçage en T-TBS, la membrane est mise en contact avec la solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué en T-TBS-Régilait 5 %, pendant 1 h à

température ambiante. La détection se fait à l'aide du kit *Pierce ECL Plus Western blotting substrate* et la quantification du signal grâce au logiciel ImageJ.

IV.3.2. Immunomarquage

Les cellules ou coupes de tissus sont rincées en PBS pour retirer toute trace de solution fixatrice/conservatrice puis incubées 30 min (pour les cellules) ou 2 h (pour les coupes de tissus) dans une solution de PBS (0,5 % triton / 0,1 % tween ; 3 % BSA) à température ambiante. Les cellules ou coupes de tissus sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS (0,5 % triton / 0,1 % tween ; 1 % BSA), la nuit à 4 °C, sous agitation. Après rinçages en tampon PBS (0,5 % triton / 0,1 % tween), les cellules ou coupes de tissus sont placées en présence de l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome (1 h, à température ambiante) dilué dans une solution de PBS (0,5 % triton / 0,1 % tween ; 1 % BSA) et contenant du Hoechst 33342 (10 µg/mL). Les cellules ou les coupes de tissus sont de nouveau rincées avant d'être montées entre lame et lamelle avec une solution d'Aqua-Poly/Mount.

Les anticorps utilisés dans ces deux techniques sont dans le **tableau 4**.

IV.4. Traitement des données

IV.4.1. Analyse d'images

Les photographies à différents grossissements et les mosaïques d'images ont été réalisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Leica DM6000B (logiciel MetaMorph®) et analysées avec le logiciel ImageJ.

IV.4.2. Traitements statistiques

Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm écart-type (ET) et les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica. Les tests statistiques utilisés pour chaque expérience ont été précisés dans les légendes des figures avec un seuil de significativité fixé à 5 %.

Anticorps	Dilution	Fournisseur	Référence
Western Blot			
HAF	1/300	Novus	NBP1-89024
HIF-1 α	1/200	BD biosciences	610959
HIF-2 α	1/200	Novus	NB-100-122
Actine	1/1000	Cell signaling	3700S
Cycline B1	1/200	Santa-cruz	sc-245
Caspase 3 clivée	1/1000	Cell signaling	9661
Immunohistologie et immunocytoologie			
CAIX	1/200	Abcam	ab10470
CD206	1/500	Bio-rad	MCA2235GA
CD68	1/800	Abcam	ab53444
Collagène IV	1/200	Southern biotech	1340-1
HAF	<u>1/200</u>	<u>Santa-Cruz</u>	<u>sc-292462</u>
HIF-1 α	1/200	Santa-Cruz	sc-10790
HIF-2 α	<u>1/300</u> ou 1/200	<u>Santa-Cruz</u> ou Genetex	<u>sc-28706</u> ou GTX30114
Laminine	1/1000	Abcam	ab11575
Pimonidazole	1/50	Hypoxyprobe incorporation	1MAB1
Vimentine	1/1000	Sigma	HPA001762
α -tubuline	<u>1/500</u>	<u>Sigma</u>	<u>T9026</u>
γ H2AX	<u>1/300</u>	Cell signaling	<u>2577</u>

Tableau 4 : Anticorps utilisés en immunomarquage.

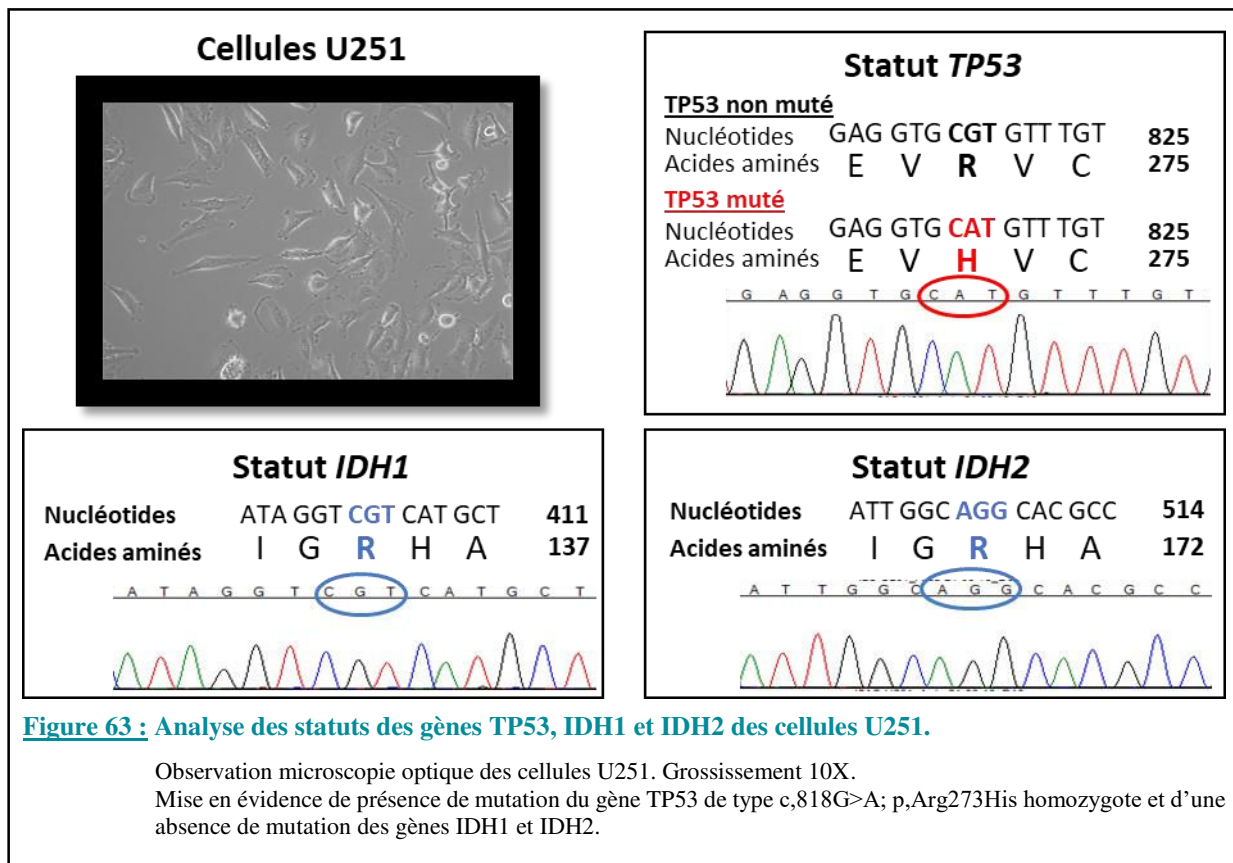
Résultats

Résultats

I. Etude de l'effet de l'extinction de HAF sur la croissance des glioblastomes

I.1. Caractérisation du modèle d'étude

Pour l'ensemble des études réalisées *in vitro* et *in vivo*, nous avons utilisé la lignée cellulaire humaine U251 (issue d'une biopsie de GB d'un homme de 75 ans) puisque ces cellules présentent les principales caractéristiques cytogénétiques retrouvées en clinique pour les GB. En effet, les cellules U251 décrites par Joseph et collaborateurs comme représentative d'un phénotype classique/proneural, présentent une mutation du gène *TP53* sur le codon 273 de l'exon 8 (CGT → CAT), mais pas de mutation des gènes *IDH1* ni *IDH2* (Li *et al.*, 1998; Joseph *et al.*, 2015) (Figure 63). Les données complémentaires issues de la littérature ont permis de montrer que ces cellules présentent également des mutations de p14, p16, PTEN, kRAS et d'EGFR (Pontén & Macintyre, 1968).



In vivo, les tumeurs issues de l'implantation intracérébrale des cellules U251 ont été caractérisées par IRM. Les images T2 pondérée (T2w) de ces tumeurs (**Figure 64 A**) montrent la présence de régions en hypersignal au centre de la tumeur, correspondant à de la nécrose (flèche rouge). En périphérie de la tumeur, un hypersignal est également observé (flèche verte) et correspond à l'œdème tumoral qui peut être lui-même un reflet de l'invasion des cellules tumorales (**Corroyer-Dulmont et al., 2013**).

L'IRM permet également d'appréhender la vascularisation de ces tumeurs et ce, après administration d'un agent de contraste. Grâce à cet agent, il est possible d'évaluer la vascularisation de la tumeur à partir de cartes de volume sanguin cérébral. Sur ces cartes, l'hypersignal observé autour de la tumeur (**Figure 64 B**) traduit une vascularisation soutenue. En revanche, le faible signal observé dans le cœur de la tumeur, au niveau des zones de nécrose, est le reflet d'une faible vascularisation au sein de cette région. En accord avec ces données IRM, une analyse en TEP de la captation du radiotracer FMISO, marqueur spécifique des régions hypoxiques, montre que le cœur de ces tumeurs hypovascularisé est particulièrement hypoxique (**Figure 64 C**).

Ces données d'imagerie ont été confirmées par des analyses immunohistologiques utilisant des marqueurs d'invasion (vimentine, **Figure 64 D**), de vascularisation (RECA, *rat endothelial cell antigen*, **Figure 64 E**), d'hypoxie (pimonidazole, **Figure 64 F**).

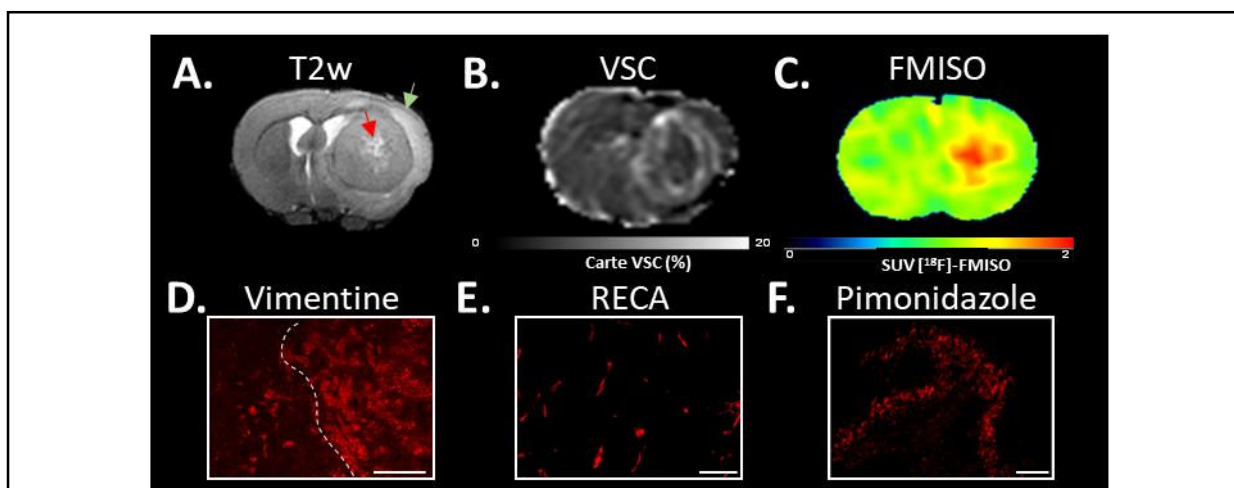


Figure 64 : Caractérisation du modèle orthotopique de cellules U251.

A. et D. Aspects nécrotiques et invasifs par imagerie IRM en T2 pondérée (T2w) et immunomarquage de l'invasion (vimentine). Sont indiqués la zone nécrotique (flèche rouge) et l'œdème tumoral (flèche verte).

B. et E. Vascularisation par reconstitution de carte de VSC après injection de produit de contraste à l'IRM et immunomarquage de la vascularisation (RECA).

C. et F. Aspects hypoxiques par l'accumulation du radiotracer FMISO en imagerie TEP et immunomarquage du pimonidazole. Barre d'échelle : 100 μm .

D'après **Corroyer-Dulmont et al., 2013**.

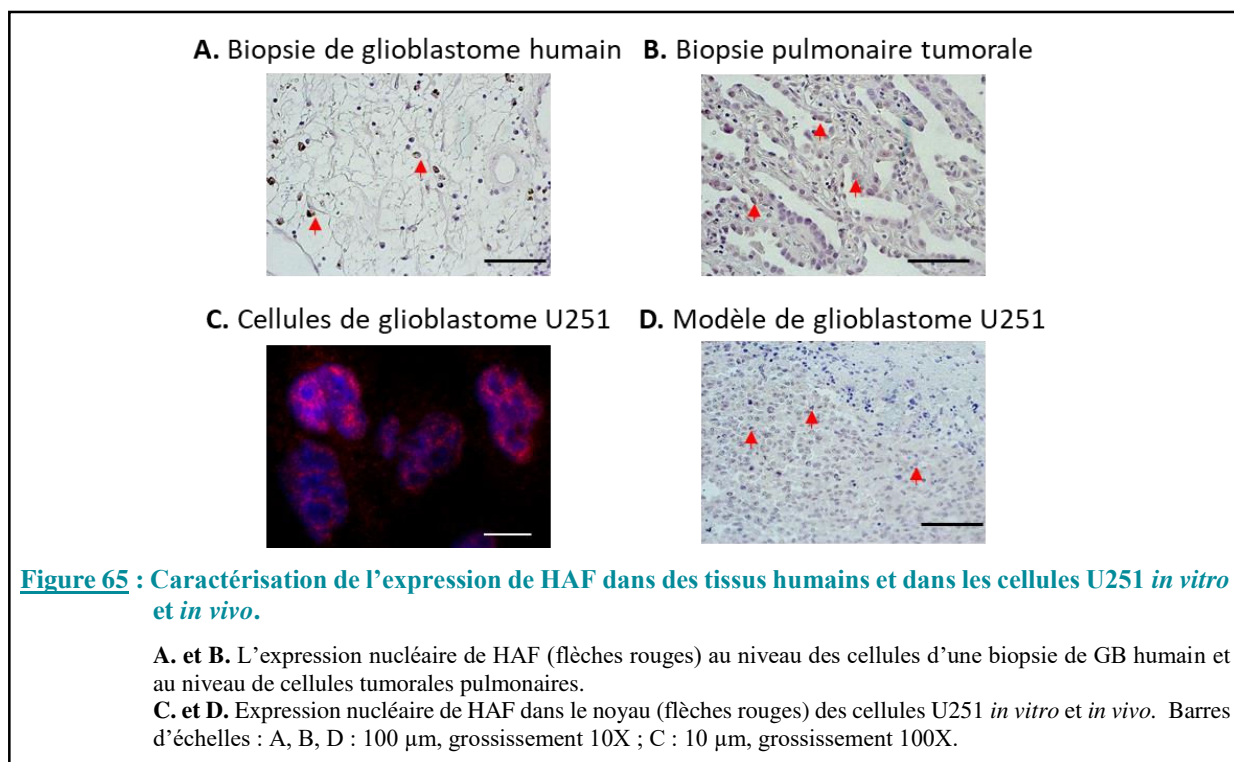
En résumé, les tumeurs issues de l'implantation intracérébrale des cellules de GB U251 sont des tumeurs dont les caractéristiques se rapprochent de celles retrouvées en clinique pour les GB *IDH1 wild-type / TP53* muté (GB *de novo*). Ces tumeurs sont invasives, nécrotiques, hypoxiques et peu vascularisées (Corroyer-Dulmont *et al.*, 2013).

I.2. Expression de HAF dans les glioblastomes

Avant d'engager l'étude visant à établir le rôle de HAF dans la progression des GB, nous avons préalablement vérifié si ce facteur était bien exprimé dans les tumeurs issues de patients et dans les tumeurs issues des cellules U251.

En collaboration avec le service d'anatomopathologie du CHU de Caen (CPP n°DC-2008-588) et la plateforme CMABio, un immunomarquage de HAF a été réalisé sur une biopsie de GB ainsi que sur une biopsie tumorale de poumon utilisée comme témoin positif. Comme le montre la **Figure 65 A**, quelques cellules de GB présentent un immunomarquage pour HAF localisé au niveau du noyau, tout comme les cellules pulmonaires tumorales (**Figure 65 B**). Cet immunomarquage nucléaire est également présent sur les cellules U251 en culture (**Figure 65 C**) ainsi que pour les cellules de la xénogreffe intracérébrale (**Figure 65 D**).

Cette expérience préliminaire nous a ainsi permis d'envisager d'éteindre l'expression de HAF dans les cellules U251 afin d'identifier, à l'échelle préclinique, la contribution de ce facteur dans la progression des GB.



I.3. Validation de l'extinction de HAF dans les cellules U251 par ARN interférence

Les cellules U251 ont été infectées avec des particules lentivirales qui expriment la séquence du shARN de HAF humain de façon à inhiber la traduction de l'ARNm de HAF et ainsi diminuer l'expression de la protéine HAF. Cinq séquences de shARN HAF ont été testées.

Après sélection des cellules par la puromycine, le niveau d'extinction par les différents shARN a été évalué par qPCR pour sélectionner celui pour lequel le shHAF induit la plus forte diminution de l'expression de HAF. En parallèle, des cellules U251 ont été infectées avec une séquence *scrambled* (qui ne reconnaît aucun ARNm humain connu), de façon à disposer de cellules « contrôle » des effets de l'infection virale. Ces cellules ont été dénommées U251-shScr. De fait, l'analyse transcriptomique de HAF ne montre pas de différence d'expression entre les cellules U251 naïves et les cellules U251-shScr (**Figure 66 A**). Les 5 séquences de shARN éteignent le niveau d'expression de HAF, cependant avec des efficacités distinctes. Nous avons retenu la séquence 3 qui éteint à 80 % l'expression de HAF dans les cellules U251 (**Figure 66 A**). Les cellules infectées avec la séquence 3 du shARN ont été retenues pour la suite des expériences et dénommées U251-shHAF. La stabilité de l'extinction de l'expression de HAF dans ces cellules a été vérifiée sur le long terme, après amplification des cellules pendant 10 passages (**Figure 66 B**).

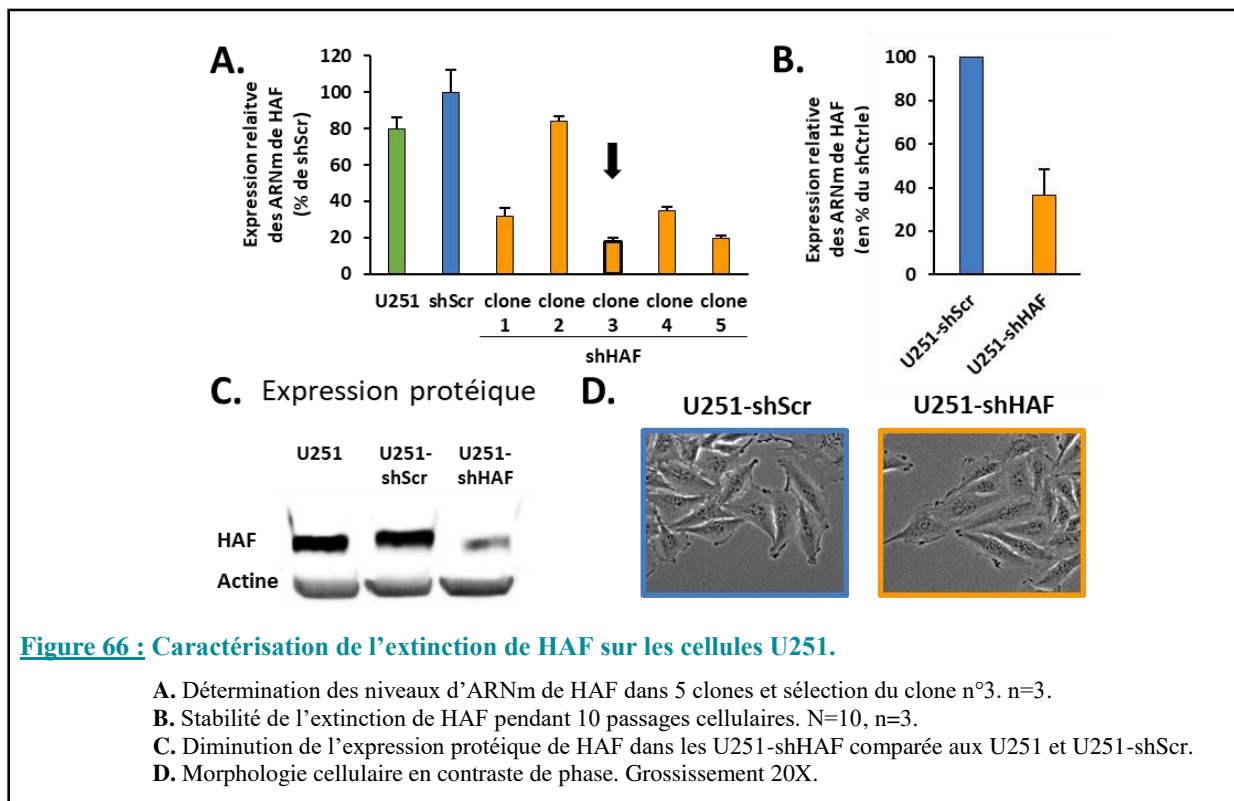


Figure 66 : Caractérisation de l'extinction de HAF sur les cellules U251.

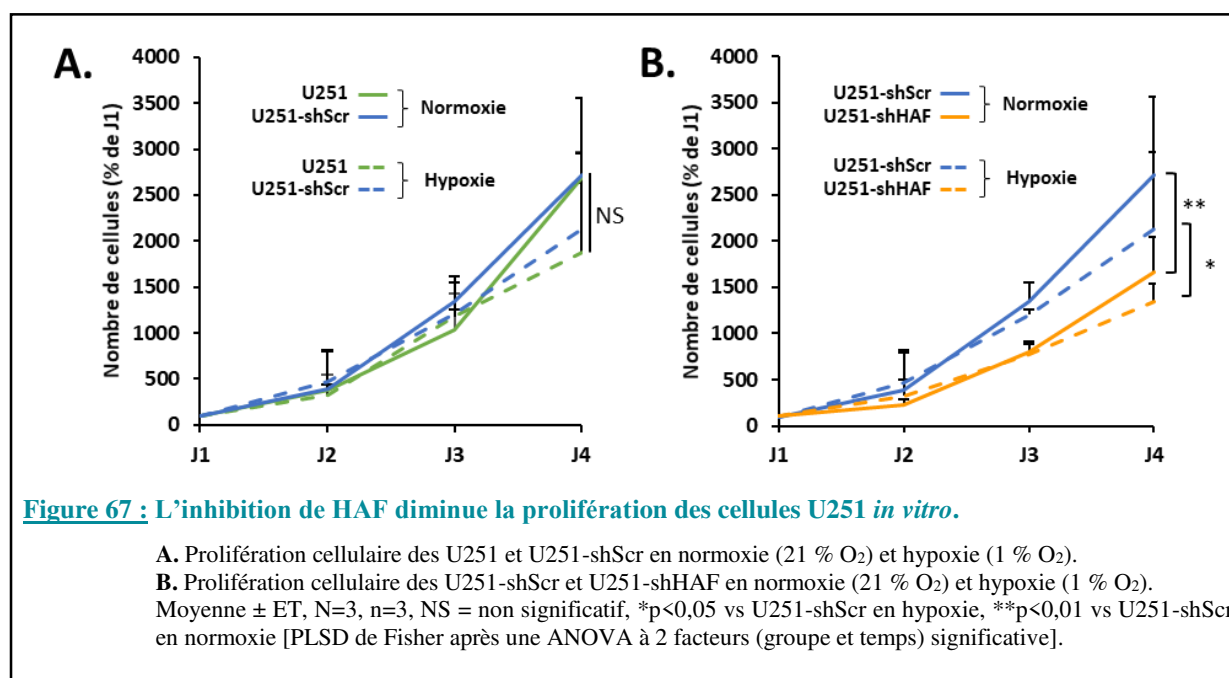
- A. Détermination des niveaux d'ARNm de HAF dans 5 clones et sélection du clone n°3. n=3.
- B. Stabilité de l'extinction de HAF pendant 10 passages cellulaires. N=10, n=3.
- C. Diminution de l'expression protéique de HAF dans les U251-shHAF comparée aux U251 et U251-shScr.
- D. Morphologie cellulaire en contraste de phase. Grossissement 20X.

Par ailleurs, l'extinction de l'expression des ARNm de HAF est confirmée au niveau de l'expression protéique (**Figure 66 C**) et n'induit pas de perturbations morphologiques des cellules (**Figure 66 C**). Nous avons alors recherché quel était l'impact de l'extinction de HAF sur la croissance tumorale par des études *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*.

I.4. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de l'expression de HAF sur la prolifération cellulaire

Historiquement, HAF a été décrit comme étant exprimé dans le noyau des cellules en prolifération et associé au caractère malin de certaines tumeurs, comme par exemple pour les cellules issues de tumeurs de l'œsophage (**Shichijo et al., 1998**). Nous avons alors recherché si l'extinction de l'expression de HAF pouvait influencer la prolifération des cellules U251 et ce, en condition de normoxie (21 % d'O₂) ou d'hypoxie (1 % d'O₂). Cette condition d'hypoxie a été choisie car elle correspond à la condition de pO₂ majoritairement retrouvée au sein des tumeurs des patients souffrant de GB (**Rampling et al., 1994; Koh & Powis, 2012**).

Nous avons tout d'abord vérifié que l'infection virale n'altérait pas la cinétique de prolifération des cellules U251. Ainsi, en normoxie, aucune différence n'a été observée entre les courbes de prolifération des cellules U251 et U251-shScr (**Figure 67 A**). Par ailleurs, en accord avec les données de la littérature, l'hypoxie entraîne un léger ralentissement de la prolifération des cellules U251, effet retrouvé également et de façon comparable pour les cellules U251-shScr (**Richards et al., 2016**) (**Figure 67 A**).



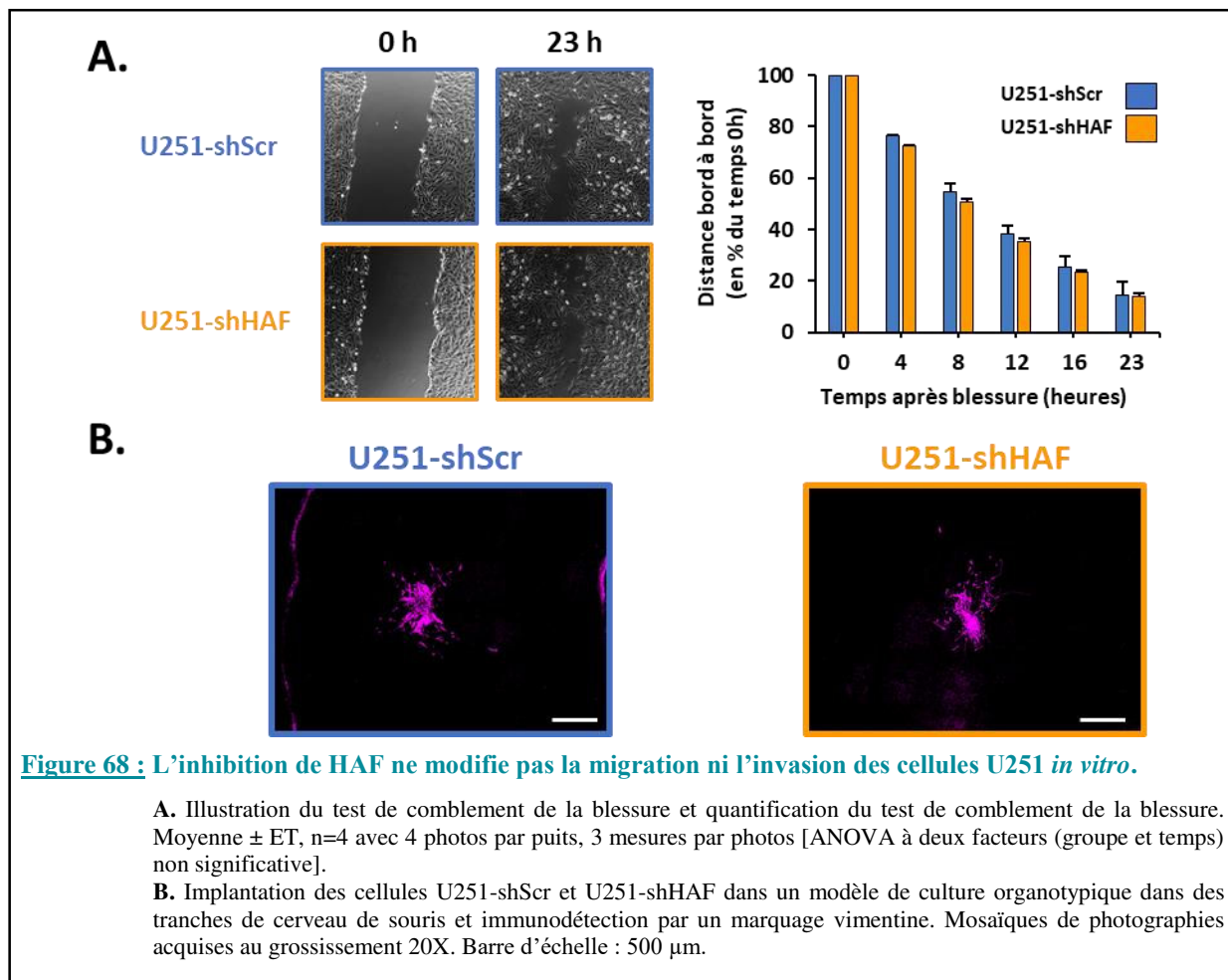
Cette étude préliminaire nous a permis de confirmer que l'infection virale ne perturbe pas les propriétés biologiques des cellules U251. Par conséquent, les expériences suivantes ont été réalisées en utilisant les cellules U251-shScr comme contrôle. La comparaison de la cinétique de prolifération des cellules U251-shHAF aux cellules U251-shScr montre que l'extinction de HAF conduit à un ralentissement significatif de la prolifération des cellules U251 de J2 à J4 que ce soit en normoxie ou hypoxie (**Figure 67 B**).

Les GB étant caractérisées comme des tumeurs ayant un potentiel prolifératif et de fortes capacités d'invasion, nous avons recherché si l'extinction de l'expression de HAF pouvait influencer la migration et l'invasion des cellules U251.

I.5. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de l'expression de HAF sur la migration et l'invasion des cellules de glioblastome

La migration des cellules a été étudiée par le test du comblement de brèche réalisé sur un tapis de cellules en monocouche, lesquelles ont été préalablementensemencées sur un support de collagène I. Lorsque les cellules sont à 80 % de confluence, une blessure est réalisée. Ce test de migration permet d'observer la migration monodirectionnelle des cellules (vitesse et persistance du mouvement dans une direction). Les cellules ont été filmées pendant 23 h (**Figure 68 A**). L'analyse quantitative de cette migration en fonction du temps ne met pas en évidence de différence de comportement entre les cellules U251-shScr et U251-shHAF. Cette expérience a été complétée par un test d'invasion réalisé en implantant les cellules tumorales dans des cultures organotypiques de cerveau de souris (modèle de culture organotypique) afin de se rapprocher au mieux du microenvironnement cérébral. Sept jours après implantation des cellules, les cellules tumorales sont détectées par un immunomarquage de la vimentine permettant ainsi d'évaluer leur capacité d'invasion du parenchyme cérébral. Une illustration représentative de 3 expériences présentée sur la **Figure 68 B** ne montre pas de différence de comportement entre les deux types cellulaires.

De ces expériences réalisées *in vitro*, il semble que la diminution de l'expression de HAF dans les cellules U251 induise un léger retard de prolifération de ces cellules, sans affecter leurs propriétés de migration et d'invasion. Par conséquent, nous avons voulu dans un second temps étudier le comportement de ces cellules *in vivo*.

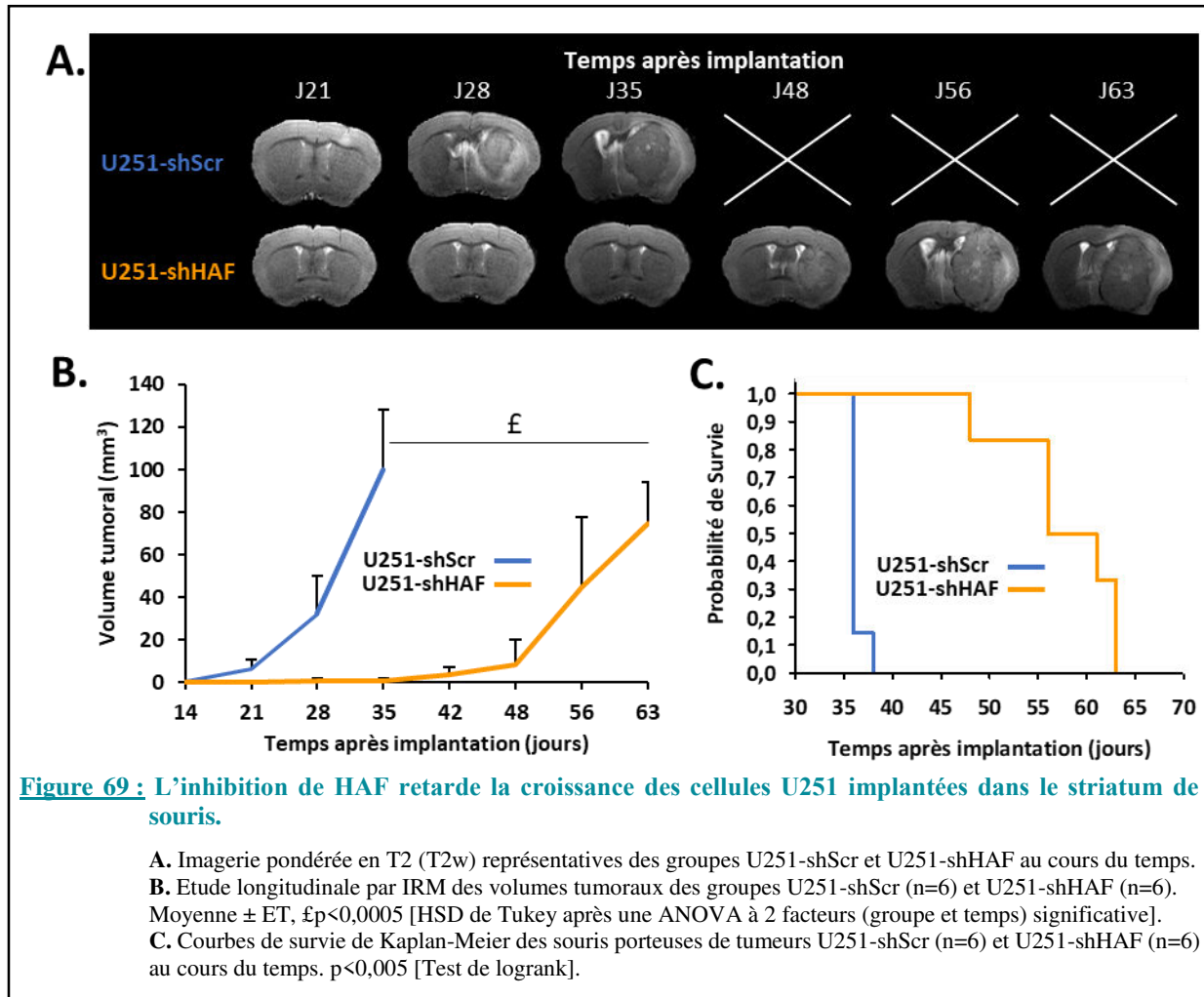


I.6. Etude *in vivo* de l'effet de l'inhibition de l'expression de HAF sur la croissance tumorale et la survie des animaux

Les cellules humaines U251-shHAF et U251-shScr ont été implantées dans le striatum de souris *nude*. Une étude longitudinale par IRM T2 pondérée (T2w) a permis d'évaluer l'effet de l'extinction de HAF sur la progression tumorale (**Figure 69 A**). Les mesures de volume tumoral à partir des données d'imagerie (**Figure 69 B**) montrent que l'extinction de HAF induit un fort retard de croissance de la tumeur d'environ 3 semaines. Par exemple, pour les cellules U251-shHAF, les tumeurs ne sont détectables (environ 10 mm³) que 48 jours post-implantation des cellules, alors les tumeurs U251-shScr débutent leur croissance vers 21 jours (**Figure 69 B**). En revanche, les deux types de tumeurs présentent des caractéristiques similaires en imagerie T2w : un hypersignal autour de la tumeur et dans le cœur de la tumeur témoignant de la présence d'œdème et de zones de nécrose, respectivement (**Figure 69 A**).

En accord avec ces données, l'étude de la survie des animaux montre que celle-ci est augmentée d'environ 67 % puisque la médiane de survie des animaux porteurs de tumeurs

U251-shHAF est de 60 jours alors que celle des animaux porteurs de tumeurs U251-shScr est seulement de 36 jours (**Figure 69 C**). Cette médiane de survie est en accord avec celle obtenue lors d'une étude précédente menée au sein de l'équipe (**Thèse d'Elodie Pérès, 2012**).



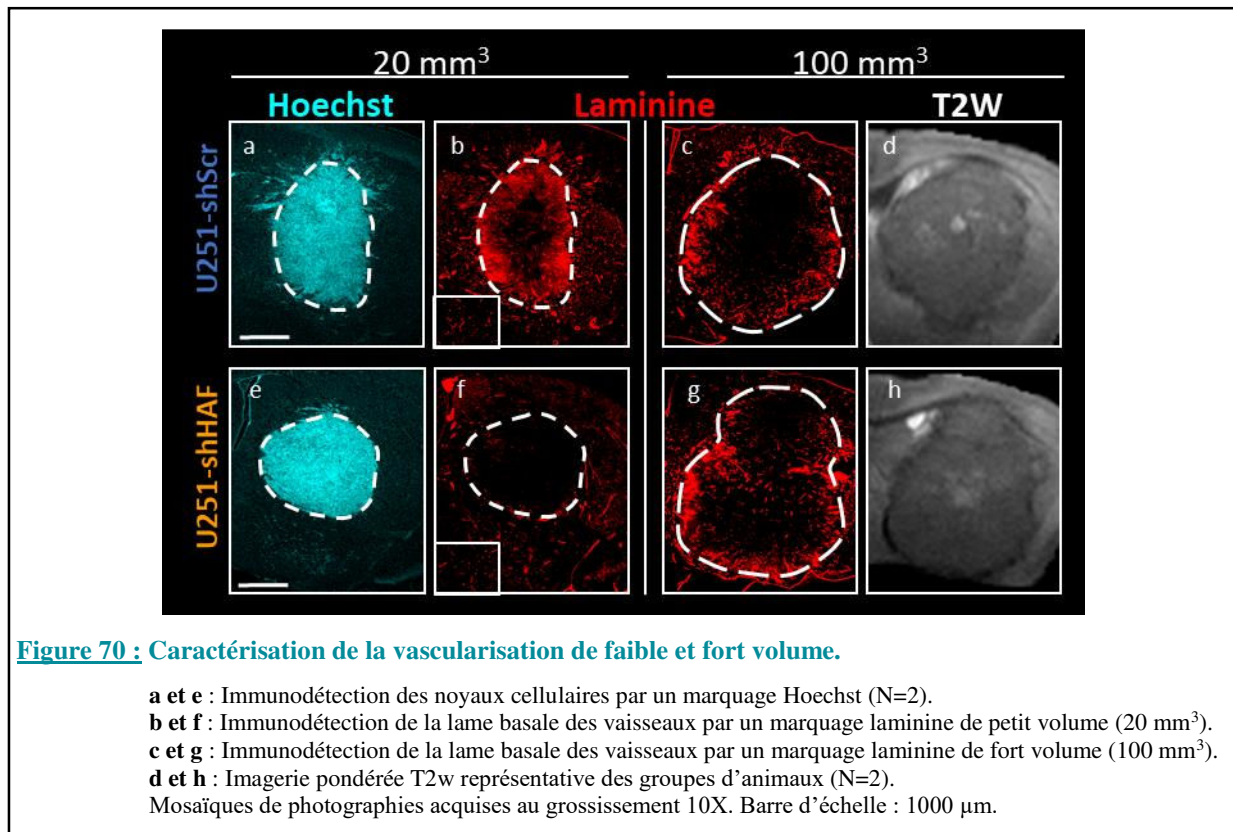
L'extinction de l'expression de HAF dans les cellules de GB entraîne donc un fort retard de la croissance tumorale. Cet effet pourrait être à rapprocher des résultats obtenus *in vitro* montrant un ralentissement de la prolifération des cellules U251-shHAF. Cependant, cet effet est moins marqué *in vitro*, ce qui laisse suggérer qu'il ne serait pas à lui seul à l'origine de l'effet observé *in vivo*. C'est pourquoi nous nous sommes ensuite intéressés au microenvironnement des deux groupes de tumeurs.

I.7. Etude *ex vivo* de l'effet de l'inhibition de l'expression de HAF sur les cellules de glioblastome

L'étude du microenvironnement tumoral a été réalisée *ex vivo* par immunohistologie et s'est focalisée sur le compartiment vasculaire (**Figure 70**) et l'inflammation (**Figure 71**). Ces deux compartiments ont été étudiés pour les tumeurs issues des deux groupes d'animaux et pour des volumes différents : des tumeurs en phase de croissance et de faible volume (environ 20 mm³) et des tumeurs en fin de croissance de grand volume (environ 100 mm³).

La vascularisation tumorale a été étudiée par immunomarquage de la lame basale des vaisseaux avec un anticorps dirigé contre la laminine (**Figure 70 A**, illustration représentative de 3 animaux). Il faut cependant noter que l'anticorps utilisé présente une réaction croisée avec la laminine humaine et de souris. De ce fait, un immunomarquage positif pourra être détecté tant sur les vaisseaux cérébraux que dans le stroma tumoral puisqu'il est connu que les cellules de GB sécrètent de la laminine (McKeever *et al.*, 1989).

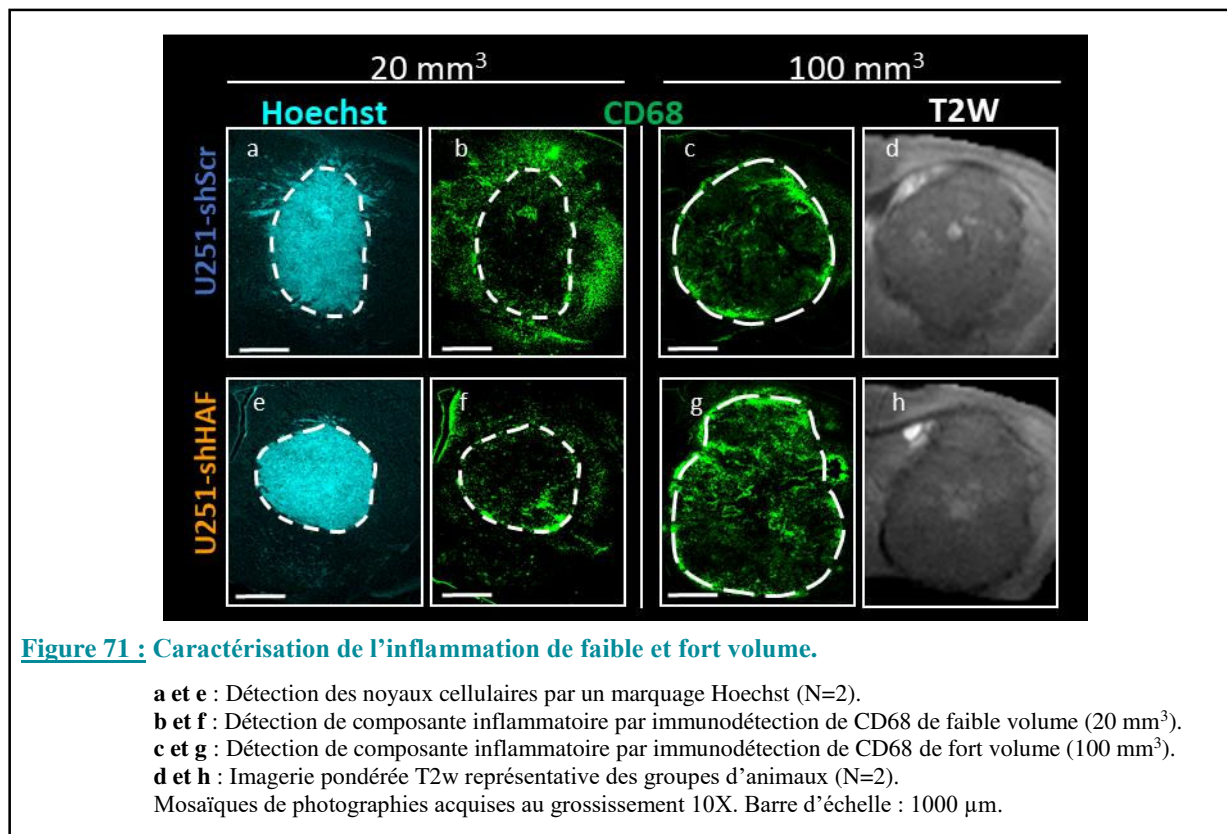
Concernant les tumeurs U251-shScr en début de croissance, un réseau vasculaire dense s'organise autour de la tumeur (**Figure 70 b**). En accord avec les données de la littérature, les vaisseaux de la tumeur présentent des morphologies différentes de ceux présents dans le tissu sain cérébral. Ce réseau vasculaire se caractérise par des vaisseaux pénétrants à large diamètre et dont la structure ne semble pas intègre. En revanche, au cœur de la tumeur, des vaisseaux de structure beaucoup plus courte sont détectés. En fin de croissance, cette couronne vasculaire est cependant moins dense. De plus, les vaisseaux du cœur de la tumeur finissent par disparaître (**Figure 70 c**). Cette faible vascularisation au centre de la tumeur pourrait être à l'origine des zones de nécrose observées en IRM à ce même temps (**Figure 70 d**). Cette même analyse réalisée sur les tumeurs U251-shHAF (**Figure 70 f**) montre une organisation du réseau vasculaire différente de celle des tumeurs U251-shScr lorsque les tumeurs ont un faible volume. En effet, ces tumeurs plus compactes sont entourées d'un réseau vasculaire moins dense et absent dans le cœur de la tumeur. En revanche, pour des forts volumes, l'organisation et l'intensité de la vascularisation tumorale associée aux zones nécrotiques sont comparables à celles décrites pour les animaux du groupe contrôle (**Figure 70 g et h**).



Ces observations sont à rapprocher des travaux de Yancopoulos suggérant que la tumeur en croissance s'accompagne d'une angiogenèse mais que celle-ci évoluera, pour des phases plus tardives, vers une masse tumorale avasculaire suite à une régression des vaisseaux au sein de la masse tumorale (Yancopoulos *et al.*, 2000). Le retard de croissance des tumeurs U251-shHAF pourrait être dû à un déficit de suppléance vasculaire lorsque la tumeur commence à se développer. Toutefois, cette faible vascularisation péri-tumorale pourrait être liée également au caractère moins infiltrant de ces tumeurs. En effet, les cellules U251-shHAF sont plus compactes et semble sécréter moins de laminine que les cellules U251-shScr (**Figure 70 b et f**) ; la laminine, composant de la MEC pouvant servir de support de migration aux cellules tumorales (Kawataki *et al.*, 2007). Cette hypothèse est également étayée par les observations issues de l'étude de la réaction inflammatoire.

La réaction inflammatoire a été étudiée par immunomarquage des cellules CD68⁺ qui permet de détecter l'ensemble des cellules inflammatoires (macrophages et microglie). Comme le montre la **Figure 71 c et g**, lorsque les tumeurs des deux groupes sont en fin de croissance, les cellules inflammatoires sont préférentiellement localisées sur les pourtours mais aussi au cœur de la tumeur et plus spécifiquement autour des régions nécrotiques et hypoxiques (Leblond *et al.*, 2015). En revanche, l'intensité de la réponse inflammatoire semble différente

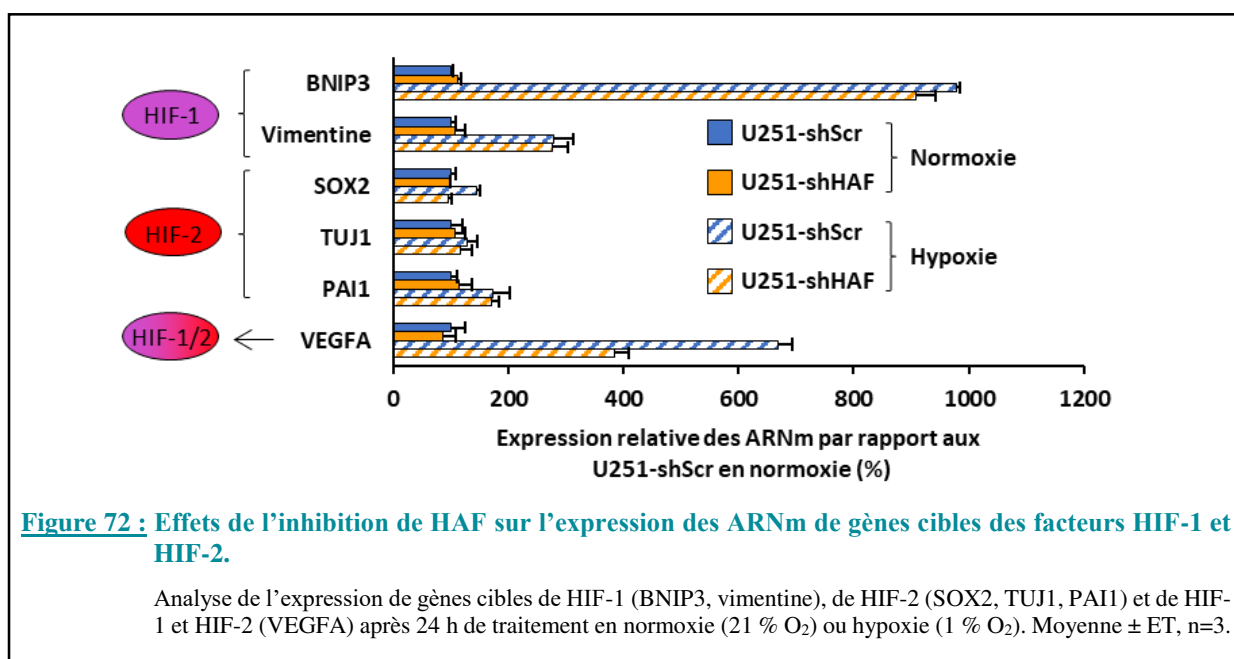
entre les tumeurs U251-shHAF et les tumeurs contrôles en phase de croissance. Cette réaction inflammatoire est moins intense pour les tumeurs U251-shHAF (**Figure 71 b et f**). Comme nous l'avons évoqué pour la vascularisation, la réaction inflammatoire pourrait être moins stimulée pour ces tumeurs qui sont moins invasives que les tumeurs contrôles en début de croissance.



En résumé, cette étude immunohistologique a permis de montrer que l'inhibition de l'expression de HAF dans les cellules U251 influence l'environnement de ces tumeurs en début de croissance. En effet, les tumeurs de faible volume, issues de l'implantation des cellules U251-shHAF, présentent des caractéristiques différentes des tumeurs contrôles : la masse tumorale est plus compacte, non infiltrante et est associée à une faible vascularisation ainsi qu'à une faible réaction inflammatoire. Afin de proposer une hypothèse mécanistique sous-tendant ces effets, nous avons recherché si l'extinction de l'expression de HAF dans les cellules U251 pouvait moduler l'expression de certains gènes à l'origine du comportement de ces cellules, observé *in vivo*. Dans cet objectif, nous avons étudié *in vitro* l'expression transcriptomique de gènes cibles des facteurs de transcription HIFs, lesquels sont modulés par HAF.

I.8. Etude de l'effet de l'inhibition de l'expression de HAF sur l'expression transcriptomique de gènes cibles des facteurs HIFs

L'étude transcriptomique a été effectuée *in vitro* sur les cellules U251-shHAF et U251-shScr placées en condition de normoxie (21 % d'O₂) et d'hypoxie (1 % d'O₂), de façon à mimer l'environnement hypoxique des tumeurs *in vivo*. Au regard du rôle de HAF sur la régulation des facteurs HIFs, parmi les gènes étudiés, nous avons retenu ceux dont l'expression est modulée par HIF-1 (Vimentine, BNIP3), par HIF-2 (TUU1, PAI1, SOX2) ainsi qu'un gène dépendant de l'activation de HIF-1 et HIF-2 (VEGFA) (**Figure 72**). Sur le plan biologique, certains de ces gènes sont impliqués dans le phénotype des cellules tumorales comme SOX2, responsable du caractère souche. TUU1, PAI1 et la vimentine sont des protéines impliquées dans la migration des cellules de GB alors que BNIP3 peut contrôler le processus d'apoptose. De plus, le VEGF sécrété par les cellules tumorales peut contrôler à la fois l'angiogenèse et l'inflammation (Proescholdt *et al.*, 1999).



L'étude de l'expression transcriptomique de ces gènes montre que l'inhibition de l'expression de HAF dans les cellules U251 ne module pas l'expression basale de chacun de ces gènes lorsque les cellules U251-shHAF et U251-shScr sont placées en condition de normoxie. En revanche, de façon attendue, l'hypoxie induit une augmentation d'expression de chacun de ces gènes dans les cellules U251-shScr, cependant avec une amplitude variable. Seule l'expression de TUU1 est faiblement modulée comme nous l'avons préalablement décrit au sein de notre équipe pour ce type cellulaire (Bordji *et al.*, 2014). Cette modulation

d'expression est retrouvée dans les cellules U251-shHAF pour l'ensemble des gènes étudiés à l'exception du VEGF, pour lequel l'extinction de HAF réduit d'environ 50 % le niveau d'expression induit par la condition d'hypoxie dans les cellules U251-shScr.

I.9. Conclusion-Discussion

En résumé, les résultats de cette étude visant à élucider le rôle de HAF dans la progression des GB ont permis de montrer que l'extinction de ce facteur dans les cellules U251 ralentit de façon durable la croissance tumorale, effet associé à une augmentation de la survie des animaux. Cet effet ne semble pas lié à un effet cytostatique ni cytotoxique de ce facteur ou de ses gènes cibles sur les cellules tumorales. Cette hypothèse est sous tendue par les données obtenues *in vitro* pour lesquelles les deux lignées cellulaires présentaient des profils de cycle cellulaire similaires et qu'aucune mort (par apoptose ou nécrose) n'a été détectée. Toutefois, à de faibles volumes (20 mm³), les tumeurs pour lesquelles l'expression de HAF a été réprimée sont moins invasives, moins angiogéniques et moins inflammatoires que les tumeurs contrôles. Cependant, la croissance d'une tumeur conditionnant l'évolution de son environnement, il est difficile de déterminer si ces modifications de la vascularisation et de l'inflammation sont une cause ou une conséquence du ralentissement de la croissance de ces tumeurs.

Cet effet est cependant transitoire. Bien qu'il existe un délai de 3 semaines entre les deux groupes, les tumeurs du groupe U251-shScr et du groupe U251-shHAF finissent par présenter les mêmes caractéristiques : les tumeurs ayant atteint des volumes d'environ 100 mm³ sont nécrotiques, avec un cœur tumoral peu vascularisé, une régression vasculaire péri-tumorale et une réaction inflammatoire intra-tumorale plus intense notamment autour des zones de nécrose. Ces résultats pourraient être dus au fait que nous n'avons pas procédé à une sélection clonale des cellules infectées et donc que la population cellulaire infectée et sélectionnée par l'antibiotique soit hétérogène en terme d'extinction du gène de HAF. Ainsi, au cours du temps, les cellules ayant intégré un faible nombre de copies du plasmide, et donc présentant une répression moins importante de l'expression de HAF, pourraient être plus agressives que les cellules U251-shHAF ayant une forte répression de l'expression de HAF. Ces cellules pourraient alors se diviser plus rapidement et diluer l'effet de l'extinction de HAF, ce qui conduirait à long-terme à des tumeurs présentant les mêmes caractéristiques que les tumeurs U251 contrôles.

Cette étude a été initiée de façon à déterminer si le facteur HAF pouvait contrôler la progression des GB par l'intermédiaire de la régulation des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α . Selon

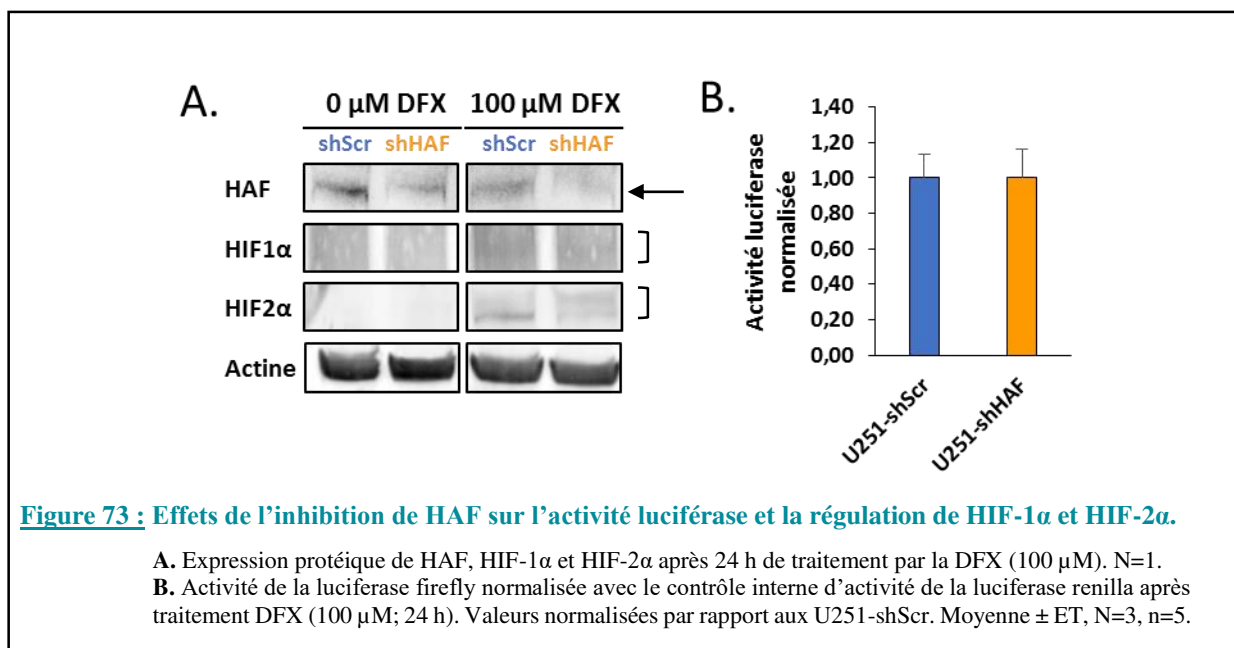
l'hypothèse de Koh *et al.*, HAF permettrait de favoriser l'activation de HIF-2 α au dépend de HIF-1 α dans des conditions d'hypoxie (Koh *et al.*, 2011). Il faut cependant noter que ces auteurs ont formulé cette hypothèse à partir de résultats obtenus sur des cellules de carcinomes rénaux qui présentent une mutation de pVHL. Cette mutation inhibant le processus de dégradation des HIF- α en normoxie conduit à un phénotype dit de « pseudohypoxie ».

Contrairement aux résultats de Koh, les résultats de notre étude ne semblent pas en faveur d'une implication des facteurs HIFs dans l'effet observé suite à l'inhibition de HAF. Plusieurs résultats d'expérience supportent cette hypothèse (Koh *et al.*, 2011). Une étude de l'expression protéique de HIF-1 α et HIF-2 α a été réalisée par immunotransfert à partir des extraits cellulaires totaux et les anticorps recommandés pour cette application (Mandl *et al.*, 2017) (**Figure 73 A**). Les résultats obtenus à partir des extraits protéiques totaux des cellules exposées ou non à la DFX (agent mimant la stabilisation de HIF- α par de l'hypoxie), ne semble pas montrer de différence de signal entre les cellules traitées ou non par cet agent (Sharp & Bernaudin, 2004). L'interprétation de cette observation est certes difficile car le signal obtenu pour les isoformes de HIF est connu comme pouvant être diffus (Berra *et al.*, 2003; Pacary *et al.*, 2006). Toutefois, une analyse quantitative relative de ces résultats (signal HIF-1 α ou HIF-2 α / signal de l'actine correspondant, données non présentées) ne permet pas de détecter de modulation de l'expression protéique de HIF-1 α et de HIF-2 α lorsque les cellules U251-shHAF sont mises en présence de DFX, (**Figure 73 A**) par comparaison aux cellules non traitées. Ces résultats descriptifs et issus d'une expérience représentative sont cependant renforcés par une étude fonctionnelle visant à rechercher l'impact de l'extinction de HAF sur l'activité promotrice de la séquence HRE. Dans cet objectif, les cellules U251-shHAF et U251-shScr ont été transfectées afin d'exprimer le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle de 4 copies de la séquence HRE du promoteur de HIF- α (Pacary *et al.*, 2006). En réponse au traitement à la DFX, les résultats issus de trois expériences, ne montrent aucune différence entre ces deux lignées cellulaires (**Figure 73 B**). Enfin, comme nous l'avons présenté sur la **Figure 72**, les modulations d'expression des ARNm des gènes cibles de HIF-1 α et/ou de HIF-2 α sont identiques pour les cellules U251-shHAF et U251-shScr exposées à une condition d'hypoxie, à l'exception du VEGF (cf. page 126).

Les travaux de Koh a également montré sur des cellules de GB (cellules de la lignée humaine U87) que la surexpression de HAF augmente les niveaux d'expression de marqueurs de cellules souches, en particulier dans la sous-population de cellules flottantes (plutôt que pour les cellules adhérentes). Le développement tumoral, suite à l'injection intracérébrale de ces cellules s'accompagne d'une diminution de la survie des animaux. Ces auteurs proposent que la

surexpression de HAF dans les cellules U87 leur confère un comportement similaire à celui des cellules souches tumorales, c'est-à-dire très agressif.

La divergence entre nos résultats et ceux de l'étude de Koh pourrait s'expliquer par la différence entre les lignées cellulaires utilisées (Koh *et al.*, 2011). En effet, les cellules U251, qui récapitulent les principales altérations cytogénétiques observées chez les patients sont mutées pour le gène *TP53* et arborent une surexpression de l'EGFR, alors que les cellules U87 ne présentent pas ces altérations. *In vivo*, les cellules U251 forment des tumeurs beaucoup plus hypoxiques et invasives que les cellules U87 (Corroyer-Dulmont *et al.*, 2013). Par ailleurs, les stratégies de modification génique dans chacune de ces études sont également différentes. Nous avons opté pour une stratégie d'inhibition d'expression par ARN interférence par des particules lentivirales sur les cellules U251 adhérentes donc différenciées, tandis que dans l'étude de Koh, seules les cellules U87 de phénotype souche ont été modifiées génétiquement pour surexprimer HAF suite à une infection rétrovirale.



Lors de la découverte de HAF, il a été montré que ce facteur se liait au promoteur de l'EPO mais aussi à une séquence en 5' UTR du gène du VEGF et qu'un ARN anti-sens de HAF diminuait, en hypoxie, l'expression des ARNm du VEGF (Gupta *et al.*, 2000). Ainsi, l'effet que nous avons observé pourrait impliquer un tel mécanisme. Cependant, afin de conforter cette hypothèse, il serait nécessaire de doser et comparer les concentrations de VEGF à partir de prélèvements de tumeurs de faible volume issus des deux groupes d'animaux. Cette information permettrait également de statuer sur le mécanisme à l'origine de la faible vascularisation et de la faible inflammation des tumeurs U251-shHAF par rapport aux tumeurs U251-shScr.

Il pourrait donc être proposé que HAF puisse agir indépendamment de son rôle favorisant la transactivation de HIF-2. Cette hypothèse a été également récemment formulée lors d'une étude clinique rétrospective (Tchoghandjian *et al.*, 2016). En analysant des astrocytomes de bas grade, cette équipe a proposé qu'il y aurait une corrélation entre l'expression de HAF et le marqueur de cellules souches SOX2 mais indépendamment de l'expression de HIF-2. Toutefois cette corrélation n'est établie que dans une population d'astrocytomes de bas grade dits « triple négatifs » (IDH non muté, 1p19q non codéleté, l'expression de p53 négative) (Tchoghandjian *et al.*, 2016).

Enfin, nous avons également recherché si l'effet de l'extinction de HAF ne pouvait pas être attribué à son rôle associé au spliceosome (Matsumoto *et al.*, 2006). Rappelons que HAF par ce biais, est impliqué dans la maturation des ARNm de certains gènes dont la sororine, protéine assurant une ségrégation correcte des chromatides (Sundaramoorthy *et al.*, 2014). Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence un tel mécanisme sur les cellules U251-shHAF (données non présentées).

En adoptant une stratégie de blocage de l'expression de HAF, nous cherchions également à appréhender indirectement l'importance de HIF-2 dans la progression des GB. En effet, très peu d'études cliniques se sont attachées à étudier ne serait-ce que l'expression de ce facteur sur les biopsies de patients. A l'échelle préclinique, les données sont également fragmentaires et quelques fois les conclusions issues de ces études sont opposées : certains proposant que HIF-2, en favorisant le statut souche des cellules de GB serait pro-tumoral, tandis que d'autres identifient HIF-2 comme étant anti-tumoral en favorisant l'apoptose de ces cellules (Acker *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009). Afin de renforcer ces connaissances, ce travail s'est poursuivi par l'étude de l'effet de l'extinction de HIF-2 α sur la progression des GB.

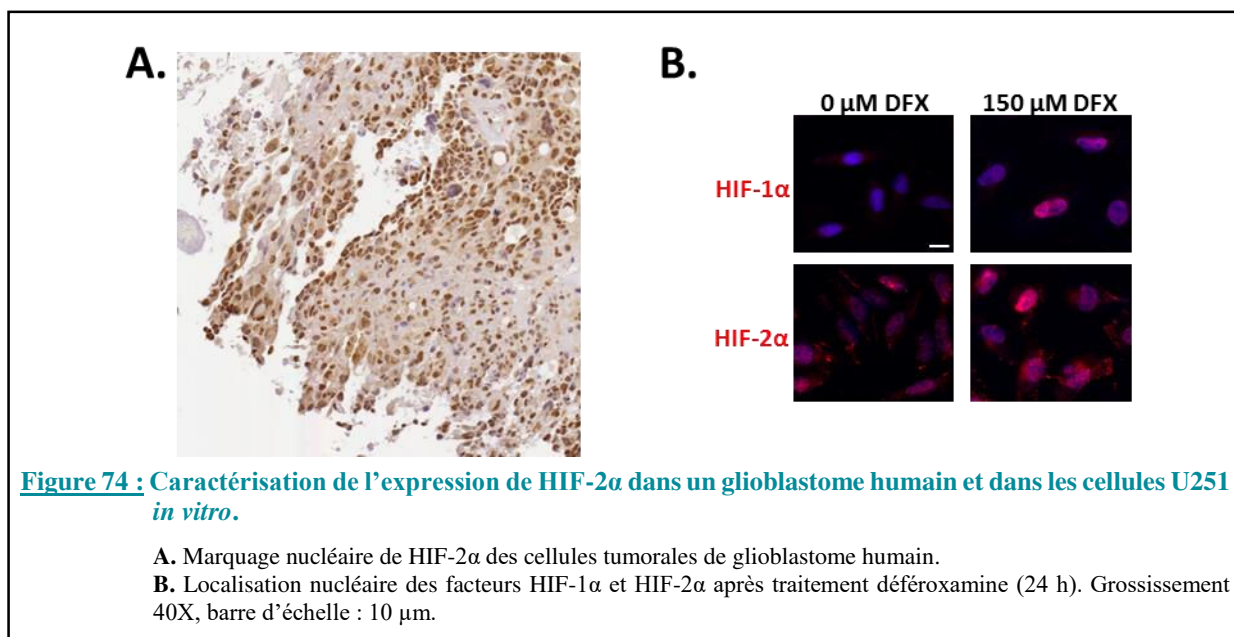
II. Implication de HIF-2 dans la progression des glioblastomes

Certains outils et méthodes utilisés pour cette étude étant identiques à ceux utilisés pour l'étude 1 (implication de HAF dans la progression des GB), les expériences ont été pour certaines moins détaillées.

II.1. Expression de HIF-2 dans les cellules de glioblastome

Très récemment, une étude s'est intéressée à l'expression de HIF-2 α dans les gliomes diffus (grade II à IV) de l'adulte (Renfrow *et al.*, 2017). Dans cette étude, une expression de HIF-2 α est observée dans les GB (n=13/16) mais non détectée dans les gliomes de bas grade (n=4) suggérant que HIF-2 α soit corrélé au grade tumoral et que HIF-2 α puisse être exprimé par les cellules de GB différenciées. Nous avons confirmé cette observation sur une biopsie humaine pour laquelle l'immunomarquage nucléaire de HIF-2 α est détecté dans les cellules de GB (Figure 74 A). Nous avons également montré que ce facteur était exprimé dans les cellules U251 et que celui-ci pouvait se transloquer dans le noyau des cellules exposées à un traitement de DFX. Des résultats similaires ont été observés pour HIF-1 α , utilisé ici comme témoin positif de l'effet de la DFX (Figure 74 B).

Pour la suite des expérimentations, les cellules U251 ont été manipulées génétiquement par ARN interférence de façon à éteindre l'expression de HIF-2 α .



II.2. Validation de l'extinction de HIF-2 dans les cellules U251 par ARN interférence

Après infection des cellules U251 infectées par 5 séquences de shARN distinctes ciblant l'isoforme HIF-2 α humaine, nous avons retenu les cellules infectées avec la séquence 4 de shRNA (**Figure 75 A**), dénommées par la suite U251-shHIF2. Pour ces cellules, la diminution d'expression des ARNm de HIF-2 α d'environ 90 % par rapport aux cellules U251-shScr a été confirmée au niveau protéique. Ainsi, comme le montre la **Figure 75 B**, si le traitement à la DFX induit une augmentation d'expression de HIF-2 α dans les cellules U251-shScr, le signal disparaît pour les cellules U251-shHIF2.

Il est intéressant de noter que quelles que soient les conditions de culture (normoxie ou hypoxie), les cellules U251-shHIF2 adoptent un phénotype fusiforme, à l'inverse des cellules U251-shScr, pour lesquelles ce phénotype n'est observé qu'en condition d'hypoxie (**Figure 75 C**). Ce changement morphologique induit par l'hypoxie est qualifié dans la littérature comme correspondant à un phénotype de type « mésoenchymateux » (*Monteiro et al., 2017*).

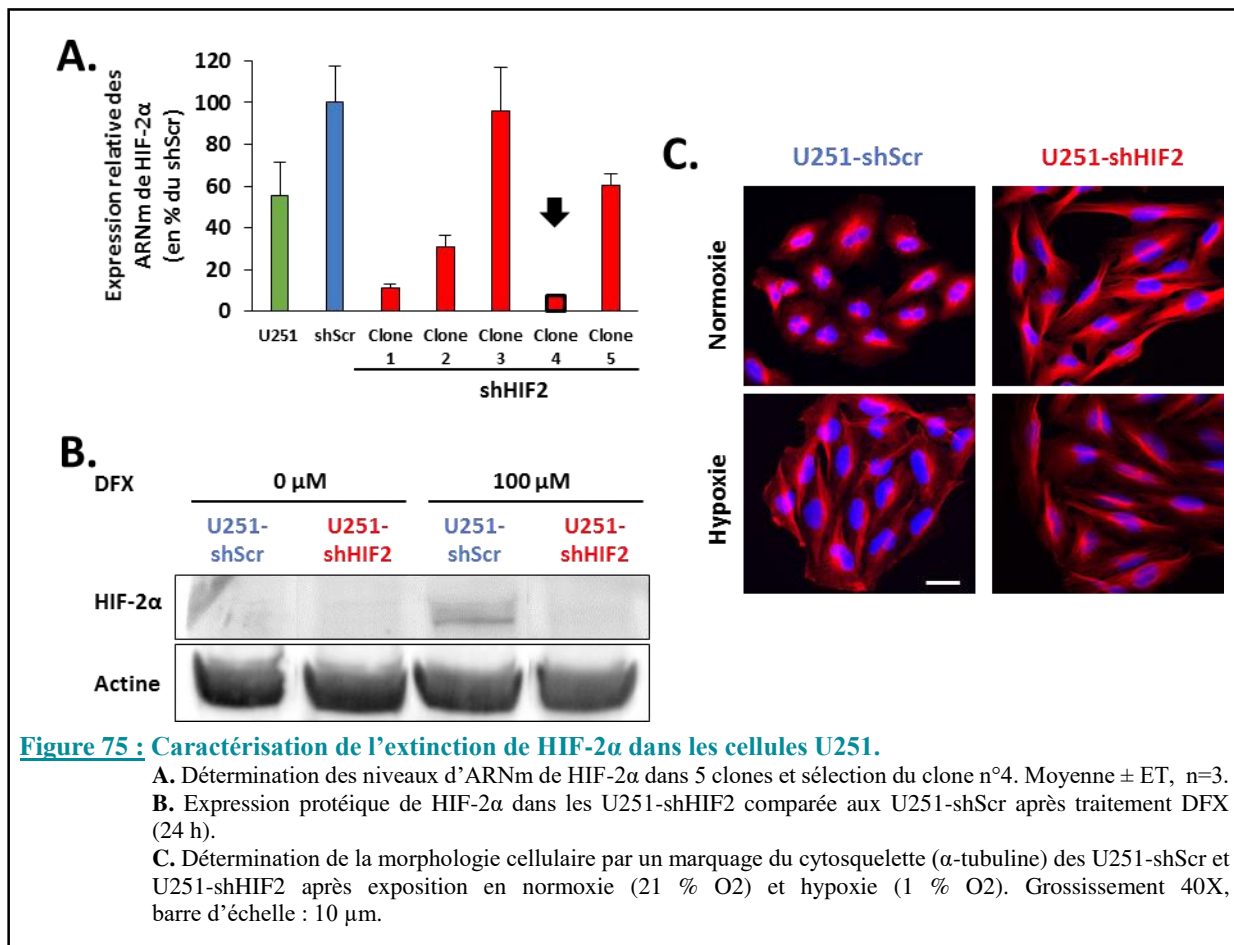
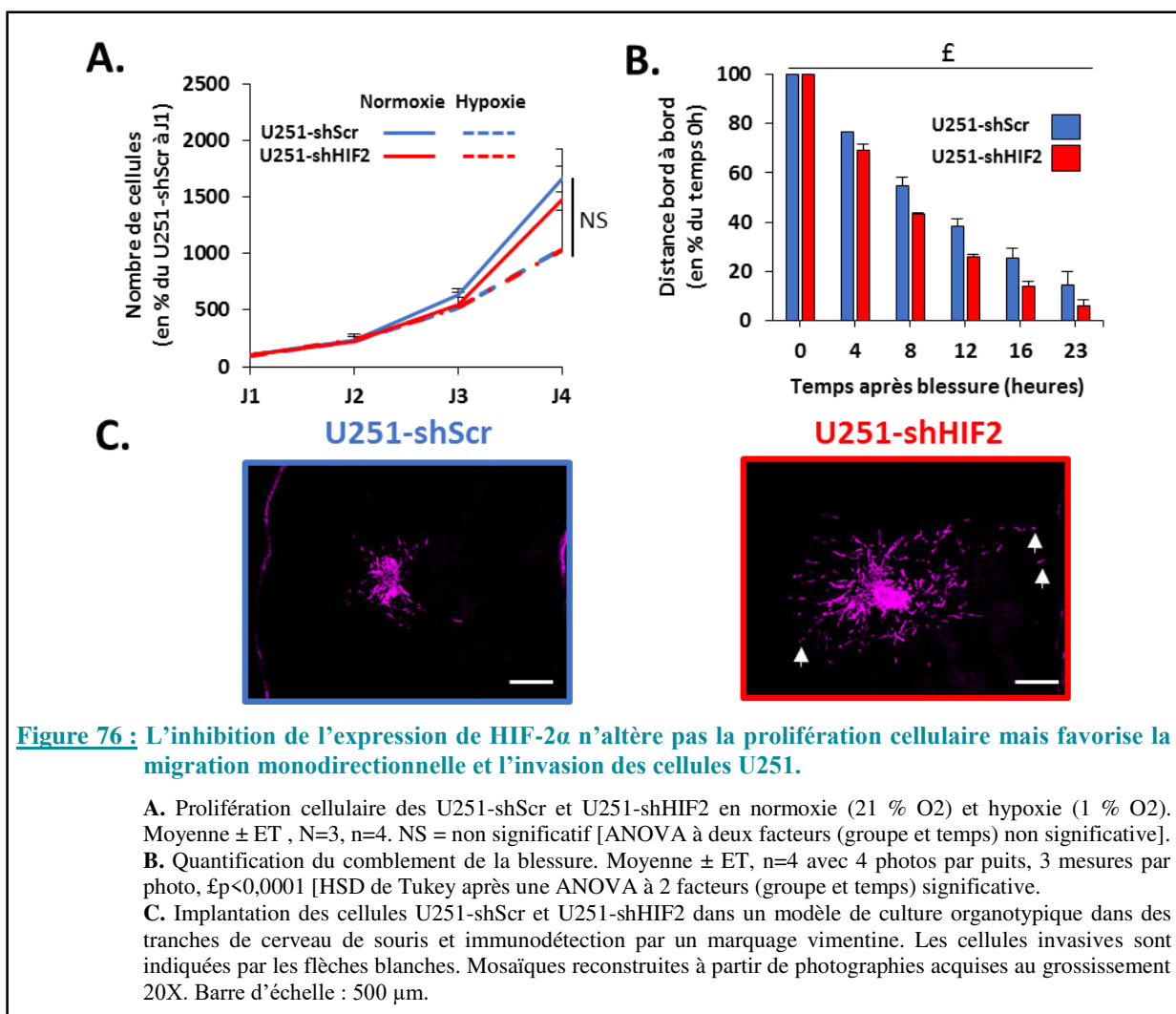


Figure 75 : Caractérisation de l'extinction de HIF-2 α dans les cellules U251.

- A.** Détermination des niveaux d'ARNm de HIF-2 α dans 5 clones et sélection du clone n°4. Moyenne \pm ET, n=3.
B. Expression protéique de HIF-2 α dans les U251-shHIF2 comparée aux U251-shScr après traitement DFX (24 h).
C. Détermination de la morphologie cellulaire par un marquage du cytosquelette (α -tubuline) des U251-shScr et U251-shHIF2 après exposition en normoxie (21 % O₂) et hypoxie (1 % O₂). Grossissement 40X, barre d'échelle : 10 μ m.

II.3. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de l'expression de HIF-2

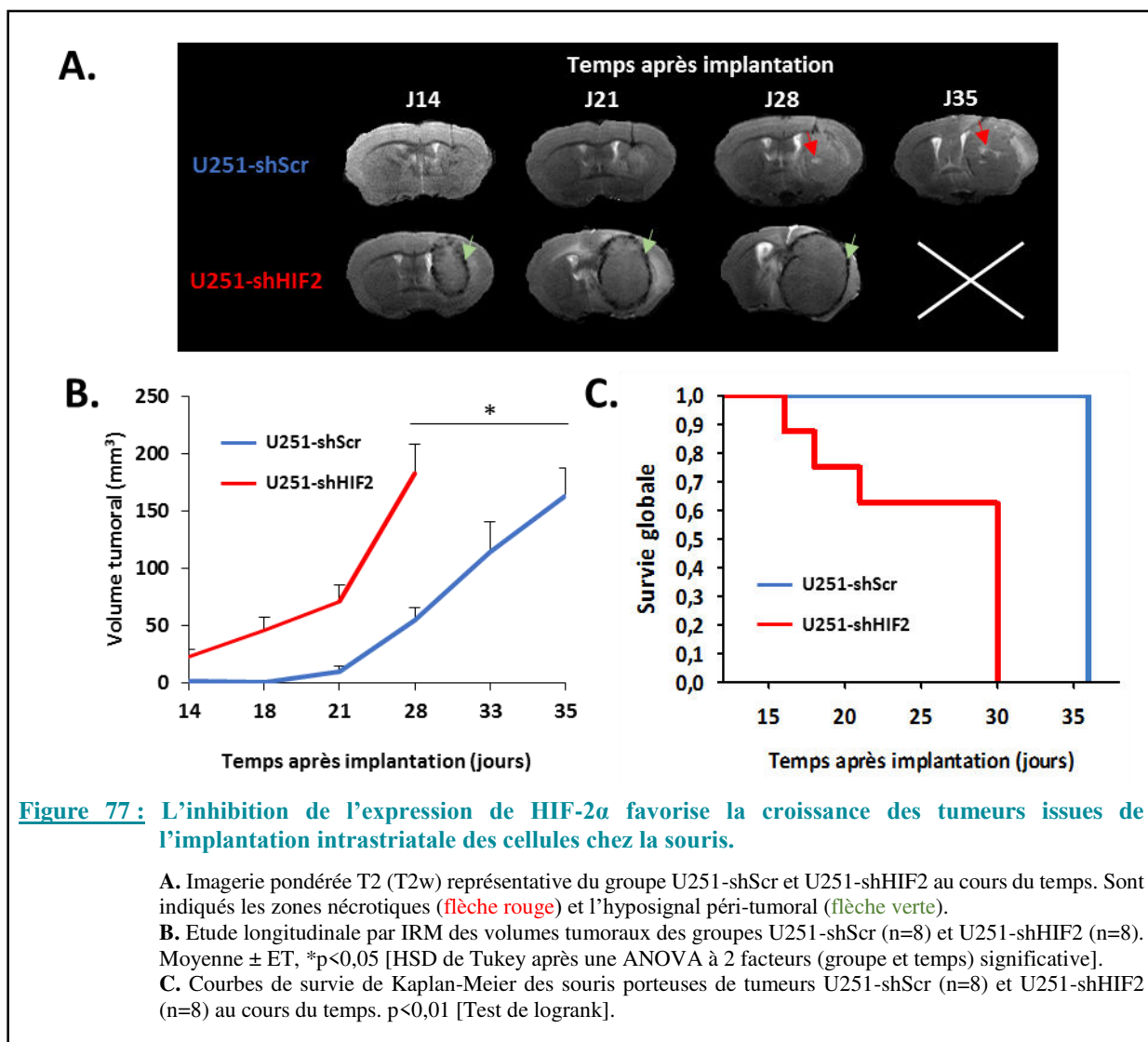
L'extinction de HIF-2 α ne modifie pas la cinétique de prolifération des cellules U251 et ce, que ce soit en normoxie ou hypoxie. En effet, comme le montre la **Figure 76 A**, des profils similaires ont été obtenus pour les cellules U251-shHIF2 et U251-shScr. En revanche, la migration monodirectionnelle est favorisée pour les cellules U251-shHIF2 par comparaison aux cellules U251-shScr (**Figure 76 B**). L'analyse quantitative du comblement de brèche montre un effet significativement différent entre les deux types cellulaires sur l'ensemble des temps étudiés. Les cellules U251-shHIF2 sont également plus invasives lorsqu'elles sont implantées dans un modèle de cultures organotypiques de cerveau de souris (**Figure 76 C**).



En résumé, *in vitro*, les cellules U251-shHIF2 adoptent un phénotype « mésenchymateux » et semblent présenter des caractéristiques migratoires et invasives plus prononcées que les cellules U251-shScr. Nous avons ensuite étudié le comportement de ces cellules *in vivo*.

II.4. Etude *in vivo* de l'effet de l'inhibition de l'expression de HIF-2

Une étude longitudinale de la croissance tumorale effectuée par IRM, nous a permis de montrer des différences majeures entre les tumeurs induites après implantation des cellules U251-shHIF2 et U251-shScr. Les tumeurs U251-shHIF2 sont, en effet, plus agressives que les tumeurs contrôles comme en témoignent les images T2w acquises en IRM et les volumes tumoraux déterminés à partir de ces images (**Figure 77 A et B**). Il est ainsi observé que la croissance des tumeurs U251-shHIF2 est accélérée de 7 jours par rapport aux tumeurs U251-shScr. Ces tumeurs se caractérisent également par un hyposignal péri-tumoral très marqué ; et ce dès J14, du début de la progression tumorale et jusqu'à la fin de la croissance de la tumeur (**Figure 77 A**). En revanche, et contrairement aux tumeurs U251-shScr, aucune zone de nécrose (hypersignal visible au cœur de la tumeur) n'est détectée dans ces tumeurs même lorsqu'elles ont atteint un volume élevé (**Figure 77 A**).



En accord avec l'augmentation de la croissance tumorale induite par l'extinction de HIF-2 α , la survie des animaux du groupe U251-shHIF2 est diminuée, certains animaux étant morts précocement dans un intervalle de 15 à 20 jours après implantation des cellules tumorales (**Figure 77 C**). Dans cette étude, l'ensemble des animaux du groupe contrôle a été mis à mort au temps J35 car ils avaient atteint le point limite en termes de volume tumoral (**Figure 77C**). Concernant l'hyposignal observé à la périphérie des tumeurs U251-shHIF2 sur les images T2w, celui-ci peut être le reflet d'une hémorragie ou d'une inflammation. De façon à identifier ces phénomènes, nous avons réalisé des études par immunohistologie sur des tumeurs de faibles (30 mm³) et forts volumes (150 mm³) pour chacun des deux groupes d'animaux.

II.5. Etude *ex vivo* de l'effet de l'extinction de HIF-2 sur le comportement tumoral et son environnement

II.5.1. Modèle de tumeur orthotopique intracérébrale

II.5.1.1. Etude immunohistologique des tumeurs en début de croissance

L'étude immunohistologique réalisée à faible volume, nous a permis de confirmer les caractéristiques précédemment décrites au cours de **l'étude 1** pour le groupe de tumeurs U251-shScr (**Figure 78**), à savoir : 1/ une vascularisation péri-tumorale robuste pour laquelle les vaisseaux pénètrent vers le tissu tumoral comme le montre l'immunomarquage de la laminine et du collagène IV ; 2/ une réaction inflammatoire plus intense au centre de la tumeur

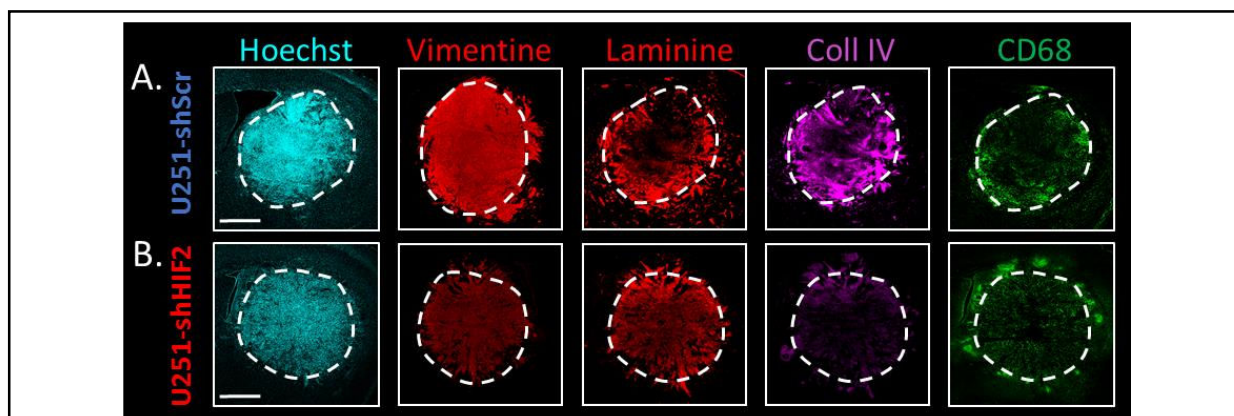


Figure 78 : Etudes immunohistologiques de l'invasion, la vascularisation et de l'inflammation des tumeurs U251 de faible volume.

A. Panel représentatif pour le groupe U251-shScr. Immunodétection de l'invasion (vimentine), de la vascularisation (laminine et collagène IV) et de l'inflammation (CD68) (N=2).

B. Panel représentatif pour le groupe U251-shHIF2. Immunodétection de l'invasion (vimentine), de la vascularisation (Laminine et collagène IV) et de l'inflammation (CD68) (N=2).

Pour les 2 groupes de tumeurs, les noyaux des cellules sont mis en évidence par un marquage au Hoechst (intercalant de l'ADN). Mosaïques reconstruites à partir de photographies acquises au grossissement 10X. Barre d'échelle : 1000 μ m.

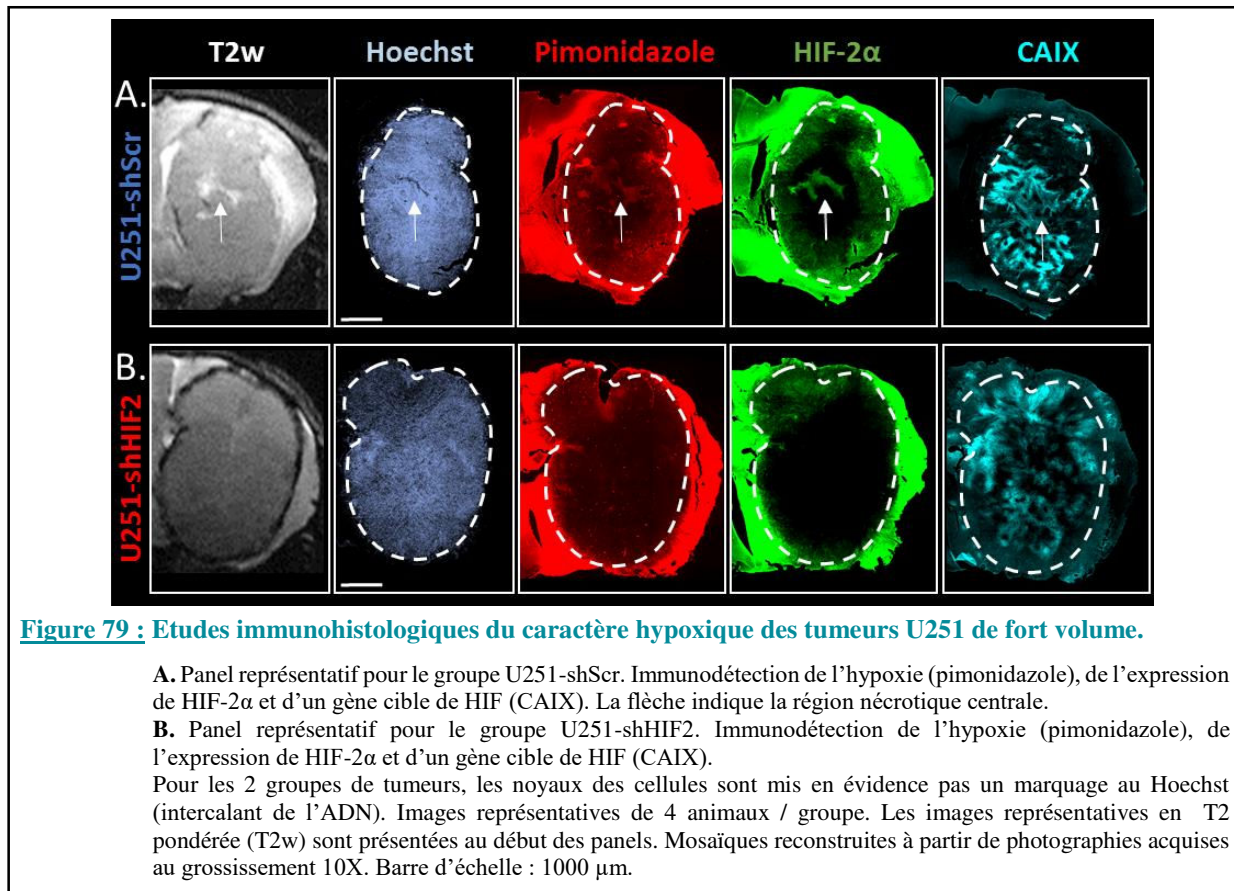
(**Figure 78 A**). Par ailleurs, l'immunodétection de la vimentine met en évidence quelques régions infiltrantes des cellules tumorales en périphérie de la tumeur (**Figure 78 A**).

En revanche, et en accord avec les résultats obtenus *in vitro* évaluant l'invasion sur tranches de cerveau, les tumeurs issues des cellules shHIF2 sont plus invasives comme en témoigne de l'immunomarquage de la vimentine (**Figure 78 B**). De façon intéressante, et contrairement aux tumeurs contrôles, les immunomarquages de la laminine et du collagène IV ne permettent pas de visualiser la vascularisation de ces tumeurs. En revanche, ceux-ci se rapprochent de celui obtenu pour la vimentine (**Figure 78 B**), suggérant que les cellules U251-shHIF2 ont une propension à synthétiser ces facteurs (McKeever *et al.*, 1989). Enfin, contrairement aux tumeurs contrôles, la réaction inflammatoire mise en évidence avec l'anticorps anti-CD68 est très intense en bordure (regroupés en spots) et au cœur de la tumeur (**Figure 78 B**).

II.5.1.2. Etude immunohistologique des tumeurs en fin de croissance

À plus fort volume (150 mm³), une des caractéristiques des tumeurs shHIF-2, mise en évidence en IRM, est l'absence de plages de nécrose au cœur de ces tumeurs contrairement aux tumeurs contrôles (**Figure 79 A et B**). L'analyse immunohistologique des tumeurs U251-shScr révèle que ces zones de nécrose correspondent à des régions hypoxiques (**Figure 79 A**), visualisées après injection sous-cutanée de pimonidazole aux animaux avant le prélèvement des cerveaux puis détection immunologique de ce composé (Corroyer-Dulmont *et al.*, 2013). En accord avec ce résultat, ces régions hypoxiques correspondent aux régions pour lesquelles HIF-2 α est exprimé (**Figure 79 A**). Par ailleurs, au cœur de ces tumeurs contrôles, une forte expression de l'anhydrase carbonique CAIX, gène cible de HIF-1 et HIF-2, est également retrouvée, notamment à proximité des régions nécrotiques (**Figure 79 A**) (Lee & Simon, 2015).

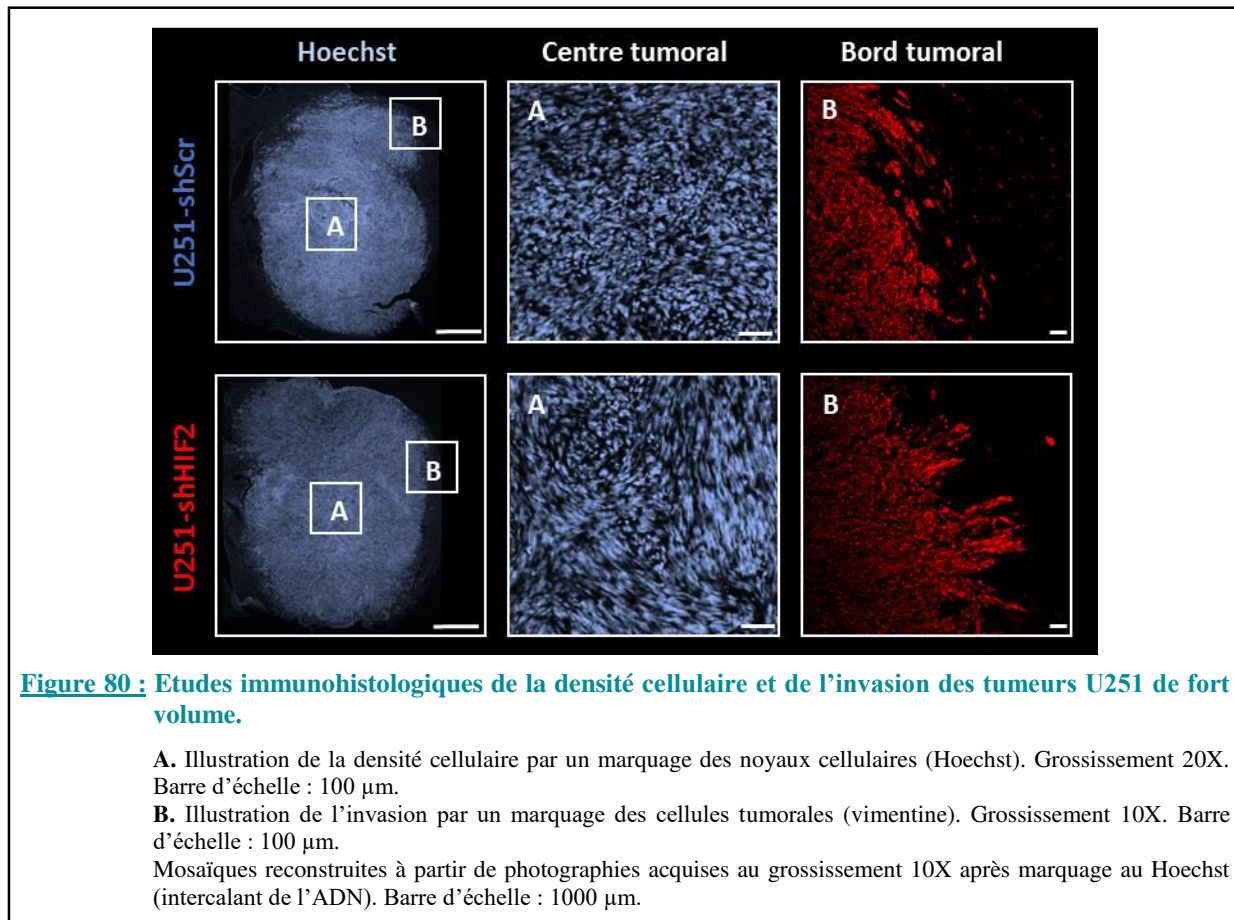
En revanche, concernant les tumeurs U251-shHIF2 (**Figure 79 B**), les observations obtenues pour ces trois immunomarquages sont différentes. Tout d'abord, nous avons confirmé que l'expression de HIF-2 était bien éteinte dans ces cellules tumorales sur le long terme puisqu'aucun signal n'est détecté avec l'anticorps anti-HIF-2 α sur les tumeurs prélevées 30 jours post-implantation intracérébrale des cellules. Nous confirmons également les données obtenues en IRM (**Figure 79 B**) sur l'absence de nécrose dans les tumeurs U251-shHIF2 puisqu'aucun signal hypoxique n'est détecté par l'immunomarquage du pimonidazole. Cependant, un immunomarquage de la CAIX est observé mais celui-ci est distinct des tumeurs contrôles. En effet, l'expression de la CAIX est plus faiblement détectée dans le cœur de la tumeur mais plus marqué et diffus au niveau des régions invasives de la tumeur (**Figure 79 B**).



En résumé, en accord avec les données macroscopiques de l'IRM, les tumeurs issues de l'implantation des cellules U251-shHIF2 présentent des caractéristiques microscopiques particulières. Par comparaison aux tumeurs contrôles, ces tumeurs semblent plus invasives comme le montre l'immunomarquage à la vimentine observé à plus fort grossissement : les cellules tumorales s'orientent et envahissent de façon unidirectionnelle le parenchyme cérébral vers le cortex contrairement aux cellules tumorales contrôles qui s'organisent de façon concentrique à la tumeur (**Figure 80 B**).

Par ailleurs, le marquage des noyaux de ces cellules au Hoechst permet d'apprécier la densité cellulaire au cœur de la tumeur. Comme le montre la **Figure 80 A**, même pour de forts volumes, la densité des cellules U251-shHIF2 est plus faible que celle des cellules U251-shScr. Il peut être également noté que les cellules U251-shHIF2 fusiformes s'organisent « en volutes » en ménageant autour d'elles un espace péri-cellulaire plus important que les cellules U251-shScr (**Figure 80 A**). Cette différence de densité pourrait expliquer l'absence de régions hypoxiques au sein des tumeurs shHIF2.

L'analyse par IRM a fait également apparaître un hyposignal très prononcé dans la région péri-tumorale qui pourrait être le reflet d'une forte vascularisation ou d'une inflammation. Nous avons caractérisé plus en détails chacun de ces compartiments.



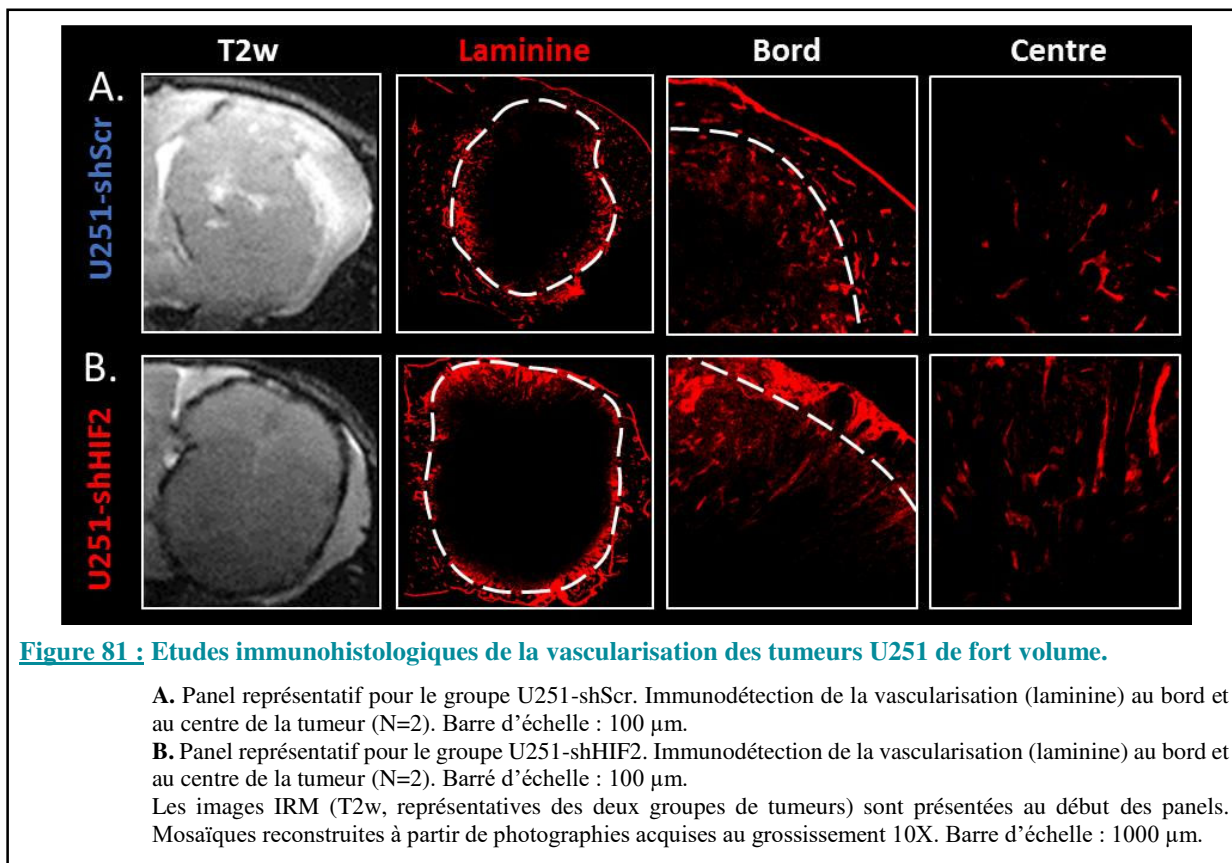
II.5.1.3. Etude du microenvironnement tumoral des xénogreffes intracérébrales

II.5.1.3.1. Caractérisation de la vascularisation

La vascularisation cérébrale a été étudiée par immunomarquage de la laminine pour les deux groupes de tumeurs. A fort volume, la vascularisation intra-tumorale est quasi-absente et les quelques vaisseaux présents ont des structures anarchiques (**Figure 81**). Cette observation est en accord avec l'hypothèse de Yancopoulos et les travaux antérieurs du laboratoire proposant que les vaisseaux régressent au cœur des tumeurs en fin de croissance (*Yancopoulos et al., 2000; Valable et al., 2009*). En revanche, ce réseau vasculaire est plus marqué dans la zone péri-tumorale mais l'organisation de ces vaisseaux est différente entre les tumeurs U251-shScr et U251-shHIF2. Pour le groupe de tumeurs contrôles, les vaisseaux s'organisent de façon concentrique à la tumeur (**Figure 81 A**), alors que pour les tumeurs U251-shHIF2, les

vaisseaux pénètrent plus en profondeur la tumeur (**Figure 81 B**). Par ailleurs, à ce stade de croissance, il semblerait que la tumeur coopte les vaisseaux de la surface corticale.

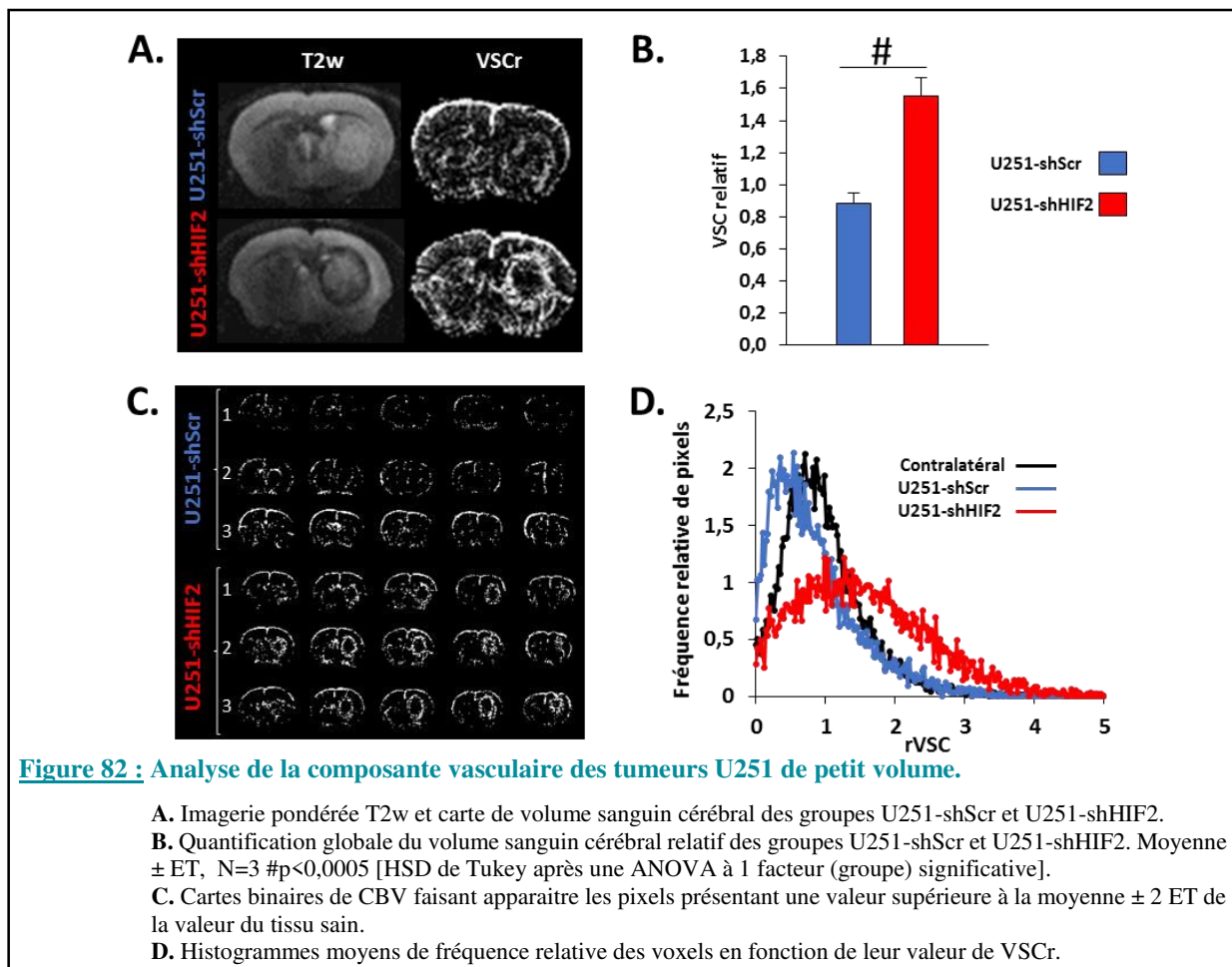
Pour ces tumeurs, l'organisation de la vascularisation péri-tumorale peut être rapprochée de l'orientation de la migration des cellules tumorales. En effet, en accord avec les données de la littérature, les résultats de cette étude immunohistologique suggèrent que les cellules tumorales migrent préférentiellement le long des vaisseaux, notamment ceux de l'espace sous-pial (Louis, 2006) (**Figure 11**). Ainsi, pour les tumeurs U251-shScr, qui présentent quelques plages de cellules tumorales migrant de façon concentrique à la tumeur, les vaisseaux péri-tumoraux sont organisés de façon parallèle à la tumeur. Pour les tumeurs U251-shHIF2, les cellules tumorales migrent vers le cortex, alors que les vaisseaux péri-tumoraux plongent vers le cœur tumoral.



En comparant les images obtenues en IRM T2w et celles obtenues en microscopie à fluorescence, l'hyposignal T2 observé pour les tumeurs U251-shHIF2 pourrait être le reflet d'un apport sanguin plus important acheminé par cette vascularisation péri-tumorale. De façon à renforcer cette hypothèse, nous avons mené une expérience complémentaire en utilisant une imagerie IRM qui permet de caractériser les propriétés de cette vascularisation, notamment à

partir des données quantitatives du volume sanguin cérébral (VSC) (Valable *et al.*, 2009; Corroyer-Dulmont *et al.*, 2013).

Dans ce but, nous avons utilisé une méthode IRM de perfusion à l'équilibre basée sur l'utilisation d'un agent de contraste le P904 (Guerbet Research). Cet agent de contraste composé de particules de fer (*USPIO ultra small particules iron oxyde*), a un poids moléculaire et une rémanence vasculaire élevés. Sur ces propriétés, il est possible d'obtenir une mesure du VSC, à partir des modifications du contraste obtenu entre l'image réalisée avant puis après injection de produit de contraste (imagerie T2*). A partir de ces données, des cartes de VSC peuvent être générées (Figure 82 A). Des valeurs de VSC relatif (VSCr) au sein de la tumeur sont obtenues en ayant reporté sur l'imagerie T2*, une région d'intérêt (ROI) qui correspond à la tumeur identifiée à partir de l'imagerie T2w. Cette même ROI est reportée au niveau du striatum contralatéral sain. Ainsi, le ratio VSC tumeur/tissu sain calculé correspond au VSCr (Figure 82 B). Cette expérience a été effectuée sur des tumeurs de petits volumes puisque cet hyposignal T2 est visible dès le début de la croissance des tumeurs U251-shHIF2.



Comme le montre les cartes de VSC présentées sur la **Figure 82 A**, et en accord avec notre hypothèse, les tumeurs U251-shHIF2 présentent des valeurs de VSC élevées dans la région péri-tumorale qui correspond à l'hyposignal détecté sur l'imagerie T2w. En revanche, cette augmentation des valeurs de VSC dans la zone péri-tumorale n'est pas présente pour les tumeurs U251-shScr (**Figure 82 A**) et ceci corrobore également l'absence d'hyposignal sur l'imagerie T2w. L'exploitation quantitative des données de cartes de VSC montre que le VSCr des tumeurs U251-shHIF2 est significativement supérieur à celui des tumeurs contrôles.

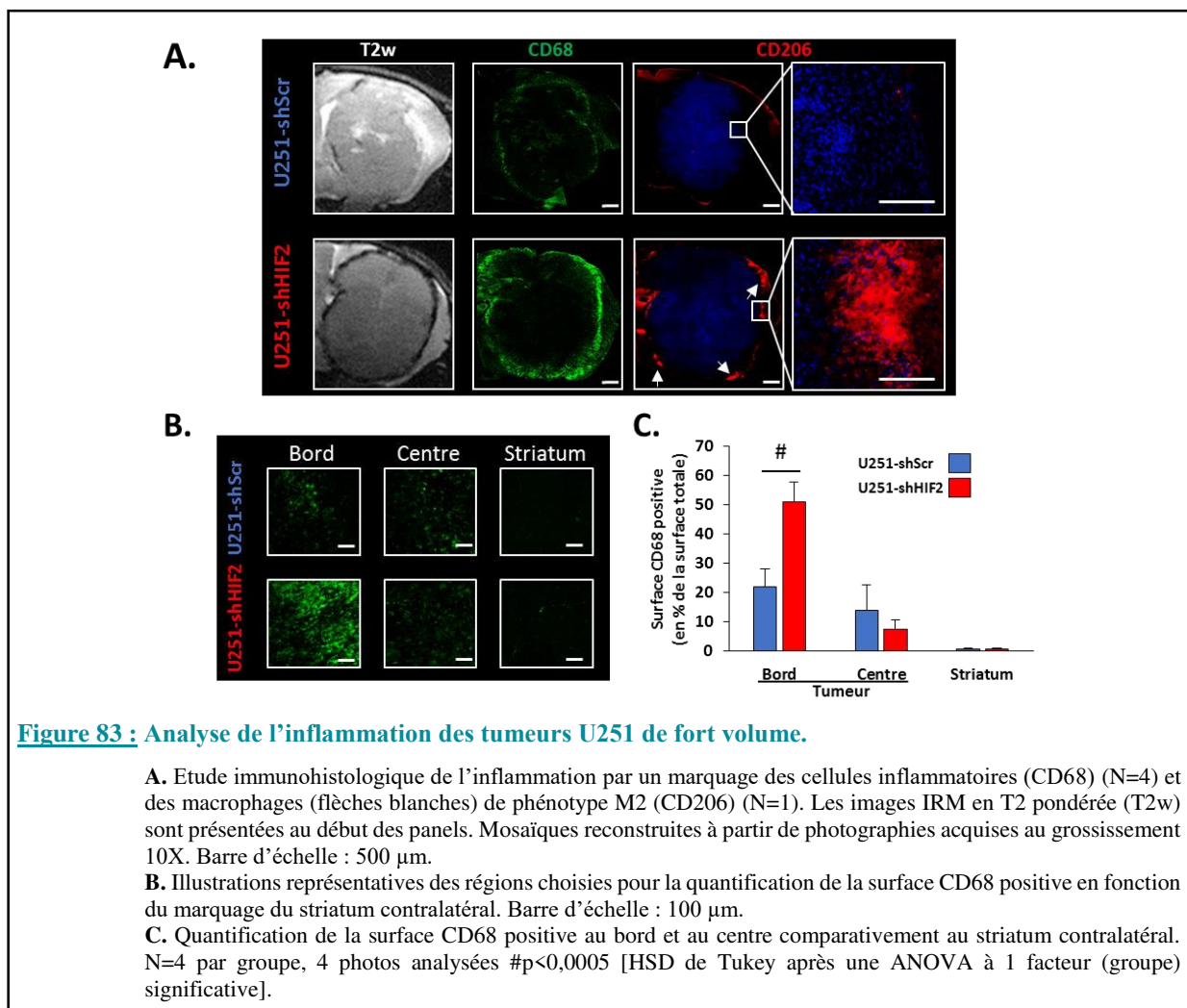
Afin de renforcer ces données, une exploitation quantitative plus fine a été réalisée (**Figure 82 C et D**). Pour cela, nous avons généré les histogrammes de distribution relative des voxels à partir des cartes de VSCr obtenues pour trois animaux par groupe de tumeur. Cette distribution a été reportée pour chacun des groupes de tumeurs et comparée à celle caractéristique du tissu sain. Comme le montre le graphique, et ce, de manière attendue, l'histogramme du tissu sain est centré sur la valeur de 1. Pour les tumeurs U251-shScr, le profil de distribution est décalé vers la gauche du profil obtenu pour le tissu sain (striatum controlatéral) (**Figure 82 D**). Ces résultats suggèrent que les tumeurs contrôles sont moins bien vascularisées, en accord avec une altération des propriétés morphologiques des vaisseaux tumoraux. En revanche, pour les tumeurs U251-shHIF2, le profil de distribution du VSCr se décale à droite par comparaison au profil du tissu sain.

En résumé, en début de croissance, les tumeurs U251-shHIF2 bénéficient d'un réseau vasculaire péri-tumoral fonctionnel qui délivre un VSC plus important que pour les tumeurs contrôles. L'hyposignal détecté sur les images T2w (**Figure 82 A**) serait donc probablement dû à cet afflux de volume sanguin. Toutefois, comme nous l'avons évoqué précédemment, il pourrait être également le reflet d'une réaction inflammatoire. Nous avons donc recherché si tel était le cas.

II.5.1.3.2. Caractérisation de l'inflammation

La réaction inflammatoire a été étudiée en identifiant les cellules exprimant l'antigène CD68, marqueur présent sur les macrophages et les cellules microgliales. Comme illustré sur la **Figure 83 A et B**, l'immunomarquage CD68 souligne l'existence d'une forte réaction inflammatoire péri-tumorale pour les tumeurs U251-shHIF2 par comparaison aux tumeurs contrôles. L'analyse quantitative confirme cette observation avec 22 % de surface en péri-tumoral CD68 positive pour les tumeurs U251-shScr contre 51 % pour les tumeurs

U251-shHIF2 (**Figure 83 C**). Ainsi, l'hyposignal détecté en IRM T2w pourrait être dû à un flux sanguin important et/ou à cette réaction inflammatoire. Nous avons émis l'hypothèse qu'à ce stade de croissance tumorale, l'inflammation pourrait, par le biais de la présence de macrophages M2, participer à l'angiogenèse péri-tumorale. En effet, comme nous l'avons mentionné en introduction, ce phénotype M2 est décrit comme étant pro-angiogénique (Goswami *et al.*, 2017). De fait, en utilisant le marqueur CD206 pour identifier les macrophages M2, nous avons détecté une plus forte expression de ces macrophages dans la région entourant les tumeurs U251-shHIF2 que pour les tumeurs U251-Scr (**Leblond *et al.*, 2015**) (**Figure 83 A et B**).



La réaction inflammatoire semble donc se relocaliser au cours de la croissance tumorale. En effet, pour les deux groupes de tumeurs en début de croissance (**Figure 78**), les cellules CD68⁺ se répartissent majoritairement dans le tissu tumoral, pour se concentrer en péri-tumoral pour des tumeurs de volume plus élevé (**Figure 83 A**). A ce stade, cette réaction inflammatoire particulièrement prononcée pour les tumeurs U251-shHIF2 serait probablement un des

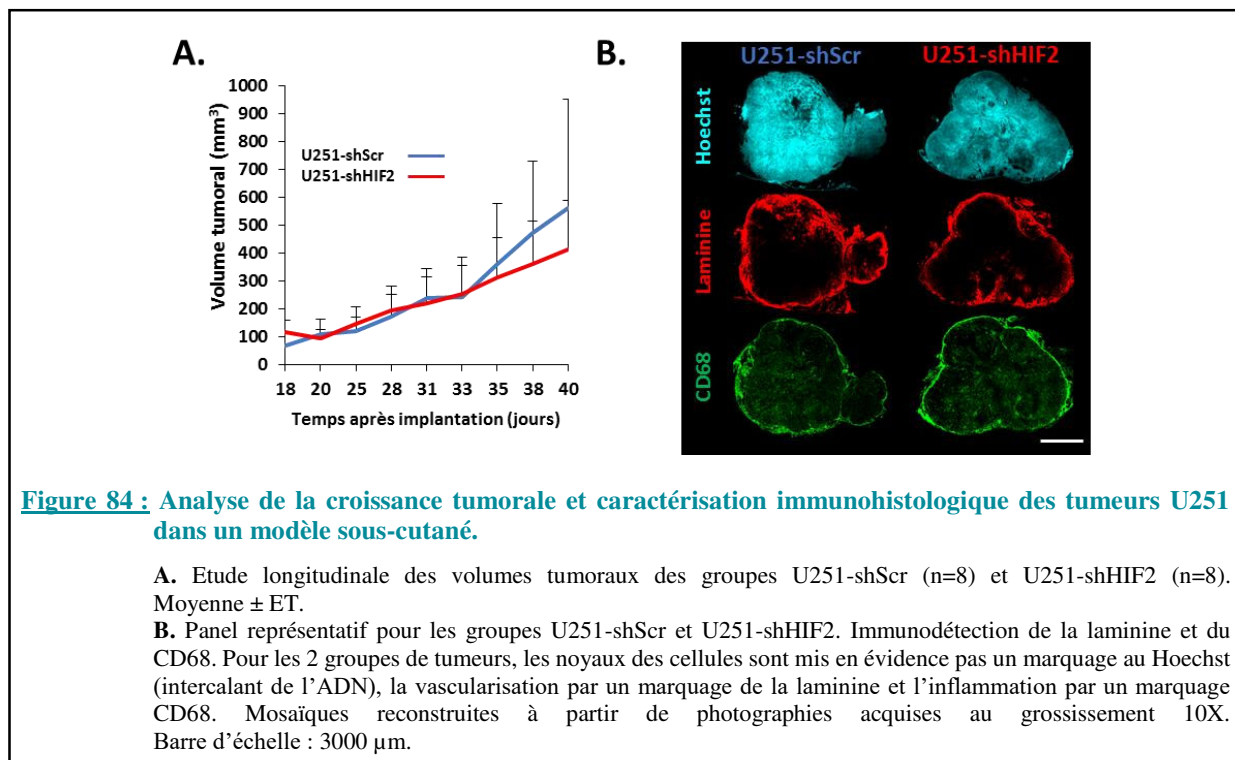
événements cellulaires à l'origine de l'hyposignal détecté par IRM. En revanche, lorsque ces tumeurs sont de faibles volumes, cet hyposignal serait plutôt le reflet d'un apport sanguin important.

Afin de déterminer si le microenvironnement pouvait influencer la croissance des tumeurs U251-shHIF2, nous avons réalisé une expérience *in vivo* en implantant ces cellules par voie sous-cutanée.

II.5.2. Modèle de tumeur sous-cutanée

Les cellules U251-shHIF2 et U251-shScr ont été implantées par voie sous-cutanée, dans le flanc de souris *nude*. Les volumes tumoraux ont été établis à partir des mesures faites au pied à coulisse tous les 3 jours. Comme le montre la **Figure 84 A**, et contrairement aux résultats obtenus pour les greffes intracérébrales, les cinétiques de croissance pour ces deux groupes de tumeurs sont identiques lorsque ce sont des xéngreffes sous-cutanées.

Par ailleurs, la caractérisation par immunohistologie de la vascularisation et de l'inflammation de ces tumeurs n'a pas non plus permis de mettre en évidence de différence entre les tumeurs U251-shHIF2 et U251-shScr (**Figure 84 B**).



Les résultats de ces expériences tendent à montrer que l'environnement cérébral favorise la croissance des tumeurs U251-shHIF2. Les modèles tumoraux issus de xéngreffes ectopiques développées dans le flanc des animaux présentent un certain nombre de limites parmi lesquelles un défaut de vascularisation. Or, les résultats obtenus sur les greffes intracérébrales tendent à montrer que les tumeurs U251-shHIF2 nécessitent, pour se développer, de bénéficier d'une perfusion sanguine robuste, ce qui pourrait être un frein lorsque ces cellules sont implantées par voie sous-cutanée.

II.6. Conclusion-Discussion

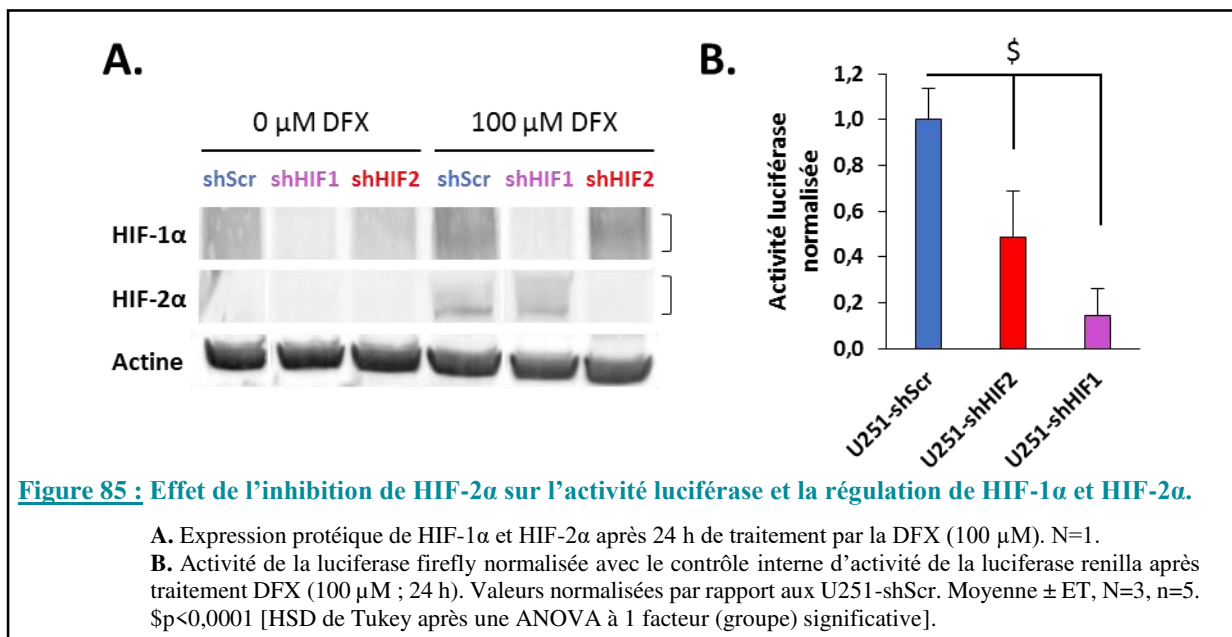
Le rôle de HIF-2 dans les GB est relativement peu documenté que ce soit à l'échelle clinique ou préclinique. Dans ce contexte, le but de cette étude était d'évaluer l'impact de HIF-2 α sur la progression des GB. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé une stratégie d'ARN interférence appliquée à des cellules de GB différenciées. L'infection lentivirale de shHIF2 dans les cellules U251 a permis d'éteindre 80 % de l'expression des ARNm de HIF-2 α et ce de façon stable. Les résultats obtenus *in vivo* ont montré que les tumeurs issues de l'implantation des cellules U251-shHIF2 se développent beaucoup plus rapidement que les tumeurs contrôles. Dans la littérature, deux études précliniques, proposent des conclusions opposées. En effet, selon Li *et al.*, l'inactivation de HIF-2 α par ARNi dans des CSG inhibe leur capacité d'auto-renouvellement, de prolifération, de survie *in vitro* et diminue leur capacité tumorigénique *in vivo* (Li *et al.*, 2009). A l'inverse, Acker *et al.*, ont suggéré par différentes approches que HIF-2 pourrait agir comme un suppresseur de tumeur (Acker *et al.*, 2005). En effet, selon ces auteurs, une surexpression de cette isoforme dans des cellules de gliomes différenciées ralentit la croissance tumorale mais favorise l'angiogenèse tumorale. Inversement, une perte d'expression stimule la croissance de la tumeur gliale bien que le réseau vasculaire intra-tumoral soit peu développé. Sur le plan mécanistique, ces auteurs ont proposé que HIF-2 régulerait la mort apoptotique de ces cellules tumorales. Nos résultats se rapprochent en partie de ceux d'Acker puisque, nous avons également observé une accélération de la croissance tumorale pour les cellules U251-shHIF2. Toutefois, sur notre modèle, ce résultat ne serait pas dépendant d'un effet direct de l'extinction de HIF-2 α sur la survie des cellules U251. En effet, *in vitro*, les cellules U251-shScr et U251-shHIF2 présentent des profils de prolifération et de cycle cellulaire identiques. En revanche, *in vivo*, des différences notables concernant la vascularisation entre les tumeurs U251-shScr et U251-shHIF2 ont été mises en évidence. Tout comme Acker *et al.*, nos résultats montrent que la vascularisation au cœur des tumeurs U251-

shHIF2 est peu développée (Acker *et al.*, 2005). Ceci pourrait s'expliquer par une diminution de synthèse de VEGF par ces cellules tumorales. De fait, lors de la caractérisation des cellules après infection, nous avons vérifié si l'extinction de HIF-2 α s'accompagnait d'une modulation d'expression de certains de ses gènes cibles, ce qui était le cas du VEGF (résultats non présentés). En revanche, la croissance des tumeurs U251-shHIF2 semble dépendante d'une perfusion sanguine robuste qui comme le suggèrent nos résultats pourrait être assurée par le recrutement de vaisseaux péri-tumoraux, et ce tout au long de la croissance tumorale. En outre, cette vascularisation tumorale pourrait être renforcée par le biais de la présence des macrophages pro-angiogéniques de type M2, particulièrement présents en fin de croissance tumorale dans cette région.

La divergence de résultats entre ces différentes études précliniques pourrait s'expliquer non seulement par la nature des cellules tumorales ciblées (CSG *vs* cellules de GB différenciées) mais aussi par une différence de microenvironnement tumoral. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que l'effet pro-tumoral de l'extinction de HIF-2 α observé dans un modèle orthotopique (greffe intrastriatale) n'était pas retrouvé dans un modèle ectopique (greffe sous-cutanée). L'influence du microenvironnement a été plus étudié pour HIF-1 (Blouw *et al.*, 2003). Ainsi, l'extinction de HIF-1 α dans des cellules d'astrocytome résulte en des tumeurs de phénotypes opposés lorsque les cellules étaient implantées dans le cerveau ou sous la peau. De façon intéressante, ces tumeurs possèdent des caractéristiques similaires à celles décrites pour les tumeurs U251-shHIF2. Notamment, ces tumeurs intracérébrales ne présentent pratiquement pas de zones de nécrose. De même, en accord avec nos résultats, suite à l'extinction de HIF-1 α , les tumeurs sont dans l'incapacité de développer une angiogenèse. En revanche, les cellules tumorales utilisent la vascularisation environnante de façon à migrer le long des vaisseaux sanguins normaux existants pour se propager, phénomène que nous avons également observé pour les tumeurs U251-shHIF2. Ces capacités de migration ont été également observées *in vitro* et pourraient être liées au phénotype de type mésenchymateux adopté par ces cellules. L'hypoxie favorise la TEM (Monteiro *et al.*, 2017). Ainsi, les cellules U251-shScr placées en hypoxie acquièrent un phénotype fusiforme qui s'accompagne d'une augmentation d'expression des ARNm de la N-cadhérine (un des marqueurs de la TEM). Pour les cellules U251-shHIF2, cette augmentation d'expression de la N-cadhérine est détectée en normoxie et renforcée en conditions d'hypoxie (données non présentées). En revanche, nous n'avons pas détecté de différence d'expression transcriptomique des autres marqueurs de TEM HIF-dépendants, tels les MMP-2, MMP-9, vimentine (données non présentées). Il faut noter que ce

phénotype de cellules fusiformes a été également décrit pour les cellules d'astrocytome invalidées pour HIF-1 α (Blouw *et al.*, 2003).

La régulation de l'activation des facteurs HIFs par l'hypoxie est complexe et ce d'autant plus qu'il peut exister une compensation réciproque des isoformes HIF-1 α et HIF-2 α lorsque l'expression l'une de ces isoformes est réprimée (Schulz *et al.*, 2012). Cette hypothèse ne peut pas être écartée pour les cellules U251-shHIF2. Comme le montre la **Figure 85 A**, l'exposition à la DFX conduit à une surexpression de HIF-1 α pour les cellules U251-shScr et U251-shHIF2 mais pas pour les cellules U251-shHIF1. Comme évoqué précédemment (cf. page 128), l'évaluation de l'expression de HIF-1 α par immunotransfert est rendue difficile en raison du caractère diffus du signal. Cependant ces observations sont renforcées par l'étude réalisée par la technique de gène rapporteur luciférase sous contrôle des séquences HRE. Les résultats obtenus montrent que l'activité de la luciférase est quasiment éteinte dans les cellules U251-shHIF1 transfectées avec ce plasmide, ce qui n'est pas le cas pour les cellules U251-shHIF2 qui présentent encore 50 % d'activité par comparaison aux cellules contrôles (**Figure 85 B**).



Au vu de ces résultats, et comme présenté dans l'introduction (cf. page 76) l'extinction d'expression de HIF-2 α dans les U251-shHIF2 pourrait s'accompagner d'une compensation d'expression de HIF-1 α ce qui expliquerait que l'activité luciférase soit diminuée de moitié. En revanche, l'inverse ne serait pas vrai. En effet, comme le suggèrent les résultats de la **Figure 85 B**, il n'y aurait pas de compensation de la perte d'expression de HIF-1 α par HIF-2 α . Cependant, ces données mériteraient d'être confirmés par des expériences complémentaires. En

effet, les résultats présentés ont été obtenus après 24 h d'exposition des cellules à la DFX. Or, des études menées au sein de l'équipe pour différentes lignées de GB ont montré que l'expression de HIF-2 α est stabilisée pour des temps d'hypoxie prolongée (Bordji *et al.*, 2014). Ainsi, nous pouvons proposer qu'une compensation de la perte d'expression de HIF-2 α pourrait intervenir pour des temps plus tardifs. Nous n'avons cependant pas retrouvé d'expression de HIF-1 α dans le tissu tumoral issu des souris shHIF-2, que ce soit en début ou fin de croissance. Cette absence d'immunomarquage pourrait être liée à des problèmes techniques liés aux anticorps commerciaux que nous avons utilisés. Il serait donc nécessaire de confirmer ce résultat par l'utilisation d'autres anticorps anti-HIF-1 α .

Si les données précliniques concernant HIF-2 sont fragmentaires, le rôle de HIF-1 dans les GB a été un peu plus étudié. Toutefois, tout comme pour HIF-2, des conclusions opposées se dégagent selon les modèles et types cellulaires étudiés. En effet, certains travaux attestent d'un effet pro-tumoral et d'autres montrent que la perte d'expression de HIF-1 favorise la progression tumorale. Afin de réconcilier ces résultats, Fiorenzo et collaborateurs ont proposé qu'il existerait une coopération entre les cellules HIF-1 α^+ et HIF-1 α^- résultant en des tumeurs plus agressives (Fiorenzo *et al.*, 2010). Depuis, plusieurs années, il est désormais admis qu'il existe des coopérations intercellulaires. Par exemple, une coopération métabolique a été notamment décrite entre des cellules tumorales en normoxie et celles en hypoxie mais aussi entre cellules tumorales et stromales (Koukourakis *et al.*, 2006; Icard & Lincet, 2013). Bien que nous ne l'ayons pas vérifiée, cette hypothèse semble peu plausible pour les cellules U251-shHIF2. En effet, ces cellules, certes n'ont pas été clonées, mais la sélection par l'antibiotique assure que l'ensemble des cellules possèdent une extinction de HIF-2 α , mais peut-être à des niveaux différents. Ainsi, il peut être envisagé qu'une sélection de cellules résistantes s'opère au cours de la sélection et de l'amplification ou au cours de la progression tumorale.

Enfin, illustrant la complexité du rôle des HIFs dans la progression tumorale, des travaux issus de la même équipe montrent que l'extinction de l'expression de HIF-1 α par shARN dans les cellules U251 conduit à des tumeurs plus agressives que celles issues de l'implantation de cellules en intracérébral suivi d'une injection de siARN pour éteindre l'expression de ce facteur de transcription (Womeldorff *et al.*, 2014).

Collectivement, ces données montrent qu'à l'échelle préclinique, suivant les modèles utilisés, la modulation de l'expression de HIF-1 α ou de HIF-2 α peut aboutir à des effets différents, voire opposés dans la progression tumorale soulignant ainsi la nécessité de poursuivre les recherches dans ce domaine sur des modèles appropriés.

III. Effets de l'extinction de HIF-2 ou HAF sur la radiosensibilité des cellules de glioblastome

Jusqu'à présent, les quelques études portant sur les GB attribuent l'expression de HIF-2 α et HAF aux CSG. A ce titre, ces molécules pourraient être considérées comme des facteurs de résistance thérapeutique puisqu'il est démontré que les CSG sont impliquées dans la radiorésistance (Renfrow *et al.*, 2018). Toutefois, ces données cliniques souffrent du peu de données expérimentales étayant ces données cliniques, c'est pourquoi, nous avons recherché à l'échelle préclinique quelle était l'influence de HIF-2 α ou HAF sur la réponse des cellules de GB à la radiothérapie.

III.1. Etude de la survie après irradiation

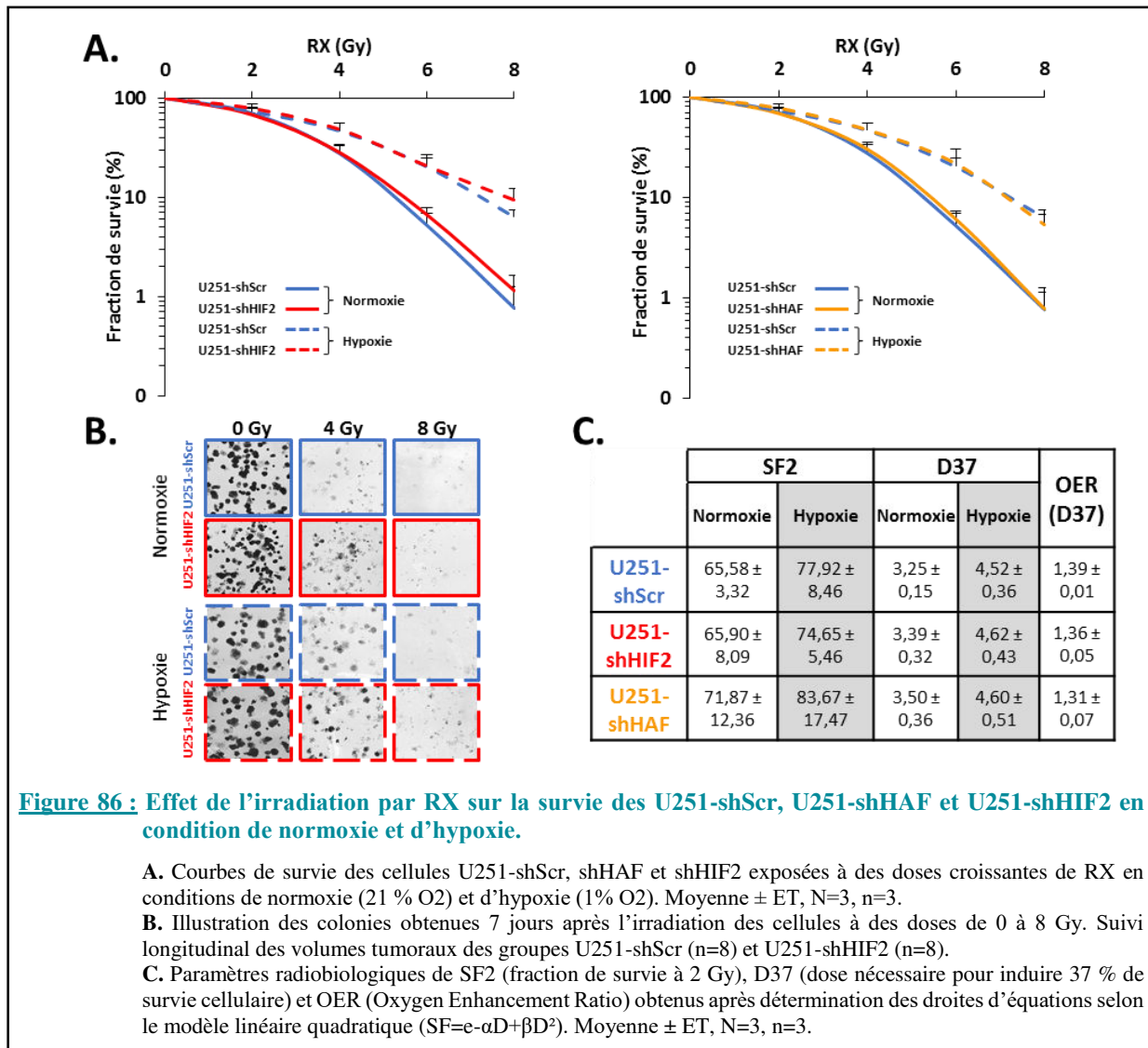
Afin de déterminer l'impact de HIF-2 α et HAF sur la radiosensibilité des cellules de GB, une étude de cytotoxicité des rayons X, évaluée par test clonogénique, a été réalisée sur les cellules U251, modifiées ou non génétiquement.

Les cellules, ensemencées à très faible densité et incubées en condition de normoxie (21 % O₂) ou hypoxie (1 % O₂), ont été exposées à différentes doses de RX variant de 0 à 8 Gy. Après irradiation, ces cellules sont remises en culture pendant 1 semaine, en atmosphère de normoxie ou d'hypoxie. Les cellules ayant survécu se développeront en formant des colonies comme illustré sur la **Figure 86 B**. La quantification du nombre de colonies en fonction de la dose d'irradiation permet d'établir les courbes de survie de chaque type cellulaire (**Figure 86 A**).

Ainsi, en conditions de normoxie, les courbes de survie sont similaires pour les trois lignées cellulaires, U251-shScr, U251-shHIF2, U251-shHAF (**Figure 86 A**). Lorsque ces cellules sont placées en hypoxie à 1 % d'O₂ avant et après l'exposition aux RX l'analyse des courbes de survie confirme que l'hypoxie est un facteur de résistance des cellules de GB à la RT (**Figure 86 A**). Cependant, aucune différence de radiosensibilité n'est observée lorsque l'expression de HIF-2 α ou de HAF a été éteinte dans ces cellules, comme le confirment la quantification des différents paramètres de radiobiologie (**Figure 86 C**).

Ces paramètres ont été calculés à partir des représentations graphiques obtenues pour chaque type cellulaire. Pour chacune des lignées, il peut être déterminé l'équation de droite selon le modèle linéaire quadratique qui est généralement utilisé pour ce type d'irradiation ($SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ avec SF = fraction de survie et D = dose d'irradiation reçue par les cellules).

Ainsi, les valeurs de SF2 (fraction de survie à 2 Gy), D37 (dose d'irradiation pour laquelle la survie des cellules est de 37%) et d'OER (*oxygen enhancement ratio*) ont été calculées pour chaque type de cellules U251 et ce en normoxie et en hypoxie (**Figure 86 C**).



La SF2 est le paramètre de radiobiologie le plus fréquemment utilisé pour comparer la sensibilité de différents types cellulaires à la RT. La dose de 2 Gy est retenue pour ce paramètre car elle correspond à celle utilisée en clinique lors de l'irradiation fractionnée des tumeurs chez le patient. La D37, quant à elle, correspond à la dose létale moyenne et reflète aussi la radiosensibilité des cellules. Pour appréhender quantitativement la contribution de l'O₂ dans la réponse des cellules à la RT, phénomène connu sous le nom de « effet oxygène », l'OER est calculé en effectuant le rapport des doses d'irradiation délivrées en normoxie et en hypoxie. Ainsi, l'OER peut être déterminé par le rapport suivant : $OER = D37 \text{ hypoxie} / D37 \text{ normoxie}$.

Un OER>1 traduit une radiorésistance des cellules liée à l'hypoxie. Comme le montre la **Figure 86 C**, les trois lignées cellulaires ont, en hypoxie, des valeurs de SF2 et D37 supérieures à celles déterminées en normoxie ainsi qu'un OER>1, ces trois critères traduisant une radiorésistance aux RX. Toutefois les valeurs de ces trois paramètres sont identiques entre U251-shScr, U251-shHIF2 et U251-shHAF.

Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre la survie des trois types cellulaires, les cellules U251-shHIF2 semblent légèrement plus résistantes que les cellules U251-shScr que ce soit en normoxie ou en hypoxie, comme en témoigne les valeurs de SF supérieures à 4 Gy (**Figure 86 A**). En accord avec ce résultat, les colonies U251 shHIF-2 sont de plus grosses tailles que les colonies U251-shScr après une exposition à 4 Gy (**Figure 86 B**).

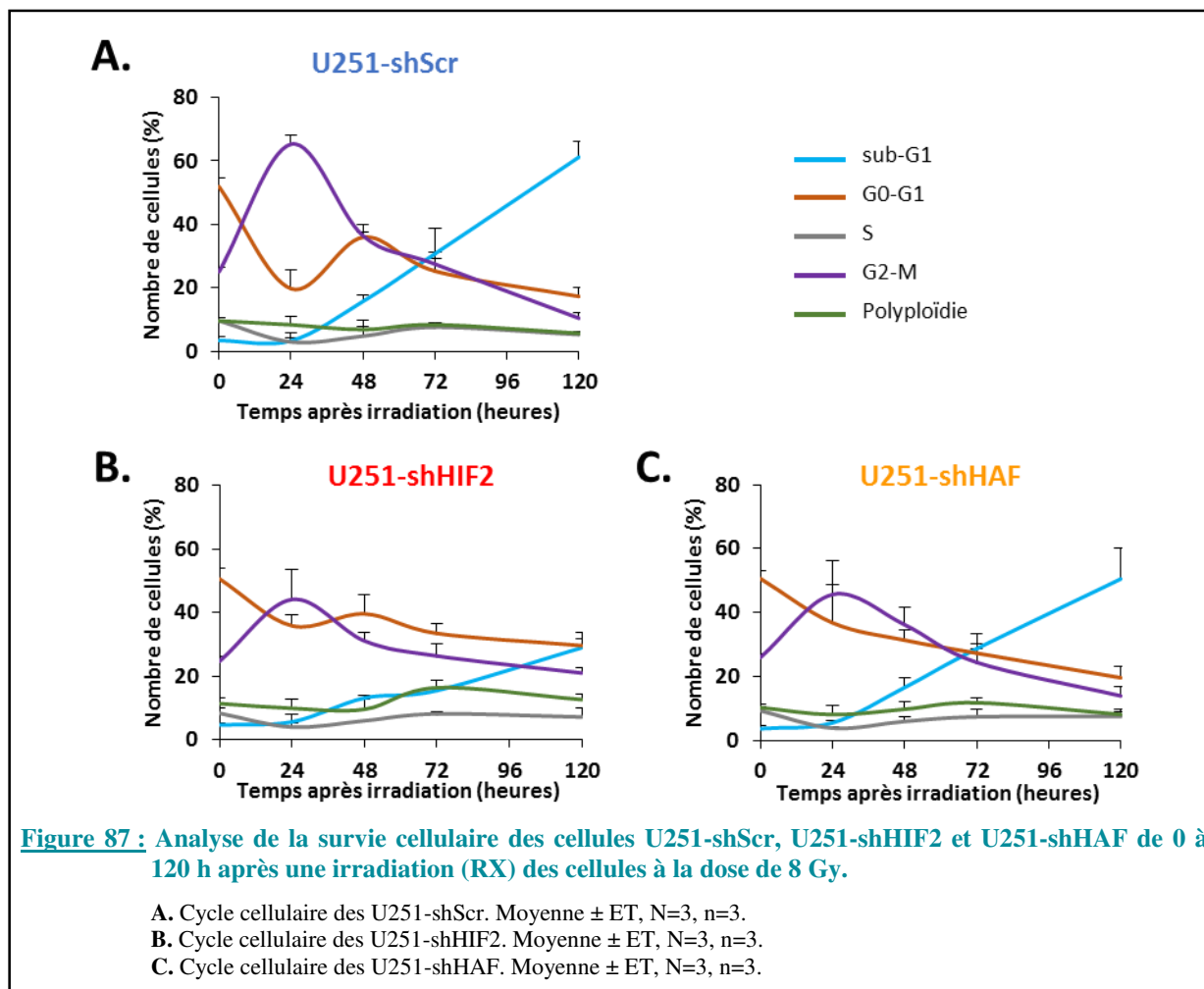
Le test de clonogénicité permet d'appréhender la radiorésistance des cellules tumorales sur le long terme. Nous avons complété cette étude en recherchant si l'extinction de HIF-2 α ou HAF dans les cellules U251 ne perturberait pas les processus mis en jeu par la cellule dans les phases aiguës de réponse à l'irradiation, notamment en étudiant le cycle cellulaire de ces cellules exposées aux RX.

III.2. Etude du cycle cellulaire après irradiation des cellules

La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été quantifiée après différents temps d'exposition des cellules U251-shScr, U251-shHIF2 et U251-shHAF aux RX à une dose de 8 Gy (**Figure 87**). De façon attendue, les trois lignées cellulaires exposées à l'irradiation présentent un arrêt en G2/M et ce, 24 h après irradiation (**Figure 87**). Cet arrêt en phase G2/M se traduit par une augmentation du nombre de cellules U251-shScr (de 25 % à 0 h à 65 % à 24 h), compensée par une baisse de la proportion de cellules présentes en phase G0/G1. Cet arrêt observé pour les cellules U251-shHIF2 et U251-shHAF est cependant d'amplitude plus faible. En effet, pour ces deux lignées, environ 45 % des cellules totales sont présentes en phase G2/M.

L'arrêt des cellules en phase G2/M est transitoire avec un retour à un état basal 72 h post-RX pour toutes les phases du cycle (**Figure 87**). Puis, à partir de ce temps, une augmentation du nombre de cellules en phase sub-G1 est observée, reflétant une fragmentation de l'ADN et suggérant ainsi qu'une mort par apoptose se déclenche. La proportion de cellules en phase sub-G1 est cependant différente entre les trois lignées cellulaires. Par exemple, à 120 h post-RX, environ 60 % des cellules U251-shScr se retrouvent en phase sub-G1 (**Figure 87 A**), les cellules U251-shHAF sont détectées dans des proportions similaires (50 %)

(Figure 87 C), alors que seuls 30 % des cellules U251-shHIF2 sont détectées dans cette phase (Figure 87 B).



L'étude de l'impact des RX sur la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire tend à montrer un comportement différent entre les cellules U251-shHIF2 et U251-shHAF. Pour les deux lignées cellulaires, une plus faible proportion de cellules s'arrête en phase G2/M par comparaison aux cellules U251-shScr. Cependant, une forte proportion des cellules U251-shHAF et U251-shScr semblent mourir par apoptose puisque ces cellules s'accumulent en phase sub-G1 mais cet effet est retrouvé dans une moindre mesure pour les cellules U251-shHIF2. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons caractérisé la mort apoptotique par une étude en cytométrie du marquage des cellules à l'Annexine-V.

III.3. Etude de la mort par apoptose radio-induite

Dans la phase précoce de l'apoptose, la translocation de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane plasmique peut être mise en évidence par fixation spécifique de l'Annexine-V couplée à un fluorophore. Ce marqueur, utilisé conjointement avec de l'iodure de propidium (IP), lequel reflète la présence de nécrose car ce composé entre dans la cellule uniquement si la membrane plasmique est fragmentée. Ainsi, par cytométrie en flux, il est possible de déterminer les proportions de cellules vivantes (absence de marquage Annexine-V ou IP) et les proportions des cellules mortes par apoptose (simples positives à l'Annexine-V), nécrose (positives à l'IP) ou apoptose/nécrose tardive (doubles positives à l'Annexine-V et à l'IP).

L'apoptose des cellules U251-shScr, U251-shHIF2, U251-shHAF a été étudiée dans les mêmes conditions expérimentales que celles de l'étude du cycle cellulaire (de 24 h à 120 h après une exposition à une dose de RX de 8 Gy). Nous avons pu ainsi montrer que la cinétique d'apparition de l'apoptose est comparable à celle de l'évolution de ces cellules en phase sub-G1 (**Figure 88**). En effet, l'apoptose apparaît pour les trois types cellulaires à partir de 48 h post-RX et s'amplifie jusqu'à 120 h mais dans des proportions différentes pour chacune des lignées. Ainsi, à 72 h et 120 h post-RX, les cellules 251-shScr ont une plus forte propension à mourir par apoptose que les cellules U251-shHAF et U251-shHIF2 ; les cellules U251-shHIF2 étant les plus résistantes à ce type de mort (**Figure 88 B**). À 120 h post-irradiation, le nombre de cellules vivantes est significativement plus important lorsque l'expression de HIF-2 α a été éteinte dans les cellules de GB (**Figure 88 A**). Seules 26 % de ces cellules meurent par apoptose, alors qu'environ la moitié des cellules U251-shScr (53 %) et U251-shHAF (45 %) sont engagées dans ce type de mort. À ce temps, il faut noter qu'une faible proportion des cellules meure par nécrose variant de 8 % pour les cellules U251-shScr à 5 % pour les cellules U251-shHAF et U251-shHIF2.

Pour conforter ces résultats en faveur d'une radiorésistance des cellules U251-shHIF2, par comparaison aux cellules contrôles et aux cellules U251-shHAF, une étude visant à évaluer les capacités à réparer les dommages à l'ADN a été menée.

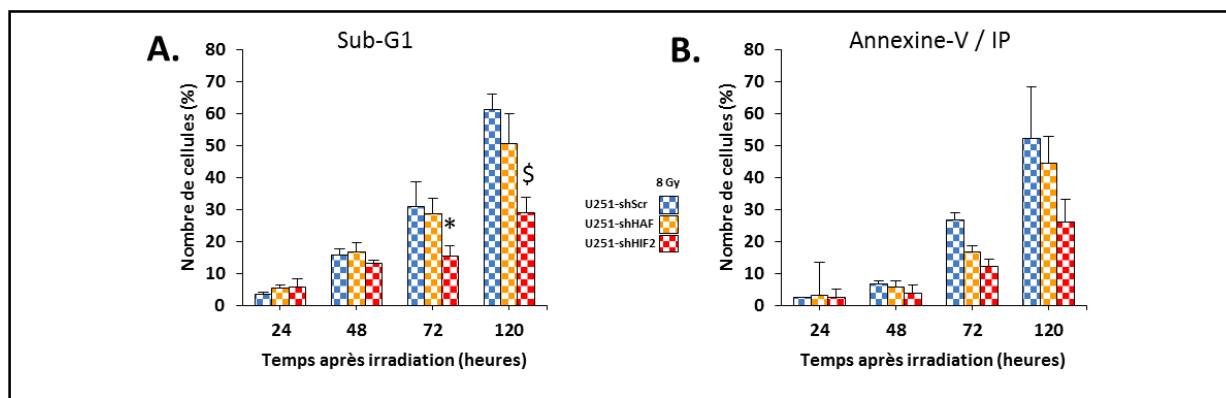


Figure 88 : Analyse de la survie cellulaire des cellules U251-shScr, U251-shHAF et U251-shHIF2 après une irradiation (RX) des cellules à la dose de 8 Gy.

A. Analyse de la répartition des cellules en phase Sub-G1 du cycle cellulaire. Moyenne \pm ET, N=3, n=3, * $p < 0,05$ vs U251-shScr du temps 72 h, \$ $p < 0,0005$ vs U251-shScr du temps 120 h [HSD de Tukey après une ANOVA à deux facteurs (groupe et temps) significative].

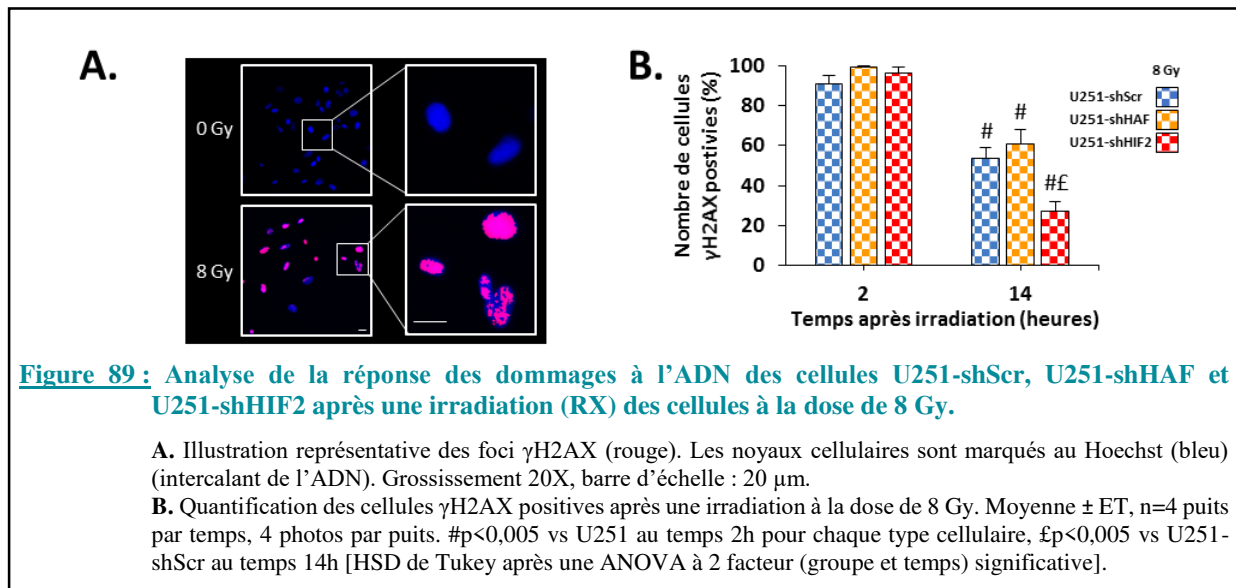
B. Analyse de la mort apoptotique par un marquage annexine en cytométrie en flux après une irradiation à la dose de 8 Gy. Moyenne \pm ET, N=3, n=3 [ANOVA à deux facteurs (groupe et temps) non significative].

III.4. Etude des dommages à l'ADN radio-induits

En réponse à une irradiation, comme nous l'avons décrit en introduction, des protéines comme la DNA-PK, ATM ou ATR, sont activées. Ces sérine-thréonine kinases pourront alors phosphoryler le résidu sérine 139 de l'histone H2AX (Rogakou *et al.*, 1998). Cette phosphorylation fait partie des événements les plus précoces qui suivent la formation physique des cassures double-brin de l'ADN (CDB). Ainsi, l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ H2AX) montre la présence de nombreux *foci* dans le noyau des cellules irradiées (Figure 88 A). Il existe une étroite corrélation entre le nombre de *foci* γ H2AX⁺ et le nombre de CDB induites après irradiation (Rothkamm & Löbrich, 2003). Ce test permet donc de quantifier à un temps précoce les dommages de l'ADN radio-induits et à un temps plus tardif, d'évaluer la capacité des cellules à réparer ces dommages (Pérès *et al.*, 2015).

Les trois lignées cellulaires, U251-shScr, U251-shHIF2 et U251-shHAF ont été exposées à une irradiation de 8 Gy et le nombre de *foci* γ H2AX⁺ a été déterminé précocement, 2 h et 14 h post-RX. Comme le montre la Figure 89 B, de façon attendue, dès 2 h post-irradiation, cette dose d'irradiation induit des CDB dans la totalité des cellules et ce, quelle que soit la lignée cellulaire étudiée. En revanche, à 14 h post-irradiation, les cellules U251-shScr et U251-shHAF ont amorcé la réparation de ces lésions de l'ADN puisque pour ces deux types cellulaires environ 60 % des cellules présentent encore des CDB. En revanche,

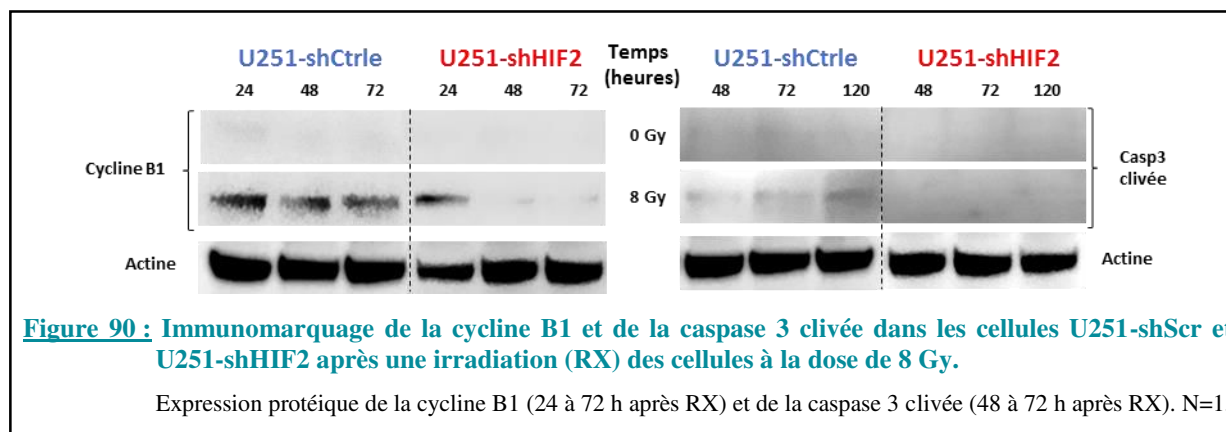
les cellules U251-shHIF2 semblent disposer d'une capacité de réparation plus efficace car ces dommages à l'ADN ne sont détectés que dans 30 % des cellules.



Les résultats présentés ci-dessus ont montré que lorsque l'expression de HIF-2 α était éteinte dans les cellules de GB : 1/ ces cellules réparent plus efficacement les dommages à l'ADN radio-induits, 2/ peu de cellules s'arrêtent au point de contrôle G2/M du cycle cellulaire et 3/ le nombre de cellules en apoptose est réduit, par comparaison aux cellules U251 contrôles. Nous avons recherché si ces effets s'accompagnaient d'une modulation de certains intermédiaires moléculaires. Parmi eux, nous avons étudié les variations d'expression de la cycline B1, une des protéines impliquées dans la régulation du point de surveillance G2/M et de la caspase-3 clivée, comme reflet de l'activation de la voie apoptotique.

III.5. Etude de l'expression des intermédiaires moléculaires des effets radio-induits

Concernant la cycline B1, une très faible expression est détectée lorsque les cellules U251-shScr ne sont pas irradiées (Figure 90). En revanche, 24 h après une irradiation de 8 Gy, temps pour lequel nous avons montré que 65 % de ces cellules s'arrêtaient en phase G2/M (Figure 87), l'expression de la cycline B1 est fortement augmentée. Puis, celle-ci tend à diminuer à 48 h et 72 h, lorsque les cellules rentrent progressivement dans le cycle et que la répartition de ces cellules dans le cycle cellulaire revient à son niveau de base (cellules non irradiées) (Figure 87).



Ce profil de variation d'expression de la cycline B1 est différent pour les cellules U251-shHIF2 irradiées (**Figure 90**). En accord avec la plus faible proportion de cellules arrêtées en phase G2/M 24 h post-RX (**Figure 87**), l'augmentation d'expression de la cycline B1 est plus faible que celle observée à ce temps pour les cellules U251-shCtrl ; cette expression disparaît pratiquement à 48 h et 72 h.

L'analyse de l'expression de la caspase 3 clivée, réalisée pour des temps plus longs post-RX (de 48 h à 120 h), montre une légère augmentation d'expression de cette protéine au cours du temps, pour les cellules U251-shCtrl, effet qui n'est pas retrouvé pour les cellules U251-shHIF2.

En résumé, l'ensemble de ces expériences montrent que l'extinction de HAF dans les cellules de GB (U251) ne modifie pas la radiosensibilité de ces cellules, contrairement à l'extinction de HIF-2 α qui semble rendre ces cellules radio-résistantes. Ces effets pourraient s'exercer à différents niveaux qui participeraient à la diminution de la mort par apoptose de ces cellules.

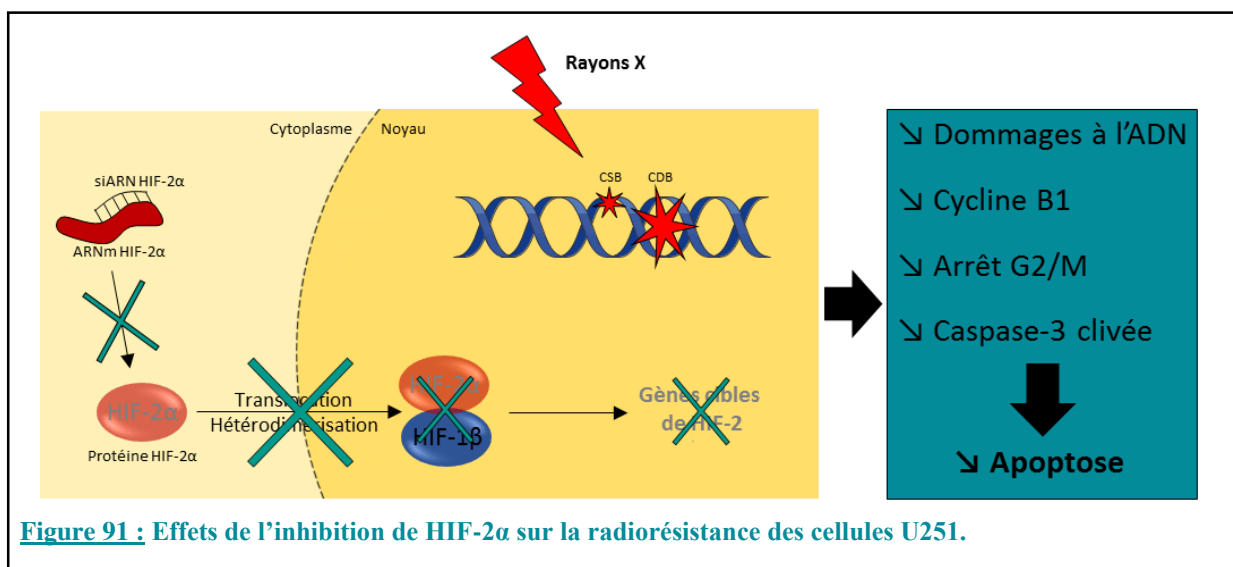
III.6. Conclusion-Discussion

L'hypoxie est un facteur de radio-résistance pour les tumeurs solides. Au regard du rôle majeur des facteurs HIFs dans la réponse cellulaire à l'hypoxie, certaines études ont cherché à identifier quel était le rôle de ces facteurs dans la réponse des cellules tumorales à l'irradiation. En outre, il a été également rapporté qu'une exposition des cellules tumorales aux rayons X conduit à la stabilisation du facteur HIF-1 α notamment par la production d'ERO (cf. page 91). En accord avec ces données de la littérature, des résultats issus de l'équipe (non publiés) ont effectivement montré qu'une exposition des cellules de GB (U251) conduisait à une

stabilisation de HIF-1 α mais aussi de HIF2 α dans ces cellules et ce en condition de normoxie. Paradoxalement, très peu d'études fondamentales ont été menées sur les cellules issues de GB, pour HIF-1 α et aucune à notre connaissance pour HIF-2 α , alors que ces tumeurs sont connues pour être particulièrement hypoxiques et radiorésistantes.

Les CSG sont particulièrement résistantes à la radiothérapie, notamment par leur grande capacité à activer les voies de réparation des dommages à l'ADN (Bao *et al.*, 2006). Plus récemment, l'équipe de Pietras a proposé que la voie de signalisation OPN/CD44, impliquée dans le maintien du statut des CSG et dans l'activation de HIF-2 α , puisse également être à l'origine de la radiorésistance de ces cellules (Pietras *et al.*, 2014). Ces observations ont conduit à suspecter un rôle de HIF-2 dans la radiorésistance des CSG.

Toutefois, jusqu'à présent, les études restent descriptives et les mécanismes à l'origine de cette radiorésistance ne sont pas encore établis. De plus, aucune étude n'a été menée sur les cellules de GB différenciées. Les résultats présentés dans ce travail, montrent que, suite à l'extinction de HIF-2 α , les cellules de GB sont plus radiorésistantes. Comme illustrés sur la **Figure 91**, ces effets pourraient s'exercer successivement à différents niveaux qui, en final, conduiraient à la diminution de la mort par apoptose de ces cellules.



Par ailleurs, dans ces conditions, HIF-1 α pourrait être également à l'origine de la radioresistance des cellules U251-shHIF2. En effet, comme nous l'avons énoncé précédemment, des résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont montré que les radiations ionisantes favorisent l'expression de ce facteur de transcription. De plus, nous avons également évoqué précédemment (cf. page 76) qu'il pourrait exister une expression compensatoire de HIF-1 α dans

les U251-shHIF2. Ainsi, une stabilisation de HIF-1 α dans les U251-shHIF2, pourrait être renforcée par l'irradiation, favorisant alors la survie des U251-shHIF2.

Ces résultats qui nécessitent d'être confirmés et renforcés par des études mécanistiques complémentaires, pourraient cependant être à rapprocher de ceux de Acker *et al.*, qui proposent que l'effet suppresseur de tumeur de HIF-2 α dans les GB serait dû à un effet anti-apoptotique (Acker *et al.*, 2005).

Les dommages à l'ADN radio-induits sont plus faibles dans les cellules U251-shHIF2 suggérant que ces cellules aient des capacités de réparation plus importantes que les cellules contrôles. Des études menées sur des cellules placées en hypoxie ont rapporté une accumulation de γ H2AX lorsque les cellules expriment une forme stabilisée de HIF-2 (Wrann *et al.*, 2013). Lors de l'activation de la voie de réponse des dommages à l'ADN, l'histone H2AX est phosphorylée par différentes kinases telles, ATM, ATR et la DNA-PK ; Par ailleurs, selon une autre étude réalisée en condition d'hypoxie, il a été montré que la PARP-1, protéine également impliquée dans le contrôle de la réparation de l'ADN, régule l'activité de HIF-1 α et de HIF-2 α (Gonzalez-Flores *et al.*, 2014). Il pourrait être intéressant d'étudier quelle est la relation entre HIF-2 α et ces différentes protéines.

En parallèle, nous avons, recherché si HAF pourrait moduler la radiosensibilité des cellules de GB. Cependant, aucun effet n'a été observé au cours de cette étude. Les données de la littérature concernant la contribution de ce facteur dans la résistance aux traitements anti-cancéreux sont encore moins nombreuses. Il n'existe aucune étude sur les traitements de radiothérapie. Une seule étude a identifié un rôle potentiel de HAF dans la chimiorésistance des cancers colorectaux (Allen *et al.*, 2012).

Bien que préliminaires, les résultats présentés suggèrent que HIF-2 α puisse non seulement participer à la progression tumorale mais également à la réponse au traitement de RT. Toutefois, ces expériences réalisées en condition de normoxie devraient être reproduites en condition d'hypoxie.

Discussion générale

Perspectives

Discussion générale-Perspectives

Les glioblastomes (GB) sont des tumeurs cérébrales particulièrement invasives et agressives. Une des caractéristiques majeures de ces tumeurs réside dans la présence de régions hypoxiques.

Il est désormais clairement démontré que l'hypoxie contribue à la progression des tumeurs mais aussi à leur résistance aux traitements de chimio- et radiothérapie et ce, en activant un ensemble de réponses adaptatives régulées majoritairement par la famille des facteurs de transcription HIFs. Au sein de cette famille, les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α sont généralement associés à un phénotype tumoral agressif. En effet, HIF-1 α et HIF-2 α favorisent les processus nécessaires à la croissance tumorale, tels que l'angiogenèse, la glycolyse, l'invasion, l'inflammation, ainsi que l'auto-renouvellement des cellules souches ; chacune de ces isoformes pouvant exercer des fonctions communes ou non redondantes dans la régulation de ces processus.

Le rôle des HIFs est cependant complexe car l'activation de ces facteurs de transcription peut conduire à la fois à des activités pro-tumorales ou anti-tumorales exigeant un contrôle strict de la réponse à l'hypoxie. Comme nous l'avons mentionné en introduction de ce manuscrit, le contrôle des facteurs HIFs est hautement régulé par un réseau complexe de régulateurs positifs ou négatifs intervenant tant au niveau transcriptomique, protéique et qu'épigénétique. Ces régulateurs moléculaires permettent ainsi, au cours de la croissance tumorale, d'ajuster et d'adapter de façon flexible l'activation des facteurs HIFs en fonction de la sévérité de l'hypoxie et de sa durée, allant de l'hypoxie aiguë à chronique. C'est ainsi qu'il a été proposé que HIF-2 α s'accumulerait dans des régions d'hypoxie modérées et son activation serait maintenue dans les cas d'hypoxie chronique, alors que HIF-1 α serait activé transitoirement pour des conditions d'hypoxie plus sévère. Le facteur HAF serait un de ces régulateurs moléculaires en faveur du *switch* de HIF-1 α vers HIF-2 α (Koh *et al.*, 2011).

Cette régulation fine de l'activation des HIFs est d'autant plus importante dans les GB qui présentent des régions hypoxiques intra-tumorales très hétérogènes, suggérant qu'il existe une activation spatio-temporelle complexe des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α . Pour les GB, il est généralement admis que HIF-1 α et HIF-2 α sont de mauvais pronostic (Li *et al.*, 2009). Toutefois, un rôle de suppresseur de tumeur a également été rapporté pour ces deux facteurs dans ce contexte tumoral (Acker *et al.*, 2005). Ces données de la littérature qui pourraient au

demeurant, sembler contradictoires, s'expliquent par le large éventail de réponses adaptatives à l'hypoxie induites par HIF-1 α et HIF-2 α , allant des mécanismes augmentant la survie cellulaire à ceux induisant un arrêt du cycle cellulaire, voire la mort cellulaire. Ainsi, le résultat net sur la survie cellulaire dépendra donc du degré et de la durée de l'hypoxie, de l'activité respective de HIF-1 α et de HIF-2 α ainsi que du rapport relatif entre HIF-1 α et HIF-2 α qui pourrait dépendre du facteur HAF.

Les rôles clés des facteurs HIFs dans la progression tumorale et la résistance aux traitements en font des cibles attrayantes en matière de traitement anti-tumoral. Il existe de plus en plus d'études illustrant l'importance du facteur HIF-1 α dans la gliomagenèse et la résistance au traitement de chimio- et radiothérapie. Les données concernant HIF-2 α dans les GB sont cependant plus fragmentaires. Le peu d'études cliniques qui se sont intéressées à ce facteur suggèrent que HIF-2 α régule la capacité tumorigénique des CSG (Li *et al.*, 2009; Renfrow *et al.*, 2018). Toutefois, des travaux antérieurs de l'équipe, suggèrent que cette isoforme de HIF puisse agir également sur les cellules de GB différenciées (Bordji *et al.*, 2014).

C'est dans ce contexte que nos travaux se sont positionnés. L'objectif de ce travail était d'enrichir les connaissances relatives au rôle de HIF-2 α dans la progression des GB. Au regard du rôle de HAF dans la régulation de HIF-2 α , nous avons également recherché quelle était la contribution de ce facteur dans ce contexte tumoral. Enfin, l'effet de HAF et de HIF-2 sur la réponse des cellules de GB à la radiothérapie a également été évalué.

Afin d'atteindre ces objectifs, des cellules de GB différenciées (lignée cellulaire humaine de GB U251) ont été modifiées génétiquement en utilisant deux approches d'ARN interférence, une approche ciblant HAF et l'autre ciblant HIF-2 α (Figure 62).

Les résultats obtenus au cours de ces études, ont montré que 1/ l'inactivation de HAF conduit à un fort ralentissement de la croissance de ces tumeurs mais indépendamment de HIF-1 α ou HIF-2 α , 2/ l'effet de l'inactivation de HIF-2 α dans les cellules tumorales serait, quant à lui, dépendant de l'environnement tumoral puisque la diminution d'expression de HIF-2 α dans les cellules U251 ne modifie pas la croissance tumorale dans un modèle ectopique, alors que celle-ci favorise la croissance tumorale dans un modèle orthotopique.

Un rôle de HIF-2 α dans le contrôle de l'apoptose est également suggéré lorsque les cellules de GB sont exposées à une irradiation.

Lorsque nous avons initié cette étude, une seule équipe proposait que l'expression de HAF soit associée aux marqueurs de CSG (Koh *et al.*, 2011). Cependant, selon nos résultats, HAF

semble avoir un rôle différent sur les cellules de GB différenciées, puisque nous suggérons qu'il puisse exercer un effet pro-tumoral mais indépendamment de sa régulation d'expression des HIFs. Cependant, afin de renforcer ces conclusions, il serait nécessaire de confirmer ces résultats sur d'autres modèles expérimentaux se rapprochant au mieux de la situation clinique. Il faudrait notamment utiliser des lignées primaires de cellules de patients et introduire *in vitro* les cultures cellulaires 3D afin de mieux mimer les conditions des modèles développés *in vivo* (*Patient-derived xenograft*, PDX). En effet, pour les cellules tumorales, ces modèles 3D seraient plus conformes notamment en termes de cytoarchitecture et d'hypoxie que les modèles 2D.

Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que le facteur HAF pourrait constituer une voie d'attaque pour améliorer la prise en charge des GB. Bien que nous n'ayons pas identifié les mécanismes sous-jacents de l'effet anti-tumoral induits par le blocage de ce facteur, nous avons émis plusieurs hypothèses. Ainsi, sur le plan mécanistique, nous avons suggéré que HAF pourrait contrôler la croissance de la tumeur en modulant la synthèse de VEGF et ce indépendamment d'une activation des facteurs HIF-1 α ou HIF-2 α . En effet, il a été montré que HAF a la capacité de se fixer sur la région 5' UTR du gène du VEGF (Gupta *et al.*, 2000). Cette régulation démontrée sur des cellules d'une lignée d'hépatocytes devrait cependant être confirmée sur les cellules de GB.

Nous avons également envisagé que l'effet propre de HAF puisse être imputé à son rôle dans l'assemblage du spliceosome et qu'il pourrait ainsi indirectement participer à la maturation de certains ARNm. Parmi ceux-ci, à l'heure actuelle, seule la sororine, une protéine impliquée dans la ségrégation des chromatides, a été identifiée comme étant un des gènes concernés par ces altérations d'épissage suite à une extinction de HAF (Sundaramoorthy *et al.*, 2014). Cependant, nous n'avons pas retrouvé de tels effets sur les cellules de GB.

En oncologie, l'étude des défauts d'épissage ouvrent de nouvelles perspectives pour le traitement de certains cancers dont les GB (Marcelino Meliso *et al.*, 2017). En effet, l'épissage alternatif affecte plus de 90 % des gènes humains et constitue une source importante de variation de transcrits et de régulation des gènes. Or, les mutations et les modifications des facteurs d'épissage sont très répandues dans de nombreux cancers, ce qui démontre le potentiel de l'épissage pour agir en tant que facteur tumoral. Il pourrait donc être intéressant de cibler les composants de la machine à épisser. C'est ainsi que plusieurs médicaments inhibant les facteurs d'épissage ou favorisant des changements d'épissage sont actuellement à l'étude de façon à les proposer pour améliorer les traitements actuels de certains cancers.

Enfin, au-delà du rôle de HAF comme régulateurs de l'expression des HIFs, cette protéine pourrait avoir un intérêt comme stratégie d'immunothérapie. HAF est l'homologue murin de SART1 qui existe sous deux formes SART1₂₅₉ et SART1₈₀₀. Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés à la forme 800. Or, il a été décrit dans certains contextes tumoraux y compris dans les gliomes que la protéine SART1₂₅₉ possède des antigènes de rejet de tumeur suggérant que celle-ci pourrait être utile pour développer une stratégie d'immunothérapie pour ces patients porteurs de ces tumeurs (Imaizumi *et al.*, 1999). En outre, une étude récente a mis en évidence la présence de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) de SART1 chez certains patients souffrant de GB (Keller *et al.*, 2011). Parmi ces SNPs, certains sont communs à d'autres contextes tumoraux et ont été associés par exemple à un risque accru de cancer du sein. Il pourrait être proposé que la recherche de tels SNPs de SART-1 à partir de sérum des patients souffrant d'un GB, puisse contribuer à proposer des traitements adaptés et personnalisés pour chaque patient.

Le rôle de HAF dans la progression tumorale est complexe et probablement pléiotrope. Cet effet pléiotrope, indépendant des HIFs a également été montré pour les régulateurs majeurs de l'activation de ces facteurs que sont les PHDs. Ainsi, les PHD2 et PHD3 ont été décrites comme étant des suppresseurs de tumeurs mais par le biais de l'activation de la voie NF- κ B et non de leur action sur la régulation d'expression des facteurs HIFs (Lee *et al.*, 2008; Henze *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2010).

Collectivement, ces données illustrent les difficultés de proposer les intermédiaires moléculaires impliqués dans les voies de rétro-inhibition des HIFs (telles les PHD) ou de *switch* d'expression tel HAF, comme des cibles thérapeutiques potentielles, ces molécules étant impliquées dans d'autres voies de régulation.

C'est pourquoi, désormais, le ciblage direct des facteurs de transcription est de plus en plus envisagé en oncologie (Bhagwat & Vakoc, 2015). Ainsi, il est actuellement proposé que HIF-2 α soit une cible tout aussi pertinente que HIF-1 α pour les gliomes. En effet, sur la base des données cliniques (bases de données REMBRANDT), une corrélation négative entre la survie des patients souffrants de GB a été établie pour HIF-2 α (Li *et al.*, 2009). Par ailleurs, HIF-2 α est particulièrement exprimé par les CSG. Or, ces cellules sont à l'origine de la récurrence des patients après traitement, ces cellules sont particulièrement agressives et résistantes à la chimio- et radiothérapie (Bao *et al.*, 2006). De façon intéressante, dans un contexte tumoral, HIF-2 α est également exprimé par les macrophages et les cellules endothéliales (Le Bras *et al.*, 2007; Skuli

et al., 2009a; Imtiyaz *et al.*, 2010; Egners *et al.*, 2016). Ainsi, cibler ce facteur permettrait donc non seulement d'atteindre le compartiment tumoral mais aussi son microenvironnement cellulaire (inflammatoire et vasculaire) qui contribue à sa progression. Toutefois, le développement d'inhibiteurs spécifiques de HIF-2 α nécessite de pouvoir valider en amont ces molécules à l'échelle préclinique sur des modèles appropriés.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont notamment montré que l'inactivation de HIF-2 α dans les cellules différenciées de GB pouvait conduire à des effets différents en fonction du site d'implantation des cellules. En effet, en réponse à l'extinction de HIF-2 α , les tumeurs issues de greffes intracérébrales se sont développées beaucoup plus rapidement que les tumeurs contrôles et ce notamment parce que ces tumeurs ont bénéficié d'une perfusion sanguine robuste tout au long de la croissance tumorale. Or, cette observation n'a pas été retrouvée lorsque les cellules génétiquement modifiées ont été greffées en sous-cutané. Ainsi, ces résultats soulignent la nécessité de prendre en compte le microenvironnement tumoral, notamment vasculaire, afin de mieux comprendre le comportement et l'adaptation de la tumeur en réponse à son environnement hypoxique.

Ces dernières années, les nouveaux traitements proposés en oncologie se sont focalisés sur les facteurs en aval des facteurs de transcription. C'est ainsi que les tumeurs hypoxiques et angiogéniques ont bénéficié du développement des inhibiteurs de la voie de signalisation VEGF-A/VEGFR2. A titre d'exemple, le bevacizumab (Avastin), un inhibiteur du VEGF-A, a été approuvé par la FDA (*Food Drug Administration*) pour le cancer colorectal en 2004 puis approuvé en 2017 pour les GB en récurrence. Depuis ce temps, de nombreux médicaments ciblant le VEGF, notamment des anticorps et des inhibiteurs du récepteur à tyrosine kinase, ont été mis au point, notamment le sunitinib, l'axitinib, le sorafenib et le lenvatinib. Cependant, les résultats cliniques n'ont pas toujours été à la hauteur des attentes notamment pour les GB traités au bevacizumab (Rahman *et al.*, 2010; Guillamo, 2011). En effet, même si un contrôle de la maladie est observé dans certains cas, l'effet est transitoire. Cet échappement des GB aux stratégies anti-angiogéniques conduit très souvent à une récurrence tumorale très agressive comme en témoigne l'infiltration à distance observée avec ces traitements, notamment avec le sunitinib (Wick *et al.*, 2017).

Parmi les avantages en faveur du ciblage des facteurs de transcription, il est proposé que cette stratégie permettrait de bloquer plusieurs voies biologiques en aval, limitant ainsi les processus d'échappement. Une étude récente pourrait argumenter cette hypothèse. En effet, pour les patients souffrant d'un carcinome rénal métastatique, il a été proposé que la récurrence observée après traitement par le sunitinib serait due au *switch* de HIF-1 α vers HIF-2 α via HAF

(Lai *et al.*, 2017). L'activité de transactivation de HIF-2 α étant renforcée la production de facteurs pro-angiogéniques serait favorisée et conduirait ainsi à la récurrence de ces tumeurs. Ces auteurs proposent que le ciblage de l'axe HAF-HIF-2 α offrirait une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement des carcinomes rénaux. Une telle hypothèse mécanistique pourrait s'appliquer aux patients souffrants de GB traités au bevacizumab.

En conclusion, les travaux présentés dans ce travail de thèse apportent un éclairage sur la contribution de HAF et HIF-2 dans la croissance des GB et dans la réponse de ces tumeurs aux traitements de radiothérapie. Les échecs relatifs des traitements anti-angiogéniques en oncologie a relancé l'intérêt pour l'inhibition des facteurs de transcription. Inhiber la signalisation de ces facteurs tels que HIF-2 pourrait être prometteur.

Toutefois, ces travaux de thèse soulignent la nécessité d'apporter en amont une validation sur des modèles précliniques robustes tels que les modèles PDX qui récapitulent les principales caractéristiques des tumeurs d'origine en termes d'hétérogénéité moléculaire et environnementale.

Bibliographie

Bibliographie

- Acker T, Diez-Juan A, Aragonés J, Tjwa M, Brusselmans K, Moons L, Fukumura D, Moreno-Murciano MP, Herbert J-M, Burger A, Riedel J, Elvert G, Flamme I, Maxwell PH, Collen D, Dewerchin M, Jain RK, Plate KH & Carmeliet P (2005). Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2 α . *Cancer Cell* **8**, 131–141.
- Ahir BK, Ozer H, Engelhard HH & Lakka SS (2017). MicroRNAs in glioblastoma pathogenesis and therapy: A comprehensive review. *Crit Rev Oncol Hematol* **120**, 22–33.
- Alfonso JCL, Talkenberger K, Seifert M, Klink B, Hawkins-Daarud A, Swanson KR, Hatzikirou H & Deutsch A (2017). The biology and mathematical modelling of glioma invasion: a review. *Journal of The Royal Society Interface* **14**, 20170490.
- Alifieris C & Trafalis DT (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* **152**, 63–82.
- Allen WL, Stevenson L, Coyle VM, Jithesh PV, Proutski I, Carson G, Gordon MA, Lenz H-JD, Van Schaeuybroeck S, Longley DB & Johnston PG (2012). A systems biology approach identifies SART1 as a novel determinant of both 5-fluorouracil and SN38 drug resistance in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* **11**, 119–131.
- Amellem O & Pettersen EO (1991). The role of protein accumulation on the kinetics of entry into S phase following extreme hypoxia. *Anticancer Res* **11**, 1083–1087.
- Anido J et al. (2010). TGF- β Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* **18**, 655–668.
- Aprelikova O, Chandramouli GVR, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM & Barrett JC (2004). Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem* **92**, 491–501.
- Attenello FJ, Mukherjee D, Dato G, McGirt MJ, Bohan E, Weingart JD, Olivi A, Quinones-Hinojosa A & Brem H (2008). Use of Gliadel (BCNU) wafer in the surgical treatment of malignant glioma: a 10-year institutional experience. *Ann Surg Oncol* **15**, 2887–2893.
- Averbeck D (2000). [Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]. *Cancer Radiother* **4**, 335–354.
- Baluk P, Hashizume H & McDonald DM (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 102–111.
- 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**, 756–760.
- Begicevic R-R & Falasca M (2017). ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci*; DOI: 10.3390/ijms18112362.
- Begley DJ (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther* **104**, 29–45.
- Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh T & Millhorn DE (2000). Regulation of CREB by moderate hypoxia in PC12 cells. *Adv Exp Med Biol* **475**, 143–152.
- Bekaert L, Valable S, Lechapt-Zalcman E, Ponte K, Collet S, Constans J-M, Levallet G, Bordji K, Petit E, Branger P, Emery E, Manrique A, Barré L, Bernaudin M & Guillamo J-S (2017). [18F]-FMISO PET study of hypoxia in gliomas before surgery: correlation with molecular markers of hypoxia and angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **44**, 1383–1392.

- Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C & Van Meir EG (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1046–1069.
- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D & Keshet E (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* **103**, 159–165.
- van den Bent MJ (2010). Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathologica* **120**, 297–304.
- Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, Mackenzie ET & Petit E (2000). Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* **30**, 271–278.
- Beroukhi R et al. (2007). Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 20007–20012.
- Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D & Pouyssegur J (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* **22**, 4082–4090.
- Bhagwat AS & Vakoc CR (2015). Targeting Transcription Factors in Cancer. *Trends Cancer* **1**, 53–65.
- Bhatt RS, Landis DM, Zimmer M, Torregrossa J, Chen S, Sukhatme VP, Iliopoulos O, Balk S & Buble GJ (2008). Hypoxia-inducible factor-2alpha: effect on radiation sensitivity and differential regulation by an mTOR inhibitor. *BJU Int* **102**, 358–363.
- Blecic S, Rynkowski M, De Witte O & Lefranc F (2013). [Glutamate and malignant gliomas, from epilepsy to biological aggressiveness: therapeutic implications]. *Bull Cancer* **100**, 829–835.
- Bloch O, Han SJ, Cha S, Sun MZ, Aghi MK, McDermott MW, Berger MS & Parsa AT (2012). Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: Clinical article. *Journal of Neurosurgery* **117**, 1032–1038.
- Blouw B, Song H, Tihan T, Bosze J, Ferrara N, Gerber HP, Johnson RS & Bergers G (2003). The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* **4**, 133–146.
- Bordji K, Grandval A, Cuhna-Alves L, Lechapt-Zalcman E & Bernaudin M (2014). Hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α), but not HIF-1 α , is essential for hypoxic induction of class III β -tubulin expression in human glioblastoma cells. *FEBS J* **281**, 5220–5236.
- Box AH & Demetrick DJ (2004). Cell cycle kinase inhibitor expression and hypoxia-induced cell cycle arrest in human cancer cell lines. *Carcinogenesis* **25**, 2325–2335.
- Brada M, Stenning S, Gabe R, Thompson LC, Levy D, Rampling R, Erridge S, Saran F, Gattamaneni R, Hopkins K, Beall S, Collins VP & Lee S-M (2010). Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol* **28**, 4601–4608.
- Brahimi-Horn C, Mazure N & Pouyssegur J (2005). Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* **17**, 1–9.
- Brahimi-Horn MC & Pouyssegur J (2009). HIF at a glance. *J Cell Sci* **122**, 1055–1057.
- Brat DJ & Van Meir EG (2001). Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol* **158**, 789–796.
- Bregy A, Wong TM, Shah AH, Goldberg JM & Komotar RJ (2013). Active immunotherapy using dendritic cells in the treatment of glioblastoma multiforme. *Cancer Treatment Reviews* **39**, 891–907.
- Brem H, Ewend MG, Piantadosi S, Greenhoot J, Burger PC & Sisti M (1995). The safety of interstitial chemotherapy with BCNU-loaded polymer followed by radiation therapy in

- the treatment of newly diagnosed malignant gliomas: phase I trial. *J Neurooncol* **26**, 111–123.
- Brennan CW et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477.
- Broekman ML, Maas SLN, Abels ER, Mempel TR, Krichevsky AM & Breakefield XO (2018). Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol* **14**, 482–495.
- Bronisz A, Godlewski J & Chiocca EA (2016). Extracellular Vesicles and MicroRNAs: Their Role in Tumorigenicity and Therapy for Brain Tumors. *Cell Mol Neurobiol* **36**, 361–376.
- Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, Fitzpatrick SF, Cheong A, Scholz CC, Simpson DA, Leonard MO, Tambuwala MM, Cummins EP & Taylor CT (2011). MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1alpha activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol* **31**, 4087–4096.
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A & Gilbertson RJ (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* **11**, 69–82.
- Carmeliet P & Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257.
- Carvalho da Fonseca AC, Wang H, Fan H, Chen X, Zhang I, Zhang L, Lima FRS & Badie B (2014). Increased expression of stress inducible protein 1 in glioma-associated microglia/macrophages. *J Neuroimmunol* **274**, 71–77.
- Cervellini I, Bello E, Frapoli R, Porretta-Serapiglia C, Oggioni N, Canta A, Lombardi R, Camozzi F, Roglio I, Melcangi RC, D'incalci M, Lauria G, Ghezzi P, Cavaletti G & Bianchi R (2010). The neuroprotective effect of erythropoietin in docetaxel-induced peripheral neuropathy causes no reduction of antitumor activity in 13762 adenocarcinoma-bearing rats. *Neurotox Res* **18**, 151–160.
- Chakhoyan A, Guillamo J-S, Collet S, Kauffmann F, Delcroix N, Lechapt-Zalcman E, Constans J-M, Petit E, MacKenzie ET, Barré L, Bernaudin M, Touzani O & Valable S (2017). FMISO-PET-derived brain oxygen tension maps: application to glioblastoma and less aggressive gliomas. *Sci Rep* **7**, 10210.
- Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R & Kettenmann H (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia* **59**, 1169–1180.
- Chen J, McKay RM & Parada LF (2012). Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* **149**, 36–47.
- Chen L, Lin Z-X, Lin G-S, Zhou C-F, Chen Y-P, Wang X-F & Zheng Z-Q (2015). Classification of microvascular patterns via cluster analysis reveals their prognostic significance in glioblastoma. *Hum Pathol* **46**, 120–128.
- Chi K-H, Wang Y-S & Kao S-J (2012). Improving radioresponse through modification of the tumor immunological microenvironment. *Cancer Biother Radiopharm* **27**, 6–11.
- Chinot O, Soulier P & Frenay M (2010). [Chemotherapy and targeted treatments in glioblastomas]. *Neurochirurgie* **56**, 491–498.
- Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes AA, Hilton M, Abrey L & Cloughesy T (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **370**, 709–722.
- Clara CA, Marie SKN, de Almeida JRW, Wakamatsu A, Oba-Shinjo SM, Uno M, Neville M & Rosemberg S (2014). Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1 α in human glioblastoma. *Neuropathology* **34**, 343–352.

- Clavreul A, Guette C, Faguer R, Tétaud C, Boissard A, Lemaire L, Rousseau A, Avril T, Henry C, Coqueret O & Menei P (2014). Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *J Pathol* **233**, 74–88.
- Colman H, Zhang L, Sulman EP, McDonald JM, Shooshtari NL, Rivera A, Popoff S, Nutt CL, Louis DN, Cairncross JG, Gilbert MR, Phillips HS, Mehta MP, Chakravarti A, Pelloski CE, Bhat K, Feuerstein BG, Jenkins RB & Aldape K (2010). A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro-Oncology* **12**, 49–57.
- Colwell N, Larion M, Giles AJ, Seldomridge AN, Sizzdahkhani S, Gilbert MR & Park DM (2017). Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro-Oncology* **19**, 887–896.
- Coman D, Huang Y, Rao JU, De Feyter HM, Rothman DL, Juchem C & Hyder F (2016). Imaging the intratumoral-peritumoral extracellular pH gradient of gliomas. *NMR Biomed* **29**, 309–319.
- Corroyer-Dulmont A, Pérès EA, Petit E, Durand L, Marteau L, Toutain J, Divoux D, Roussel S, MacKenzie ET, Barré L, Bernaudin M & Valable S (2013). Noninvasive assessment of hypoxia with 3-[18F]-fluoro-1-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-propanol ([18F]-FMISO): a PET study in two experimental models of human glioma. *Biol Chem* **394**, 529–539.
- Coulet F, Nadaud S, Agrapart M & Soubrier F (2003). Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem* **278**, 46230–46240.
- Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino M del C, Otero A, Lopes MC, de Oliveira C, Domingues P, Orfao A & Taberner MD (2015). Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol* **185**, 1820–1833.
- Dang K & Myers KA (2015). The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci* **16**, 6353–6372.
- Dang L et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**, 739–744.
- Daumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, Udo N, Koziak M & Chodkiewicz JP (1997). Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J Neurooncol* **34**, 61–78.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC & Yancopoulos GD (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161–1169.
- Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J & Mazure NM (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* **66**, 3688–3698.
- Dewhirst MW (2007). Intermittent hypoxia furthers the rationale for hypoxia-inducible factor-1 targeting. *Cancer Res* **67**, 854–855.
- Dewhirst MW, Cao Y & Moeller B (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* **8**, 425–437.
- Dische S, Anderson PJ, Sealy R & Watson ER (1983). Carcinoma of the cervix--anaemia, radiotherapy and hyperbaric oxygen. *Br J Radiol* **56**, 251–255.
- Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, Coussens LM, Karin M, Goldrath AW & Johnson RS (2010). Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* **70**, 7465–7475.

- Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J & Tímár J (2007). Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* **170**, 1–15.
- Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z & Bergers G (2008). HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* **13**, 206–220.
- Durafourt BA, Moore CS, Zammit DA, Johnson TA, Zaguia F, Guiot M-C, Bar-Or A & Antel JP (2012). Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* **60**, 717–727.
- Egners A, Erdem M & Cramer T (2016). The Response of Macrophages and Neutrophils to Hypoxia in the Context of Cancer and Other Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm* **2016**, 2053646.
- El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idbah A, Marie Y, Mokhtari K, Thomas J-L, Eichmann A, Delattre J-Y, Maniotis AJ & Sanson M (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* **133**, 973–982.
- Engelhardt B (2006). Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm (Vienna)* **113**, 477–485.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB & Herman JG (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**, 1350–1354.
- Evans SM, Jenkins KW, Chen HI, Jenkins WT, Judy KD, Hwang W-T, Lustig RA, Judkins AR, Grady MS, Hahn SM & Koch CJ (2010). The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study. *Transl Oncol* **3**, 160–169.
- Fam NP, Verma S, Kutryk M & Stewart DJ (2003). Clinician guide to angiogenesis. *Circulation* **108**, 2613–2618.
- Ferrer VP, Moura Neto V & Mentlein R (2018). Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. *Glia*; DOI: 10.1002/glia.23309.
- Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C & Bouvier C (2008). Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol (Paris)* **164**, 505–515.
- Filatova A, Acker T & Garvalov BK (2013). The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 2496–2508.
- Fine HA, Dear KBG, Loeffler JS, Mc Black PL & Canellos GP (1993). Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* **71**, 2585–2597.
- Fiorenzo P, Mongiardi MP, Dimitri D, Cozzolino M, Ferri A, Montano N, Trevisi G, Maira G, Battistini L, Falchetti ML, Levi A & Pallini R (2010). HIF1-positive and HIF1-negative glioblastoma cells compete in vitro but cooperate in tumor growth in vivo. *Int J Oncol* **36**, 785–791.
- Folkman J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182–1186.
- da Fonseca ACC & Badie B (2013). Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies. *Clin Dev Immunol* **2013**, 264124.
- Franklin RA & Li MO (2016). Ontogeny of Tumor-associated Macrophages and Its Implication in Cancer Regulation. *Trends Cancer* **2**, 20–34.

- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P & Ohgaki H (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* **80**, 65–72.
- Fukumura D, Duda DG, Munn LL & Jain RK (2010). Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation* **17**, 206–225.
- Gallego O (2015). Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Curr Oncol* **22**, e273-281.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F & Vescovi A (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**, 7011–7021.
- Gariboldi MB, Ravizza R & Monti E (2010). The IGFR1 inhibitor NVP-AEW541 disrupts a pro-survival and pro-angiogenic IGF-STAT3-HIF1 pathway in human glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* **80**, 455–462.
- Gilbert MR et al. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* **370**, 699–708.
- Ginhoux F & Prinz M (2015). Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020537.
- Goda N, Dozier SJ & Johnson RS (2003). HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression. *Antioxid Redox Signal* **5**, 467–473.
- Gonzalez-Flores A, Aguilar-Quesada R, Siles E, Pozo S, Rodríguez-Lara MI, López-Jiménez L, López-Rodríguez M, Peralta-Leal A, Villar D, Martín-Oliva D, del Peso L, Berra E & Oliver FJ (2014). Interaction between PARP-1 and HIF-2 α in the hypoxic response. *Oncogene* **33**, 891–898.
- Gordan JD, Bertout JA, Hu C-J, Diehl JA & Simon MC (2007). HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* **11**, 335–347.
- Goswami KK, Ghosh T, Ghosh S, Sarkar M, Bose A & Baral R (2017). Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cell Immunol* **316**, 1–10.
- Gotoh M, Shichijo S, Hoshino T, Imai Y, Imaizumi T, Inoue Y, Takasu H, Yamaoka T & Itoh K (1998). Sequence analysis of genes encoding rodent homologues of the human tumor-rejection antigen SART-1. *Jpn J Cancer Res* **89**, 849–854.
- Gottschald OR, Malec V, Krasteva G, Hasan D, Kamlah F, Herold S, Rose F, Seeger W & Hänze J (2010). TIAR and TIA-1 mRNA-binding proteins co-aggregate under conditions of rapid oxygen decline and extreme hypoxia and suppress the HIF-1 α pathway. *J Mol Cell Biol* **2**, 345–356.
- Graeber MB, Scheithauer BW & Kreutzberg GW (2002). Microglia in brain tumors. *Glia* **40**, 252–259.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L & Bradfield CA (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr* **7**, 205–213.
- Guarino M, Rubino B & Ballabio G (2007). The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* **39**, 305–318.
- Guillamo J-S (2011). [Anti-angiogenic strategies in glioblastoma]. *Rev Neurol (Paris)* **167**, 662–667.
- Gupta M, Mungai PT & Goldwasser E (2000). A new transacting factor that modulates hypoxia-induced expression of the erythropoietin gene. *Blood* **96**, 491–497.
- Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U & Bondesson M (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* **9**, 617–628.

- Habberstad AH, Lind-Landström T, Sundstrøm S & Torp SH (2012). Primary human glioblastomas - prognostic value of clinical and histopathological parameters. *Clin Neuropathol* **31**, 361–368.
- Hadjipanayis CG & Van Meir EG (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med* **15**, 519–530.
- Hambardzumyan D & Bergers G (2015). Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer* **1**, 252–265.
- Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, Jiang T & Wu A (2014). Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer* **110**, 2560–2568.
- Hanisch U-K (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140–155.
- Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K & Hiraoka M (2009). The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J Biol Chem* **284**, 5332–5342.
- Hardee ME & Zagzag D (2012). Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* **181**, 1126–1141.
- Harris AL (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**, 38–47.
- Hartwell LH & Kastan MB (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821–1828.
- Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, Jääskeläinen J, Paetau A, Haltia M & Alitalo K (1995). Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am J Pathol* **146**, 368–378.
- 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**, 3274–3284.
- Henze A-T & Acker T (2010). Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle* **9**, 2749–2763.
- Henze A-T, Riedel J, Diem T, Wenner J, Flamme I, Pouysegur J, Plate KH & Acker T (2010). Prolyl hydroxylases 2 and 3 act in gliomas as protective negative feedback regulators of hypoxia-inducible factors. *Cancer Res* **70**, 357–366.
- 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**, 829–840.
- Hochberg FH (1979). Quality and Duration of Survival in Glioblastoma Multiforme: Combined Surgical, Radiation, and Lomustine Therapy. *JAMA* **241**, 1016.
- Hofer S & Merlo A (2002). Options thérapeutiques pour les gliomes malins de degré III et IV OMS. *Forum Médical Suisse* **32/33**, 748–755.
- Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg A, Gradin K, Poellinger L & Pålman S (2006). Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* **10**, 413–423.
- Hosokawa M, Kadota R, Shichijo S, Itoh K, Dmitriev I, Krasnykh V, Curiel DT, Takue Y, Wakasugi H, Takashima S & Heike Y (2005). Cell cycle arrest and apoptosis induced by SART-1 gene transduction. *Anticancer Res* **25**, 1983–1990.
- Hu Y-L, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS & Aghi MK (2012). Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res* **72**, 1773–1783.

- Huang J, Liu F, Liu Z, Tang H, Wu H, Gong Q & Chen J (2017). Immune Checkpoint in Glioblastoma: Promising and Challenging. *Front Pharmacol* **8**, 242.
- Huang LE, Gu J, Schau M & Bunn HF (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7987–7992.
- Humphries W, Wei J, Sampson JH & Heimberger AB (2010). The role of tregs in glioma-mediated immunosuppression: potential target for intervention. *Neurosurg Clin N Am* **21**, 125–137.
- Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E & Heimberger AB (2006). The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-oncology* **8**, 261–279.
- Icard P & Lincet H (2013). [The cancer tumor: a metabolic parasite?]. *Bull Cancer* **100**, 427–433.
- Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD & Steindler DA (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* **39**, 193–206.
- Imaizumi T, Kuramoto T, Matsunaga K, Shichijo S, Yutani S, Shigemori M, Oizumi K & Itoh K (1999). Expression of the tumor-rejection antigen SART1 in brain tumors. *Int J Cancer* **83**, 760–764.
- Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan L-J, Hammond R, Gimotty PA, Keith B & Simon MC (2010). Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* **120**, 2699–2714.
- Inda M-D-M, Bonavia R & Seoane J (2014). Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers (Basel)* **6**, 226–239.
- Irshad K, Mohapatra SK, Srivastava C, Garg H, Mishra S, Dikshit B, Sarkar C, Gupta D, Chandra PS, Chattopadhyay P, Sinha S & Chosdol K (2015). A combined gene signature of hypoxia and notch pathway in human glioblastoma and its prognostic relevance. *PLoS ONE* **10**, e0118201.
- Iwadata Y (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* **11**, 1615–1620.
- Jain RK & Carmeliet P (2012). SnapShot: Tumor angiogenesis. *Cell* **149**, 1408-1408.e1.
- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG & Batchelor TT (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* **8**, 610–622.
- Jalal S, Earley JN & Turchi JJ (2011). DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clin Cancer Res* **17**, 6973–6984.
- Jögi A, Øra I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H & Pålman S (2002). Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7021–7026.
- Johansson E, Grassi ES, Pantazopoulou V, Tong B, Lindgren D, Berg TJ, Pietras EJ, Axelson H & Pietras A (2017). CD44 Interacts with HIF-2 α to Modulate the Hypoxic Phenotype of Perinecrotic and Perivascular Glioma Cells. *Cell Rep* **20**, 1641–1653.
- Jokilehto T & Jaakkola PM (2010). The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. *J Cell Mol Med* **14**, 758–770.
- Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, Balasubramanian V, Wagemakers M, den Dunnen WFA & Krut FAE (2015). Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis. *Cancer Lett* **359**, 107–116.
- Jouanneau E, Black KL, Veiga L, Corder R, Goverdhana S, Zhai Y, Zhang X, Panwar A, Mardiros A, Wang H, Gragg A, Zandian M, Irvin DK & Wheeler CJ (2014).

- Intrinsically de-sialylated CD103(+) CD8 T cells mediate beneficial anti-glioma immune responses. *Cancer Immunol Immunother* **63**, 911–924.
- Kaal ECA & Vecht CJ (2004). The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol* **16**, 593–600.
- Kahlert UD, Nikkhah G & Maciaczyk J (2013). Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett* **331**, 131–138.
- Karsy M, Guan J, Jensen R, Huang LE & Colman H (2016). The Impact of Hypoxia and Mesenchymal Transition on Glioblastoma Pathogenesis and Cancer Stem Cells Regulation. *World Neurosurg* **88**, 222–236.
- Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ & Van Meir EG (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology* **7**, 134–153.
- Kawai N, Lin W, Cao W-D, Ogawa D, Miyake K, Haba R, Maeda Y, Yamamoto Y, Nishiyama Y & Tamiya T (2014). Correlation between ¹⁸F-fluoromisonidazole PET and expression of HIF-1 α and VEGF in newly diagnosed and recurrent malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **41**, 1870–1878.
- Kawataki T, Yamane T, Naganuma H, Rousselle P, Andurén I, Tryggvason K & Patarroyo M (2007). Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp Cell Res* **313**, 3819–3831.
- Keith B, Johnson RS & Simon MC (2012). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature Reviews Cancer* **12**, 9–22.
- Keller A, Harz C, Matzas M, Meder B, Katus HA, Ludwig N, Fischer U & Meese E (2011). Identification of novel SNPs in glioblastoma using targeted resequencing. *PLoS ONE* **6**, e18158.
- Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA & Semenza GL (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* **93**, 1074–1081.
- Kempf H, Bleicher M & Meyer-Hermann M (2015). Spatio-Temporal Dynamics of Hypoxia during Radiotherapy. *PLoS ONE* **10**, e0133357.
- Kernohan JW & Mabon RF (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin* **24**, 71–75.
- Kessler J, Hahnel A, Wichmann H, Rot S, Kappler M, Bache M & Vordermark D (2010). HIF-1 α inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *BMC Cancer* **10**, 605.
- Kewley RJ, Whitelaw ML & Chapman-Smith A (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 189–204.
- Kim JE et al. (2017). Combination Therapy with Anti-PD-1, Anti-TIM-3, and Focal Radiation Results in Regression of Murine Gliomas. *Clin Cancer Res* **23**, 124–136.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS & Ferrara N (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841–844.
- Kim Y-H, Jung T-Y, Jung S, Jang W-Y, Moon K-S, Kim I-Y, Lee M-C & Lee J-J (2012). Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas. *Br J Neurosurg* **26**, 21–27.
- Kim YZ (2014). Altered histone modifications in gliomas. *Brain Tumor Res Treat* **2**, 7–21.
- Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger A-K, Drechsel D, Fischer S, Konstantinova I, Habermann B, Grabner H, Yaspo M-L, Himmelbauer H, Korn B, Neugebauer K, Pisabarro MT & Buchholz F (2004). An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* **432**, 1036–1040.

- Klaus A & Birchmeier W (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 387–398.
- Koh MY, Darnay BG & Powis G (2008). Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol* **28**, 7081–7095.
- Koh MY, Lemos R, Liu X & Powis G (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res* **71**, 4015–4027.
- Koh MY, Nguyen V, Lemos R, Darnay BG, Kiriakova G, Abdelmelek M, Ho TH, Karam J, Monzon FA, Jonasch E & Powis G (2015). Hypoxia-induced SUMOylation of E3 ligase HAF determines specific activation of HIF2 in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* **75**, 316–329.
- Koh MY & Powis G (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 364–372.
- Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkisson S, Losman JA, Joensuu P, Bergmann U, Gross S, Travins J, Weiss S, Looper R, Ligon KL, Verhaak RGW, Yan H & Kaelin WG (2012). Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* **483**, 484–488.
- Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J & Takeya M (2008). Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* **216**, 15–24.
- Konnikova L, Simeone MC, Kruger MM, Kotecki M & Cochran BH (2005). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res* **65**, 6516–6520.
- Koong AC, Chen EY & Giaccia AJ (1994). Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* **54**, 1425–1430.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL & Sivridis E (2006). Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res* **66**, 632–637.
- Krieg AJ, Rankin EB, Chan D, Razorenova O, Fernandez S & Giaccia AJ (2010). Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth. *Mol Cell Biol* **30**, 344–353.
- Ku M-C, Wolf SA, Respondek D, Matyash V, Pohlmann A, Waiczies S, Waiczies H, Niendorf T, Synowitz M, Glass R & Kettenmann H (2013). GDNF mediates glioblastoma-induced microglia attraction but not astrogliosis. *Acta Neuropathol* **125**, 609–620.
- Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D & Sawaya R (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery* **95**, 190–198.
- Laetsch TW, Liu X, Vu A, Sliozberg M, Vido M, Elci OU, Goldsmith KC & Hogarty MD (2014). Multiple components of the spliceosome regulate Mcl1 activity in neuroblastoma. *Cell Death Dis* **5**, e1072.
- Lagadic-Gossmann D, Huc L & Lecreur V (2004). Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ* **11**, 953–961.
- Lai X-M, Liu S-Y, Tsai Y-T, Sun G-H, Chang S-Y, Huang S-M & Cha T-L (2017). HAF mediates the evasive resistance of anti-angiogenesis TKI through disrupting HIF-1 α and HIF-2 α balance in renal cell carcinoma. *Oncotarget* **8**, 49713–49724.

- Lanvin O, Monferran S, Delmas C, Couderc B, Toulas C & Cohen-Jonathan-Moyal E (2013). Radiation-induced mitotic cell death and glioblastoma radioresistance: a new regulating pathway controlled by integrin-linked kinase, hypoxia-inducible factor 1 alpha and survivin in U87 cells. *Eur J Cancer* **49**, 2884–2891.
- Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL & Rich JN (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* **29**, 1203–1217.
- Lauber K, Ernst A, Orth M, Herrmann M & Belka C (2012). Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front Oncol* **2**, 116.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC & Semenza GL (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* **21**, 3995–4004.
- Le Bras A, Lionneton F, Mattot V, Lelièvre E, Caetano B, Spruyt N & Soncin F (2007). HIF-2alpha specifically activates the VE-cadherin promoter independently of hypoxia and in synergy with Ets-1 through two essential ETS-binding sites. *Oncogene* **26**, 7480–7489.
- Le DM, Besson A, Fogg DK, Choi K-S, Waisman DM, Goodyer CG, Rewcastle B & Yong VW (2003). Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *J Neurosci* **23**, 4034–4043.
- Leblond MM, G rault AN, Corroyer-Dulmont A, MacKenzie ET, Petit E, Bernaudin M & Valable S (2015). Hypoxia induces macrophage polarization and re-education toward an M2 phenotype in U87 and U251 glioblastoma models. *Oncoimmunology* **5**, e1056442.
- Lee K, Lynd JD, O'Reilly S, Kiupel M, McCormick JJ & LaPres JJ (2008). The biphasic role of the hypoxia-inducible factor prolyl-4-hydroxylase, PHD2, in modulating tumor-forming potential. *Mol Cancer Res* **6**, 829–842.
- Lee KE & Simon MC (2015). SnapShot: Hypoxia-Inducible Factors. *Cell* **163**, 1288–1288.e1.
- Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP & Iruela-Arispe ML (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* **130**, 691–703.
- Li H, Ko HP & Whitlock JP (1996). Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem* **271**, 21262–21267.
- Li H, Li J, Cheng G, Zhang J & Li X (2016). IDH mutation and MGMT promoter methylation are associated with the pseudoprogression and improved prognosis of glioblastoma multiforme patients who have undergone concurrent and adjuvant temozolomide-based chemoradiotherapy. *Clin Neurol Neurosurg* **151**, 31–36.
- Li W & Graeber MB (2012). The molecular profile of microglia under the influence of glioma. *Neuro-oncology* **14**, 958–978.
- Li Y, Millikan RC, Carozza S, Newman B, Liu E, Davis R, Miike R & Wrensch M (1998). p53 mutations in malignant gliomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 303–308.
- Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB & Rich JN (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* **15**, 501–513.
- Lim J-H, Lee Y-M, Chun Y-S, Chen J, Kim J-E & Park J-W (2010). Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell* **38**, 864–878.
- Lin W, Zhu C, Hong J, Zhao L, Jilg N, Fusco DN, Schaefer EA, Brisac C, Liu X, Peng LF, Xu Q & Chung RT (2015). The spliceosome factor SART1 exerts its anti-HCV action through mRNA splicing. *J Hepatol* **62**, 1024–1032.

- Lino MM, Merlo A & Boulay J-L (2010). Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target? *BMC Med* **8**, 72.
- Liu X, Zhang Q, Mu Y, Zhang X, Sai K, Pang JC-S, Ng H-K & Chen Z (2011). Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *J Neurooncol* **105**, 173–179.
- Liu YV & Semenza GL (2007). RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* **6**, 656–659.
- Lou F, Chen X, Jalink M, Zhu Q, Ge N, Zhao S, Fang X, Fan Y, Björkholm M, Liu Z & Xu D (2007). The opposing effect of hypoxia-inducible factor-2alpha on expression of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cancer Res* **5**, 793–800.
- Louis DN (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* **1**, 97–117.
- 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 Neuropathologica* **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 Neuropathologica* **131**, 803–820.
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH & Kipnis J (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**, 337–341.
- Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D, Isachenko N, Fouse SD, Phillips JJ, Cheresch DA, Park M & Bergers G (2012). VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* **22**, 21–35.
- Luo W, Chang R, Zhong J, Pandey A & Semenza GL (2012). Histone demethylase JMJD2C is a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 that is required for breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, E3367–3376.
- Machein MR, Knedla A, Knoth R, Wagner S, Neuschl E & Plate KH (2004). Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model. *Am J Pathol* **165**, 1557–1570.
- Maciaczyk D, Picard D, Zhao L, Koch K, Herrera-Rios D, Li G, Marquardt V, Pauck D, Hoerbelt T, Zhang W, Ouwens DM, Remke M, Jiang T, Steiger HJ, Maciaczyk J & Kahlert UD (2017). CBF1 is clinically prognostic and serves as a target to block cellular invasion and chemoresistance of EMT-like glioblastoma cells. *Br J Cancer* **117**, 102–112.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN & Yancopoulos GD (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55–60.
- Makarova OV, Makarov EM & Lührmann R (2001). The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *EMBO J* **20**, 2553–2563.
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A & Poellinger L (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* **414**, 550–554.
- Malatesta M, Steinhauer C, Mohammad F, Pandey DP, Squatrito M & Helin K (2013). Histone acetyltransferase PCAF is required for Hedgehog-Gli-dependent transcription and cancer cell proliferation. *Cancer Res* **73**, 6323–6333.
- Mandl MM, Zhang S, Ulrich M, Schmoeckel E, Mayr D, Vollmar AM & Liebl J (2017). Inhibition of Cdk5 induces cell death of tumor-initiating cells. *Br J Cancer* **116**, 912–922.

- Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J & Weinberg RA (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A & Locati M (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* **229**, 176–185.
- Marcelino Meliso F, Hubert CG, Favoretto Galante PA & Penalva LO (2017). RNA processing as an alternative route to attack glioblastoma. *Hum Genet* **136**, 1129–1141.
- Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, Jelkmann W, Jaakkola P & Metzen E (2004). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J* **381**, 761–767.
- Matrone C, Pignataro G, Molinaro P, Irace C, Scorziello A, Di Renzo GF & Annunziato L (2004). HIF-1 α reveals a binding activity to the promoter of iNOS gene after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem* **90**, 368–378.
- Matsumoto T, Hamada M, Osanai M & Fujiwara H (2006). Essential domains for ribonucleoprotein complex formation required for retrotransposition of telomere-specific non-long terminal repeat retrotransposon SART1. *Mol Cell Biol* **26**, 5168–5179.
- Matsunaga K, Nakao M, Masuoka K, Inoue Y, Gouhara R, Imaizumi T, Nishizaka S & Itoh K (1999). Cytokines required for induction of histocompatibility leukocyte antigen-class I-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by a SART1-derived peptide. *Jpn J Cancer Res* **90**, 1007–1015.
- Mayer A, Schneider F, Vaupel P, Sommer C & Schmidberger H (2012). Differential expression of HIF-1 in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Oncol* **41**, 1260–1270.
- McIntyre A, Patiar S, Wigfield S, Li J-L, Ledaki I, Turley H, Leek R, Snell C, Gatter K, Sly WS, Vaughan-Jones RD, Swietach P & Harris AL (2012). Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. *Clin Cancer Res* **18**, 3100–3111.
- McKeever PE, Fligel SE, Varani J, Castle RL & Hood TW (1989). Products of cells cultured from gliomas. VII. Extracellular matrix proteins of gliomas which contain glial fibrillary acidic protein. *Lab Invest* **60**, 286–295.
- Mi Z, Rapisarda A, Taylor L, Brooks A, Creighton-Gutteridge M, Melillo G & Varesio L (2008). Synergistic induction of HIF-1 α transcriptional activity by hypoxia and lipopolysaccharide in macrophages. *Cell Cycle* **7**, 232–241.
- Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP & Moore CS (2015). Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* **138**, 1138–1159.
- Min J-H, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG & Pavletich NP (2002). Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* **296**, 1886–1889.
- Minchinton AI & Tannock IF (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* **6**, 583–592.
- Miranda-Gonçalves V, Reis RM & Baltazar F (2016). Lactate Transporters and pH Regulation: Potential Therapeutic Targets in Glioblastomas. *Curr Cancer Drug Targets* **16**, 388–399.
- Moeller BJ & Dewhirst MW (2004). Raising the bar: how HIF-1 helps determine tumor radiosensitivity. *Cell Cycle* **3**, 1107–1110.
- Monteiro AR, Hill R, Pilkington GJ & Madureira PA (2017). The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells*; DOI: 10.3390/cells6040045.

- Monti E & Gariboldi MB (2011). HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention. *Curr Mol Pharmacol* **4**, 62–77.
- Mosser DM & Edwards JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958–969.
- Mrugala MM & Chamberlain MC (2008). Mechanisms of disease: temozolomide and glioblastoma--look to the future. *Nat Clin Pract Oncol* **5**, 476–486.
- Murdoch C, Giannoudis A & Lewis CE (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* **104**, 2224–2234.
- Nambiar D, Rajamani P & Singh RP (2011). Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. *Mutat Res* **728**, 139–157.
- Nguyen LK, Cavadas MAS, Scholz CC, Fitzpatrick SF, Bruning U, Cummins EP, Tambuwala MM, Manresa MC, Kholodenko BN, Taylor CT & Cheong A (2013). A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) network. *Journal of Cell Science* **126**, 1454–1463.
- Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P & Ohgaki H (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res* **15**, 6002–6007.
- Noushmehr H et al. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* **17**, 510–522.
- Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23–28.
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW & Weinert TA (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**, 617–656.
- Ogawa K, Ishiuchi S, Inoue O, Yoshii Y, Saito A, Watanabe T, Iraha S, Toita T, Kakinohana Y, Ariga T, Kasuya G & Murayama S (2012). Phase II trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with multiagent chemotherapy (procarbazine, nimustine, and vincristine) for high-grade gliomas: long-term results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **82**, 732–738.
- Ohgaki H & Kleihues P (2007). Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology* **170**, 1445–1453.
- Oka Y, Varmark H, Vitting-Seerup K, Beli P, Waage J, Hakobyan A, Mistrik M, Choudhary C, Rohde M, Bekker-Jensen S & Mailand N (2014). UBL5 is essential for pre-mRNA splicing and sister chromatid cohesion in human cells. *EMBO Rep* **15**, 956–964.
- Onesto C, Berra E, Grépin R & Pagès G (2004). Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem* **279**, 34217–34226.
- Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C & Barnholtz-Sloan JS (2016). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology* **18**, v1–v75.
- Pacary E, Legros H, Valable S, Duchatelle P, Lecocq M, Petit E, Nicole O & Bernaudin M (2006). Synergistic effects of CoCl₂ and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *J Cell Sci* **119**, 2667–2678.
- Papadopoulos MC, Saadoun S, Binder DK, Manley GT, Krishna S & Verkman AS (2004). Molecular mechanisms of brain tumor edema. *Neuroscience* **129**, 1011–1020.
- Parsons DW et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807–1812.
- Pawlik TM & Keyomarsi K (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**, 928–942.
- Pérès EA, Gérault AN, Valable S, Roussel S, Toutain J, Divoux D, Guillamo J-S, Sanson M, Bernaudin M & Petit E (2015). Silencing erythropoietin receptor on glioma cells

- reinforces efficacy of temozolomide and X-rays through senescence and mitotic catastrophe. *Oncotarget* **6**, 2101–2119.
- Pérès EA, Valable S, Guillamo J-S, Marteau L, Bernaudin J-F, Roussel S, Lechapt-Zalcman E, Bernaudin M & Petit E (2011). Targeting the erythropoietin receptor on glioma cells reduces tumour growth. *Exp Cell Res* **317**, 2321–2332.
- Persson AB & Buschmann IR (2011). Vascular growth in health and disease. *Front Mol Neurosci* **4**, 14.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG & Aldape K (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**, 157–173.
- Pietras A, Johnsson AS & Pålman S (2010). The HIF-2 α -driven pseudo-hypoxic phenotype in tumor aggressiveness, differentiation, and vascularization. *Curr Top Microbiol Immunol* **345**, 1–20.
- Pietras A, Katz AM, Ekström 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**, 357–369.
- Ping Y-F & Bian X-W (2011). Concise review: Contribution of cancer stem cells to neovascularization. *Stem Cells* **29**, 888–894.
- Pollard PJ, Loenarz C, Mole DR, McDonough MA, Gleadle JM, Schofield CJ & Ratcliffe PJ (2008). Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *Biochem J* **416**, 387–394.
- Polyak K & Weinberg RA (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* **9**, 265–273.
- Pontén J & Macintyre EH (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glioma. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**, 465–486.
- Pouyssegur J, Dayan F & Mazure NM (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**, 437–443.
- Proescholdt MA, Heiss JD, Walbridge S, Mühlhauser J, Capogrossi MC, Oldfield EH & Merrill MJ (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 613–627.
- Proescholdt MA, Merrill MJ, Stoerr E-M, Lohmeier A, Pohl F & Brawanski A (2012). Function of carbonic anhydrase IX in glioblastoma multiforme. *Neuro-oncology* **14**, 1357–1366.
- Prosniak M, Harshyne LA, Andrews DW, Kenyon LC, Bedelbaeva K, Apanasovich TV, Heber-Katz E, Curtis MT, Cotzia P & Hooper DC (2013). Glioma grade is associated with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers. *Clin Cancer Res* **19**, 3776–3786.
- Puisségur M-P, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, Maurin T, Lebrigand K, Cardinaud B, Hofman V, Fourre S, Magnone V, Ricci JE, Pouyssegur J, Gounon P, Hofman P, Barbry P & Mari B (2011). miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ* **18**, 465–478.
- Qazi H, Shi Z-D & Tarbell JM (2011). Fluid shear stress regulates the invasive potential of glioma cells via modulation of migratory activity and matrix metalloproteinase expression. *PLoS ONE* **6**, e20348.
- Rahman R, Smith S, Rahman C & Grundy R (2010). Antiangiogenic therapy and mechanisms of tumor resistance in malignant glioma. *J Oncol* **2010**, 251231.

- Ramplung R, Cruickshank G, Lewis AD, Fitzsimmons SA & Workman P (1994). Direct measurement of pO₂ distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **29**, 427–431.
- Raychaudhuri B, Rayman P, Ireland J, Ko J, Rini B, Borden EC, Garcia J, Vogelbaum MA & Finke J (2011). Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-oncology* **13**, 591–599.
- Reichert M, Steinbach JP, Supra P & Weller M (2002). Modulation of growth and radiochemosensitivity of human malignant glioma cells by acidosis. *Cancer* **95**, 1113–1119.
- Reifenberger G, Wirsching H-G, Knobbe-Thomsen CB & Weller M (2017). Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 434–452.
- Reitman ZJ, Parsons DW & Yan H (2010). IDH1 and IDH2: not your typical oncogenes. *Cancer Cell* **17**, 215–216.
- Renfrow JJ, Mott RT, Huang Y, Wong T, Lesser GJ & Debinski W (2017). In situ expression of hypoxia inducible factor 2- α in gliomas. *J Clin Oncol*.
- Renfrow JJ, Soike MH, Debinski W, Ramkissoon SH, Mott RT, Frenkel MB, Sarkaria JN, Lesser GJ & Strowd RE (2018). Hypoxia-inducible factor 2 α : a novel target in gliomas. *Future Med Chem* **10**, 2227–2236.
- Rennert RC, Achrol AS, Januszyk M, Kahn SA, Liu TT, Liu Y, Sahoo D, Rodrigues M, Maan ZN, Wong VW, Cheshier SH, Chang SD, Steinberg GK, Harsh GR & Gurtner GC (2016). Multiple Subsets of Brain Tumor Initiating Cells Coexist in Glioblastoma. *Stem Cells* **34**, 1702–1707.
- Richards R, Jenkinson MD, Haylock BJ & See V (2016). Cell cycle progression in glioblastoma cells is unaffected by pathophysiological levels of hypoxia. *PeerJ* **4**, e1755.
- Ristow M & Zarse K (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol* **45**, 410–418.
- Rodriguez FJ, Orr BA, Ligon KL & Eberhart CG (2012). Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget* **3**, 98–106.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS & Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858–5868.
- Romani M, Pistillo MP, Carosio R, Morabito A & Banelli B (2018). Immune Checkpoints and Innovative Therapies in Glioblastoma. *Front Oncol* **8**, 464.
- 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**, 449–457.
- Rothkamm K & Löbrich M (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 5057–5062.
- Ryu S, Buatti JM, Morris A, Kalkanis SN, Ryken TC, Olson JJ & AANS/CNS Joint Guidelines Committee (2014). The role of radiotherapy in the management of progressive glioblastoma: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol* **118**, 489–499.
- Sahoo P, Rathore RKS, Awasthi R, Roy B, Verma S, Rathore D, Behari S, Husain M, Husain N, Pandey CM, Mohakud S & Gupta RK (2013). Subcompartmentalization of extracellular extravascular space (EES) into permeability and leaky space with local arterial input function (AIF) results in improved discrimination between high- and low-grade glioma using dynamic contrast-enhanced (DCE) MRI. *J Magn Reson Imaging* **38**, 677–688.

- Salceda S, Beck I, Srinivas V & Caro J (1997). Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney Int* **51**, 556–559.
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K & Delattre J-Y (2009). Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 4150–4154.
- Sayour EJ, McLendon P, McLendon R, De Leon G, Reynolds R, Kresak J, Sampson JH & Mitchell DA (2015). Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* **64**, 419–427.
- Schimmel J, Balog CIA, Deelder AM, Drijfhout JW, Hensbergen PJ & Vertegaal ACO (2010). Positively charged amino acids flanking a sumoylation consensus tetramer on the 110kDa tri-snRNP component SART1 enhance sumoylation efficiency. *J Proteomics* **73**, 1523–1534.
- Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD & Groothuis DR (1999). Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc Res* **58**, 312–328.
- Schmid MC & Varner JA (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol* **2010**, 201026.
- Schmidt N, Windmann S, Reifenberger G & Riemenschneider MJ (2012). DNA hypermethylation and histone modifications downregulate the candidate tumor suppressor gene RRP22 on 22q12 in human gliomas. *Brain Pathol* **22**, 17–25.
- Scholz A, Lang V, Henschler R, Czabanka M, Vajkoczy P, Chavakis E, Drynski J, Harter PN, Mittelbronn M, Dumont DJ, Plate KH & Reiss Y (2011). Angiopoietin-2 promotes myeloid cell infiltration in a β_2 -integrin-dependent manner. *Blood* **118**, 5050–5059.
- Schulz K, Milke L, RübSamen D, Menrad H, Schmid T & Brüne B (2012). HIF-1 α protein is upregulated in HIF-2 α depleted cells via enhanced translation. *FEBS Lett* **586**, 1652–1657.
- Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD & Wrensch M (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology* **2**, 494–503.
- Sciumè G, Santoni A & Bernardini G (2010). Chemokines and glioma: invasion and more. *J Neuroimmunol* **224**, 8–12.
- See AP, Parker JJ & Waziri A (2015). The role of regulatory T cells and microglia in glioblastoma-associated immunosuppression. *J Neurooncol* **123**, 405–412.
- Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze A-T, Nistér M, Reifenberger G, Lundeberg J, Frisén J & Acker T (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . *Brain* **133**, 983–995.
- Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721–732.
- Semenza GL (2006). Development of novel therapeutic strategies that target HIF-1. *Expert Opin Ther Targets* **10**, 267–280.
- Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, Gearhart JD & Antonarakis SE (1991). Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8725–8729.
- Semenza GL & Wang GL (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447–5454.
- Seystahl K, Wick W & Weller M (2016). Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update. *Crit Rev Oncol Hematol* **99**, 389–408.

- Sharma S, Sharma MC, Gupta DK & Sarkar C (2006). Angiogenic patterns and their quantitation in high grade astrocytic tumors. *J Neurooncol* **79**, 19–30.
- Sharp FR & Bernaudin M (2004). HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* **5**, 437–448.
- Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niiya F, Yang D, Toh Y, Yamana H & Itoh K (1998). A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **187**, 277–288.
- Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber H-P & Ferrara N (2007). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol* **25**, 911–920.
- Simon JM, Noël G, Chiras J, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Baillet F & Mazeron JJ (2003). Radiotherapy and chemotherapy with or without carbogen and nicotinamide in inoperable biopsy-proven glioblastoma multiforme. *Radiother Oncol* **67**, 45–51.
- Simonelli M, Persico P, Perrino M, Zucali PA, Navarra P, Pessina F, Scorsetti M, Bello L & Santoro A (2018). Checkpoint inhibitors as treatment for malignant gliomas: “A long way to the top.” *Cancer Treat Rev* **69**, 121–131.
- 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**, 5821–5828.
- Sinha S, Koul N, Dixit D, Sharma V & Sen E (2011). IGF-1 induced HIF-1 α -TLR9 cross talk regulates inflammatory responses in glioma. *Cell Signal* **23**, 1869–1875.
- Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, Iruela-Arispe L, Simon MC & Keith B (2009a). Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood* **114**, 469–477.
- Skuli N, Monferran S, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Toulas C & Cohen-Jonathan Moyal E (2009b). α 3 β 5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res* **69**, 3308–3316.
- Smyth MJ, Dunn GP & Schreiber RD (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* **90**, 1–50.
- Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, Pollack IF & Park DM (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene* **28**, 3949–3959.
- Sottoriva A, Kang H, Ma Z, Graham TA, Salomon MP, Zhao J, Marjoram P, Siegmund K, Press MF, Shibata D & Curtis C (2015). A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet* **47**, 209–216.
- Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C & Tavaré S (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 4009–4014.
- Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH & Harris AL (2001). HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* **61**, 6669–6673.
- Spasic E, Buchheit I, Bernier V & Noël A (2011). [Dosimetry comparison of irradiation with conformal radiotherapy, intensity modulated radiotherapy, conformal radiotherapy in stereotactic conditions and robotic stereotactic radiotherapy for benign brain tumours]. *Cancer Radiother* **15**, 287–293.
- Spence AM, Muzi M, Swanson KR, O’Sullivan F, Rockhill JK, Rajendran JG, Adamsen TCH, Link JM, Swanson PE, Yagle KJ, Rostomily RC, Silbergeld DL & Krohn KA (2008). Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole

- positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res* **14**, 2623–2630.
- Steffens R, Semrau S, Lahmer G, Putz F, Lettmaier S, Eyüpoglu I, Buchfelder M & Fietkau R (2016). Recurrent glioblastoma: who receives tumor specific treatment and how often? *J Neurooncol* **128**, 85–92.
- Stenning S, Freedman L & Bleehen N (1987). An overview of published results from randomized studies of nitrosoureas in primary high grade malignant glioma. *British Journal of Cancer* **56**, 89–90.
- Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL & Del Maestro RF (1987). Quantitative study of microvessel ultrastructure in human peritumoral brain tissue. Evidence for a blood-brain barrier defect. *J Neurosurg* **67**, 697–705.
- Stiehl DP, Wirthner R, Köditz J, Spielmann P, Camenisch G & Wenger RH (2006). Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem* **281**, 23482–23491.
- Stolze IP, Tian Y-M, Appelhoff RJ, Turley H, Wykoff CC, Gleadle JM & Ratcliffe PJ (2004). Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) in regulating hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional target genes [corrected]. *J Biol Chem* **279**, 42719–42725.
- Ströfer M, Jelkmann W, Metzen E, Brockmeier U, Dunst J & Depping R (2011). Stabilisation and knockdown of HIF--two distinct ways comparably important in radiotherapy. *Cell Physiol Biochem* **28**, 805–812.
- Stummer W (2007). Mechanisms of tumor-related brain edema. *Neurosurg Focus* **22**, E8.
- Stupp R, Weller M, Belanger K, Bogdahn U, Ludwin SK, Lacombe D & Mirimanoff RO (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* **10**.
- Sun W, Jelkmann W & Depping R (2014). Prolyl-4-hydroxylase 2 enhances hypoxia-induced glioblastoma cell death by regulating the gene expression of hypoxia-inducible factor- α . *Cell Death Dis* **5**, e1322.
- Sundaramoorthy S, Vázquez-Novelle MD, Lekomtsev S, Howell M & Petronczki M (2014). Functional genomics identifies a requirement of pre-mRNA splicing factors for sister chromatid cohesion. *EMBO J* **33**, 2623–2642.
- Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, Coussens LM & DeClerck YA (2012). Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res* **72**, 2473–2480.
- Taal W et al. (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**, 943–953.
- Takano S (2012). Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation. *Brain Tumor Pathol* **29**, 73–86.
- Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J & Nedergaard M (2001). Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* **7**, 1010–1015.
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ & Harris AL (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* **157**, 411–421.
- Tchoghandjian A, Koh M, Taieb D, Ganaha S, Powis G, Bialecki E, Graziani N, Figarella-Branger D & Metellus P (2016). Hypoxia-associated factor expression in low-grade and anaplastic gliomas: a marker of poor outcome. *Oncotarget*.

- Tomita M & Maeda M (2015). Mechanisms and biological importance of photon-induced bystander responses: do they have an impact on low-dose radiation responses. *J Radiat Res* **56**, 205–219.
- Trylcova J, Busek P, Smetana K, Balaziová E, Dvorankova B, Mifkova A & Sedo A (2015). Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. *Tumour Biol* **36**, 5873–5879.
- Valable S, Eddi D, Constans J-M, Guillamo J-S, Bernaudin M, Roussel S & Petit E (2009). MRI assessment of hemodynamic effects of angiopoietin-2 overexpression in a brain tumor model. *Neuro-oncology* **11**, 488–502.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu H-K, Wen PY & Olson JJ (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* **60**, 166–193.
- Vaupel P (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* **9 Suppl 5**, 10–17.
- Vaupel P (2010). Metabolic microenvironment of tumor cells: a key factor in malignant progression. *Exp Oncol* **32**, 125–127.
- Venkatesh HS, Johung TB, Caretti V, Noll A, Tang Y, Nagaraja S, Gibson EM, Mount CW, Polepalli J, Mitra SS, Woo PJ, Malenka RC, Vogel H, Bredel M, Mallick P & Monje M (2015). Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroigin-3 Secretion. *Cell* **161**, 803–816.
- Verhaak RGW et al. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110.
- Vertegaal ACO, Andersen JS, Ogg SC, Hay RT, Mann M & Lamond AI (2006). Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **5**, 2298–2310.
- Vitucci M, Hayes DN & Miller CR (2011). Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. *Br J Cancer* **104**, 545–553.
- Vordermark D, Katzer A, Baier K, Kraft P & Flentje M (2004). Cell type-specific association of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) protein accumulation and radiobiologic tumor hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 1242–1250.
- Wada T, Shimba S & Tezuka M (2006). Transcriptional regulation of the hypoxia inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) gene during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull* **29**, 49–54.
- Wang GL & Semenza GL (1993). Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* **82**, 3610–3615.
- Wang GL & Semenza GL (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**, 1230–1237.
- Wang H, Zhang Y, Yu W, Zhao X, Xue Y & Xu H (2016). Radiosensitizing effect of irisquinone on glioma through the downregulation of HIF-1 α evaluated by 18F-FDG and 18F-FMISO PET/CT. *Nucl Med Commun* **37**, 705–714.
- Wang J, Wang H, Li Z, Wu Q, Lathia JD, McLendon RE, Hjelmeland AB & Rich JN (2008). c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS ONE* **3**, e3769.
- Wang J-B, Dong D-F, Wang M-D & Gao K (2014). IDH1 overexpression induced chemotherapy resistance and IDH1 mutation enhanced chemotherapy sensitivity in Glioma cells in vitro and in vivo. *Asian Pac J Cancer Prev* **15**, 427–432.
- Wang JYJ & Cho SK (2004). Coordination of repair, checkpoint, and cell death responses to DNA damage. *Adv Protein Chem* **69**, 101–135.

- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P & Ohgaki H (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* **6**, 217–223; discussion 23–24.
- Weiss N, Miller F, Cazaubon S & Couraud P-O (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 842–857.
- Weller M, Cloughesy T, Perry JR & Wick W (2013). Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro-oncology* **15**, 4–27.
- Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A & Loeffler M (2009). Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 5743–5750.
- Weller M, Roth P, Preusser M, Wick W, Reardon DA, Platten M & Sampson JH (2017). Vaccine-based immunotherapeutic approaches to gliomas and beyond. *Nature Reviews Neurology* **13**, 363–374.
- Welti J, Loges S, Dimmeler S & Carmeliet P (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* **123**, 3190–3200.
- Werno C, Menrad H, Weigert A, Dehne N, Goerdts S, Schledzewski K, Kzhyshkowska J & Brüne B (2010). Knockout of HIF-1 α in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis* **31**, 1863–1872.
- Westermarck B, Pontén J & Hugosson R (1973). Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand A* **81**, 791–805.
- Wick W et al. (2017). Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med* **377**, 1954–1963.
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ & Maxwell PH (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* **92**, 2260–2268.
- Wigerup C, Pählman S & Bexell D (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther* **164**, 152–169.
- Wild-Bode C, Weller M & Wick W (2001). Molecular determinants of glioma cell migration and invasion. *Journal of Neurosurgery* **94**, 978–984.
- Wiranowska M & Vrionis FD (2013). Gliomas: Symptoms, Diagnosis and Treatment Options. *Nova Science Publishers Inc.*
- Wöhrer A, Waldhör T, Heinzl H, Hackl M, Feichtinger J, Gruber-Mösenbacher U, Kiefer A, Maier H, Motz R, Reiner-Concin A, Richling B, Idriceanu C, Scarpatetti M, Sedivy R, Bankl H-C, Stiglbauer W, Preusser M, Rössler K & Hainfellner JA (2009). The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. *J Neurooncol* **95**, 401–411.
- Wolburg H & Lippoldt A (2002). Tight junctions of the blood–brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology* **15**.
- Womeldorff M, Gillespie D & Jensen RL (2014). Hypoxia-inducible factor-1 and associated upstream and downstream proteins in the pathophysiology and management of glioblastoma. *Neurosurg Focus* **37**, E8.

- Wrann S, Kaufmann MR, Wirthner R, Stiehl DP & Wenger RH (2013). HIF mediated and DNA damage independent histone H2AX phosphorylation in chronic hypoxia. *Biol Chem* **394**, 519–528.
- Xu L, Fukumura D & Jain RK (2002). Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J Biol Chem* **277**, 11368–11374.
- Xue J, Li X, Jiao S, Wei Y, Wu G & Fang J (2010). Prolyl hydroxylase-3 is down-regulated in colorectal cancer cells and inhibits IKKbeta independent of hydroxylase activity. *Gastroenterology* **138**, 606–615.
- Yaghi L, Poras I, Simoes RT, Donadi EA, Tost J, Daunay A, de Almeida BS, Carosella ED & Moreau P (2016). Hypoxia inducible factor-1 mediates the expression of the immune checkpoint HLA-G in glioma cells through hypoxia response element located in exon 2. *Oncotarget* **7**, 63690–63707.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B & Bigner DD (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**, 765–773.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ & Holash J (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242–248.
- Yang I, Tihan T, Han SJ, Wrensch MR, Wiencke J, Sughrue ME & Parsa AT (2010). CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *J Clin Neurosci* **17**, 1381–1385.
- Yeom CJ, Goto Y, Zhu Y, Hiraoka M & Harada H (2012). Microenvironments and cellular characteristics in the micro tumor cords of malignant solid tumors. *Int J Mol Sci* **13**, 13949–13965.
- Yoon S-J, Shim J-K, Chang JH, Moon JH, Roh T-H, Sung KS, Lee J-H, Kim E-H, Kim SH, Hong Y-K, Lee S-J, Huh Y-M & Kang S-G (2016). Tumor Mesenchymal Stem-Like Cell as a Prognostic Marker in Primary Glioblastoma. *Stem Cells Int* **2016**, 6756983.
- Yoshida D, Kim K, Noha M & Teramoto A (2006). Hypoxia inducible factor 1-alpha regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells. *J Neurooncol* **76**, 13–21.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL & Yu JS (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**, 9392–9400.
- Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB & Newcomb EW (2006). Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Laboratory Investigation* **86**, 1221–1232.
- Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW & Semenza GL (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* **88**, 2606–2618.
- Zeiner PS, Preusse C, Blank A-E, Zachskorn C, Baumgarten P, Caspary L, Braczynski AK, Weissenberger J, Bratzke H, Reiß S, Pennartz S, Winkelmann R, Senft C, Plate KH, Wischhusen J, Stenzel W, Harter PN & Mittelbronn M (2015). MIF Receptor CD74 is Restricted to Microglia/Macrophages, Associated with a M1-Polarized Immune Milieu and Prolonged Patient Survival in Gliomas. *Brain Pathol* **25**, 491–504.
- Zhai H, Heppner FL & Tsirka SE (2011). Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia* **59**, 472–485.
- Zhang JG, Eguchi J, Kruse CA, Gomez GG, Fakhrai H, Schroter S, Ma W, Hoa N, Minev B, Delgado C, Wepsic HT, Okada H & Jadus MR (2007). Antigenic profiling of glioma

- cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics. *Clin Cancer Res* **13**, 566–575.
- Zhang Z, Yao L, Yang J, Wang Z & Du G (2018). PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Molecular Medicine Reports*; DOI: 10.3892/mmr.2018.9375.
- Zhao J, Du F, Luo Y, Shen G, Zheng F & Xu B (2015). The emerging role of hypoxia-inducible factor-2 involved in chemo/radioresistance in solid tumors. *Cancer Treat Rev* **41**, 623–633.
- Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan K-L & Xiong Y (2009). Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science* **324**, 261–265.
- Zhou BB & Elledge SJ (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433–439.
- Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P, Bauchet F, Kerr C, Fabbro M, Figarella-Branger D, Taillandier L, Duffau H, Trétarre B & Bauchet L (2012). Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives. *Neurochirurgie* **58**, 4–13.

Annexe I

Annexe I : Curriculum Vitae

Gaëlle Lambert, 27 ans
 206, Rue Saint Jean
 14000 Caen
 06.33.80.56.55
 gaelle.lambert@laposte.net

Formation

- 2015-2018 **Doctorat Biologie, Médecine et Santé-Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie – Université de Caen Normandie**
- 2013-2015 **Master Sciences Biomédicales, Neurosciences - Mention Bien**
Université de Rouen
- 2010-2013 **Licence Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire, et Physiologie**
Université de Rouen
- 2008-2010 **Première année du Premier Cycle des Etudes de Médecine**
Université de Rouen

Expériences professionnelles

- 2015-2018 **Unité ISTCT - FRE2001 Imagerie et Stratégies Thérapeutiques des pathologies Cérébrales et Tumorales**
Pr. Edwige Petit – Université de Caen-Normandie
Evaluation préclinique de l'impact des facteurs HAF et HIF-2 sur la croissance des tumeurs des glioblastomes et leur réponse à la radiothérapie.
- 2015 **INSERM U982 Communication Neuronale et Neuroendocrine**
Pr. Pierrick Gandolfo / Dr. Hélène Castel - Université de Rouen
Rôle de la protéine Gαi3 dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G chimiotactiques

- 2014 **INSERM U982 Communication Neuronale et Neuroendocrine**
Pr. Pierrick Gandolfo / Dr. Hélène Castel - Université de Rouen
Etude de l'impact d'un traitement conjugu e ciblant deux systèmes
peptidergiques vasoactifs sur la tumorigenèse gliale
- 2013 **UMR 7364 Laboratoire de neurosciences cognitives et adaptatives**
Dr. Anne-Laurence Boutillier - Université de Strasbourg
Mise en évidence par immunohistochimie de neurones exprimant la
doublecortine dans le gyrus dent e de souris transgéniques après un
traitement pharmacologique.

Activités d'enseignements et d'encadrements

- 2017-2018 Encadrement de stagiaires de L3/M1
- 2016 Activités d'enseignement à l'Université de Caen dans le cadre d'un
avenant enseignement au contrat doctoral : remise à niveau en Biologie
et Physiologie du M1 Valorisation des Innovations Biologiques (64 h)

Compétences techniques

Expérimentation animale

- Manipulation des animaux (souris *nude*)
- Administration de solutions en intrapéritonéal et sous-cutan e
- Euthanasie, perfusion cardiaque
- Prélèvement d'organes

Biologie cellulaire

- Culture lignées cellulaires
- Culture cellulaire en condition hypoxique (manipulation chambre à hypoxie)
- Culture de tranches *ex vivo* après implantation de cellules tumorales
- Irradiation cellulaire par rayons X (  l'aide d'un irradiateur XRAD)
- Cytométrie en flux
- Marquage Annexine
- Cultures bactériennes, transformation bactérienne
- Etude de migration (test de la blessure, chambre modifi e de Boyden)
- Activité luciférase

Biologie moléculaire

- Extraction ADN/ARN/protéines
- PCR/RT-qPCR/gel électrophorèse
- Western blot

Imagerie

- IRM sur la souris
- Méthode de coupe de tissus au freezing microtome
- Méthode de coupe de cerveau murin au *tissu chopper*
- Immunocytochimie/Immunohistochimie
- Microscope à  pi-fluorescence

- Microscope time-lapse

Informatique

- ImageJ (traitements d'images)
- Microsoft office

Logistique

- Gestion de stocks
- Commande de produits
- Négociation avec commerciaux/Demande de devis

Communications scientifiques

Communications affichées

Gaëlle Lambert, Elodie Pérès, Karim Bordji, Didier Divoux, Jérôme Toutain, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Edwige Petit **The hypoxia-associated factor HAF, a potential therapeutic target for glioblastoma? Evaluation of its role in survival of glioma cells and their radiosensitivity to X-rays.** 1ère Journée normande de recherche biomédicale, 16 septembre 2016, Rouen.

Lambert G, Pérès EA, Bordji K, Divoux D, Toutain J, Valable S, Bernaudin M, Petit E. **HAF: a potential mediator in glioblastoma growth?** Journées de l'Ecole Doctorale, 16-17 mars 2017, Le Havre.

Charly Helaine, Aurélie N. Gérard, Marine M. Leblond, Aurélien Corroyer-Dulmont, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable et Edwige Petit. **Etude de la radiosensibilité du compartiment vasculaire dans un contexte de glioblastome.** 10èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 10-12 mai 2017.

Pérès EA*, Gérard AN*, Lambert G, Anfray C, Leblond MM, Divoux D, Toutain J, Valable S, Bernaudin M, Petit E. **Efficacité de l'hadronthérapie par ions carbone en comparaison à la radiothérapie conventionnelle par rayons X dans les glioblastomes : influence de l'oxygène ?** 10èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 10-12 mai 2017.

Charly Helaine, Aurélie N. Gérard, Marine M. Leblond, Aurélie Ferré, Aurélien Corroyer-Dulmont, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable et Edwige Petit. **Influence du microenvironnement tumoral sur la radiosensibilité de la composante vasculaire des glioblastomes : études in vivo et in vitro.** Journée Normande de la Recherche biomédicale, Caen, 14 novembre 2017

Pérès EA*, Gérard AN*, Lambert G, Anfray C, Leblond MM, Divoux D, Toutain J, Valable S, Bernaudin M, Petit E. **Efficacité de l'hadronthérapie par ions carbone en comparaison à la radiothérapie conventionnelle par rayons X dans les glioblastomes : quelle influence de l'oxygène ?** Journée Normande de la Recherche biomédicale, Caen, 14 novembre 2017.

Gaëlle Lambert, Elodie Pérès, Charly Helaine, Didier Divoux, Jérôme Toutain, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Edwige Petit **What about HAF in proliferation and radioresistance of glioma cells in vitro?** Journées de l'Ecole Doctorale, 22-23 mars 2018, Rouen.

Charly Helaine, Aurélie N. Gérard, Marine M. Leblond, Aurélien Corroyer-Dulmont, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable et Edwige Petit. **A dialogue between endothelial cells and macrophages might contribute to vasculopathy in response to brain radiotherapy.** 20èmes journées de l'école doctorale, Rouen, 22-23 mars 2018.

Gaëlle Lambert, Elodie Pérès, Charly Helaine, Didier Divoux, Jérôme Toutain, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Edwige Petit **HAF inhibition in glioma cells reduces tumor growth without modifying the efficacy of chemo- and radiotherapy.** 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 30 juin-3 juillet 2018, Amsterdam.

Charly Helaine, Aurélie Ferré, Marine Leblond, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. **Macrophages contribute to vascular damage after irradiation in glioblastoma: in vitro and in vivo studies.** International Marie Sklodowska-Curie Meeting, Paris, 12 Octobre 2018.

Charly H elaine, Aurélie Ferr e, Marine M. Leblond, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. **Involvement of tumor microenvironment on the sensitivity of glioblastoma vascularization to irradiation.** Société Française d'Angiogenèse, Reims, 14-16 Octobre 2018.

Communications orales

Lambert G, Pérès EA, Bordji K, Divoux D, Toutain J, Valable S, Bernaudin M, Petit E. **Implication de HAF dans la croissance des glioblastomes : caractérisation in**

vitro et in vivo. 10èmes journées scientifiques, Canceropôle Nord-Ouest, 10-12 mai 2017, Deauville.

Publications

Lambert G, Pérès EA, Bordji K, Divoux D, Toutain J, Valable S, Bernaudin M, Petit E.

Opposite effects of HAF and HIF-2 on glioma growth: a preclinical study.

(En rédaction)

Evaluation préclinique de l'impact de HAF et HIF-2 sur la croissance des glioblastomes et leur réponse à la radiothérapie.

L'hypoxie tumorale est l'une des principales causes de l'agressivité des glioblastomes (GB). Plusieurs études attestent de l'implication de l'isoforme HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*) dans la progression de ces tumeurs et dans leur résistance à la radiothérapie (RT). Plus récemment, il a été établi que l'isoforme HIF-2 α régule la capacité tumorigénique des cellules souches de GB (CSG). Cependant, le rôle de ce facteur dans la croissance des cellules de GB différenciées et leur réponse à la RT est moins documenté. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de renforcer ces connaissances à l'échelle préclinique en utilisant deux approches d'ARN interférence (ARNi) pour moduler l'expression de HIF-2 : cibler directement HIF-2 α ou cibler HAF (*hypoxia associated factor*), un facteur impliqué dans le *switch* de HIF-1 α vers HIF-2 α . Les résultats obtenus sur un modèle orthotopique de cellules humaines de GB (U251-MG) différenciées montrent que l'invalidation de HAF conduit à un fort ralentissement de la croissance de ces tumeurs mais indépendamment de HIF-1 α ou HIF-2 α . L'effet de l'invalidation de HIF-2 α serait, quant à lui, dépendant de l'environnement tumoral. En effet, la diminution d'expression de HIF-2 α dans les cellules U251 ne modifie pas la croissance tumorale dans un modèle de greffe sous-cutanée, alors que celle-ci favorise la croissance tumorale lorsque les cellules de GB sont implantées en intracérébral. Par comparaison aux tumeurs contrôles, ces tumeurs sont plus invasives et mieux perfusées. *In vitro*, l'inhibition de l'expression de HIF-2 α n'a aucun effet sur la survie des cellules U251 alors qu'elle diminue la mort apoptotique de ces cellules exposées aux rayons X.

L'ensemble des données présentées dans cette étude suggère que HAF et HIF-2 α pourraient réguler la capacité tumorigénique des cellules de GB différenciées, tout comme observé pour les CSG. En outre, ces résultats soulignent la nécessité de prendre en compte le microenvironnement cellulaire afin de mieux comprendre le comportement de la tumeur dans son environnement hypoxique.

Preclinical Evaluation of the Impact of HAF and HIF-2 on glioblastoma growth and response to radiotherapy.

Hypoxia is one of the main causes of glioblastoma (GB) aggressiveness. Various studies attest on the involvement of the HIF-1 α isoform (*hypoxia inducible factor-1 α*) in the progression of these tumors and in their resistance to radiation therapy (RT). More recently, it was established that the HIF-2 α isoform regulates the tumorigenic capacity of GB stem cells (GSC). However, the role of this factor in the growth of differentiated GB cells and their response to RT is less documented. In this context, the goal of this work was to strengthen this knowledge at the preclinical level by using two RNA interference (RNAi) strategies to modulate the expression of HIF-2: one directly targets HIF-2 α , the other one targets HAF (*hypoxia associated factor*), a factor involved in the switch of HIF-1 α to HIF-2 α . Our results obtained on an orthotopic model of differentiated human GB (U251-MG) cells showed that the invalidation of HAF leads to a strong slowdown in tumor growth but independently of HIF-1 α or HIF-2 α . On the other hand, the effect of HIF-2 α silencing seems dependent on the tumor environment. Indeed, the extinction of HIF-2 α expression in U251 cells does not modify tumor growth in a subcutaneous model, whereas it promotes tumor growth when GB cells are intracerebrally grafted. Compared to control tumors, these tumors are more invasive and highly perfused. *In vitro*, the inhibition of HIF-2 α expression has no effect on GB cell survival whereas decreasing the X-rays induced apoptotic death.

Collectively, these data suggest that HAF and HIF-2 α could regulate the tumorigenic capacity of differentiated GB cells, like it does in CSGs. In addition, these results highlight the need to take into account the cellular microenvironment to better understand the behavior of the tumor in its hypoxic environment.

Mots clés: glioblastome, HIF-2, HAF, hypoxie, radiothérapie

Discipline: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Adresse du laboratoire : ISTCT FRE2001-CNRS, CEA, Université de Caen-Normandie

GIP CYCERON,
Boulevard Henri Becquerel
14074 Caen, France