



HAL
open science

Évaluation préclinique de stratégies inhibitrices sélectives de HIF-2 α et de la β III-tubuline pour limiter le développement des glioblastomes et la résistance aux traitements

Rhéda Stroiazzo

► **To cite this version:**

Rhéda Stroiazzo. Évaluation préclinique de stratégies inhibitrices sélectives de HIF-2 α et de la β III-tubuline pour limiter le développement des glioblastomes et la résistance aux traitements. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC417 . tel-02870882

HAL Id: tel-02870882

<https://theses.hal.science/tel-02870882>

Submitted on 17 Jun 2020

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 stratégies inhibitrices sélectives de HIF-2alpha et de la betalll-tubuline pour limiter le développement des glioblastomes et la résistance aux traitements.

**Présentée et soutenue par
Rheda STROIAZZO**

**Thèse soutenue publiquement le 16/12/2019
devant le jury composé de**

M. MICHEL CHEREL	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Nantes	Rapporteur du jury
M. BERTRAND LIAGRE	Professeur des universités, Université de Limoges	Rapporteur du jury
Mme JANA DE OLIVEIRA SANTOS	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. SAMUEL MEIGNAN	Chercheur, Centre Oscar Lambret	Membre du jury
M. KARIM BORDJI	Ingénieur de recherche au CNRS, 14 CYCERON de CAEN	Directeur de thèse
Mme NATHALIE COLLOC'H	Chargé de recherche au CNRS, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par KARIM BORDJI et NATHALIE COLLOC'H, 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



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

Évaluation préclinique de stratégies inhibitrices sélectives de HIF-2 α et de la β III-tubuline pour limiter le développement des glioblastomes et la résistance aux traitements

Présentée et soutenue par
Rhéda STROIAZZO

Thèse soutenue publiquement le 16/12/2019
devant le jury composé de

M. MICHEL CHEREL	Professeur des universités, Praticien Hospitalier, Université de Nantes	Rapporteur du jury
M. BERTRAND LIAGRE	Professeur des universités, Université de Limoges	Rapporteur du jury
Mme JANA SOPKOVA-DE OLIVEIRA SANTOS	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. SAMUEL MEIGNAN	Chercheur, Centre Oscar Lambret	Membre du jury
M. KARIM BORDJI	Ingénieur de recherche, CNRS, Caen	Directeur de thèse
Mme NATHALIE COLLOC'H	Chargé de recherche, CNRS, Caen	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par Karim BORDJI et Nathalie COLLOC'H, Imagerie et Stratégies Thérapeutiques de Pathologies Cérébrales et Tumorales



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



IMAGERIE & STRATÉGIES
THÉRAPEUTIQUES DES PATHOLOGIES
CÉRÉBRALES & TUMORALES

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Myriam Bernaudin pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'équipe Cervoxy ainsi que de nous permettre de travailler dans d'excellentes conditions matérielles.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Les rapporteurs, le Pr. Bertrand Liagre et le Pr. Michel Chérel ainsi que les examinateurs, la Pr. Jana Sopkova De Olivera Santos et le Dr. Samuel Meignan.

Merci également à vous Nathalie et Karim, d'avoir pris sur vous d'assumer (à la dernière minute) de m'accepter en stage qui aura été le début de cette longue histoire. Vous m'avez donné ma chance, sans laquelle, je n'aurais probablement pas pu finir ces études.

Un grand merci à toutes les personnes de l'équipe qui m'ont permis d'assurer la mise au point et la réalisation des expériences menées au cours de ces trois ans.

Merci à Florence et Carole pour votre aide et votre bonne humeur.

Merci à toutes les personnes du labo pour votre humour, votre aide et votre bienveillance.

Un grand merci à tous mes amis de promo ainsi qu'aux nouveaux pour les pauses, les cafés, les sorties, les rigolades, les batailles d'eau (oui oui...). C'était un bonheur de travailler à vos côtés et je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite.

Merci à tous mes amis qui auront su me soutenir jusqu'à la fin et surtout pendant les moments les plus difficiles. J'ai toujours pu compter sur vous pour décompresser.

Merci à toi Gaëlle, pour le soutien sans failles, ta compréhension, ta patience (au quotidien) et ton amour.

Enfin, merci à ma famille, pour avoir toujours tout fait pour que je ne manque de rien, pour m'avoir poussé à continuer quelques soit les difficultés, et pour votre compréhension. Ce travail, c'est aussi le vôtre.

Une pensée particulière à ma mère et à mon grand-père qui auraient sans doute aimé être encore présents pour assister à ça. C'est aussi grâce à eux que j'en suis arrivé là aujourd'hui.

Table des matières

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures	5
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	11
Avant-propos	13
Étude bibliographique	15
I. GLIOMES & GLIOBLASTOMES	15
I.1. Données cliniques	15
I.2. Classification des gliomes par l'Organisation Mondiale de la Santé	16
I.2.1. Critères anatomopathologiques.....	16
I.2.2. Altérations chromosomiques & moléculaires	17
I.3. Prise en charge thérapeutique.....	19
I.3.1. L'exérèse tumorale	19
I.3.2. La radiothérapie.....	19
I.3.3. La chimiothérapie concomitante.....	21
I.3.4. Approches innovantes	22
I.4. Physiopathologie des glioblastomes & microenvironnement tumoral.....	24
I.4.1. La cellule tumorale.....	24
I.4.2. Métabolisme de la cellule tumorale : l'effet Warburg.....	26
I.4.3. Angiogenèse	27
I.4.4. Le Microenvironnement tumoral	32
I.5. L'Hypoxie : une caractéristique majeure des glioblastomes	34
I.5.1. L'hypoxie dans les glioblastomes.....	34
I.5.2. Les facteurs de transcription HIFs (<i>Hypoxia Inducible Factor</i>)	38
II. LES MICROTUBULES	50
II.1. Caractéristiques et propriétés des microtubules.....	50

II.1.1.	Structure et rôles des microtubules	50
II.1.2.	Microtubules : une structure hautement dynamique	51
II.1.3.	Isoformes de beta-tubuline.....	54
II.2.	Microtubules : Cibles thérapeutiques de choix	55
III.	LA β III-TUBULINE.....	62
III.1.	Distribution cellulaire	62
III.1.1.	Tissus normaux	62
III.1.2.	Tumeurs neuronales et non neuronales	65
III.2.	β III-tubuline & résistance aux traitements	66
III.3.	La β III-tubuline, un facteur de survie induit par l'hypoxie tumorale ?.....	68
III.4.	β III-tubuline et gliomes.....	69
III.5.	β III-tubuline : cible thérapeutique dans les glioblastomes ?.....	71
Objectifs	73
Matériels & méthodes	75
I.	Méthodologie <i>in vitro</i>	75
I.1.	Culture cellulaire	75
I.1.1.	Lignées humaines	75
I.1.2.	Transfections transitoires et infections lentivirales.....	76
I.2.	Traitements cellulaires	77
I.2.1.	Hypoxie	77
I.2.2.	Exposition aux molécules anti HIF-2 α	77
I.2.3.	Irradiation.....	77
I.2.4.	Traitements chimiothérapeutiques	78
I.2.5.	Technique des gènes rapporteurs	78
I.3.	Modèles d'études.....	79
I.3.1.	Technologie xCELLigence	79
I.3.2.	Test de blessure	80
I.3.3.	Test de clonogénicité : Analyse de la survie cellulaire.....	81

1.3.4.	Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux	82
1.3.5.	Expression protéique	82
1.3.6.	Expression des ARNm	83
1.3.7.	Etude de la morphologie cellulaire	84
1.3.8.	FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	84
II.	Méthodologie <i>in vivo</i>	86
II.1.	Modèle orthotopique d'implantation de glioblastome humain chez la souris	86
II.2.	Etude longitudinale par IRM	87
II.3.	Analyse de la survie des animaux.....	87
III.	Méthodologie <i>ex vivo</i>	88
III.1.	Coupes histologiques.....	88
III.2.	Immunohistochimie	88
IV.	Analyses statistiques.....	89
Résultats	91
I.	Etude de l'effet de l'extinction de la β III-tubuline sur des lignées humaines de glioblastomes	91
I.1.	Caractérisation des modèles d'études	91
I.2.	Expression de la β III-tubuline et de HIF-2 α dans les glioblastomes.....	93
I.3.	Mesure de l'extinction de la β III-tubuline par ARN interférents	95
I.4.	Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la prolifération cellulaire	99
I.5.	Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur l'invasion cellulaire.....	101
I.6.	Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la migration cellulaire : Test de blessure	103
I.7.	Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur le cycle cellulaire	105
I.8.	Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la morphologie cellulaire	106
I.9.	Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la sensibilité des cellules de glioblastomes aux chimiothérapies.....	108
I.10.	Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la sensibilité des cellules de glioblastomes à la radiothérapie.....	110

I.11. Etude <i>in vivo</i> de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la croissance tumorale et la survie des animaux.....	114
I.12. Etude immunohistologique des tumeurs en fin de croissance.....	117
II. Recherche de ligands spécifiques de HIF-2 α	121
II.1. Caractérisation des ligands <i>in silico</i>	121
II.2. Évaluation de l'inhibition par le SR2933 et le PT2385 de la formation du dimère HIF-2 α /HIF-1 β par immunoprécipitation.....	128
II.3. Évaluation de l'inhibition du dimère HIF-2 α /HIF-1 β par F.R.E.T.....	132
II.4. Évaluation de l'inhibition par les molécules du dimère HIF-2 α /HIF-1 β par activité luciférase.....	136
Discussion générale – Perspectives	139
I. Inhibition de la β III-t.....	139
II. Recherche d'inhibiteurs sélectifs de HIF-2 α	144
Bibliographie	147

Liste des figures

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Répartition des différents types et grades de gliomes.....	15
<u>Figure 2</u> : Répartitions des différentes mutations génétiques observées qui permettent de définir des sous-types de GB.	18
<u>Figure 3</u> : Diagnostic des gliomes de bas et de hauts grades en IRM avec/sans injection de produit de contraste.	19
<u>Figure 4</u> : Réponses biologiques de la cellule aux rayonnements ionisants	20
<u>Figure 5</u> : La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité permet d'obtenir un compromis entre efficacité et toxicité.....	21
<u>Figure 6</u> : Prise en charge thérapeutique des patients.	22
<u>Figure 7</u> : Les facteurs d'hétérogénéité de la tumeur.....	25
<u>Figure 8</u> : Origine cellulaire du glioblastome.....	26
<u>Figure 9</u> : Représentation des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (Effet Warburg).....	27
<u>Figure 10</u> : Description des différents acteurs responsables du processus angiogénique en condition pathologique.	28
<u>Figure 11</u> : L'angiogenèse dans les GB.	29
<u>Figure 12</u> : Les constituants de la barrière hématoencéphalique.	30
<u>Figure 13</u> : Imageries de la vascularisation et de la perméabilité cérébrale et tumorale.....	30
<u>Figure 14</u> : Acteurs moléculaires retrouvés dans l'effet EPR dans un contexte tumoral et dans le cas d'une inflammation/infection avec un réseau vasculaire sain.....	31
<u>Figure 15</u> : Représentation du microenvironnement tumoral des glioblastomes.	32
<u>Figure 16</u> : Dialogue entre les macrophages et le gliome.	33
<u>Figure 17</u> : Illustration des niveaux d'oxygénation dans la tumeur en fonction de la distance et de la fonctionnalité des vaisseaux.	35
<u>Figure 18</u> : Mise en place du gradient d'oxygène pendant le développement tumoral.....	35
<u>Figure 19</u> : Quantification de la saturation en oxygène à partir du signal BOLD.....	36
<u>Figure 20</u> : Détection des régions hypoxiques par imagerie TEP [18F]-FMISO chez un patient atteint de glioblastome.	37
<u>Figure 21</u> : Analyse de survie de Kaplan-Meier chez des patients atteints d'un gliome nouvellement diagnostiqué.....	37
<u>Figure 22</u> : Structure des sous-unités HIF.....	39
<u>Figure 23</u> : Régulation des protéines HIFs.....	40

<u>Figure 24</u> : Conséquences majeures de l'hypoxie dans un contexte tumoral.....	43
<u>Figure 25</u> : Hypoxie et adaptation métabolique.....	44
<u>Figure 26</u> : Grandes voies de signalisation par lesquelles HIF2 α contribue à l'agressivité tumorale. ...	46
<u>Figure 27</u> : Les domaines PAS-B. La structure cristallographique de l'hétérodimère HIF-2 PAS-B.....	47
<u>Figure 28</u> : Immunoprécipitation de l'ARNT illustrant la baisse spécifique de l'hétérodimérisation avec HIF-2 α	47
<u>Figure 29</u> : Immunoprécipitation de l'ARNT illustrant la baisse spécifique de l'hétérodimérisation avec HIF-2 α	48
<u>Figure 30</u> : Immunoempreinte des tumeurs des animaux traités avec le PT2385 (10mg/kg) montrant la réduction de HIF-2 α ainsi que l'un de ses gènes cible, la cycline D1.	48
<u>Figure 31</u> : Structure des microtubules. 13 protofilaments s'assemblent pour former un microtubule.	51
<u>Figure 32</u> : L'instabilité dynamique des microtubules	53
<u>Figure 33</u> : Structure cristallographique des dimères de tubulines avec les différents sites de fixation de trois classes de TBAs (Colchicine, Taxol et Vinblastine).	56
<u>Figure 34</u> : Résistance aux TBAs.....	58
<u>Figure 35</u> : Images représentative d'un marquage de β III-t dans un tissu normal de colon (A) et dans une tumeur gastro-intestinale (B)	66
<u>Figure 36</u> : Panneau décrivant la distribution cellulaire de la β III-tubuline.	70
<u>Figure 37</u> : Principe de fonctionnement de la technologie xCELLigence.	80
<u>Figure 38</u> : Spectres d'excitations et d'émissions du couple Clover/mRuby2.....	84
<u>Figure 39</u> : Schéma illustrant le principe du FRET.	86
<u>Figure 40</u> : Analyse des statuts des gènes <i>TP53</i> , <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> des cellules U87MG. Observation en microscopie optique, grossissement X20 Pas de mutations observées sur ces trois gènes.	91
<u>Figure 41</u> : Analyse des statuts des gènes <i>TP53</i> , <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> des cellules GL15.....	92
<u>Figure 42</u> : Analyse des statuts des gènes <i>TP53</i> , <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> des cellules U251MG.....	93
<u>Figure 43</u> : Immunomarquage de la β III-tubuline dans des gliomes humains de différents grades.	94
<u>Figure 44</u> : Zone de pseudo palissade périnécrotique.	94
<u>Figure 45</u> : Caractérisation de l'extinction de la β III-t sur les cellules U87-MG par stratégie shARN (A, B et C) ou siARN (D et E).....	96
<u>Figure 46</u> : Caractérisation de l'extinction de la β III-t sur les cellules GL15.....	97
<u>Figure 47</u> : Caractérisation de l'extinction de la β III-t sur les cellules U251-MG.....	98
<u>Figure 48</u> : L'extinction de la β III-t diminue la prolifération cellulaire des lignées U87-MG et GL15. .	100
<u>Figure 49</u> : Analyse en temps réel de l'invasion cellulaire de la lignée GL15.	101

<u>Figure 50</u> : Analyse en temps réel de l'invasion cellulaire de la lignée U87-MG.....	102
<u>Figure 51</u> : Analyse en temps réel de l'invasion cellulaire de la lignée U251-MG.....	102
<u>Figure 52</u> : Test de blessure réalisé sur les trois lignées cellulaires.....	104
<u>Figure 53</u> : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire après transfections aux siARN.	105
<u>Figure 54</u> : Etude de la morphologie des trois lignées cellulaires de GB 48h après transfection par les siARN indiqués.....	107
<u>Figure 55</u> : Analyse de la chimiorésistance sur la lignée U87-MG.....	108
<u>Figure 56</u> : Analyse de la chimiorésistance sur la lignée GL15.	109
<u>Figure 57</u> : Analyse de la chimiorésistance sur la lignée U251-MG.	109
<u>Figure 58</u> : Illustration des colonies obtenues 7 jours après l'irradiation des cellules à des doses de 0 à 8 Gy.	111
<u>Figure 59</u> : Effets de l'irradiation par RX sur la survie des cellules GL15-siScr et GL15-si- β III-t.	111
<u>Figure 60</u> : Effets de l'irradiation par RX sur la survie des cellules U251-siScr et U251-si- β III-t.....	112
<u>Figure 61</u> : Tumeur issue de l'implantation intra-striatale de cellules U87-ShScr.....	114
<u>Figure 62</u> : L'inhibition de la β III-t retarde la croissance tumorale des cellules U87 implantées dans le striatum de souris <i>nude</i>	116
<u>Figure 63</u> : Etudes immunohistologiques de l'inflammation (CD68), de la prolifération (Ki67) et de la vascularisation (CD31) de tumeurs U87-shScr et U87sh- β III-t.....	117
<u>Figure 64</u> : Etudes immunohistologiques de la β III-t, d'un marqueur de cellules souches (CD133) et de l'hypoxie (Pimonidazole) de tumeurs U87-shScr et U87sh- β III-t.....	119
<u>Figure 65</u> : Structures cristallographiques des domaines PAS-B de HIF-2 α et HIF 1 β nécessaires à la dimérisation du complexe.....	121
<u>Figure 66</u> : Les 7 composés retenus après le criblage virtuel des 10 000 molécules issues de la chimiothèque du CERMN dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α	122
<u>Figure 67</u> : Etude par qPCR de l'expression des ARNm de β III-t obtenus sur la lignée GL15 après l'exposition du composé 6 pendant 18h en normoxie ou en hypoxie.....	122
<u>Figure 68</u> : Etude par qPCR de l'expression des ARNm de β III-t obtenus sur les lignées GL15 et U87MG après l'exposition du composé SR2933 pendant 18h en normoxie ou en hypoxie	123
<u>Figure 69</u> : Immunoempreinte illustrant l'inhibition de l'induction de la β III-t après une exposition au SR2933 en hypoxie sur la lignée GL15.	124
<u>Figure 70</u> : Superposition des trois composés étudiés dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α entourés des deux poches hydrophobes P1 et P2.....	124
<u>Figure 71</u> : Etude de l'expression de la β III-t par qPCR sur la lignée U87MG.....	125
<u>Figure 72</u> : Etude de l'expression de la β III-t par qPCR sur la lignée GL15.....	126

<u>Figure 73</u> : Etude de l'expression de CA-IX par qPCR sur la lignée U87MG.	127
<u>Figure 74</u> : Etude de l'expression de CA-IX par qPCR sur la lignée GL15.	127
<u>Figure 75</u> : Immunoempreinte réalisée sur HIF-2 α après avoir immunoprécipité HIF-1 β à partir de 50 μ g de protéines extraites des cellules U87MG cultivées en normoxie ou en hypoxie.	129
<u>Figure 76</u> : Révélation de HIF-1 β après immunoprécipitation de HIF-2 α . Les hypoxies à 1% ou à 0,2% sont réalisées pendant 24h.	129
<u>Figure 77</u> : Révélation de HIF-1 β après immunoprécipitation de HIF-2 α sur la lignée U251MG après exposition aux molécules pendant 18h.	130
<u>Figure 78</u> : Révélation de HIF-1 β après immunoprécipitation de HIF-2 α sur la lignée U251MG cultivée en hypoxie (1% O ₂) après exposition aux molécules pendant 18h.....	131
<u>Figure 79</u> : Révélation de HIF-1 β après immunoprécipitation de HIF-2 α sur les lignées U87MG et GL15 après exposition aux molécules pendant 18h.	132
<u>Figure 80</u> : Validation des 3 constructions plasmidiques sur trois lignées cellulaires de GB (U87MG, GL15, U251MG) cultivées en normoxie après 24h de transfection par HIF-1 α -mRuby, HIF-2 α -mRuby ou HIF- 1 β -Clover.....	133
<u>Figure 81</u> : Validation des constructions en monotransfections (HIF-1 α -mRuby, HIF-2 α -mRuby ou HIF-1 β -Clover)après 24h d'hypoxie à 0,2% d'O ₂ sur les trois lignées cellulaires de GB.	134
<u>Figure 82</u> : Acquisitions des signaux de fluorescence sur les trois lignées cellulaires (U87MG, GL15, U251MG) cotransfectées HIF-2 α -mRuby/HIF1 β -clover cultivées en hypoxie à 1% pendant 24h.	135
<u>Figure 83</u> : Activité de la luciférase Firefly normalisée avec le contrôle interne d'activité de la luciférase Renilla après traitement DFX (150 μ M ; 24h).	137

Liste des tableaux

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Les critères anatomopathologiques qui gouvernent l'attribution du grade des gliomes...	17
<u>Tableau 2</u> : Définition des niveaux d'oxygénation.....	34
<u>Tableau 3</u> : Exemples de gènes cibles de HIF-1 α ou HIF-2 α	42
<u>Tableau 4</u> : Distribution des isoformes de β -tubuline.	54
<u>Tableau 5</u> : Distribution de la β III-t dans les tissus sains.....	63
<u>Tableau 6</u> : Caractéristiques génétiques des 3 lignées humaines de GB utilisées.....	75
<u>Tableau 7</u> : Séquences des siARN utilisés pour les transfections transitoires.....	76
<u>Tableau 8</u> : Amorces utilisées en RT-qPCR.....	84
<u>Tableau 9</u> : Anticorps utilisés en immunomarquage	89
<u>Tableau 10</u> : Analyses de corrélation entre la β III-t et les facteurs HIF α avec le coefficient de corrélation de Spearman	95
<u>Tableau 11</u> : Paramètres radiobiologiques de SF2, D37 et OER	113

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ADM : agents de déstabilisation des microtubules	GLUT1 : Glucose transporter 1
ADN : Acide désoxyribonucléique	GTP : Guanosine triphosphate
ALDA : Aldolase A	Gy : Gray
Ang2 : <i>Angiopoietin 2</i>	Hb : hémoglobine
ARNT : <i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>	HIF : <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
ASM : agents stabilisants des microtubules	HK1/2 : Hexokinase 1/2
ATP : adénosine tri-phosphate	HRE : <i>Hypoxia Responsive Element</i>
ATRX : <i>α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>	HSP90 : <i>heat shock protein 90</i>
BCL2 : <i>B-cell lymphoma 2</i>	IDH : isocitrate déshydrogénase
BHE : barrière hémato-encéphalique	IL1 β : Interleukine 1 β
bHLH : basic <i>Helix-Loop-Helix</i>	IRM : imagerie à résonance magnétique
BNIP3 : BCL2/Adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3	LDHA : Lactate déshydrogénase A
BOLD : <i>Blood Oxygen Level-Dependant</i>	MAP : <i>microtubule associated protein</i>
Cabazitaxel : Caba	MAX : Myc-Associated Protein X,
CAF : <i>Cancer Associated Fibroblasts</i>	MGMT : <i>O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase</i>
CAIX : Anhydrase carbonique IX	MMPs : <i>Matrix Metalloproteases</i>
CCND1 : Cycline D1	MOI : Multiplicity of infection
CCR : Cellule de carcinome rénal	MCT-4 : Monocarboxylate-4
CE : Cellule endothéliale	mROS : mitochondrial Reactive Oxygen Species,
CERMN : Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie	MT : microtubules
CSC : cellules souches cancéreuses	MTOC : <i>Microtubule Organizing Center</i>
CSE : Cellule souche embryonnaire	MYC : V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homologue
CSG : cellules souches de gliomes	OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4
CSM : cellules souches mésenchymateuse	ODDD : <i>oxygen-dependant degradation domain</i>
CSN : cellules souches neurales	OER : oxygen enhancement ratio
DFX : déféroxamine	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PAS-B : <i>Per-Arnt-Sim</i>
DMSO : diméthylsulfoxyde	PBS : <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
dSVF : sérum de veau foetal décomplémenté	PE : <i>plating efficiency</i>
EGFR : <i>receptor for epidermal growth factor</i>	PFK : Phosphofructokinase
EPAS1 : <i>Endothelial PAS domain-containing protein 1</i>	PGK1 : Phosphoglycérate kinase 1
EPO : Erythropoïétine	PHD : <i>Prolyl Hydroxylases Domain</i>
EPR : <i>Enhanced Permeability and Retention effet</i>	Phosph. Ox. = Phosphorylation Oxydative.
FIH : <i>Factor Inhibiting HIF</i>	pO ₂ : Pression partielle en oxygène
FLASH : <i>Fast Low Angle Shot</i>	PTEN : <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Fluoromisonidazole : [¹⁸ F]-FMISO	ptO ₂ : Pression tissulaire en oxygène
FRET : <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>	PVDF : polyvinylidène
GB : glioblastome	pVHL : <i>von Hippel-Lindau protein</i>
GDP : guanosine diphosphate	RARE : <i>Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement</i>
	RT : radiothérapie
	RX : Rayons X
	SatO ₂ : saturation en oxygène
	SF : Fraction de survie

shARN : Petits ARN en épingle à cheveux

siARN : ARN interférents

SNC : système nerveux central

TAD : *terminal transactivation domain*

TAM : *Tumor-associated macrophages*

TBA : tubulin-binding agents

TE : Temps d'écho

TEP : Tomographie par émission de positons

TERT : *telomerase reverse transcriptase*

TGF- α : Transforming growth factor alpha

TMZ : témozolomide

TR : Temps de repetition

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

β III-tubuline : β III-t

γ -TuRCs : *γ -Tubulin Ring Complexes*

Avant-Propos

Avant-propos

Les glioblastomes (GB) sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et les plus agressives chez l'adulte. En dépit des traitements dispensés à ce jour, ces tumeurs restent incurables et la médiane de survie des patients reste faible (< 15 mois). Même si ces tumeurs présentent une incidence relativement faible, améliorer la prise en charge ainsi que l'efficacité thérapeutique reste un enjeu majeur de santé publique.

Les GB présentent plusieurs caractéristiques qui leur sont propres et qui déterminent en partie la physiopathologie singulière de ces tumeurs. L'hypoxie, que l'on peut définir comme une inadéquation entre les apports et la consommation en oxygène, est l'une des caractéristiques majeures des GB. Elle est, en partie, à l'origine des phénomènes adaptatifs observés au sein de ces tumeurs et participe de manière importante à leur agressivité. L'hypoxie est médiée au niveau moléculaire par des facteurs de transcription, les *Hypoxia Inducible Factors* (HIF) qui vont induire l'expression de nombreux gènes cibles favorisant la progression tumorale. L'une des cibles de ces facteurs de transcription est la β III-tubuline (β III-t). Cette protéine, qui est un composant des microtubules, est surexprimée dans des nombreuses tumeurs solides. Elle est notamment corrélée avec l'agressivité, la progression et la résistance des tumeurs aux traitements.

Depuis quelques années, plusieurs travaux semblent désigner l'isoforme HIF-2 comme étant particulièrement impliquée dans le maintien d'une hypoxie prolongée et dans le développement d'un phénotype tumoral agressif. Une stratégie vise donc à inhiber la voie HIF-2 α et plusieurs molécules pharmacologiques ont été proposées en ce sens. Dans le cas des GB, nous avons récemment mis en évidence un lien entre HIF-2 et l'induction de la β III-t. Cependant peu de données sont disponibles sur ce type de tumeurs.

Les objectifs de ces travaux de thèse ont été, d'une part, d'étudier le rôle de la β III-t dans la croissance tumorale de GB sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, nous avons cherché à inhiber l'activité de HIF-2 en nous basant sur les données issues de la littérature et en utilisant des composés potentiellement capables d'empêcher l'activation de cette voie transcriptionnelle.

La première partie de l'introduction présente les caractéristiques cliniques et la physiopathologie des GB. L'hypoxie, les complexes HIF et notamment l'intérêt d'inhiber la voie HIF-2 sont particulièrement présentés.

La deuxième partie présente le rôle et l'organisation des microtubules afin d'appréhender l'importance de ces composants au sein des cellules, notamment dans les phénomènes de résistance aux traitements.

Enfin, la troisième partie de cette introduction exposera les connaissances relatives à la β III-t dans un contexte physiologique ainsi que son importance dans les tumeurs solides, comme les GB.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'intérêt stratégique d'une inhibition de HIF-2 et de l'expression de la β III-t pour limiter le développement des GB.

Étude bibliographique

I. GLIOMES & GLIOBLASTOMES

I.1. Données cliniques

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes chez l'adulte. Ces tumeurs représentent 31% des tumeurs primaires du système nerveux central (SNC) et 81% des tumeurs malignes du SNC (Schwartzbaum *et al.*, 2006; Ostrom *et al.*, 2015). La dénomination de « gliome » regroupe toutes les tumeurs qui ont pour origine une cellule gliale et comprend : les astrocytomes, les oligodendrogliomes, les épendymomes et les gliomes mixtes.

Parmi ces tumeurs, le sous-type le plus représenté est le glioblastome (GB), et compte pour 55% des gliomes (Figure 1). L'incidence des GB varie de 0,6 à 3,7 nouveaux cas pour 100 000 habitants en fonction des pays avec une prédominance masculine, le ration hommes/femmes étant d'environ 1,6 (Ostrom *et al.*, 2015). L'âge médian du diagnostic de ces tumeurs est d'environ 62 ans (Louis *et al.*, 2016).

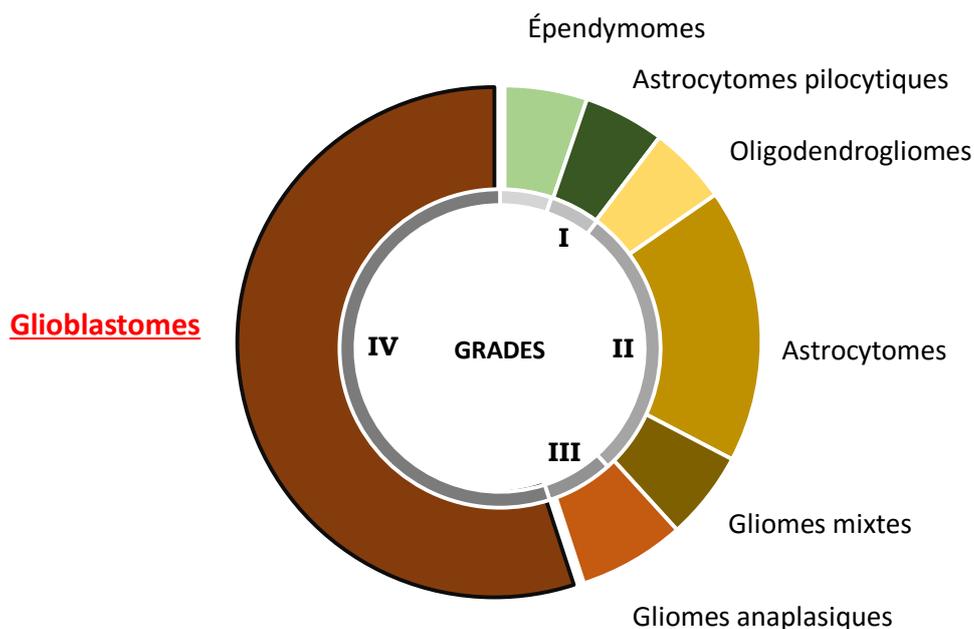


Figure 1 : Répartition des différents types et grades de gliomes

Les gliomes anaplasiques font référence aux astrocytomes, oligodendrogliomes et aux gliomes mixtes qui ont évolué vers un grade supérieur.

Adapté d'après Davis, 2018

Les GB sont les tumeurs primitives cérébrales les plus agressives. Les symptômes neurologiques sont généralement communs : des crises d'épilepsies liées à un dérèglement de l'activité neuronale, des maux de tête liés à une augmentation de la pression intracrânienne, des pertes de mémoire... L'apparition souvent brutale de ces symptômes conduit à des examens complémentaires d'imagerie. Le diagnostic établi par imagerie à résonance magnétique (IRM) avec injection d'un produit de contraste permet alors d'évaluer : la taille, la localisation et l'aspect du gliome. Même si cet examen rapide et peu invasif aide à la pose du diagnostic, le type et le grade de la tumeur ne pourra être définitif qu'après une analyse histologique. Cette analyse est établie après une biopsie stéréotaxique ou à partir d'une pièce d'exérèse en fonction des critères anatomopathologiques définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Louis *et al.*, 2016). La médiane de survie ne dépasse pas les 15 mois, malgré l'arsenal thérapeutique employé pour traiter les patients (Chinot *et al.*, 2014).

I.2. Classification des gliomes par l'Organisation Mondiale de la Santé

I.2.1. Critères anatomopathologiques

Les gliomes sont des tumeurs très hétérogènes. Les classifications ont pour but d'harmoniser le diagnostic, d'améliorer la prise en charge et d'augmenter la fiabilité du pronostic et la réponse aux traitements. La classification la plus répandue est celle de l'OMS. Elle est basée sur des critères anatomopathologiques et sur des critères moléculaires (Louis *et al.*, 2016).

Les gliomes, en fonction de l'analyse histologique, sont différenciés en astrocytomes, en oligodendrogliomes et en gliomes mixtes. Ensuite, en fonction de leur degré de malignité, un grade leur est attribué. Les tumeurs dites de « bas grade » ont un score de I à II et les tumeurs dites de « haut grade » qui sont les plus agressives, un score de III à IV. Ces grades sont attribués en fonction de la présence ou l'absence de certains paramètres anatomopathologiques comme : l'angiogenèse, l'activité mitotique ou la nécrose (Tableau 1).

<i>Tumeurs</i>	<i>Grade</i>	<i>Densité cellulaire</i>	<i>Activité mitotique</i>	<i>Angiogenèse</i>	<i>Nécrose</i>
Astrocytomes diffus	II	---	---	---	---
Oligodendrogliomes	II	---	+/-	+/-	---
Oligoastrocytomes (Gliomes mixtes)	II	---	+	---	---
Astrocytomes anaplasique	III	++	+	---	---
Oligodendrogliomes anaplasique	III	++	++	++	+/-
Oligoastrocytome anaplasique	III	++	++	+/-	---
GB IDH muté	IV	+++	+++	++	+
GB IDH sauvage	IV	+++	+++	+++	+++

[Tableau 1](#) : Les critères anatomopathologiques qui gouvernent l’attribution du grade des gliomes.

--- absente, +/- occasionnelle, + modérée, ++ augmentée, +++ élevée.

Adapté d’après Louis *et al.*, 2016.

1.2.2. Altérations chromosomiques & moléculaires

L’un des problèmes majeurs qui détermine, en partie, l’agressivité des GB est leur grande hétérogénéité histologique (Habberstad *et al.*, 2012). Cela a conduit l’OMS à rechercher d’autres caractéristiques, non discernables sur le plan histologique, comme des altérations génétiques et moléculaires afin de proposer une classification plus précise. Des sous-types de GB ont ainsi pu être établis : les GB *de novo* ou primaires et les GB secondaires ayant évolué à partir d’un gliome de grade inférieur. Ces deux sous-types se différencient principalement par la présence de mutation sur le gène de l’isocitrate déshydrogénase (IDH). Les mutations IDH-1 et IDH-2 sont considérées comme de bon pronostic. En effet, il a été montré qu’une mutation au niveau de IDH-1 provoque un arrêt du cycle cellulaire, une sensibilisation au témozolomide (TMZ) et à la radiothérapie (Wang *et al.*, 2014; Kessler *et al.*, 2019). Les GB « primaires » possèdent un gène *IDH1* non muté et représentent environ 90% des cas alors que les GB « secondaires » présentent un gène *IDH1* muté et représentent environ 10% des cas. Plusieurs mutations sont retrouvées sur d’autres gènes. Certaines de ces mutations sont spécifiques des GB primaires ou secondaires et permettent d’affiner la classification. Les mutations du

promoteur TERT (*telomerase reverse transcriptase*), de l'EGFR (*receptor for epidermal growth factor*) ainsi que de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) sont essentiellement retrouvées dans les GB primaires. A l'inverse, une mutation sur le gène ATRX (*α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) est essentiellement retrouvée dans les GB secondaires (Louis *et al.*, 2016) (Figure 2).

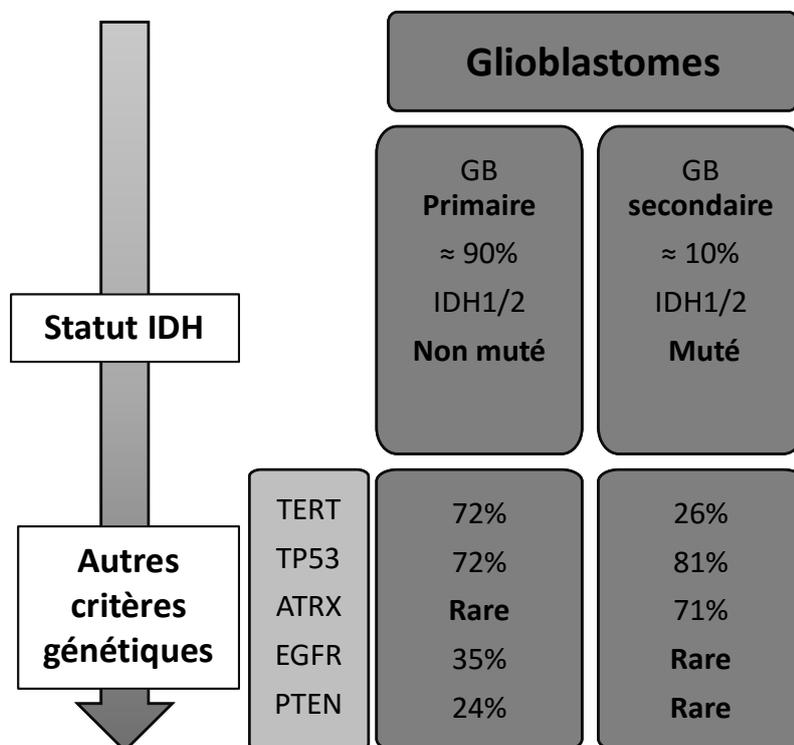


Figure 2 : Répartitions des différentes mutations génétiques observées qui permettent de définir des sous-types de GB.
Adapté d'après Louis *et al.*, 2016

D'autres différences génétiques sont aussi observées. Cependant, elles ne permettent pas d'identifier d'autres sous-types de GB mais aident à la prédiction de la réponse aux traitements. Les GB sont des tumeurs qui se distinguent par une grande variabilité inter-individu. Ces « marqueurs » génétiques sont d'une importance capitale dans le cadre d'un traitement personnalisé. Deux marqueurs principaux sont essentiellement retrouvés : la méthylation du promoteur du gène de la *O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase* (MGMT) et la co-délétion 1p/19q. La MGMT est impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN à la suite d'alkylations. La méthylation du promoteur de ce gène entraîne son inactivation et sensibilise donc les cellules cancéreuses aux chimiothérapies par agent alkylant. Cette méthylation, fréquemment observée dans les GB secondaires, est donc un facteur de bon pronostic (Cabrin *et al.*, 2015). La co-délétion 1p/19q est fréquemment associée aux mutations IDH1/2 et améliore significativement la réponse à la chimiothérapie (Sanson, 2016).

I.3. Prise en charge thérapeutique

I.3.1. L'exérèse tumorale

La première étape de la prise en charge thérapeutique est la chirurgie. Selon la taille et la localisation de la tumeur, l'exérèse de celle-ci peut s'avérer délicate (Figure 3). En effet, si la tumeur se situe dans des régions fonctionnelles ou difficilement accessibles, seule une biopsie sera réalisée.

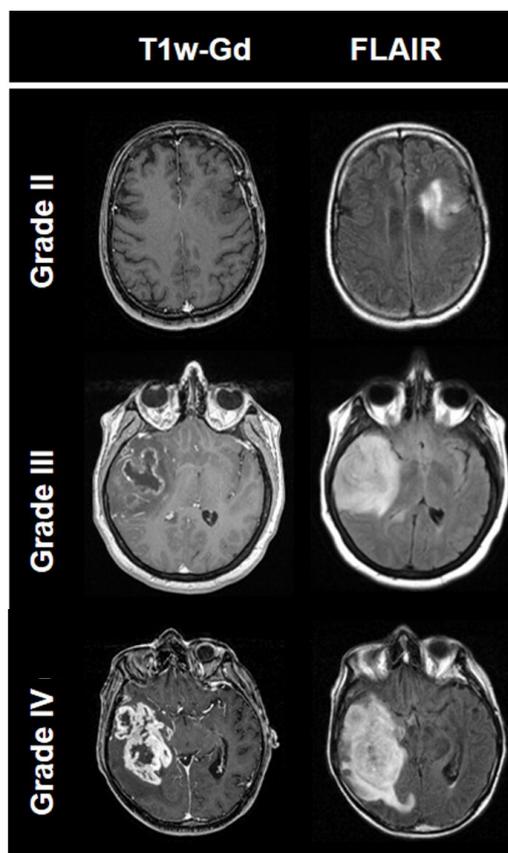


Figure 3 : Diagnostic des gliomes de bas et de hauts grades en IRM avec/sans injection de produit de contraste.

Adapté de Collet *et al.*, 2015.

La biopsie servira à confirmer le grade du gliome. Pourtant, une exérèse (même partielle) permet d'augmenter significativement la survie des patients par rapport à ceux pour qui la seule option est la biopsie (Lacroix *et al.*, 2001; Bloch *et al.*, 2012; Eseonu *et al.*, 2017). L'infiltration tumorale, caractéristique des GB, dépasse très nettement les limites tumorales estimées à l'aide de l'imagerie et jugées par le chirurgien en per opératoire. Une exérèse est jugée « complète » si la prise de contraste disparaît lors de l'IRM post opératoire (Guyotat, 2013). Néanmoins, même dans ce cas de figure, la récurrence reste quasiment inévitable.

I.3.2. La radiothérapie

Une fois la chirurgie terminée, les patients sont traités par radiothérapie (RT). La RT utilise des rayons X (RX) à haute énergie focalisés sur la tumeur afin de provoquer la mort des cellules cancéreuses. Les rayonnements ionisants peuvent engendrer deux types d'effets. Ils peuvent engendrer des effets directs : ioniser la molécule d'ADN, des lipides ou des macromolécules et ainsi produire des radicaux moléculaires. Ils peuvent aussi engendrer des effets indirects : ioniser des molécules d'eau et ainsi provoquer la radiolyse de l'eau. Cela va créer des radicaux libres qui ont la particularité d'être très

cytotoxiques et ont la capacité d’induire des lésions moléculaires. Les effets indirects liés aux rayonnements ionisants sont majoritaires (Figure 4).

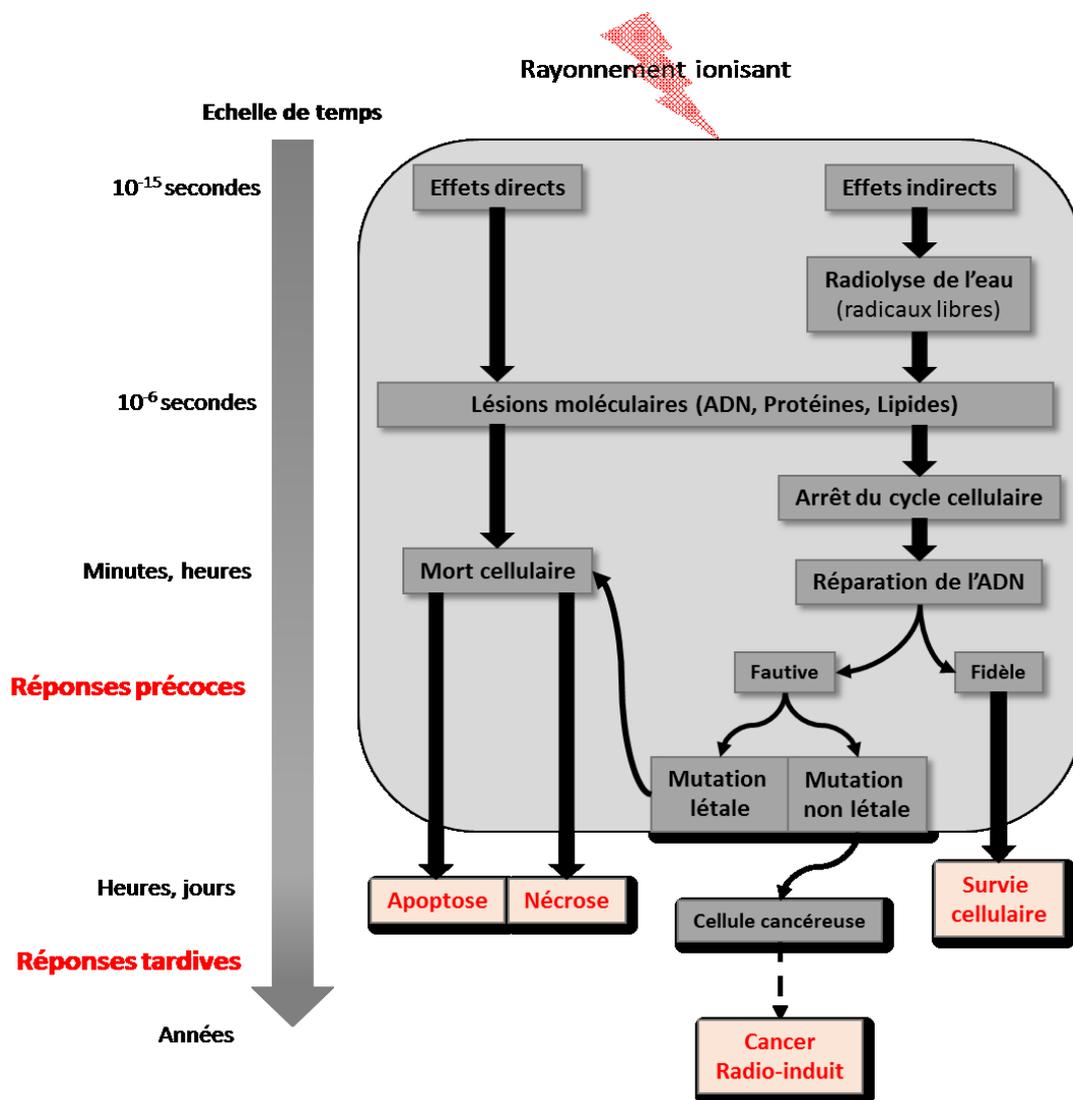


Figure 4 : Réponses biologiques de la cellule aux rayonnements ionisants. D’après Thèse Gaëlle LAMBERT., 2018

Toutefois, ce traitement a obligatoirement des conséquences sur le tissu sain avoisinant la tumeur par lequel passe le faisceau de RX. Cette exposition inévitable entraîne des effets secondaires qui peuvent être importants pour les patients. Ces effets peuvent se manifester de façon aiguë (œdème, fatigue...) ou chronique et être responsables des séquelles graves. Ces effets tardifs apparaissent sous la forme de zones de nécroses radio-induites pouvant entraîner des déficits cognitifs et diminuent la survie et la qualité de vie des patients (Greene-Schloesser *et al.*, 2012). Le problème de ces effets secondaires pose la question de trouver une technique adaptée qui consisterait à déposer suffisamment d’énergie au niveau des cellules tumorales tout en préservant au maximum le tissu sain.

La première méthode utilisée consiste à fractionner les doses. Les patients reçoivent ainsi une dose journalière de 2 Gray (Gy), 5 jours par semaine pendant 6 semaines. Une nouvelle technique innovante de RT, nommée irradiation conformationnelle, utilise plusieurs faisceaux ce qui permet de déposer une dose importante au niveau de la tumeur tout en contrôlant la dose absorbée au niveau du tissu sain (Spasic *et al.*, 2011). Toutefois, malgré ces nouvelles techniques innovantes, certaines tumeurs comme les GB présentent une radiorésistance très élevée (Figure 5).

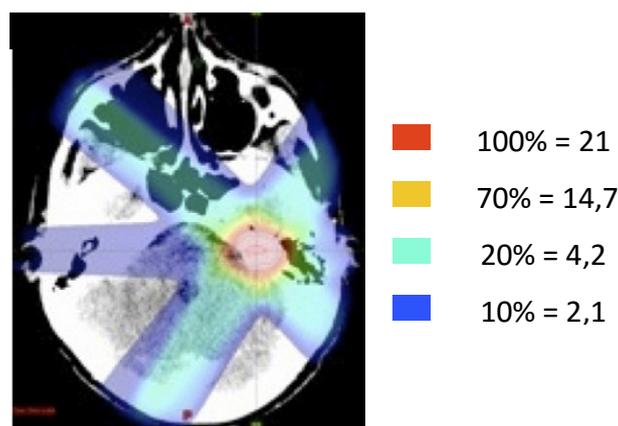


Figure 5 : La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité permet d'obtenir un compromis entre efficacité et toxicité.

Adapté de Spasic *et al.*, 2011

I.3.3. La chimiothérapie concomitante

Depuis 2005, les patients pris en charge pour un GB reçoivent une administration de témozolomide (TMZ) par voie orale. Cela présente certains avantages comme une biodisponibilité proche de 100%, une grande affinité pour les tissus tumoraux ainsi que la capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Alifieris & Trafalis, 2015).

Le protocole associant la RT au TMZ après la chirurgie est appelé « Protocole de Stupp » et correspond à :

- 60 Gy en tout répartis en 30 fractions de 2 Gy de radiothérapie 5 jours/semaine sur 6 semaines,
- TMZ quotidiennement 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 la médiane de survie des patients jusqu'à 15 mois environ. Cependant, au terme du traitement initial une récurrence est systématiquement observée (Figure 6).

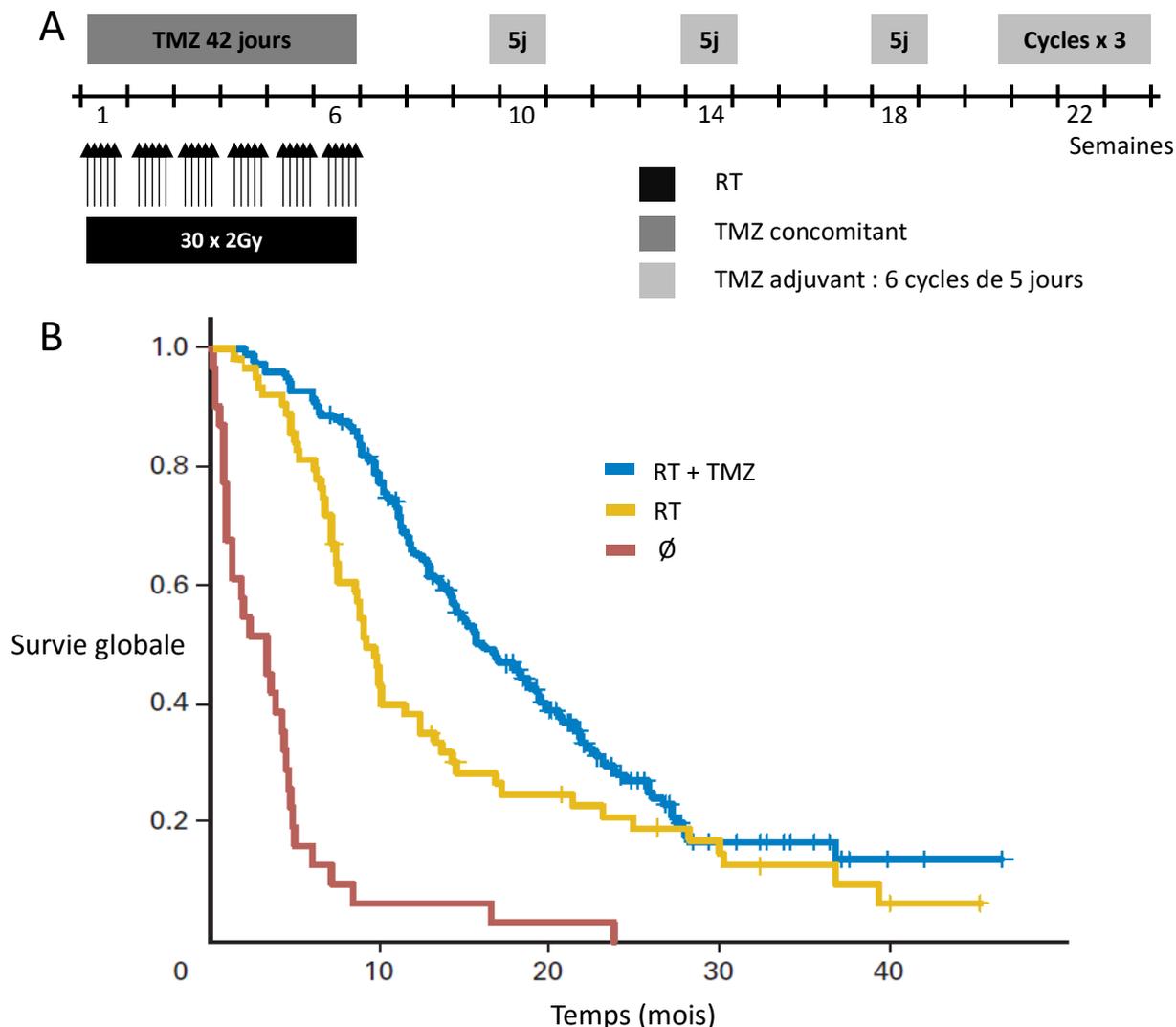


Figure 6 : Prise en charge thérapeutique des patients.

A : Protocole de Stupp Adapté de (Stupp *et al.*, 2009)

B : Courbe de survie des patients atteints de GB après avoir été traités suivant différents protocoles.

Adapté de Weller *et al.*, 2009

I.3.4. Approches innovantes

Toutes les stratégies thérapeutiques présentées auparavant rendent compte d'un pronostic sombre dans le traitement des GB. Afin d'améliorer la prise en charge de ces patients, en particulier ceux en situation de récurrence, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées. Toutefois, aucune n'est standardisée à l'heure actuelle.

L'une des stratégies ciblées les plus étudiées repose sur un traitement anti-angiogénique. En effet, le développement rapide de la vascularisation est d'une importance capitale pour le développement

tumoral. L'objectif des molécules anti-angiogéniques est d'inhiber la création de nouveaux vaisseaux afin de priver la cellule de son apport en oxygène et de nutriment. Deux études ont évalué l'effet d'un traitement à base de Bevacizumab, un anticorps humanisé ciblant le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Le VEGF est un facteur clé de l'angiogenèse. Lorsqu'il est ciblé, les conséquences peuvent être nombreuses :

- Régression des vaisseaux tumoraux
- Normalisation des vaisseaux déjà formés
- Inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux

Tout ceci a pour principal objectif d'inhiber la croissance tumorale. Le Bevacizumab est administré en combinaison avec le TMZ et la RT. Cependant, les résultats des études multicentriques de phase III ont été décevants car aucun changement sur la survie globale n'a été observé et plusieurs effets secondaires indésirables ont été notés (Gilbert *et al.*, 2014; Chinot *et al.*, 2014).

Une autre stratégie prometteuse s'est développée ces dernières années, il s'agit de l'immunothérapie. Par le biais de différents mécanismes d'adaptation, les cellules tumorales sont capables d'échapper au système immunitaire. Le microenvironnement tumoral jouant un rôle immunosuppresseur important, l'organisme ne peut alors plus fournir une réponse adaptée. Cette thérapie se base sur l'utilisation et/ou sur la stimulation du système immunitaire afin d'induire une réponse immunitaire contre la tumeur. Cette approche, qui tend à se généraliser dans le domaine de l'oncologie, donne des résultats satisfaisants dans un grand nombre de cancers (Zacharakis *et al.*, 2018; Pons-Tostivint *et al.*, 2019). Dans le cas des GB, une étude clinique de phase III portant sur l'administration d'un vaccin n'a pas permis de montrer une augmentation de la survie et la qualité de vie des patients (Weller *et al.*, 2017). Cependant l'efficacité de l'immunothérapie repose sur le fait que les anticorps doivent passer la BHE. L'intégrité de la BHE dans le cadre des tumeurs cérébrales reste complexe et discutée. C'est l'une des principales limites au succès de cette thérapie (Lampson, 2011).

D'autres stratégies reposent sur l'une des caractéristiques majeures des GB. En effet, le développement rapide des GB a pour conséquence l'apparition de zones hypoxiques. Il va en résulter plusieurs mécanismes d'adaptation de la tumeur afin de tirer avantage de cet environnement délétère pour le tissu sain. Ces mécanismes seront plus amplement décrits dans la partie I.5. C'est pourquoi des stratégies de réoxygénation tumorale ont été proposées afin d'inverser les répercussions de l'hypoxie dans la réponse aux traitements.

L'hyperoxie concomitante à la RT avait montré des résultats encourageants. Cependant, la technique mise en place a rapidement montré ses limites empêchant un développement à grande

échelle (Dische *et al.*, 1983). Une autre étude clinique sur l'hyperoxie associée, dans ce cas, au protocole standard (chimiothérapie + RT), a montré un allongement de la survie des patients (Ogawa *et al.*, 2012).

L'une des grandes limites à l'utilisation de l'oxygénothérapie réside dans le fait que les vaisseaux néo-formés au sein de la tumeur ne sont pas tout à fait fonctionnels. Une étude menée au sein de l'équipe a proposé l'utilisation du carbogène (95% O₂ ; 5% CO₂) dans la réoxygénation tumorale. L'état altéré des vaisseaux au sein des GB peut expliquer l'échec de l'utilisation de ce mélange gazeux censé dilater les vaisseaux afin de proposer un meilleur apport en oxygène (Chakhoyan *et al.*, 2017).

Il est important de considérer que ces stratégies ciblent l'origine de la baisse en oxygène au sein de la tumeur. L'une des raisons pour laquelle ces stratégies s'avèrent limitées est qu'elles ne prennent souvent pas en compte les conséquences moléculaires mises en place au sein de la cellule cancéreuse. Afin de proposer des stratégies plus ciblées et plus efficaces, il convient d'apprécier les mécanismes physiopathologiques mis en place au sein du microenvironnement tumoral.

1.4. Physiopathologie des glioblastomes & microenvironnement tumoral

Les relations entre les cellules tumorales, les cellules saines et le microenvironnement sont dans une dynamique instable qui évolue dans le temps et selon le stade de la tumeur. Il est nécessaire de connaître les différentes caractéristiques de ces acteurs majeurs pour identifier les points clés à cibler afin de prévenir l'évolution, la récurrence et l'agressivité tumorale.

1.4.1. La cellule tumorale

La cellule tumorale, et particulièrement dans le cas des GB, n'a pas de « carte d'identité » standard. Les gliomes sont très hétérogènes d'un patient à l'autre mais aussi au sein de la tumeur chez un même patient. On parle alors d'hétérogénéité intra-tumorale. Ceci s'explique par l'origine et par les caractéristiques de la cellule tumorale mais aussi des interactions qu'elles entretiennent avec leur environnement.

Depuis les travaux menés par Virchow dans les années 1850 (David, 1988), les différentes populations cellulaires à l'origine de l'hétérogénéité tumorale ont pu être identifiées. Une cellule saine qui acquiert et/ou accumule des mutations génétiques dites oncogénétiques va développer un syndrome néoplasique. Ainsi, deux modèles ont été proposés afin d'expliquer l'hétérogénéité intra-tumorale :

- Le premier modèle proposé est celui de l'évolution clonale. Dans ce modèle, la plupart des néoplasmes proviendraient d'une seule cellule. La progression tumorale résulte de la variabilité génétique acquise au sein du clone d'origine permettant la sélection de sous-lignées plus agressives. Ces dernières prolifèrent et tirent ainsi bénéfice des mutations stochastiques acquises tandis que les clones les moins adaptés sont moins compétitifs et, *in fine*, disparaissent (Nowell, 1976).
- Le second modèle, plus récent et privilégié, fait référence à un développement hiérarchique. Dans ce modèle, on émet l'hypothèse qu'une cellule unique possède des capacités d'auto-renouvellement, de différenciation, et de prolifération pratiquement infinie. Cette cellule est à l'origine à la fois de la tumeur et d'un pool de cellules souches cancéreuses (CSC). En conséquence, ces CSC, qui possèdent la capacité de se différencier, génèrent une hétérogénéité cellulaire (Prasetyanti & Medema, 2017) (Figure 7).

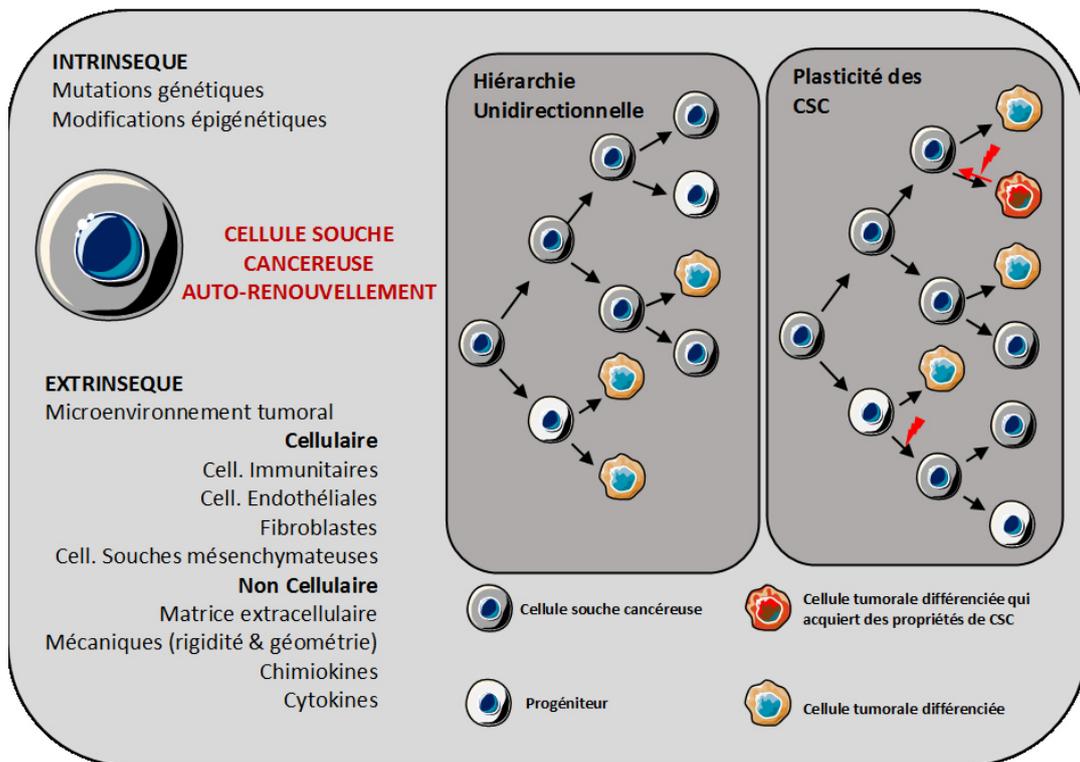


Figure 7 : Les facteurs d'hétérogénéité de la tumeur.

Le modèle originel (la hiérarchie unidirectionnelle) suppose que seules les cellules souches cancéreuses (CSC) sont capables de générer la masse tumorale via une division symétrique (l'auto-renouvellement) ou une division asymétrique (génération de cellules différenciées). Dans ce cas, la hiérarchie est strictement unidirectionnelle et exclut le concept de la réversibilité du devenir cellulaire à partir des cellules progénitrices. Au contraire, de plus en plus d'indices montrent que la hiérarchie est plus fluide que ce qui était admis jusqu'à présent. Dans le modèle de plasticité des CSC, la cellule possède une capacité de dédifférenciation depuis un état non-CSC à un état CSC et vice-versa. Dans ce modèle, la caractéristique de cellule souche et la plasticité sont déterminées par divers signaux intrinsèques et extrinsèques qui agissent simultanément ou indépendamment dans le temps. De ce fait, les cellules non-CSC peuvent servir de réservoir pour créer une population de CSC pendant l'oncogenèse. Ceci est indiqué par un éclair sur la figure et peut être le fait de signaux du microenvironnement ou de changements génétiques ou épigénétiques.

Adapté de Prasetyanti & Medema, 2017.

Dans le cas des GB, plusieurs équipes ont identifié des cellules souches de gliomes (CSG) à partir de tumeurs solides (Singh *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2004). Ces travaux soulignent l'importance des CSG dans la carcinogénèse. En effet, les auteurs ont montré qu'une centaine de cellules de CSG étaient suffisantes pour générer une nouvelle tumeur chez la souris.

Toutefois, l'origine cellulaire des GB reste encore à déterminer. L'hypothèse de départ était qu'une cellule différenciée revenait à un état de progéniteur immature. La découverte des cellules souches neurales (CSN) a remis en cause ce postulat (Figure 8) (Chen *et al.*, 2012).

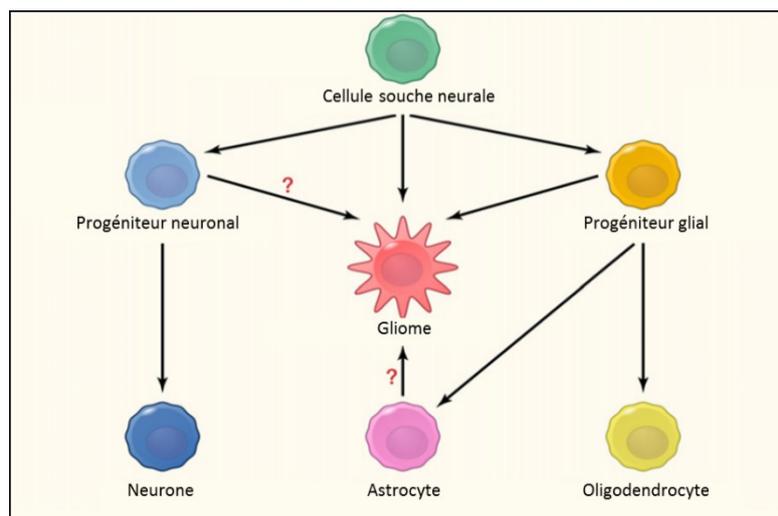


Figure 8 : Origine cellulaire du glioblastome. Des mutations chez les cellules souches neurales adultes sont suffisantes pour initier la formation d'un gliome malin *in vivo*. Certaines preuves en faveur d'une origine à partir d'un astrocyte mature ou d'un progéniteur ont également été obtenues *in vitro* et *in vivo*. Cependant l'origine des gliomes reste à ce jour non connue avec certitude. Adapté de Chen *et al.*, 2012.

1.4.2. Métabolisme de la cellule tumorale : l'effet Warburg

Le métabolisme des cellules tumorales est différent de celui des cellules saines. De façon physiologique, les cellules produisent de l'énergie en utilisant l'oxygène. Ce processus est appelé métabolisme aérobie qui produit du pyruvate grâce à la glycolyse. Le pyruvate est ensuite métabolisé au niveau des mitochondries et abouti à la formation de molécules d'ATP (adénosine tri-phosphate).

En condition d'anaérobie, c'est-à-dire en faible quantité d'oxygène, la phosphorylation oxydative ne fonctionne plus. Le pyruvate formé emprunte la voie de la fermentation lactique. Le rendement énergétique de cette voie est 16 fois moins efficace que la phosphorylation oxydative (Figure 9).

Dans les GB, la biodisponibilité de l'oxygène est très aléatoire et très hétérogène. Les cellules cancéreuses présentent de nombreuses singularités métaboliques. En effet, elles privilégient un

métabolisme anaérobie même en présence d'oxygène. Ce phénomène est dénommé « glycolyse aérobie » ou « effet Warburg », du nom de son premier observateur Otto Warburg. Il apparaît que cet effet est dû, en partie, à l'activation des oncogènes et à la perte des gènes suppresseurs de tumeurs qui induit un « switch » métabolique (Levine & Puzio-Kuter, 2010).

Cet effet est accompagné d'une augmentation importante de la captation de glucose, d'une inhibition partielle de l'activité mitochondriale et d'une consommation en oxygène diminuée (Vartanian *et al.*, 2014).

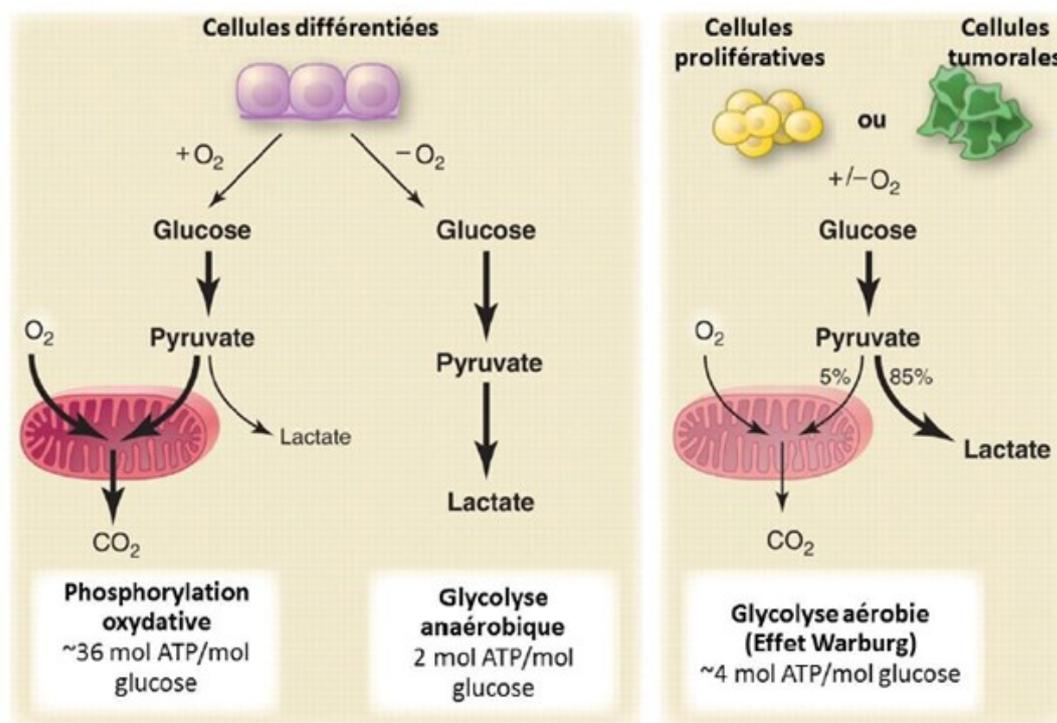


Figure 9 : Représentation des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (Effet Warburg).

ATP, adénosine triphosphate; CO₂, dioxyde de carbone; mol, molécule; O₂, dioxygène.

Adapté d'après Louis, 2006.

1.4.3. Angiogenèse

La croissance rapide de la tumeur provoque un éloignement des vaisseaux et donc une diminution des apports sanguins aux tissus. Toutefois, les cellules mettent en place des mécanismes conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux permettant à la tumeur de poursuivre sa croissance. Dans le processus de développement d'une tumeur, les premières cellules se déplacent le long des vaisseaux déjà présents. Ce mécanisme est appelé co-option vasculaire. Une fois que la masse tumorale atteint une taille critique, la demande métabolique surpasse les apports. La croissance de la

tumeur est alors ralentie. C'est alors que l'hypoxie apparaît et que l'angiogenèse se met en place (Baeriswyl & Christofori, 2009). Les GB sont des tumeurs fortement vascularisées. La prolifération importante des cellules endothéliales est corrélée à un facteur de mauvais pronostic (Chen *et al.*, 2015).

La vascularisation est un point clé dans le processus tumoral. La transformation des gliomes vers de hauts grades est accompagnée d'une modification importante de la morphologie microvasculaire et d'une augmentation marquée de sa densité. Ce phénomène appelé « switch angiogénique » est une étape critique dans la carcinogenèse. Il s'opère par une forte expression de facteurs pro-angiogéniques, de récepteurs et de cytokines (VEGF, MMPs (Matrix Metalloproteases), IL 1β...) impliqués dans les voies de synthèse de nouveaux vaisseaux (Vartanian *et al.*, 2014) (Figure 10).

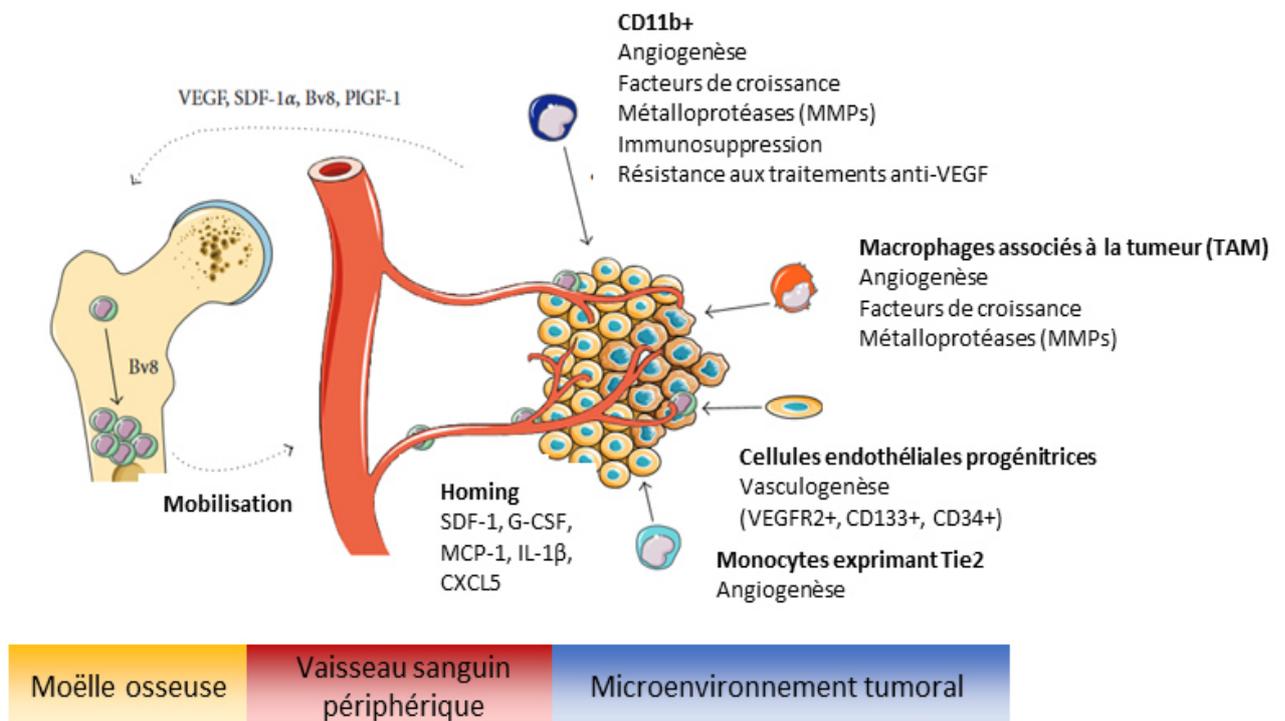


Figure 10 : Description des différents acteurs responsables du processus angiogénique en condition pathologique. D'après Schmid & Varner, 2010

De nouveaux vaisseaux se forment à partir de la vascularisation préexistante par le bourgeonnement de nouveaux capillaires. C'est la définition de l'angiogenèse. Toutefois, l'angiogenèse ne semble pas expliquer à elle seule l'arborescence vasculaire retrouvée dans les GB (Das & Marsden, 2013). En effet, il existe d'autres moyens de former de nouveaux vaisseaux comme,

par exemple, la vasculogénèse *de novo* qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de progéniteurs hématopoïétiques dérivés de la moelle osseuse (Hardee & Zagzag, 2012) (Figure 11).

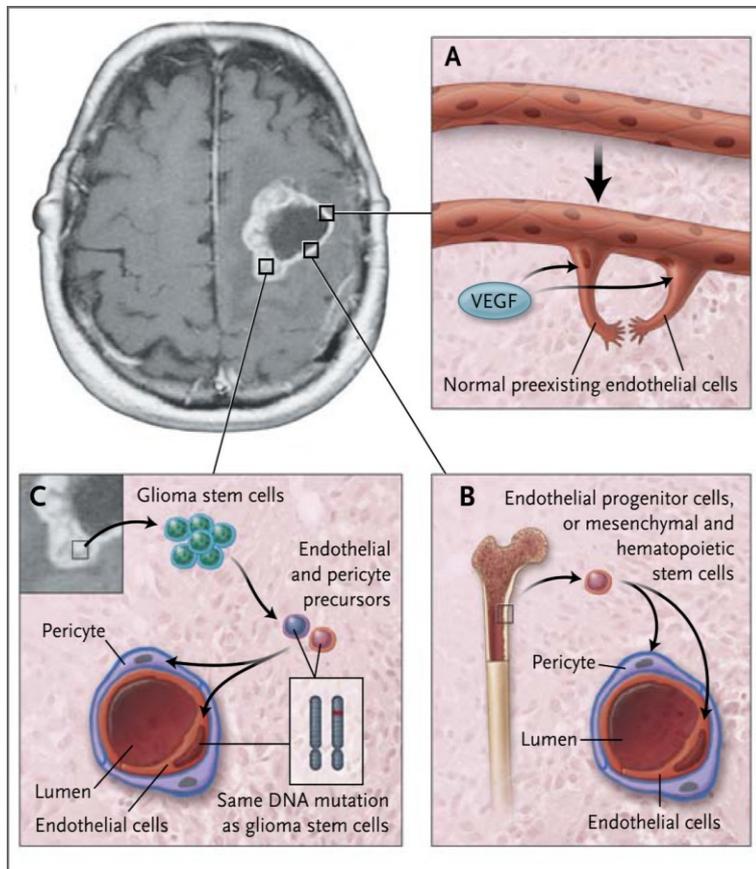
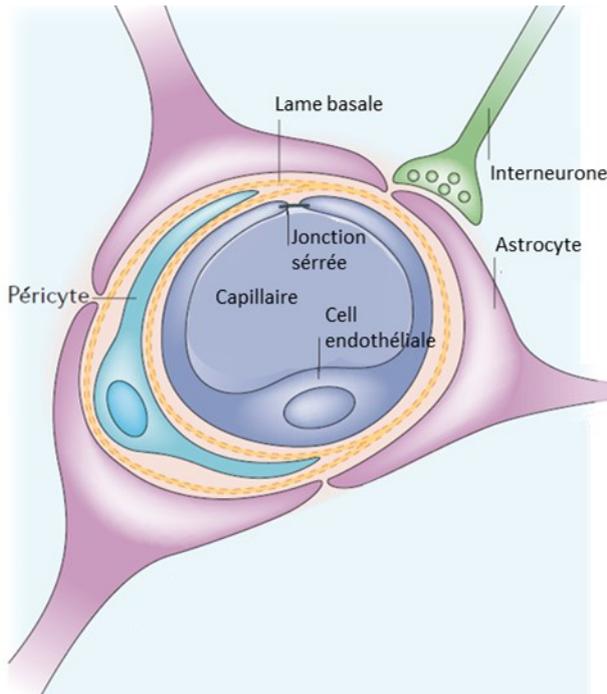


Figure 11 : L'angiogenèse dans les GB. Une grande variété de voies ont été décrites pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les glioblastomes. Les cellules tumorales hypoxiques, en particulier celles entourant le noyau nécrotique, libèrent des facteurs de croissance vasculaires, tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), qui stimulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de cellules endothéliales normales préexistantes (A). Ce processus implique à la fois une prolifération des cellules endothéliales et une perméabilité vasculaire accrue. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins se produit également par le recrutement de cellules progénitrices endothéliales dérivées de la moelle osseuse ou par des cellules souches mésenchymateuses ou hématopoïétiques (B). Ces cellules migrent de la circulation systémique vers les tumeurs. Des travaux récents montrent que les cellules souches de gliome contribuent à la formation des vaisseaux sanguins tumoraux en se différenciant en cellules endothéliales ou en péricytes, cellules contractiles qui enveloppent les cellules endothéliales de petits vaisseaux sanguins (C). Dans le tissu cérébral sain, l'unité neurovasculaire est composée de neurones, d'astrocytes, de cellules endothéliales et de péricytes. Les péricytes jouent un rôle essentiel dans la régulation de la fonction des vaisseaux sanguins: ils contrôlent le flux sanguin local et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et communiquent directement avec les cellules endothéliales par le biais de jonctions lacunaires et de signaux paracrines. D'après Das & Marsden, 2013.

Au niveau du tissu cérébral sain, on trouve une organisation stricte et très contrôlée de la vascularisation. La structure responsable de l'intégrité du parenchyme cérébral est dénommée BHE. Cette barrière implique différents acteurs cellulaires indispensables afin de préserver l'intégrité du parenchyme cérébral (Figure 12). La BHE est organisée avec des jonctions serrées et une absence de fenestration. Ce maillage entourant les vaisseaux assure une faible perméabilité (Daneman & Prat, 2016).



Dans le cas des GB, en dépit des diverses stratégies angiogéniques, les vaisseaux formés sont structurellement et fonctionnellement anormaux (Jain *et al.*, 2007) (Figure 13A, Figure 13B). L'architecture atypique de ces vaisseaux va aboutir à une pression sanguine qui n'est pas uniforme. Cela va conduire à des phénomènes d'hypoxie, d'ischémie ou de thrombose (Jain *et al.*, 2007). La BHE n'est plus fonctionnelle et la perméabilité augmente (Figure 13C, Figure 13D, Figure 13E) (Santarosa *et al.*, 2016).

Figure 12 : Les constituants de la barrière hématoencéphalique.
Adapté d'après Abbott *et al.*, 2006

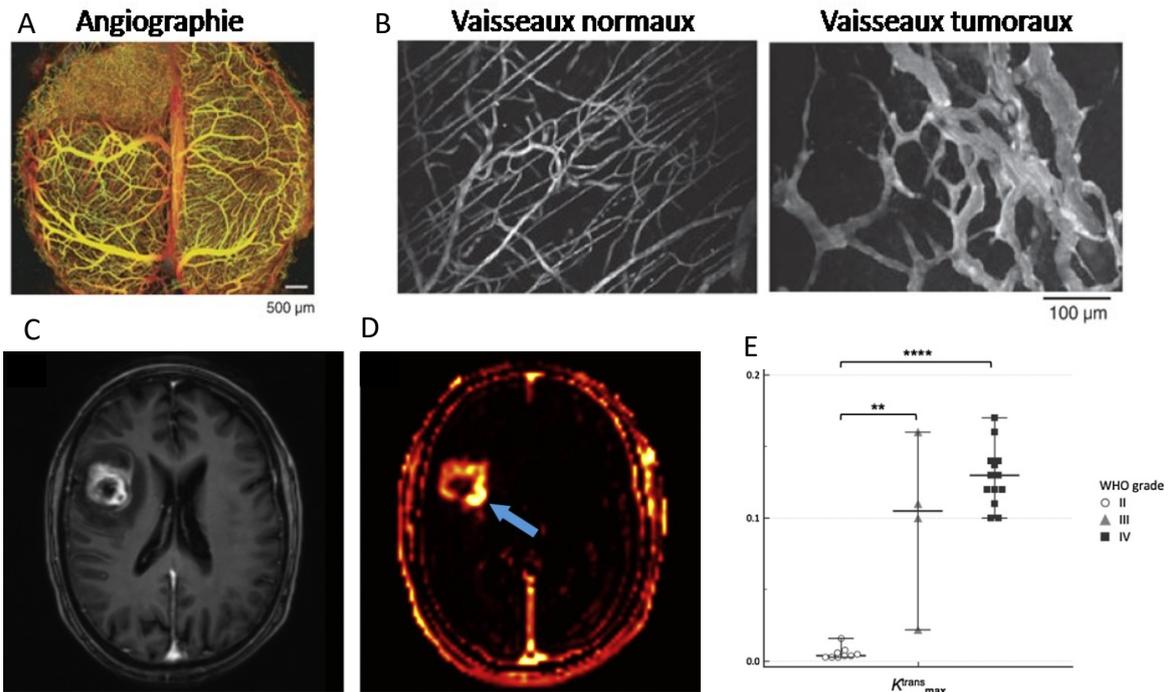


Figure 13 : Imageries de la vascularisation et de la perméabilité cérébrale et tumorale
A. Angiographie du cerveau d'une souris porteuse d'une tumeur cérébrale (en haut à gauche).
B. Acquisitions en microscopie multiphoton de vaisseaux cérébraux normaux et tumoraux. D'après (Fukumura *et al.*, 2010)
C. Visualisation par IRM T1-w avec agent de contraste d'un gliome de haut grade
D. Carte de K^{trans} associée. La lésion (flèche bleue) montre un K^{trans} élevé.
E. Les valeurs de K^{trans} ont été mesurées dans des gliomes de différents grades et montrent que la perméabilité augmente de manière significative avec le celui-ci. D'après Santarosa *et al.*, 2016

L'immaturation vasculaire va produire un effet singulier dans le parenchyme tumoral. Cet effet dénommé l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention effect*), fait référence à la perméabilité augmentée des vaisseaux et donc au passage de macromolécules dans les tissus tumoraux (Maeda & Matsumura, 1986; Gerlowski & Jain, 1986; Maeda *et al.*, 2013) (Figure 14).

Cet effet, retrouvé dans les GB, est largement étudié pour le développement de stratégies de ciblage spécifiques (Yoshikawa *et al.*, 2019). Cela a fait l'objet d'un essai clinique basé sur l'utilisation d'une molécule thérapeutique encapsulée dans des liposomes (Clarke *et al.*, 2017).

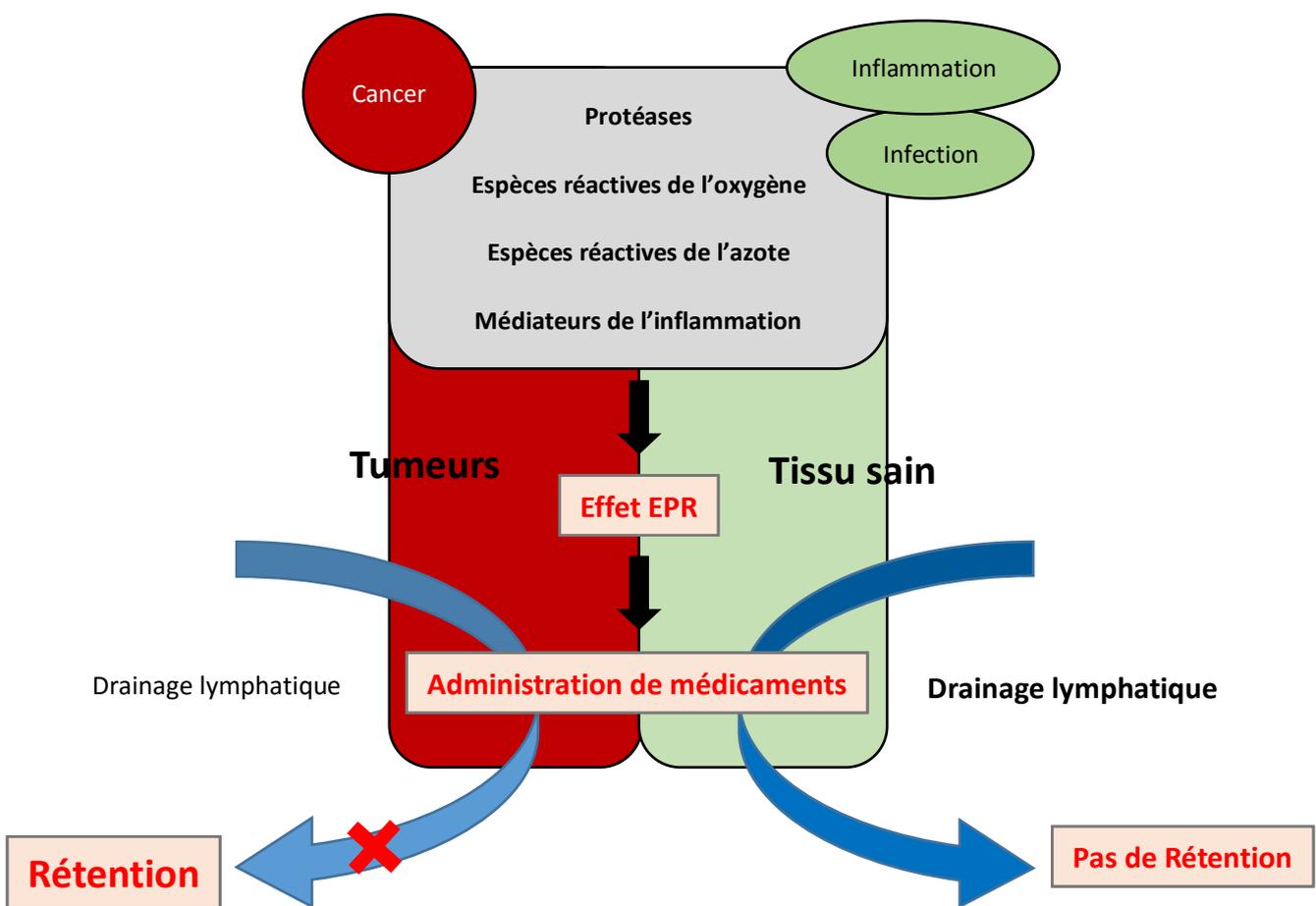


Figure 14: Acteurs moléculaires retrouvés dans l'effet EPR dans un contexte tumoral et dans le cas d'une inflammation/infection avec un réseau vasculaire sain.

De nombreux acteurs vasculaires couramment retrouvés dans des cas d'inflammations et dans le cancer contribuent à l'effet EPR. Ces médiateurs affectent également les vaisseaux sanguins normaux. Une différence majeure entre les deux lésions pathologiques est le taux de clairance des macromolécules extravasées telles que les protéines plasmatiques, les particules lipidiques ou la nanomédecine. Cela entraîne un temps de rétention prolongé dans le tissu tumoral par rapport à celui dans le tissu sain ou dans le cas d'une pathologie annexe. Adapté de Maeda *et al.*, 2013

1.4.4. Le Microenvironnement tumoral

La progression tumorale n'est pas seulement le fait de modifications cellulaires et d'angiogenèse. La tumeur interagit avec d'autres cellules qui vont aussi alimenter sa croissance. Le microenvironnement tumoral est constitué de cellules, de facteurs de croissance, de molécules de signalisation, de la matrice extracellulaire et des différents signaux mécaniques susceptibles d'induire et de promouvoir la transformation néoplasique (Swartz *et al.*, 2012). L'interaction de la tumeur avec son microenvironnement est constante. Ces deux compartiments s'influencent par le biais de différents signaux biologiques qui ont pour principale conséquence la protection de la tumeur de la veille immunitaire de l'hôte (Sonnenschein & Soto, 2008). Le microenvironnement tumoral joue aussi un rôle important dans la résistance aux traitements observé dans les GB (Li *et al.*, 2017) (Figure 15).

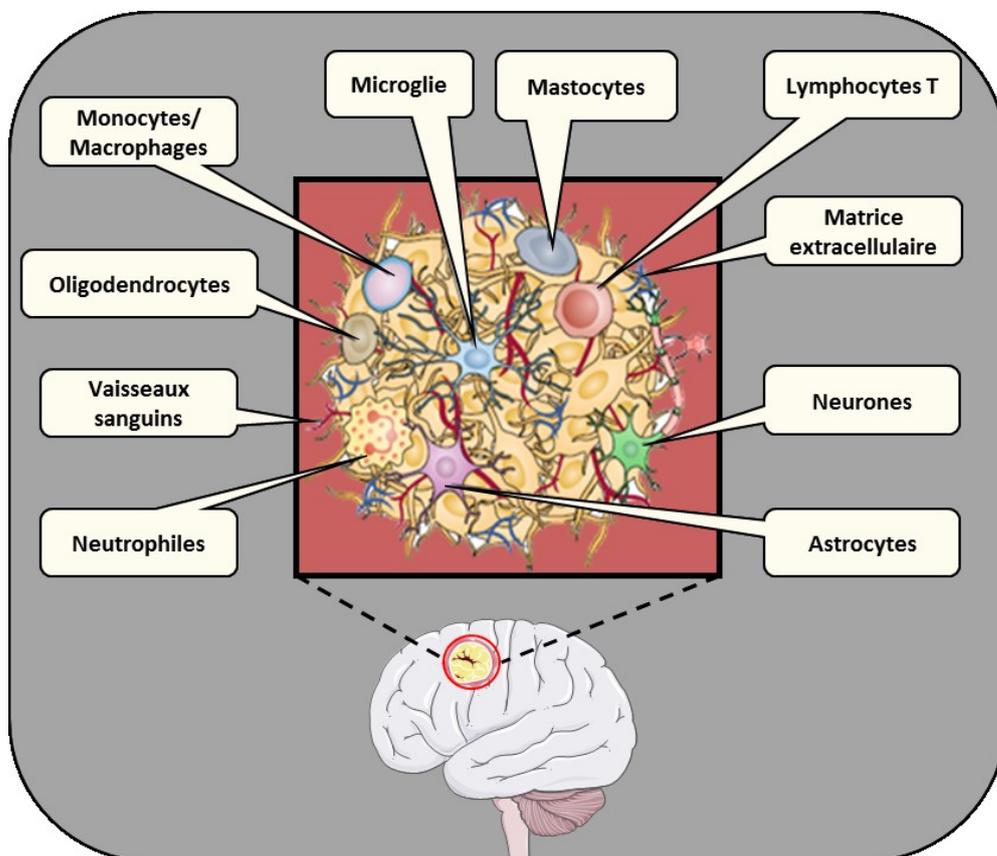


Figure 15 : Représentation du microenvironnement tumoral des glioblastomes.

Le microenvironnement tumoral se compose de différentes composantes (vaisseaux sanguins et matrice extracellulaire), d'acteurs résidents (oligodendrocytes, microglie, neurones et astrocytes) et infiltrant (neutrophiles, monocytes/macrophages, mastocytes et lymphocytes T).

D'après Broekman *et al.*, 2018

En plus des cellules entourant la tumeur, cette dernière a la capacité de recruter d'autres types cellulaires. Parmi elles, on retrouve des fibroblastes nommés *Cancer Associated Fibroblasts* (CAF) qui

proviennent de la moelle osseuse et jouent un rôle dans l'angiogenèse et dans l'invasion tumorale (Clavreul *et al.*, 2014). De la même manière, des cellules souches mésenchymateuse (CSM) ont été retrouvées chez des patients et seraient associées à un mauvais pronostic (Hossain *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2016).

Les cellules les plus recrutées sont les cellules immunitaires. Appelés TAM (*Tumor-associated macrophages*), ces macrophages associés à la tumeur sont dits de phénotype pro-tumoral ou « M2 ». Avant d'acquérir un phénotype spécifique, les macrophages possèdent un phénotype « M0 » ou non activé. Les macrophages peuvent se différencier en macrophages de type « M1 ». Ils sont dits « classiquement activés », sont pro-inflammatoires et décrits comme étant anti-tumoraux. Les macrophages « M2 » favorisent la prolifération tumorale, la survie et la migration cellulaire (Hambardzumyan *et al.*, 2015). Il est important de noter que le phénotype « M1 » ou « M2 » n'est pas définitif. En effet, en fonction des signaux du microenvironnement, les macrophages ont la capacité de passer d'un phénotype à l'autre. Une étude menée au sein de l'équipe a montré que l'hypoxie joue un rôle dans l'acquisition d'un phénotype « M2 », pro-tumoral des TAM (Leblond *et al.*, 2016) ([Figure 16](#)).

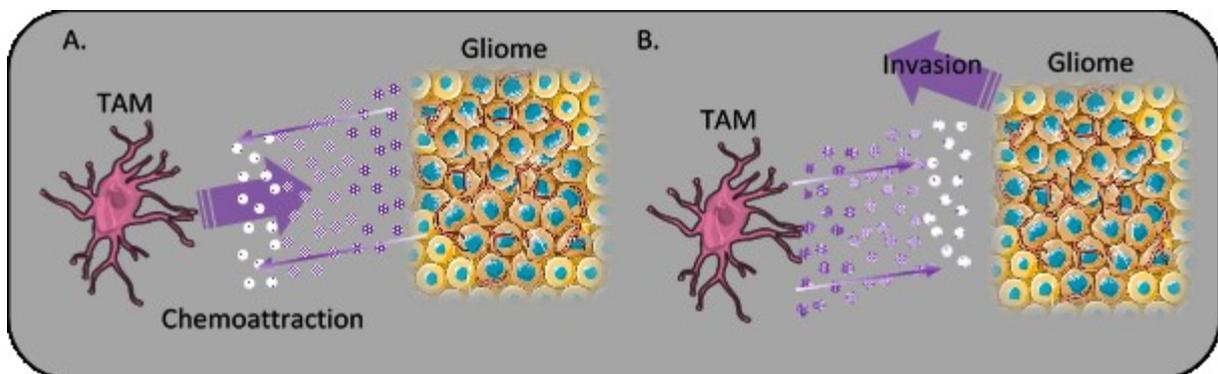


Figure 16 : Dialogue entre les macrophages et le gliome.

A. Les cellules cancéreuses libèrent différents facteurs qui vont attirer les macrophages (TAM) vers le tissu tumoral (gliome).

B. En réponse à ces facteurs, les TAM secrètent divers facteurs qui favorisent notamment l'invasion.

Adapté de Hambardzumyan *et al.*, 2015

1.5. L'Hypoxie : une caractéristique majeure des glioblastomes

1.5.1. L'hypoxie dans les glioblastomes

1.5.1.1. Mécanismes physiologiques

L'oxygène qui passe par la trachée est capté au niveau des poumons et passe dans le sang artériel où il est acheminé aux organes. Pendant ce trajet, la pression partielle en O₂ (pO₂) diminue (Koh & Powis, 2012). La pression tissulaire en O₂ (ptO₂) est toujours inférieure à la pO₂ atmosphérique. Lorsque la ptO₂ est à un niveau physiologique on parle alors de physioxie. Elle varie d'un organe à l'autre. Lorsque la pO₂ diminue en dessous des conditions physiologiques, on parle alors d'hypoxie (Tableau 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

Plusieurs niveaux d'hypoxie existent. Elle est considérée comme modérée jusqu'à 8 mm Hg puis sévère au-delà de cette limite jusqu'à arriver à l'anoxie qui correspond à une absence quasiment totale d'oxygène. Au niveau cellulaire, on peut définir l'hypoxie comme l'inadéquation entre l'apport et la consommation en oxygène. Les causes d'une hypoxie peuvent être nombreuses et variées : mauvaise perfusion sanguine, éloignement des vaisseaux, métabolisme accru, fort index prolifératif... Au niveau cérébral, la pO₂ varie entre 30 et 40 mm Hg (~5% d'O₂) dans un tissu sain. Dans le cas des GB, la ptO₂ est très hétérogène.

L'hypoxie tumorale peut être divisée en deux grandes catégories selon les causes et la durée de celle-ci. On distingue l'hypoxie aiguë de l'hypoxie chronique. La croissance rapide, le métabolisme caractéristique des cellules cancéreuses, et la vascularisation imparfaite sont les causes principales de l'apparition des zones hypoxiques dans les GB. Les régions physioxiques de la tumeur sont les régions où la croissance est la plus importante. En effet, dans ces zones, l'apport d'oxygène et de nutriments permet une prolifération tumorale active. A l'inverse, il est généralement admis qu'à une distance de 70 à 100 µm d'un vaisseau les cellules sont en souffrance et meurent. Ces régions sont les zones anoxiques où la nécrose tumorale est observée. Entre les régions physioxiques et anoxiques se

trouvent les zones hypoxiques chroniques. L'oxygène parvient dans ces zones en quantités limitées. Les cellules tumorales arrivent à survivre mais ne prolifèrent pas activement. L'hypoxie aiguë est causée par un apport d'O₂ variable qui est la conséquence de l'arborescence vasculaire imparfaite et caractéristique des GB (Yeom *et al.*, 2012) (Figure 17).

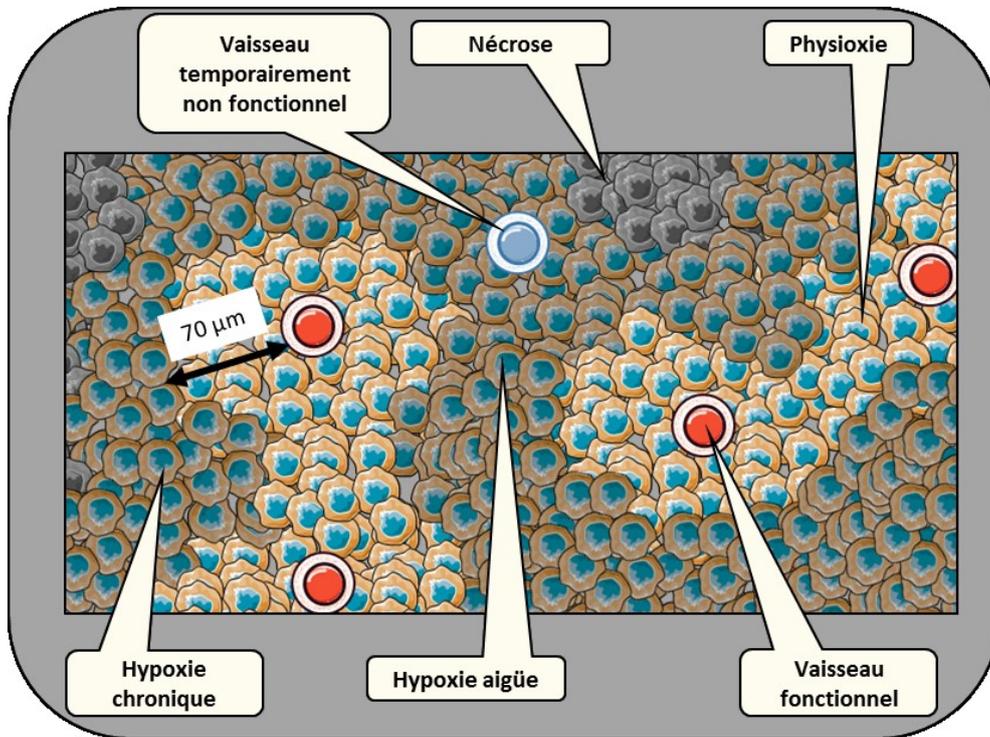


Figure 17 : Illustration des niveaux d'oxygénation dans la tumeur en fonction de la distance et de la fonctionnalité des vaisseaux. Adapté de Yeom *et al.*, 2012

L'hypoxie se met en place de manière progressive. Au stade de la tumorigénèse, les cellules sont en condition de physioxie puis au fur et à mesure de la croissance tumorale et un gradient d'oxygène apparaît (Kempf *et al.*, 2015) (Figure 18).

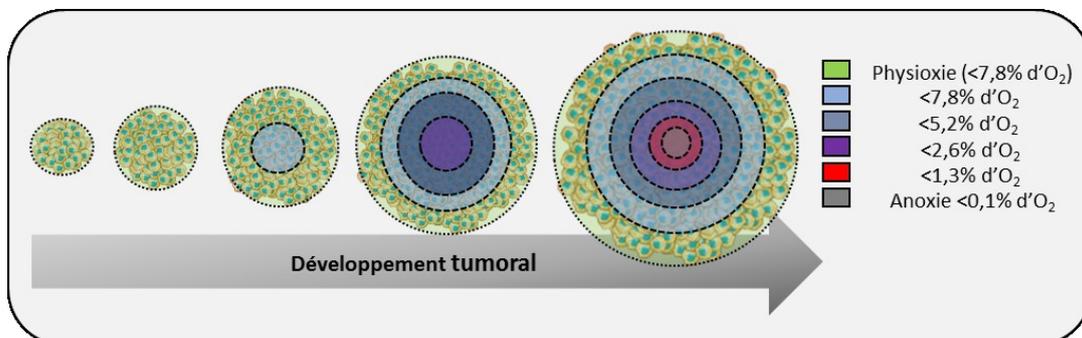


Figure 18 : Mise en place du gradient d'oxygène pendant le développement tumoral. Analyse *in silico* de la distribution en oxygène au cours de la croissance tumorale. Adapté de Kempf *et al.*, 2015

La mesure de l'oxygénation tissulaire qui reflète l'hétérogénéité tumorale reste à ce jour un enjeu majeur. Plusieurs techniques ont été mises au point pour évaluer ce paramètre.

D'un point de vue moléculaire, l'hypoxie peut être mise en évidence par la cascade de signalisation activée lorsqu'une baisse de la pO_2 est détectée. Une immunohistochimie dirigée contre les acteurs moléculaires induit par l'hypoxie ou ses cibles permet de révéler l'hypoxie. D'autres méthodes reposent sur la captation de molécules par les cellules localisées dans des zones d'hypoxie. Ces molécules sont injectées par voie systémique avant la biopsie et leur métabolisme va dépendre de la présence ou non d'oxygène. C'est le cas des dérivés imidazoles comme le pimonidazole (Varia *et al.*, 1998). Une manière plus directe repose sur l'utilisation de sondes à oxygène qui permettent de mesurer directement la pression tissulaire en oxygène (ptO_2). Ces sondes sont implantées directement dans le cerveau. Toutefois, il est important de noter que la grande limite de ces méthodes est le caractère invasif. De plus, ces méthodes ne permettent pas d'évaluer l'hypoxie tumorale dans sa globalité.

De manières moins invasives, l'hypoxie peut être détectée en clinique notamment grâce à des méthodes d'imagerie IRM ou par Tomographie par émission de positons (TEP). L'avantage des techniques d'imagerie, en plus d'être moins invasive, va être de pouvoir estimer l'oxygénation dans différents compartiments tumoraux. L'évaluation par IRM-BOLD (*Blood Oxygen Level-Dependant*) repose sur les propriétés magnétiques de l'hémoglobine (Hb) qui sont différentes lorsque l'hémoglobine est couplée ou non avec de l'oxygène. Cette méthode a été le point de départ du développement d'une technique, plus sensible, appelée qBOLD pour BOLD quantitatif. Cette technique permet d'évaluer la saturation en oxygène ($SatO_2$). La mesure de ce paramètre est le résultat complexe de l'acquisition par IRM de différentes composantes (Christen *et al.*, 2012) (Figure 19).

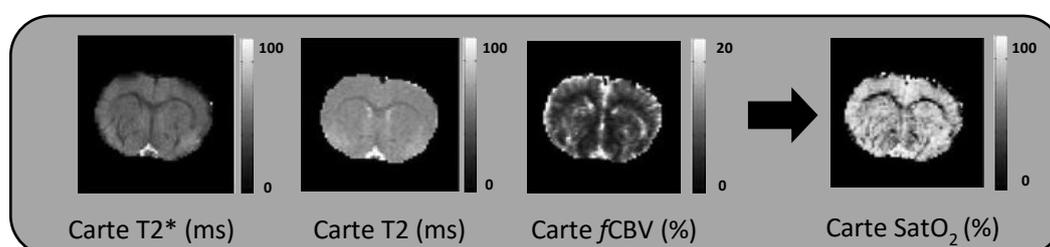


Figure 19 : Quantification de la saturation en oxygène à partir du signal BOLD. A partir de cartes T2*; T2 et de volume sanguin cérébral [fCBV], il est possible de générer une carte quantitative de $SatO_2$ dans le sang. Adapté de Christen *et al.*, 2010

Concernant la TEP, le radiotracer le plus utilisé pour visualiser l'hypoxie est le [^{18}F]-Fluoromisonidazole ([^{18}F]-FMISO) (Figure 20). Il a comme particularité d'être très sélectif de l'hypoxie

sévère (≤ 7 mmHg d'O₂) et, dans le cas des gliomes, de permettre de discriminer le grade de la tumeur (Bekaert *et al.*, 2017). La principale limite de ce radiotracer est sa faible sensibilité dans les cas d'hypoxie modérée (10 à 30 mmHg d'O₂) (Corroyer-Dulmont *et al.*, 2013).

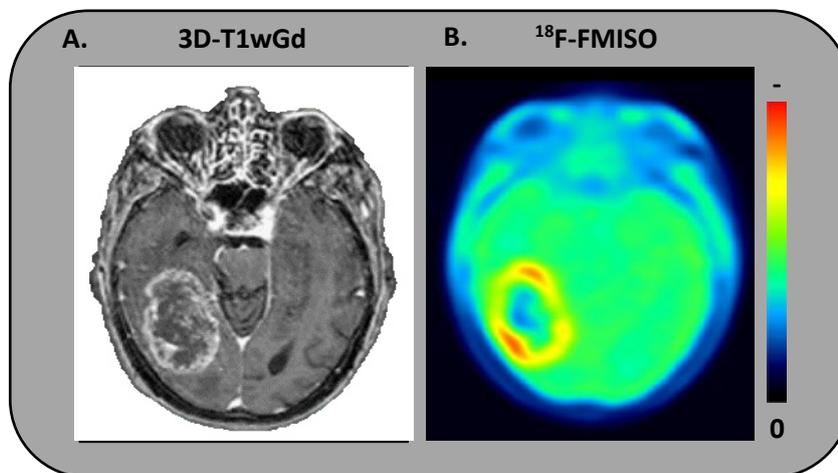


Figure 20 : Détection des régions hypoxiques par imagerie TEP [¹⁸F]-FMISO chez un patient atteint de glioblastome.

A. Imagerie pondérée en T1 après injection d'un agent de contraste.

B. Mise en évidence des zones hypoxiques par imagerie TEP [¹⁸F]-FMISO.

Adapté de Bekaert *et al.*, 2017

1.5.1.3. Hypoxie : Facteur de mauvais pronostic

L'hypoxie est l'une des caractéristiques majeures des GB. Même si sa durée et sa sévérité n'est pas constante dans la tumeur et d'un patient à l'autre, elle est pratiquement toujours observée dans cette pathologie. Plusieurs études ont mis en lumière une corrélation positive entre le degré de l'hypoxie et la survie diminuée des patients (Spence *et al.*, 2008; Sydney *et al.*, 2010; Kawai *et al.*, 2014) (Figure 21).

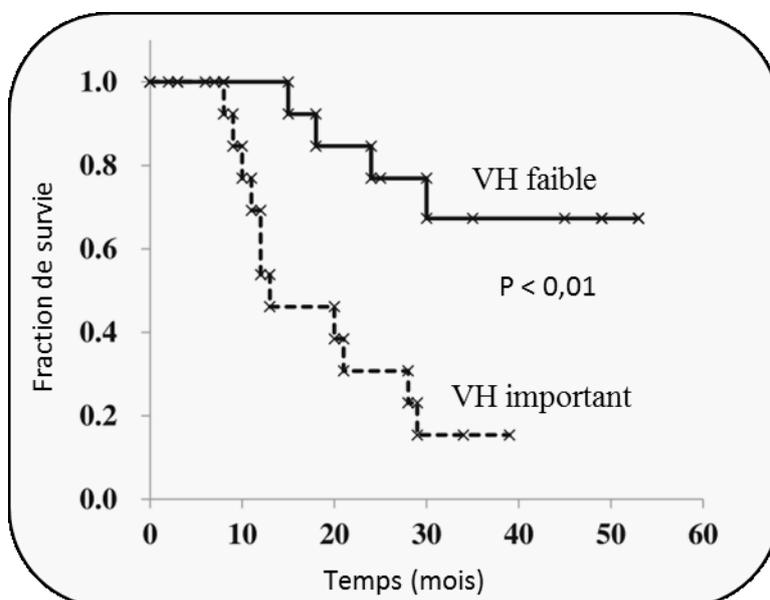


Figure 21 : Analyse de survie de Kaplan-Meier chez des patients atteints d'un gliome nouvellement diagnostiqué, comparant ceux présentant un VH faible (<20 cm³) et un VH important (≥20 cm³). VH : Volume hypoxique
D'après Kawai *et al.*, 2014

La diminution de l'oxygène au niveau cellulaire induit un stress. Les cellules s'adaptent et mettent en place différents mécanismes de survie. Dans un contexte tumoral, ces mécanismes d'adaptation vont, *in fine*, conduire à la croissance de la tumeur et à la résistance aux traitements conventionnels. Les mécanismes moléculaires de la réponse à l'hypoxie passent, notamment, par l'activation des facteurs de transcription HIFs.

1.5.2. Les facteurs de transcription HIFs (*Hypoxia Inducible Factor*)

L'adaptation à un environnement hypoxique est régulée au niveau moléculaire par cette famille de protéines HIFs. Ces protéines ont un rôle central et incontournable dans la réponse cellulaire à l'hypoxie.

1.5.2.1. Isoformes de HIF & régulation

Les protéines HIFs sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité HIF- α sensible à l'oxygène et d'une sous-unité HIF- β (également dénommée *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* ou ARNT) exprimée de manière constitutive et stable. Il existe 3 isoformes de sous-unités α : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . Si les deux premières isoformes sont bien caractérisées, le rôle de HIF-3 α est plus incertain et son action reste discutée. Elle contribuerait à la régulation de la sous-unité HIF-1 α en agissant sur l'hétérodimérisation HIF-1 α avec HIF-1 β (Makino *et al.*, 2001).

Au niveau structurel, l'ensemble de ces sous-unités possède une structure en hélice-boucle-hélice bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) qui permet à la fois la dimérisation des sous-unités α et β et la fixation à des séquences spécifiques de l'ADN, que l'on appelle éléments de réponse à l'hypoxie HRE (*Hypoxia Responsive Element*). Deux domaines PAS-A et PAS-B (*Per-Arnt-Sim*) sont impliqués dans la dimérisation et les domaines de transactivation (TAD, *terminal transactivation domain*) leur confèrent leur activité transcriptionnelle. Toutefois, seules les sous-unités HIF- α possèdent un domaine riche en résidus lysines et prolines (ODDD, *oxygen-dependant degradation domain*), responsable de leur dégradation en présence d'O₂ (Keith *et al.*, 2012) ([Figure 22](#)).

La régulation des sous-unités α des protéines HIFs est une balance entre synthèse et dégradation conditionnée par l'oxygène. La singularité de ces facteurs réside dans le fait que leurs stabilités sont en lien direct avec l'O₂.

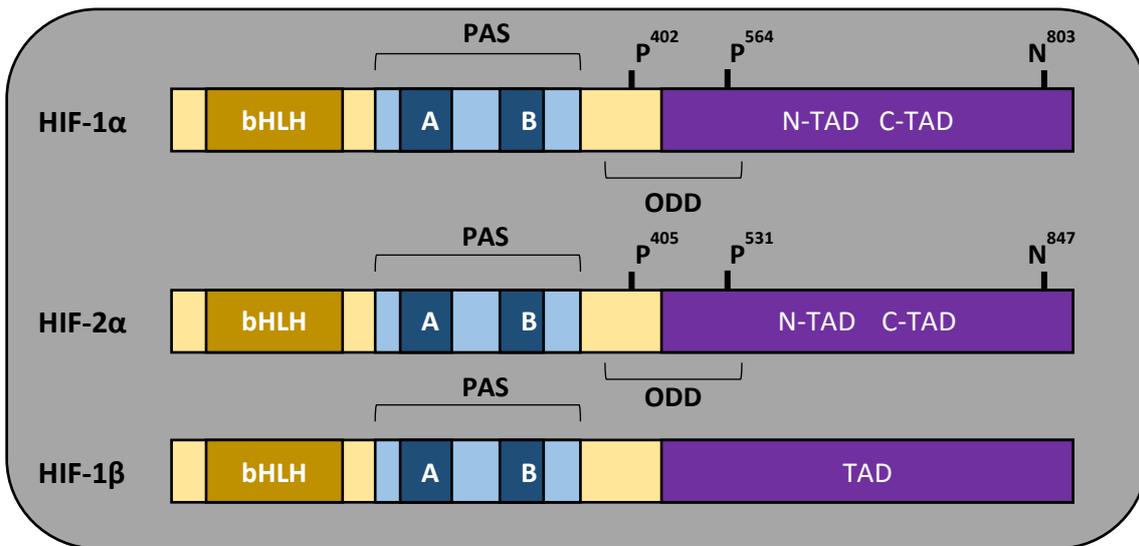


Figure 22 : Structure des sous-unités HIF.

bHLH = basic-Helix-Loop- Helix, TAD = TransActivation Domain, C-TAD = COOH-Terminal TAD, N- TAD = NH2-Terminal TAD, ODD = Oxygen-Dependent Degradation Domain, PAS = Per-Arnt-Sim.

Adapté de Keith *et al.*, 2012

En présence d'O₂, les PHD (*Prolyl Hydroxylases Domain*), des enzymes de la famille des dioxygénases utilisent l'O₂ pour hydroxyler deux prolines situées dans le domaine ODD des sous-unités α. Cette hydroxylation permet la reconnaissance par la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL). La pVHL est associée à un complexe qui ajoute de façon covalente des groupements ubiquitine. La finalité de cette cascade moléculaire est la reconnaissance et la dégradation de la sous-unité α par le protéasome.

En l'absence d'O₂, les PHD deviennent inactives, le complexe associé aux pVHL ne peut plus adresser la sous-unité α au protéasome et la protéine est stabilisée. La sous-unité α va alors se dimériser au niveau des domaines PAS-A et PAS-B avec HIF-β, le dimère est ensuite transloqué dans le noyau (Yang *et al.*, 2005) (Figure 23).

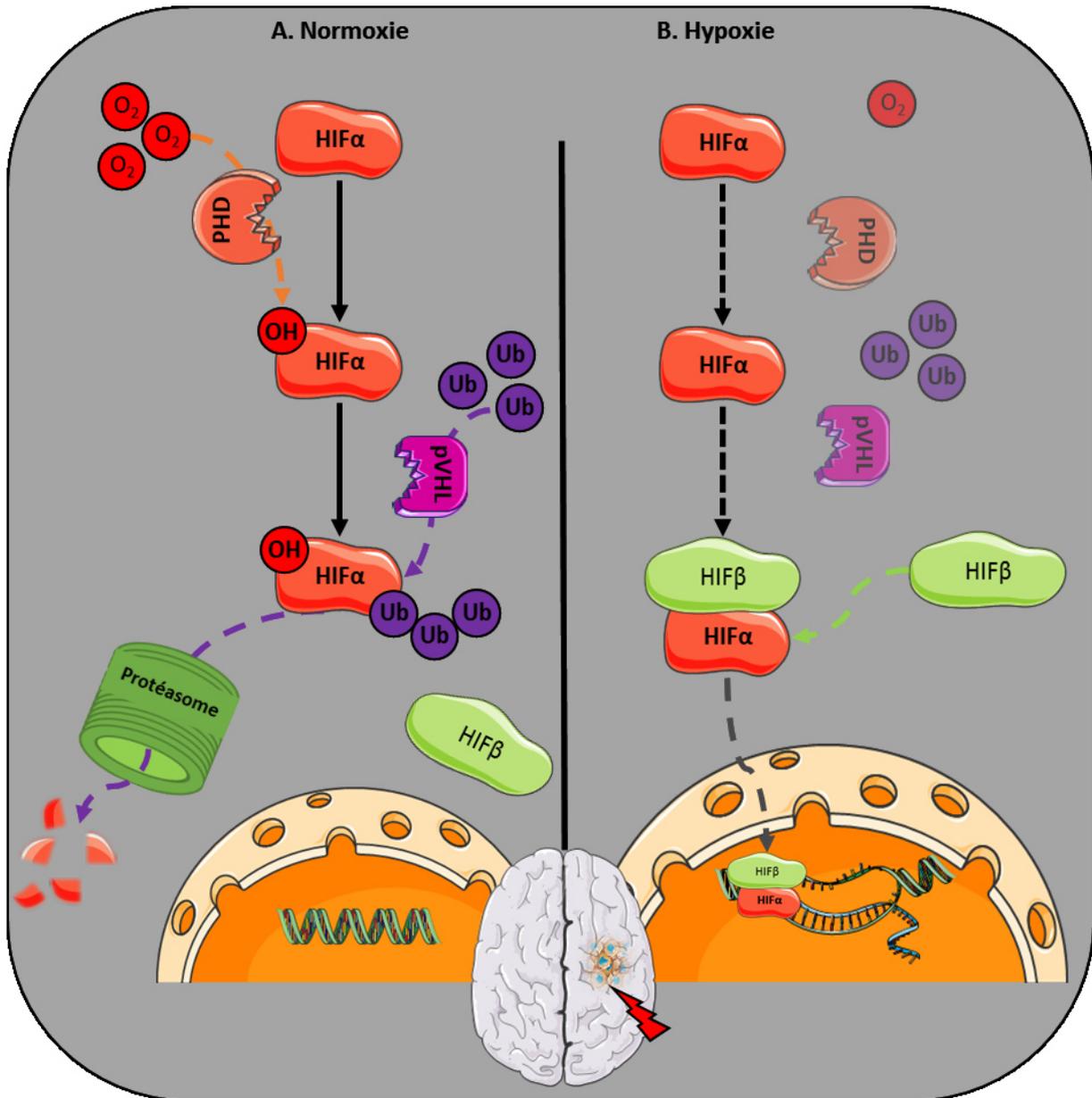


Figure 23 : Régulation des protéines HIFs.

A. Les sous-unités HIF- α (*Hypoxia Inducible Factor α*) sont hydroxylées sur des résidus proline par une famille d'enzymes spécifiques de HIF, les Prolyl Hydroxylases Domain (PHD), ce qui permet leur reconnaissance par la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL) qui contient des complexes ubiquitine ligase. La sous-unité HIF- α hydroxylée est alors dégradée par le protéasome.

B. Lorsque le niveau d'oxygène diminue, les enzymes PHD sont inhibées, ce qui permet la stabilisation de HIF- α , sa dimérisation avec HIF- 1β , et l'induction de la transcription de gènes cibles

Adapté de Simon, 2016

Le dimère ainsi formé n'est pas tout à fait fonctionnel. Une fois lié aux séquences HRE, le dimère recrute deux cofacteurs (p300 et CBP) qui sont indispensables à l'induction de la transcription de gènes cibles. Il est important de noter que l'interaction avec les cofacteurs p300 et CBP est soumise à une autre voie de régulation. Elle est assurée par une enzyme appelée FIH (*Factor Inhibiting HIF*), une asparagine hydroxylase qui catalyse l'hydroxylation de HIF- α au niveau d'un résidu asparagine localisé sur le domaine C-TAD (partie C-terminale du TAD). Cette hydroxylation a pour conséquence d'inhiber

le recrutement du coactivateur p300. La particularité principale des asparagines hydroxylases est qu'elle peut rester active à des niveaux d'O₂ qui inactivent les PHDs. Cette régulation dépendante d'un gradient d'O₂ pourrait jouer un rôle important dans un contexte tumoral (Pouysségur *et al.*, 2006).

Il convient de préciser qu'il existe d'autres voies de régulation indépendantes de l'O₂ pouvant réguler les facteurs HIFs. Certains facteurs de croissance et cytokines favorisent la traduction des ARNm de HIF (Keith *et al.*, 2012). La perte de fonction des pVHL, observée notamment dans le cancer du rein, peut favoriser la stabilisation des protéines HIFs (Cho *et al.*, 2016a). Ces régulations vont plutôt avoir un effet stabilisateur sur les facteurs HIFs. En revanche, d'autres régulateurs peuvent stimuler la dégradation de ces facteurs. C'est le cas de la protéine RACK1 qui entre en compétition avec la protéine HSP90 (*heat shock protein 90*) afin d'empêcher l'ajout de groupements ubiquitine. Cela a pour effet de bloquer l'adressage de HIF au protéasome et donc de le préserver de la dégradation (Liu & Semenza, 2007). Par ailleurs, de nombreuses modifications post-traductionnelles peuvent intervenir et entraîner des changements d'activité ou de stabilité des protéines HIFs (Dimova & Kietzmann, 2010).

Toutes ces données montrent que différents acteurs moléculaires sont susceptibles de moduler l'action et la spécificité des sous-unités α . Il est fondamental de les prendre en compte en fonction des tissus/cellules étudiés.

1.5.2.2. Cibles génétiques

La particularité des gènes induits par l'hypoxie est qu'ils possèdent une séquence HRE dans une de leurs régions régulatrices (promoteurs, régions UTR (*Untranslated Region*)). Les complexes HIFs actifs se fixent sur ces séquences qui ont pour consensus : R-CGTG (où R correspond à une base purique A ou G). Ces séquences sont présentes au sein des gènes inductibles en réponse à l'hypoxie (Semenza & Wang, 1992) (Tableau 3).

Tableau 3 : Exemples de gènes cibles de HIF-1 α ou HIF-2 α .

ADM : Adrénoméduline ; ALDA : Aldolase A ; ANG2 : Angiopoïétine 2 ; BNIP3 : BCL2/Adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3 ; CAIX : Anhydrase carbonique IX ; CCND1 : Cycline D1 ; EPO : Erythropoïétine ; GLUT1 : Glucose transporter 1 ; HK1/2 : Hexokinase 1/2 ; LDHA : Lactate déshydrogénase A ; OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4 ; PFK : Phosphofruktokinase ; PGK1 : Phosphoglycérate kinase 1 ; TGF- α : Transforming growth factor alpha ; VEGF : Vascular endothelial growth factor.

CSE : Cellule souche embryonnaire ; CCR : Cellule de carcinome rénal ; CE : Cellule endothéliale

Adapté de Keith *et al.*, 2012

Facteur de transcription	Gène cible	Fonction	Type cellulaire
HIF-1 α & HIF-2 α	GLUT1	Transport du glucose	CSE souris & CCR
	CAIX	Régulation du pH	CCR
	ADM	Angiogenèse	CCR
	VEGF	Angiogenèse	CCR & Hep3B
HIF-1 α	VEGF	Angiogenèse	CE et CSE souris
	BNIP3	Autophagie, apoptose	CCR
	HK1	Glycolyse	CSE souris
	HK2	Glycolyse	CSE souris & CCR
	PFK	Glycolyse	CSE souris & CCR
	ALDA	Glycolyse	CSE souris & CCR
	PGK1	Glycolyse	CSE souris & CCR
	LDHA	Glycolyse	CSE souris & CCR
HIF-2 α	EPO	Erythropoïèse, facteur de croissance	Rein et foie CSE souris
	OCT4	Caractère de cellules souche	CCR CCR
	TGF α	Facteur de croissance	CSE souris
	CCND1	Cycle cellulaire	
	ANG2	Remodelage des vaisseaux sanguins	

Les gènes cibles des protéines HIFs sont responsables, en condition physiologique, de la réponse à un stress généré par une diminution en oxygène. Dans le cas des GB, l'expression de gènes cibles participent à la survie, à la prolifération, à l'angiogenèse, au métabolisme et, in fine, à la croissance tumorale et à la résistance aux traitements.

1.5.2.3. Implication dans le processus tumoral

Les facteurs HIF sont des acteurs importants dans un contexte tumoral. Ils confèrent aux cellules tumorales une adaptation aux conditions de stress générées par l'hypoxie, elle-même générée par la progression tumorale. Ce sont donc les voies de signalisation du métabolisme glycolytique, de l'angiogenèse, de la survie, de l'instabilité génomique, de l'invasion, du pH, qui s'en trouvent modifiées et qui participent au développement tumoral et à la résistance aux traitements conventionnels (Erler *et al.*, 2004; Vaupel, 2004; Henze & Acker, 2010; Wilson & Hay, 2011) (Figure 24 Figure 25).

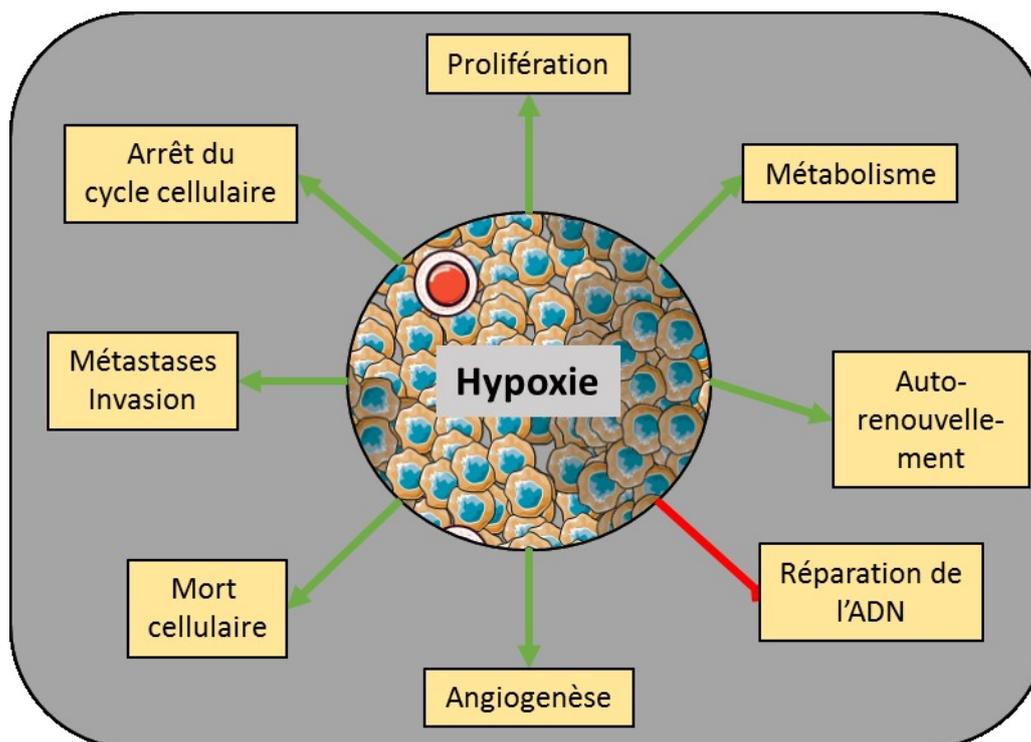


Figure 24 : Conséquences majeures de l'hypoxie dans un contexte tumoral.
Adapté de Henze & Acker, 2010

Beaucoup des gènes induits par HIF-1 sont fortement exprimés dans les tumeurs comme, par exemple, le VEGF ou encore les transporteurs de glucose (Masoud *et al.*, 2015). Dans l'angiogenèse induite par les facteurs HIFs, l'ampleur de la vascularisation *de novo* implique la transcription de deux facteurs angiogéniques clés : VEGF-A et Ang2 (*Angiopoietin 2*) (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2007). HIF-1 stimule également l'expression de la survivine, une petite protéine qui inhibe l'apoptose (Peng *et al.*, 2006). De plus, HIF surexprime des facteurs de transcription de la famille des Snail ainsi que le facteur Twist. Ces facteurs de transcription favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse qui est une caractéristique tumorale de l'invasion des cellules cancéreuses (Kim *et al.*, 2018). Comme énoncé dans la partie I.4.4, la tumeur a une capacité de recrutement cellulaire. Les CAFs (*Cancer Associated Fibroblastes*) ainsi recrutés vont être influencés par l'hypoxie et notamment par HIF-1. Ce dernier promeut l'autophagie ainsi que la glycolyse aérobie. Cela va avoir pour conséquence de fournir aux cellules entourant la tumeur l'énergie nécessaire pour favoriser leur croissance (Chiavarina *et al.*, 2010). HIF-1 contrôle également l'expression de gènes impliqués dans la régulation du pH. En effet, il régule un transporteur membranaire de monocarboxylate (MCT-4). Ce transporteur libère des protons H^+ dans le compartiment extracellulaire qui est le fruit de l'accumulation de lactate dû au métabolisme caractéristique des cellules tumorales. Cela conduit à une acidification du milieu extracellulaire (Koukourakis *et al.*, 2006).

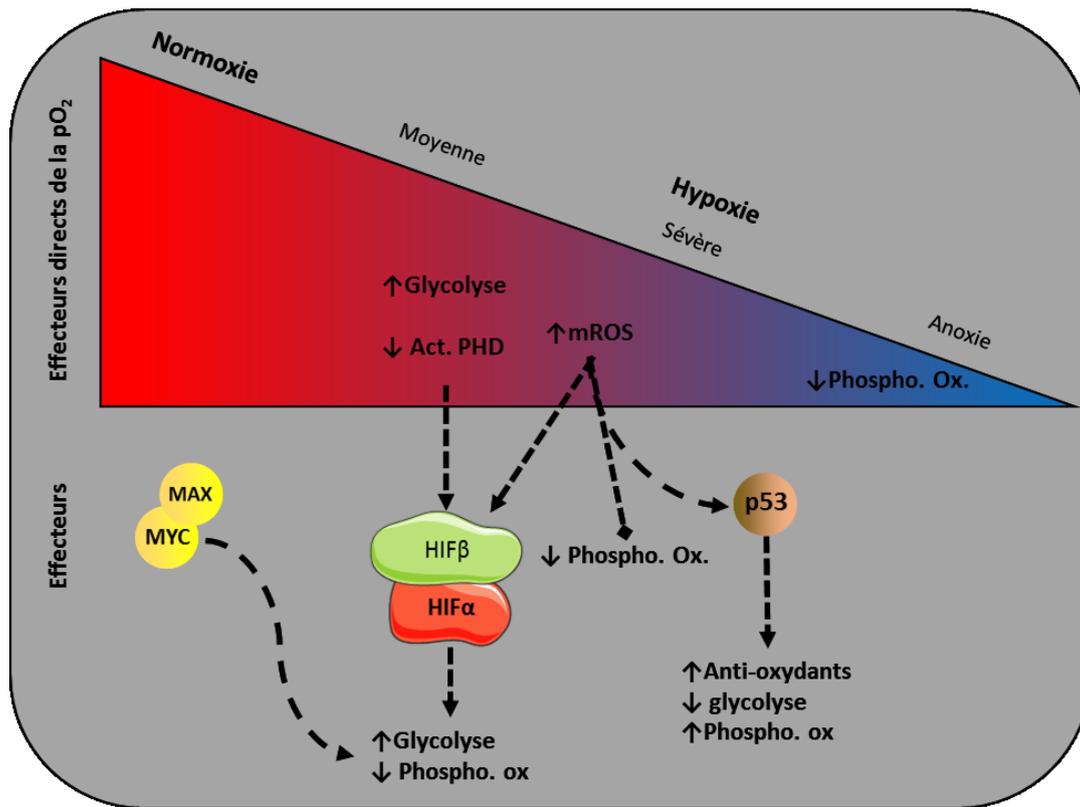


Figure 25 : Hypoxie et adaptation métabolique. La diminution de la pression en oxygène induit des modifications du métabolisme par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Les effets directs de la pression en oxygène sur le métabolisme sont représentés sur la partie haute du schéma et ceux qui dépendent de voies de signalisation activées par l'hypoxie sont représentés sur la partie basse. PHD = Prolyl-Hydroxylase Domain, mROS = mitochondrial Reactive Oxygen Species, MAX = Myc-Associated Protein X, MYC = V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homologue, Phospho. Ox. = Phosphorylation Oxydative.

Adapté de Eales *et al.*, 2016

Ces études non exhaustives font majoritairement référence à HIF-1 quant à son rôle incontournable dans le processus de développement d'un phénotype tumoral. Le rôle plus spécifique de HIF-2 va être détaillé dans la partie suivante.

1.5.2.4. HIF-2α : cible tumorale potentielle

Historiquement, les études sur les facteurs HIFs concernaient principalement l'isoforme HIF-1α. Depuis une douzaine d'années environ, de plus en plus d'études font référence au rôle de HIF-2α et aux rôles distincts et parfois communs des deux isoformes dans de nombreuses pathologies. Cependant, le rôle spécifique de ces deux protéines demeure complexe et dépend à la fois du type cellulaire ou du tissu mais également du degré et de la durée de l'hypoxie.

De nombreuses études reprises dans une revue de Koh et collaborateurs montrent qu'un « HIF switch » semble se mettre en place lorsque l'hypoxie se prolonge et devient chronique. Il semblerait que HIF-1 soit plutôt impliqué dans les phases aiguës et que HIF-2 (également appelé EPAS1, *Endothelial PAS domain-containing protein 1*) soit plutôt stabilisé dans des conditions d'hypoxie chroniques (Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006; Koh & Powis, 2012), comme cela est le cas dans un contexte tumoral. Ainsi, de nombreux articles ont montré que dans certains cancers, HIF-2 aurait un rôle majeur dans le développement d'un phénotype tumoral agressif (Koukourakis *et al.*, 2002; Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006; Helczynska *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

L'une des premières cibles reportées pour HIF-2 a été le facteur de transcription Oct-4. Ce facteur a d'abord été décrit au niveau embryonnaire comme étant essentiel dans le maintien des cellules souches pluripotentes. La baisse de l'expression de Oct-4 est primordiale dans les voies de différenciation cellulaire (Covello *et al.*, 2006) ([Figure 26](#)).

Une étude faite chez des patients atteints de neuroblastome a montré une corrélation positive entre les niveaux protéiques de HIF-2 et un mauvais pronostic. De plus, les auteurs ont montré que HIF-2 promeut un phénotype agressif dans cette pathologie (Carmeliet, 2005).

Dans le cas du cancer du rein, la stabilisation de HIF-2 est le résultat de la perte de fonction des pVHL. Il a été montré que HIF-2 joue un rôle crucial dans la progression tumorale (Kondo *et al.*, 2003; Gordan *et al.*, 2008).

Dans le cancer du poumon non à petites cellules, HIF-2 est associé à un mauvais pronostic et pourrait être considéré comme un facteur de risque (Giatromanolaki *et al.*, 2001).

L'acquisition d'un phénotype tumoral agressif n'est pas seulement le résultat de mutations génétiques mais, elle est aussi la conséquence d'un processus de sélection par étapes orchestrée en partie par l'hypoxie (Graeber *et al.*, 1996).

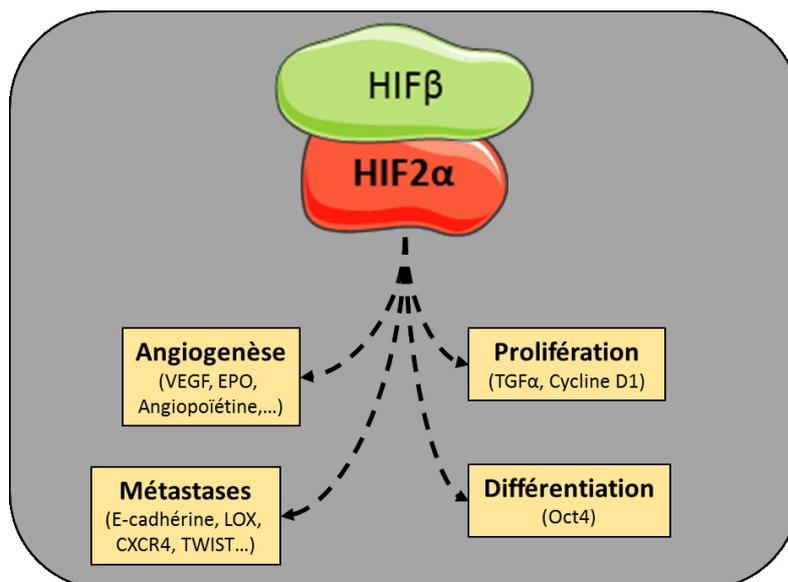


Figure 26 : Grandes voies de signalisation par lesquelles HIF2 α contribue à l'agressivité tumorale.

Adapté de Qing & Simon, 2009

Dans le cas des GB, l'une des causes de l'échappement au traitement est la création par la tumeur de niches pour CSC. Une étude menée par Seidel et collaborateurs indique que HIF-2 α serait le principal médiateur de la transformation en CSC. Les CSC sont regroupées dans des niches qui favorisent le maintien de leur phénotype. Un pourcentage élevé de ces cellules sont positives au marqueur de cellules souches CD133. Ces niches se localisent principalement à la limite des zones nécrotiques (Christensen *et al.*, 2008; Seidel *et al.*, 2010). Il est important de noter que HIF-2 α joue, par le biais des CSC, un rôle au niveau de la résistance des GB à la RT. Ces données semblent donc indiquer un rôle central de HIF-2 dans la tumorigenèse, dans la mise en place d'un phénotype tumoral agressif et dans la résistance aux traitements (Bertout *et al.*, 2009; Qing & Simon, 2009; Keith *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces données sur HIF-2 ont donc désigné cet isoforme comme étant une cible potentielle pour ralentir ou empêcher le développement tumoral.

L'étude des structures cristallographiques du dimère des domaines PAS-B de HIF-1 α ou de HIF-2 α avec le domaine PAS-B de HIF- β (ARNT) a montré qu'il existait une cavité interne hydratée au centre des domaines PAS-B. Toutefois, la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α est trois fois plus grande que celle de HIF-1 α (360 Å³ versus 100 Å³). Ce domaine étant impliqué dans l'hétérodimérisation de HIF-1/2 α avec HIF-1 β , les auteurs ont donc recherché des composés capables de se lier dans la cavité de HIF-2 α mais pas dans celle de HIF-1 α . dans le but d'inhiber sélectivement la formation du complexe HIF-2 α /HIF-1 β (Erbel *et al.*, 2003; Scheuermann *et al.*, 2009; Bersten *et al.*, 2013) (Figure 27).

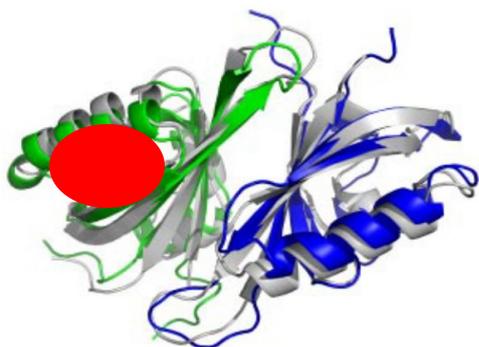


Figure 27 : Les domaines PAS-B. La structure cristallographique de l'hétérodimère HIF-2 PAS-B (HIF-2α PAS-B en vert, ARNT PAS-B en bleu, cavité en rouge)
D'après Scheuermann *et al.*, 2013.

Des études de screening de molécules ont en effet permis d'identifier un certain nombre de composés se liant sélectivement dans cette cavité et ne pouvant pénétrer dans la cavité plus petite de HIF-1α (Key *et al.*, 2009; Qing & Simon, 2009; Scheuermann *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015). Leurs liaisons dans la cavité de HIF-2α induit des changements de conformation au niveau du feuillet β nécessaire à la liaison avec le domaine PAS-B de HIF-β. Ces modifications allostériques ligand-dépendantes du domaine PAS-B de HIF-2α sont suffisantes pour perturber la formation du complexe HIF-2α/ARNT. Après de nombreuses étapes de pharmacomodulation et de criblage

in vitro, un composé de référence, le JN-128-022, sélectif de l'isoforme HIF-2 (Figure 28) a été sélectionné pour être testé *in vivo* (Scheuermann *et al.*, 2013).

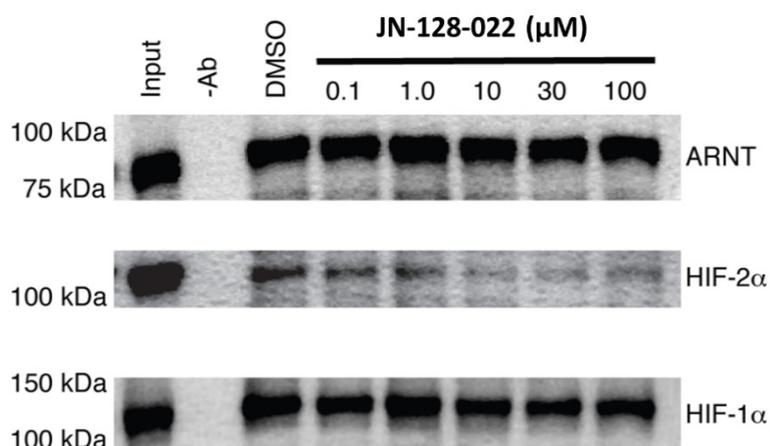


Figure 28 : Immunoprécipitation de l'ARNT illustrant la baisse spécifique de l'hétérodimérisation avec HIF-2α.
D'après Scheuermann *et al.*, 2013.

Bien que ces travaux préliminaires aient été déterminants pour identifier des composés modulant l'activité de HIF-2, les antagonistes rapportés présentent une affinité limitée et, surtout, des propriétés physiques médiocres qui empêchent leur utilisation en tant que cible de HIF-2α pour le traitement du cancer du rein.

L'idée de cibler HIF-2 dans un contexte tumoral, et particulièrement dans le cas des tumeurs rénales, est devenue l'un des principaux objectifs de l'entreprise pharmaceutique Peloton Therapeutics.

Les travaux de Wallace et collaborateurs, en collaboration avec Peloton Therapeutics, ont permis d'identifier de puissants antagonistes de HIF-2 qui possèdent d'excellentes propriétés pharmacologiques, permettant ainsi une évaluation *in vivo*. En particulier les composés PT2385 et PT 2399, qui inhibent la dimérisation avec ARNT en se liant dans la cavité du domaine PAS-B (Figure 29) présentent une activité antitumorale puissante dans le traitement du cancer du rein (Chen *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2016b; Wallace *et al.*, 2016a).

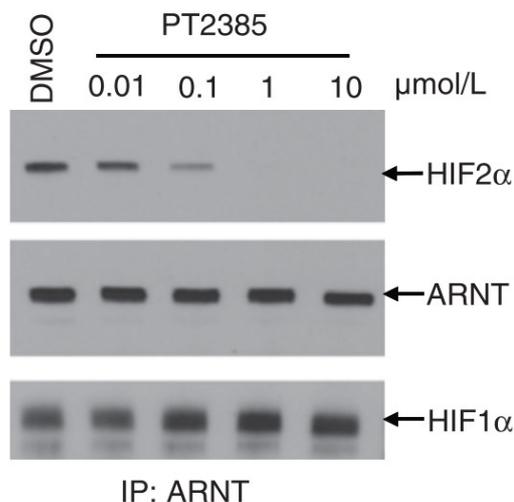


Figure 29 : Immunoprécipitation de l'ARNT illustrant la baisse spécifique de l'hétérodimérisation avec HIF-2α. D'après Wallace *et al.*, 2016.

Même si ces composés ne montrent aucun effet cytotoxique sur la prolifération de lignées tumorales humaines de cancer du rein, ils inhibent la transcription de plusieurs gènes cibles de HIF-2 et la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe (Figure 30). Le composé PT2385 fait actuellement l'objet d'études cliniques sur le cancer du rein et sur les GB (Courtney *et al.*, 2018).

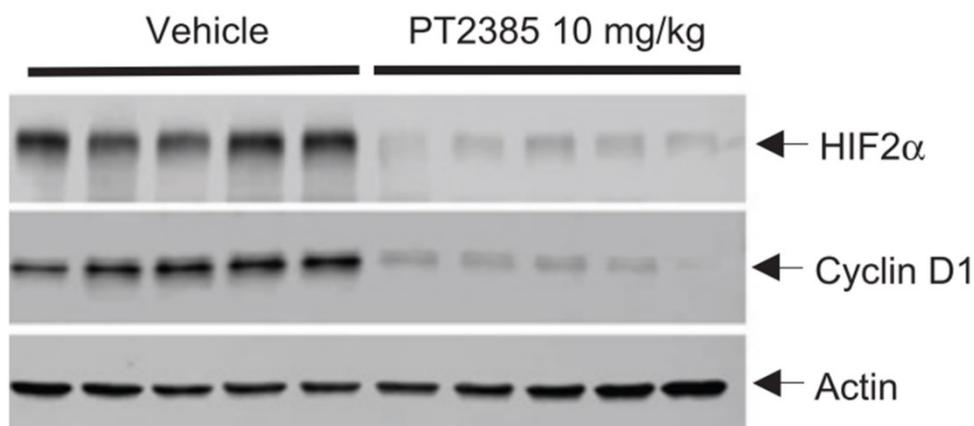


Figure 30 : Immunoempreinte des tumeurs des animaux traités avec le PT2385 (10mg/kg) montrant la réduction de HIF-2α ainsi que l'un de ses gènes cible, la cycline D1. D'après Wallace *et al.*, 2016.

Le rôle de HIF-2 a été récemment étudié dans l'obésité et dans d'autres syndromes métaboliques (Feng *et al.*, 2018). En plus de la réponse au stress hypoxique, cette étude montre que le domaine PAS-B de HIF-2 intervient également dans la réponse au stress métabolique comme un régime riche en graisses. Le PT2399 pourrait améliorer l'état métabolique chez des animaux obèses,

suggérant ainsi des applications thérapeutiques potentielles pour les antagonistes de HIF-2 dans les troubles métaboliques.

Toutes ces études révèlent un rôle particulier de HIF-2 dans le développement de certains types de tumeur mais également dans d'autres pathologies métaboliques. Elles montrent également que cibler le domaine PAS-B de HIF-2 peut être un moyen prometteur pour inhiber sélectivement cette isoforme de HIF. Cela suscite actuellement l'intérêt de l'industrie pharmaceutique qui a développé plusieurs études précliniques et cliniques dans ce sens.

Les conséquences de l'hypoxie induite par le microenvironnement tumoral entraînent notamment des modifications du cytosquelette. Ce phénomène d'adaptation va conduire à une modification du réseau de microtubules (MT) et de la composition en β -tubulines.

II. LES MICROTUBULES

II.1. Caractéristiques et propriétés des microtubules

II.1.1. Structure et rôles des microtubules

Les MTs sont des composants ubiquitaires majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle essentiel pour de nombreux processus vitaux comme la mitose, les transports intracellulaires, la migration, le maintien de la forme et la polarisation cellulaire. Au niveau de la cellule, les MTs s'organisent de manière à répondre aux contraintes environnementales. La rigidité relative des MTs est influencée par différents facteurs et des protéines appelées MAP (*microtubule associated protein*) qui jouent un rôle particulièrement important. Au niveau neuronal, les plus étudiées sont MAP2 et Tau (Felgner *et al.*, 1997). Dans le cerveau de mammifères, les MTs représentent environ 20% des protéines totales. A titre de comparaison, les MTs représentent 3-4% des protéines totales dans les autres tissus.

Les MTs sont constitués d'une succession d'hétérodimères d' α - et de β -tubuline, des petites protéines globulaires très conservées dans l'évolution (Wade, 2009). Elles ont une masse moléculaire d'environ 50 kD et possèdent autour de 450 acides aminés. L'hétérodimère α/β -tubuline est l'unité de base des microtubules (MTs). Ces hétérodimères s'associent de façon non covalente de manière à former une structure intermédiaire polarisée : le protofilament. Les fibres de MT sont donc des structures polaires tête (+)/queue (-), la sous-unité α étant orientée vers l'extrémité (-) et la sous-unité β vers l'extrémité (+) (Yanagisawa *et al.*, 1968; Mandelkow *et al.*, 1988; Wade, 2009).

Les dimères de tubulines peuvent être divisés en 3 parties :

- Partie N-terminale : site de liaison du GTP (ou GDP, sur la sous-unité β)
- Partie intermédiaire : site de liaison au taxol (drogue qui stabilise les MTs)
- Partie C-terminale : partie exposée vers l'extérieur des MTs pouvant être la cible de modifications post-traductionnelles et permet une interaction avec d'autres protéines. (Nogales *et al.*, 1998)

Les protofilaments se regroupent latéralement afin de former un feuillet qui va se refermer et ainsi prendre la forme d'un tube : le microtubule. Les MTs sont majoritairement constitués de 13 protofilaments. Ils s'assemblent parallèlement à l'axe des MTs et sont décalés longitudinalement par rapport au protofilament voisin d'environ 0,9 nm. L'endroit de la fermeture du feuillet est appelé le sillon du MT et forme alors un tube de 24 nm de diamètre (Conde & Cáceres, 2009) ([Figure 31](#)).

L'hétérogénéité du dimère et leur assemblage singulier font que les MTs sont des fibres polarisées. Cette polarité est à la base de la dynamique caractéristique des MTs (Mitchison, 1993; Fan *et al.*, 1996).

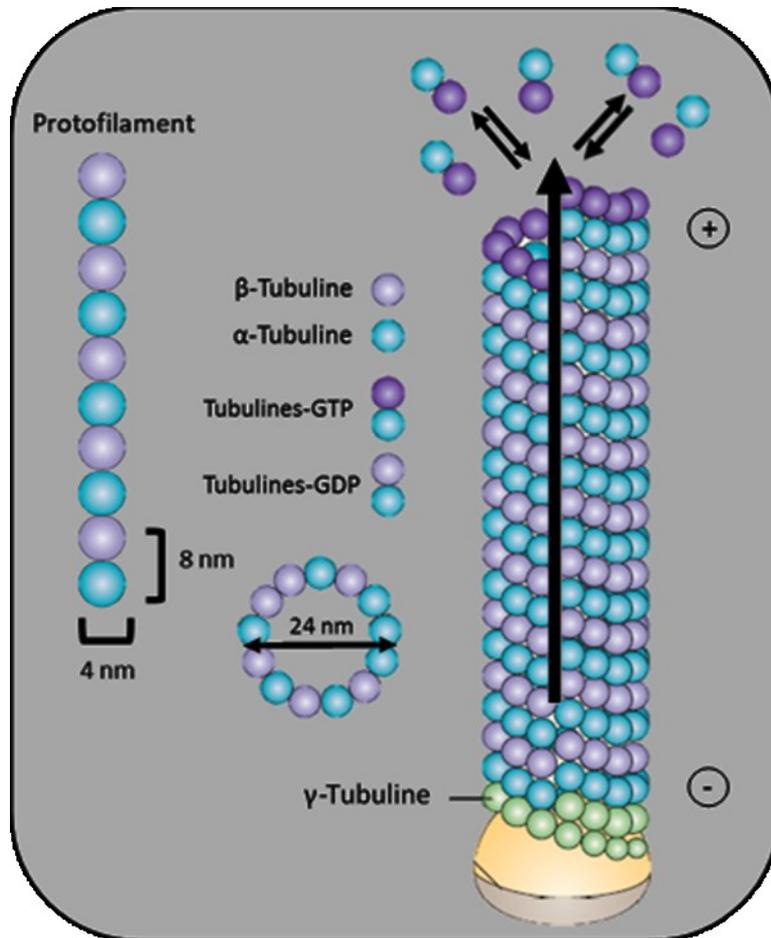


Figure 31 : Structure des microtubules. 13 protofilaments s'assemblent pour former un microtubule.

Adapté d'après Akhmanova & Steinmetz, 2008.

II.1.2. Microtubules : une structure hautement dynamique

Dans la cellule, la polymérisation des MTs est réalisée à partir du centrosome. Le centrosome, aussi appelé MTOC (*Microtubule Organizing Center*), est le point de nucléation des MTs. Il concentre une isoforme de γ -tubuline nécessaire à la nucléation et à l'organisation des MTs (Dutcher, 2003). La γ -tubuline s'associe avec d'autres protéines afin de former un macro-complexe protéique : le complexe γ -TuRCs (*γ -Tubulin Ring Complexes*). Ce complexe va servir de point de départ à la polymérisation des MTs.

Une fois la nucléation effectuée, les MTs vont progressivement s'allonger par l'addition de dimères de tubulines. La polymérisation requiert la présence de GTP sur la seule sous-unité

hydrolysable. L'extrémité (+) polymérise environ deux fois plus vite que l'extrémité (-) (Howard & Hyman, 2003).

La caractéristique majeure des MTs, décrite pour la première fois par Mitchison dans les années 1980, est l'instabilité dynamique (Mitchison & Kirschner, 1984). Ils montrent, qu'au sein d'un même MT, il existe des phases de croissance et de décroissance aléatoires et ceci, indépendamment des extrémités concernées (Horio & Hotani, 1986). Une des pistes concernant la dépolymérisation est une déstabilisation des interactions entre les protofilaments entraînant une ouverture du sillon (Mandelkow *et al.*, 1991). L'instabilité dynamique est un phénomène propre aux MTs. Le passage d'une phase de polymérisation à une phase de dépolymérisation est appelé une catastrophe. A l'inverse, le passage d'une phase de dépolymérisation à une phase de polymérisation est appelé un sauvetage (Figure 32). Mitchison & Kirschner proposent également que les catastrophes seraient provoquées par la perte de la coiffe GTP sur la sous-unité β .

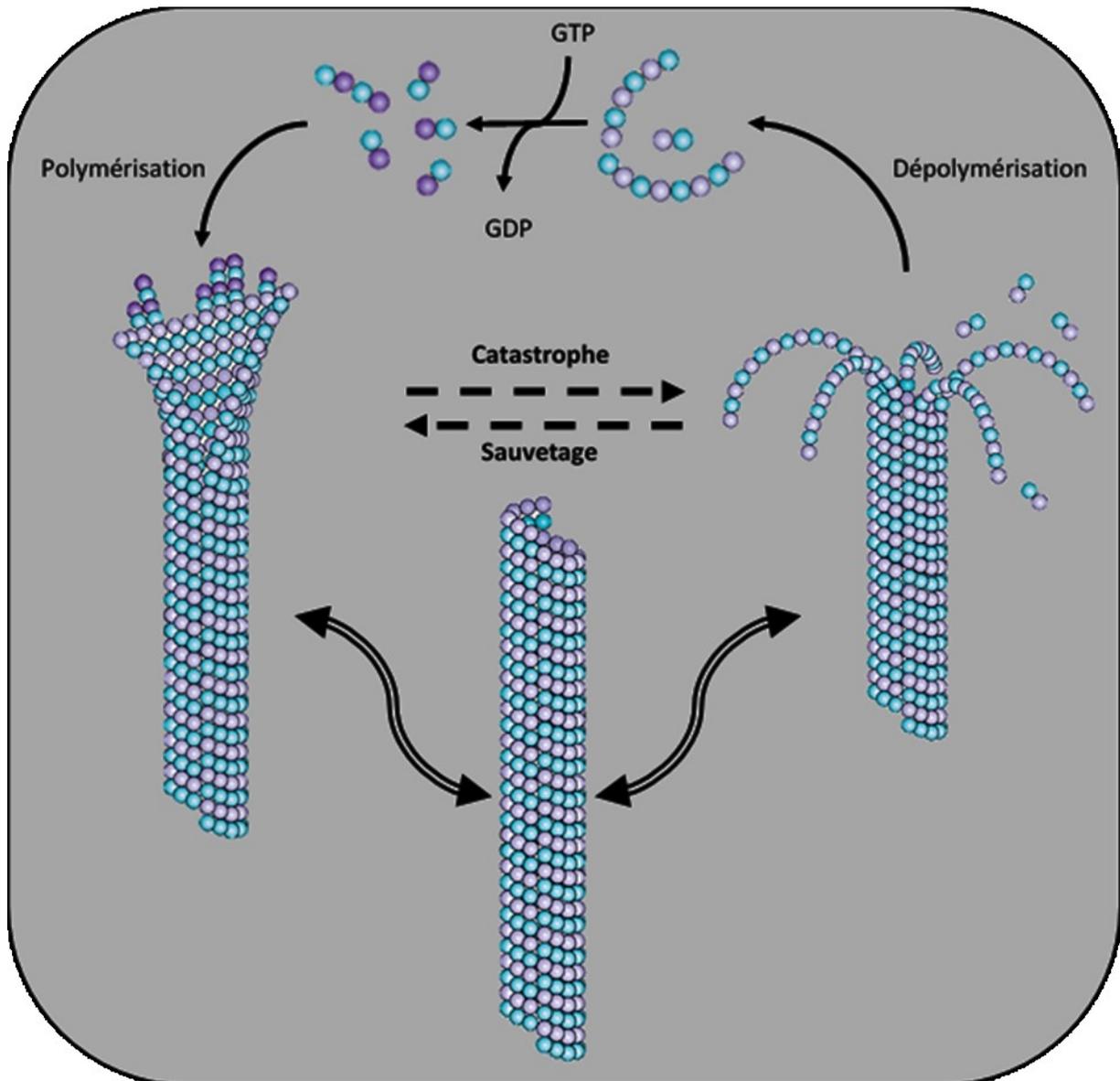


Figure 32 : L'instabilité dynamique des microtubules. Adapté d'après Akhmanova & Steinmetz, 2008.

L'existence de cette instabilité dynamique des MTs a pu être mise en évidence *in vivo* (Cassimeris *et al.*, 1988). Cette caractéristique est fondamentale dans de nombreux processus biologiques. L'exemple le plus remarquable est l'implication des MTs dans la mitose (Mitchison & Kirschner, 1985). De manière globale, l'instabilité dynamique permet une organisation rapide du réseau de MTs dans la cellule et rend possible une réponse adaptée et rapide. Toutefois, il est important de préciser qu'une régulation fine des MTs rend ces adaptations possibles. Plusieurs acteurs moléculaires sont associés aux MTs et travaillent ensemble pour assurer toutes les fonctions biologiques dans lesquels ils interviennent.

II.1.3. Isoformes de beta-tubuline

Les cellules eucaryotes ont plusieurs isotypes de tubulines. Huit tubulines différentes sont répertoriées (α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -, η - et ι -tubuline) mais les plus étudiées sont les tubulines α , β et γ (Dutcher, 2003). Chez l'homme, on a identifié huit isotypes d' α -tubuline et sept isotypes de β -tubuline (Redeker, 2010). Les sept isotypes de β -tubulines sont le produit de gènes distincts sans phénomènes de splicing alternatif (Ludueña & Banerjee, 2008). Ces sept isoformes de β -tubuline divergent principalement dans une séquence de 15-20 acides aminés situés en C-terminal de la protéine. Cette région C-terminale est, le plus souvent, impliquée dans la fixation des MAPs. Alors que la β I-tubuline est exprimée de manière ubiquitaire, les autres β -tubulines ont une distribution plus restreinte (Denoulet *et al.*, 1986; Villasante *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986; Leandro-García *et al.*, 2010). La distribution tissulaire des différents isotypes de β -tubulines est résumée dans le [Tableau 4](#). Parmi ces sept isoformes de β -tubulines, la β III-tubuline (β III-t) est particulière dans sa structure, ce qui lui confère certaines propriétés uniques. Ces dernières seront abordées dans le chapitre III. Dans un contexte physiologique, une étude *in vivo* a montré que les isoformes de la tubuline ne sont pas fonctionnellement interchangeables, ce qui suggère un recrutement différentiel de MAPs (*Microtubule associated proteins*) par les isoformes de la tubuline ou des modifications des propriétés intrinsèques du polymère (Saillour *et al.*, 2014). Cela dit, les isotypes de tubuline sont supposés être librement interchangeables et capables de se regrouper dans toutes les classes de MTs (Bhattacharya & Cabral, 2004).

[Tableau 4](#) : Distribution des isoformes de β -tubuline. Adapté d'après Kavallaris, 2010.

Isotype de tubuline	Gène	Localisation	Distribution tissulaire
β I	TUBB	6q21.33	Expression constitutive dans de nombreux types cellulaires
β II	TUBB2A	6q25.2	Neurones ++ Poumon, Rein, Rate, Estomac, Thymus +/- Adenocarcinome de la prostate ↑↑
β II	TUBB2B		
β III	TUBB3	16q24.3	Neurones +++ Cellules de Sertoli +++ Tumeurs ↑↑ (associé à l'agressivité et à l'invasion)
β IVa	TUBB4	19p13.3	Spécifique du cerveau
β IVb	TUBB2C	9q34.3	Testicules ++ Cancer du foie ↑↑
β V	TUBB6	18p11.21	Adenocarcinome utérus et endomètre
β VI	TUBB1	20q13.32	Megakaryocytes et plaquettes +++

Des isotypes de tubuline peuvent subir des modifications post-traductionnelles pouvant altérer l'interaction des microtubules avec les MAP et modifier leur fonction (Hammond *et al.*, 2008). L'expression aberrante d'isotypes et de MAP spécifiques de la β -tubuline est fortement corrélée à la résistance aux TBA dans des lignées de cellules cancéreuses du poumon, de l'ovaire, du sein et de la prostate (Kavallaris *et al.*, 1997a).

Toutefois, les fonctions physiologiques des isotypes de β -tubuline ne sont pas toutes connues. Les modifications post-traductionnelles dont elles peuvent faire l'objet peuvent ajouter une complexité fonctionnelle supplémentaire (Westermann & Weber, 2003). Des protéines pro- et anti-apoptotiques comme p53 ou la famille BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) peuvent être attachées et/ou transportées par les MTs. L'induction de l'apoptose par les TBA est médiée par la voie mitochondriale principalement par l'intermédiaire des membres de la famille BCL2. Enfin, il a été montré que l'abondance de certaines isoformes de β -tubuline pouvait grandement déterminer la cinétique de (dé)polymérisation des MTs et leur capacité de fixation de certaines drogues. Ces propriétés sont d'importance primordiale dans un contexte tumoral (Katsetos *et al.*, 2015).

II.2. Microtubules : Cibles thérapeutiques de choix

En raison de leur structure hautement dynamique et de leur implication dans de nombreux processus cellulaires, comme la mitose, les MTs sont donc devenues très tôt des cibles de choix dans les stratégies anti-tumorales qui ont été développées depuis plus d'un demi-siècle. Ainsi, une part importante de la chimiothérapie a été développée pour modifier la dynamique des filaments de MTs constituant le cytosquelette afin de bloquer la division mitotique. Cela avait pour but également de modifier de manière significative l'invasion et la migration cellulaires et de réduire fortement la formation de métastases. Ces composés ayant principalement pour cible la sous-unité β de l'hétérodimère α/β -tubuline appartiennent à la famille des TBA (tubulin-binding agents) (Figure 33).

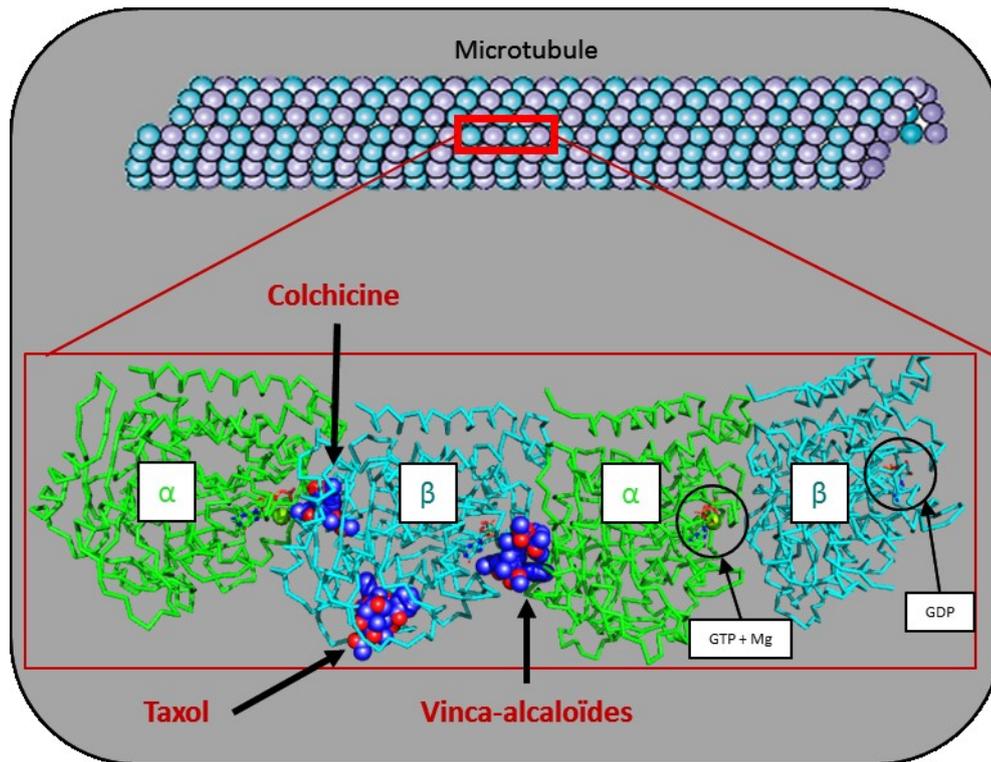


Figure 33 : Structure cristallographique des dimères de tubulines avec les différents sites de fixation de trois classes de TBA (Colchicine, Taxol et Vinblastine).

Plusieurs dizaines de classes chimiques différentes de TBA sont connues aujourd'hui. La majorité des TBA sont des petites molécules naturelles ou leurs dérivés synthétiques provenant de sources naturelles telles que des éponges, des plantes ou des bactéries marines, ou leurs dérivés synthétiques. De plus, les TBA agissent sur les réseaux de microtubules des cellules en interphase, comme les neurones, et affectent le trafic intracellulaire d'importantes molécules et d'organites. Les TBA pourraient donc aussi être bénéfiques pour traiter d'autres maladies du système nerveux. Les TBA peuvent être regroupés en deux groupes : les agents stabilisants des microtubules (ASM) qui figent les MTs dans leur état polymérisé et les agents de déstabilisation des microtubules (ADM) qui favorisent leur dépolymérisation en dimères de tubuline et en petits oligomères. Cependant, à des concentrations faibles et cliniquement pertinentes, les ASM et les ADM perturbent principalement la dynamique des microtubules (Dumontet & Jordan, 2010) (Akhmanova & Steinmetz, 2008).

Même si la colchicine, un alcaloïde très toxique, fut le premier composé identifié comme un TBA, les premiers TBA approuvés au début des années 1970 pour traiter les lymphomes et diverses tumeurs solides étaient les vinca-alcoïdes (tels que la vinblastine, la vincristine ou la vinorelbine). Ces alcaloïdes, isolés à partir des plantes, sont des ADM qui se fixent aux domaines vinca des β -tubulines près du site de fixation du GTP, à l'interface des sous-unités β et α du dimère suivant (Figure 33). La fixation des vinca-alcoïdes à proximité du site d'hydroxylation du GTP en GDP a pour conséquence

d'altérer la conformation du dimère α/β entraînant l'inhibition de l'hydrolyse du GTP. À de faibles concentrations, ils se fixent préférentiellement à l'extrémité positive et réduisent la dynamique des MTs (Toso *et al.*, 1993). À des concentrations plus fortes, les vinca-alcaloïdes ont une affinité pour les hétérodimères de tubulines libres, formant potentiellement une nouvelle géométrie incurvée. Parmi le vaste groupe d'ADM, qui comprennent également les agents de liaison au site de la colchicine à l'interface des sous-unités β et α , les vinca-alcaloïdes se sont révélés efficaces en clinique (Stanton *et al.*, 2011).

Au début des années 90, les taxanes sont devenues des médicaments de première intention pour le traitement des cancers de l'ovaire, du sein, de la vessie, de la prostate et du poumon (Dumontet & Jordan, 2010). Découvert dans les années 60, le mode d'action du paclitaxel (Taxol®) n'a été décrit que dans les années 80. Les premières études indiquaient que le médicament était un puissant inhibiteur de la réplication cellulaire et de la migration (Schiff & Horwitz, 1980). Le Taxol® a la capacité d'inhiber la dynamique des microtubules (Yvon *et al.*, 1999). Des expériences ont montré que le Taxol® se lie spécifiquement et de manière réversible aux MTs (Parness & Horwitz, 1981).

Pour améliorer la pharmacologie du paclitaxel, son analogue semi-synthétique, le docétaxel, a été introduit en tant que taxane dérivé d'un précurseur naturel. En effet, le docétaxel est plus soluble dans l'eau et s'avère plus actif que le paclitaxel contre la prolifération des cellules cancéreuses (Stanton *et al.*, 2011). Le paclitaxel augmente la nucléation et l'allongement des MTs. La structure cristallographique électronique de la tubuline complexée avec du paclitaxel révèle que le site de liaison du paclitaxel se situe sur la sous-unité β (Figure 33) (Nogales *et al.*, 1995). Le paclitaxel atteint son site de liaison par de petites ouvertures à la surface ou en raison de l'instabilité dynamique de la structure des MTs (Nogales, 2001).

Depuis l'approbation du paclitaxel et du docétaxel, les taxanes de première génération ont modifié le protocole de traitement de première intention de nombreuses tumeurs solides comme celles du sein, du poumon, de la prostate, de l'estomac et de l'ovaire. Malgré la présence d'une activité antitumorale significative en monothérapie ou en association, l'utilisation clinique des taxanes de première génération est souvent limitée par des phénomènes de résistance. La résistance innée ou acquise aux taxanes de première génération est fréquemment observée dans différents types de tumeurs et limite l'efficacité de nombreux médicaments chimiothérapeutiques (Chien & Moasser, 2008; Kavallaris, 2010). De multiples mécanismes potentiels de résistance aux taxanes ont été identifiés dans des études précliniques et il est probable que plusieurs d'entre eux contribuent à un phénotype résistant. Deux mécanismes en particulier ont souvent été associés au développement de la résistance aux taxanes. Toutefois, il convient de noter que ceux-ci doivent encore être validés et que

leur pertinence clinique n'est pas entièrement établie (Fojo & Menefee, 2005; Perez, 2009). Dans les études précliniques, la résistance résulte généralement d'une surexpression de membres de la famille de transporteurs de la cassette de liaison à l'ATP associé à la membrane, dont la glycoprotéine P, codée par le gène de multirésistance aux médicaments (*ATP-binding cassette, ABCB1*), est la mieux connue. Le docétaxel et le paclitaxel sont des substrats de la glycoprotéine P, qui agit comme une pompe d'efflux de médicament. Ce transporteur de cassette de liaison à l'ATP associé à la membrane est surexprimé dans de nombreuses lignées de cellules tumorales et diminue les taux de médicament intracellulaire, limitant ainsi la cytotoxicité du médicament (Gottesman, 2002) (Figure 34).

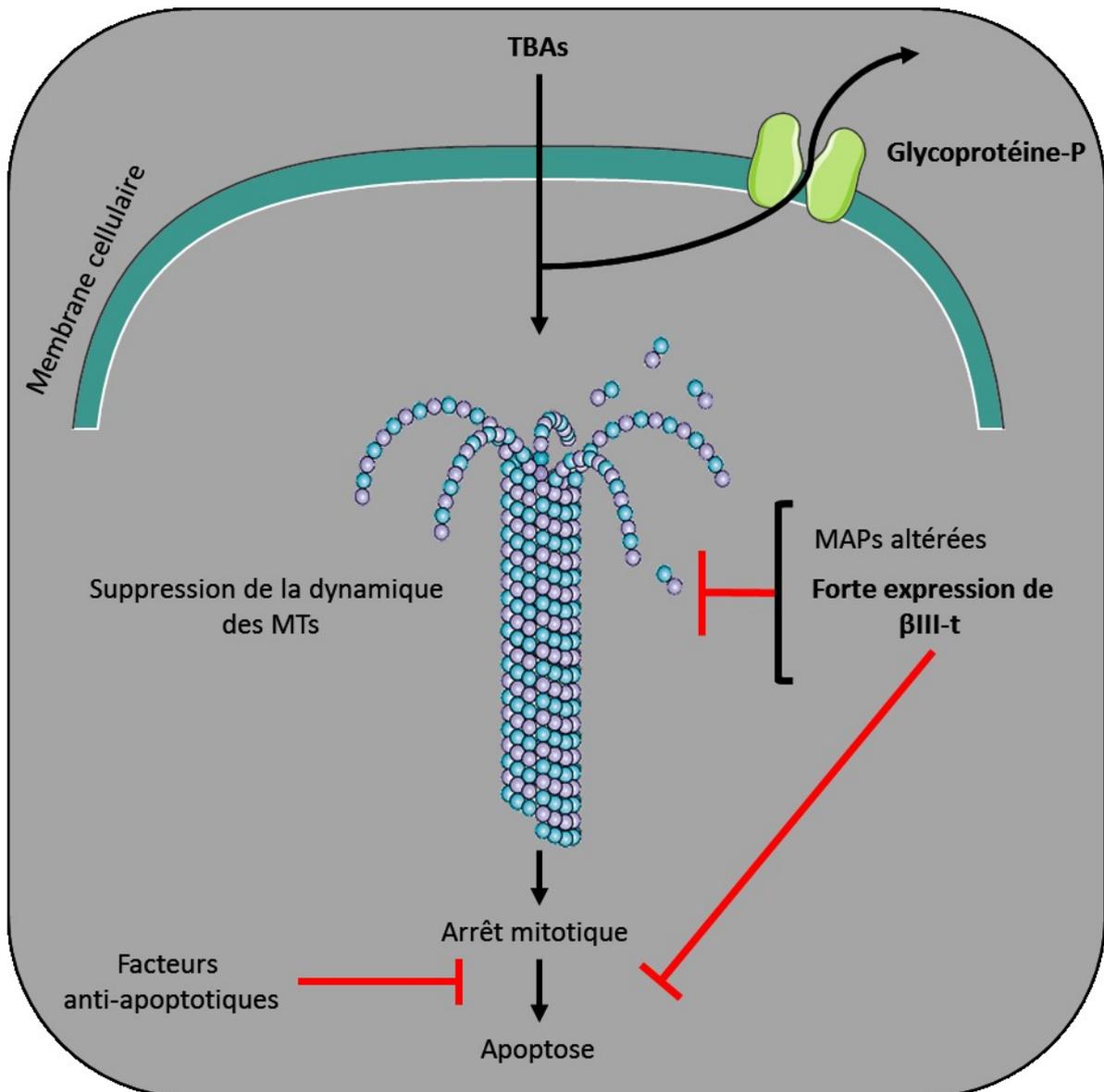


Figure 34 : Résistance aux TBAs. La pharmacorésistance est complexe et multifactorielle. La résistance aux TBAs est liée aux transporteurs de médicaments (Glycoprotéine-P), à l'expression altérée de certaines MAPs et à l'expression aberrante de certaines isoformes de β -tubuline comme, par exemple, la β III-t. Adapté de Katsetos *et al.*, 2011

Les données cliniques suggèrent que des mécanismes supplémentaires pourraient contribuer à la résistance aux taxanes chez les patients, notamment la modification de l'expression d'isotypes spécifiques de la tubuline (Kavallaris *et al.*, 1997b), l'expression ou la liaison de protéines régulatrices des microtubules (McGrogan *et al.*, 2008), la perte de régulation fonctionnelle de p53 (Giannakakou *et al.*, 2000), la perte de la signalisation apoptotique et intracellulaire (Modi *et al.*, 2005), et la diminution de la perméabilité des cellules tumorales (Vrignaud *et al.*, 2013). Le développement de thérapies alternatives capables de limiter la résistance aux taxanes a fait l'objet de nombreuses études.

Récemment approuvé en tant que traitement de deuxième intention pour des patients atteints de cancer de la prostate, le cabazitaxel (Jevtana®) est un nouvel analogue semi-synthétique du docétaxel. Sur le plan structurel, le cabazitaxel et le docétaxel sont très similaires. Les différences structurelles entraînent une meilleure captation au niveau cellulaire sans augmenter la toxicité comparée au docétaxel. De plus, le cabazitaxel qui est un substrat moins affin des glycoprotéines P, est plus lipophile que le docétaxel. Cela induit une meilleure diffusion passive aux travers des membranes lipidiques des cellules et donc une meilleure activité du composé dans des lignées résistantes où la perméabilité membranaire est altérée (Vrignaud *et al.*, 2013). Cette hypothèse a récemment été confirmée sur une lignée cancéreuse de tumeur du sein. Cette lignée qui ne surexprime pas les glycoprotéines P, absorbe plus vite le cabazitaxel que le docétaxel (Azarenko *et al.*, 2014). Lors d'essais précliniques, le cabazitaxel a démontré une activité dans les cancers résistant au docétaxel (Vrignaud *et al.*, 2013; Sémond *et al.*, 2013). De plus, la demi-vie du cabazitaxel chez l'Homme est de 95 heures contre 12 heures pour le docétaxel. Comme le paclitaxel et le docétaxel, le cabazitaxel stabilise les MTs. Il est indiqué actuellement comme un traitement alternatif aux patients diagnostiqué d'un cancer métastatique de la prostate résistant au docétaxel (Paller & Antonarakis, 2011; Azarenko *et al.*, 2014). De manière intéressante, les différences structurelles du cabazitaxel lui confèrent une meilleure capacité à franchir la BHE. Cela offre de nombreuses perspectives potentielles dans le traitement des patients avec une tumeur du système nerveux central. Une étude de Girard et collaborateurs, a montré une efficacité du cabazitaxel sur un modèle murin de tumeur cérébrale pédiatrique. Comparé au docétaxel, les auteurs ont montré une inhibition de la croissance tumorale et une amélioration significative de la survie (Girard *et al.*, 2015). Une autre étude portant sur des cellules cérébrales saines et des lignées humaines de GB a montré que le cabazitaxel ne serait pas toxique pour les neurones et les astrocytes. A l'inverse, les auteurs ont montré que le cabazitaxel est un agent cytotoxique puissant sur les lignées cellulaires. Les résultats ont révélé que le traitement au cabazitaxel réduisait de manière significative la survie et la prolifération des gliomes. De plus, ils ont démontré qu'une faible concentration de cabazitaxel était suffisante pour être efficace (Ghoochani *et al.*, 2016).

Toutefois, il est important de noter que dans l'étude de Girard et collaborateurs la dose maximale tolérée a été déterminée chez les souris C57BL6. Les souris présentant des tumeurs ont été traitées par voie intrapéritonéale avec 9, 15 ou 25 mg/kg de cabazitaxel pendant 3 jours au total. Bien que les souris ayant reçu une dose de 25 mg/kg aient perdu du poids de manière significative, toutes les souris ont récupéré de la perte de poids et sont revenues à leurs poids initiaux après 20 jours (Girard *et al.*, 2015). En revanche, une étude de Karavelioglu et collaborateurs ont traité des rats Wistar par une injection intrapéritonéale de cabazitaxel. Ces auteurs ont constaté que le cabazitaxel dosé à une concentration égale ou supérieure à 1 mg/kg par semaine pendant 4 semaines consécutives induisait de graves effets neurotoxiques dans le cerveau des rats (Karavelioglu *et al.*, 2016). Dans le cas des GB, le cabazitaxel fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase II.

Malgré la meilleure efficacité présentée par le cabazitaxel, des mécanismes de résistance subsistent, même si son activité demeure satisfaisante dans des lignées exprimant des glycoprotéines-P.

Pour relever ces défis et contrer les mécanismes de résistance, une nouvelle classe d'agents thérapeutiques chimiothérapeutiques tels que les épothilones ont vu le jour. Comme les taxanes, les épothilones sont des stabilisateurs des MTs (ASM). Naturellement produits par une bactérie, ils ont d'abord été isolés pour leurs propriétés antifongiques et cytotoxiques (Gerth *et al.*, 1996). Les épothilones possèdent des modes d'actions similaires au paclitaxel mais présentent des avantages par rapport à ce dernier. En effet, les mécanismes de résistances observés avec le paclitaxel ne semblent pas affecter les épothilones. Ils sont donc utiles dans le traitement des tumeurs résistantes aux taxanes (Altmann *et al.*, 2000). Divers analogues synthétiques et semi-synthétiques ont été développés avec une toxicité réduite et une stabilité accrue. La patupilone, qui est l'épothilone B naturelle, s'est révélée 20 fois plus efficace que le paclitaxel et présente une toxicité limitée (Goodin *et al.*, 2004). L'ixabépilone, un dérivé de l'épothilone B, a montré une cytotoxicité 2,5 fois supérieure à celle du paclitaxel et qu'il était tout aussi efficace dans les tumeurs résistantes aux taxanes (Lee *et al.*, 2001). Certains des effets secondaires associés à ce médicament comprennent des neuropathies périphériques ainsi que de la fatigue (Thomas *et al.*, 2007). Cela peut être attribué à la répartition différentielle dans les tissus et au métabolisme (Goodin *et al.*, 2004). Plusieurs autres analogues des épothilones sont en cours de développement et en cours d'essais cliniques.

En perturbant la dynamique des microtubules pendant la mitose, les TBA agissent sur la formation de fuseaux mitotiques, stoppent les cellules dans la phase de transition G2/M et, dans de nombreux cas, favorisent la mort cellulaire par apoptose. C'est cette stratégie qui est utilisée par les chimiothérapies pour lutter contre le développement tumoral. Cependant, il est important de noter

qu'ils peuvent également agir sur les réseaux de microtubules en interphase (hors processus de division cellulaire) et affectent donc le trafic intracellulaire de molécules et organites, qui sont d'une importance capitale pour les neurones. Les TBA pourraient donc avoir des applications dans le traitement de maladies du système nerveux (Baas & Ahmad, 2013).

Afin d'obtenir une efficacité thérapeutique maximale, Il faut cibler les cellules lorsqu'elles entrent en mitose. La résistance aux TBA peut survenir à plusieurs stades de la pharmacodynamique de ces agents, notamment à cause de l'efflux cellulaire d'agents anticancéreux, d'une interaction inefficace avec la cible ou d'une mauvaise induction de l'apoptose. En effet, les tumeurs et les lignées cellulaires résistantes présentent une multitude de changements dans l'expression des protéines et des microARN et la relation entre ces molécules et les actions des microtubules n'est pas toujours facile à évaluer (Dumontet & Jordan, 2010).

III. LA β III-TUBULINE

III.1. Distribution cellulaire

Le gène humain *TUBB3* codant pour la β III-t est situé sur le chromosome 16q24.3 et se compose de 4 exons qui transcrivent une protéine de 450 acides aminés. Une isoforme de 378 acides aminés est dépourvue d'une partie de l'extrémité N-terminale et pourrait être responsable de l'expression mitochondriale (Cicchillitti *et al.*, 2008), dont la signification fonctionnelle reste discutée. La β III-t s'associe, comme d'autres isotypes de β -tubulines à des GTPase essentielles à la régulation de la dynamique des microtubules (Katsetos & Dráber, 2012). Cet isotype de tubuline est le plus étudié en particulier dans l'oncogenèse car il semble être d'une importance capitale dans de nombreux mécanismes pathologiques.

III.1.1. Tissus normaux

Historiquement, l'expression de la β III-t a d'abord été rapportée dans les neurones. L'identification de la β III-t en tant que marqueur neuronal a été attestée lorsque le premier anticorps monoclonal anti- β -tubuline de classe III (*TUJ1*) est devenu disponible (Caccamo *et al.*, 1989). L'expression de β III-t suggère que cet isotype est l'un des tout premiers marqueurs signalant un engagement neuronal dans le neuroépithélium humain primitif. Cette hypothèse a ensuite été confirmée chez d'autres espèces (Lee *et al.*, 1990; Linhartová *et al.*, 1992).

L'importance fondamentale du gène *TUBB3*, codant pour la β III-t, dans le développement neural a également été confirmée par l'étude des mutations de *TUBB3* dans les syndromes congénitaux (Tuszynski *et al.*, 2006).

L'expression de la β III-t est également exprimée de manière constitutive dans les testicules. Elle est régulée par l'exposition aux androgènes au cours de l'ontogenèse dans des cellules de Sertoli de souris et de rat (De Gendt *et al.*, 2011).

Cependant, des études récentes ont montré que l'expression de la β III-t n'est pas spécifique des neurones, car une expression transitoire de cette protéine est également retrouvée dans les astrocytes au stade fœtal et dans les cellules de la matrice germinale des zones sous-ventriculaires du télencéphale humain. Cette structure comprend des précurseurs de cellules gliales et des cellules souches neurales (Dráberová *et al.*, 2008). Ces observations sont en accord avec des études antérieures qui indiquaient que la β III-t est exprimée, de manière transitoire, dans les cellules neuroendocrines de Kulchitsky de l'épithélium respiratoire du fœtus au cours du développement

pulmonaire humain (Katsetos *et al.*, 2000). La β III-t est également très exprimée dans les mélanocytes (Akasaka *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2016).

Depuis, une vaste étude réalisée sur 76 tissus sains différents a permis d'identifier les cellules positive à la β III-t ainsi que leur niveau relatif pour cette protéine. Ces résultats sont exposés dans le Tableau 5 (Person *et al.*, 2017).

Tableau 5 : Distribution de la β III-t dans les tissus sains. - : pas de coloration détectable ; + : faible coloration; ++ : coloration modérée ; +++ : forte coloration
D'après Person *et al.*, 2017.

Organe	Type de cellule
Peau, épiderme	mélanocytes +++
Les glandes sébacées de la peau,	Cellules germinatives périphériques
Nerfs périphériques	Péri-radriculaire cellule ++
Aorte, intima	L'endothélium ++
Aorte, médias	L'endothélium ++
Cœur	Les myocytes ++, endothélium ++
Muscle strié	L'endothélium ++
Langue, muscle	Neurones +++, endothélium ++
Utérus, myomètre	L'endothélium ++, cellule musculaire +
Appendice, paroi musculaire	Neurone +++
Œsophage, paroi musculaire	L'endothélium ++
Estomac, paroi musculaire	Neurones +++, endothélium ++
Iléon, musculuse	Cellules endocrines +++, fibroblastes ++
Colon descendant, paroi musculaire	L'endothélium ++, neurone +++
Bassin de rein	L'endothélium ++, fibroblastes ++
Vessie, la paroi musculaire	Neurone +++, endothélium ++
Gland du pénis	Neurones +++, endothélium ++
Ovaire, stroma	Neurones ++, stroma +++
Matières grasses	–
Lèvre, muqueuse buccale	Cellules basales ++, mélanocytes +++
Cavité buccale	Cellules basales ++
Amygdale, épithélium de surface	Cellules basales ++, centres germinaux +++
Canal anal, peau	Cellules basales ++, mélanocytes +++, kératinocytes +
Canal anal, la muqueuse transitoire	Cellules basales ++, mélanocytes +++, kératinocytes +
Exocol	Cellules basales ++
Œsophage, épithélium pavimenteux	Cellules basales ++, kératinocytes +
Rein, bassin, urothélium	Cellules basales ++, cellules intermédiaires ++, cellules superficielles ++
Vessie, urothélium	Cellules basales ++, cellules intermédiaires ++, cellules superficielles ++
Placenta, mature, amnios et chorion	Les cellules mésenchymateuses +++, endothéliales capillaires fœtales de cellules

Ganglion lymphatique	–
Rate	L'endothélium +++
Vésicule biliaire, l'épithélium	L'endothélium ++, fibroblastes ++
Foie	L'endothélium ++
Pancréas	Les îlots pancréatiques +++, endothélium ++, fibroblastes ++
Glande parotide	Fibroblastes ++
Appendice, muqueuse	Centres germinaux +++, fibroblastes +++, neurones +++, endothélium +++, cellules endocrines +++
Rectum, muqueuse	Cellules endocrines +++, fibroblastes +++, neurones +++, cellules apocrines +
Colon descendant, muqueuse	L'endothélium ++
Iléon, muqueuse	L'endothélium ++, ++ les fibroblastes, cellules endocrines +++
Duodénum, la muqueuse	L'endothélium ++, ++ les fibroblastes, cellules endocrines +++
Estomac, corpus	L'endothélium +, ++ les fibroblastes, cellules endocrines +++
Estomac, antre	L'endothélium +, ++ les fibroblastes, cellules endocrines +++
Amygdale	Centres germinaux +++
Thymus	Corpuscules de Hassall
Glande submandibulaire	L'endothélium ++
Glande sublinguale	Neurones +++, cellule canaliculaire colonnaires +++
La moelle osseuse	–
Duodénum, glandes de Brunner	–
Rein, cortex	Épithélium tube distal
Rein, moelle	–
Prostate	Les cellules sécrétrices +, fibroblastes +
Vésicule séminale	Les cellules colonnaire conduit ++
Épididyme	Hauteur cellule mince +
Testicule	Cellules spermatogoniques +++, spermatoctes primaires +, spermatoctes secondaires ++, les cellules de Sertoli ++
Bronches, muqueuse	Carcinome Baso-cellulaire +, cellules neuroendocrines ++
Bronches, glandes	L'endothélium ++
Sinus paranasales	Cellules ciliées ++
Poumon	L'endothélium ++, macrophages +
Sein	Fibroblastes +
Endocol	L'endothélium ++, des fibrocytes ++, adrénaline
Endomètre, prolifération	Cellules du stroma +++, épithélium +++
Endomètre, sécrétion	Cellules du stroma +++, épithélium +++
Trompes de Fallope, muqueuse	Cellules ciliaires +
Decidua précoce, placenta	Les cellules déciduale +++, endothélium ++
Ovaire, corps jaune	Granulosa lutéine cellules ++, thèque interna ++

Ovaire, kyste folliculaire	L'endothélium ++, thèque interna +
Placenta, jeune	Syncytiotrophoblaste +++ , endothélium ++, cellule neuroendocrine ++, trophoblaste +
Placenta, mature	Syncytiotrophoblaste ++, endothélium ++
Glande surrénale	Cellules Pheocromocyte +++ , les cellules corticales +++ , cellules sustentaculaires +++
Parathyroïde	–
Glande thyroïde	–
Cervelet, cortex	Neurones +++ , fibres nerveuses +++
Cervelet, matière grise	Cellule de Purkinje +++ , neurones +++
Cerveau, matière grise	Neurone +++ , fibres nerveuses +++
Cerveau, matière blanche	Fibres nerveuses +++
Hypophyse lobe postérieur	Cellules acidophiles +++ , cellules basophiles +++ , cellules chromophobes +++
Hypophyse lobe antérieur	Les cellules acidophiles +++ , cellules basophiles +++ , cellules chromophobes +++

III.1.2. Tumeurs neuronales et non neuronales

Dans les tumeurs neuronales ou neuroblastiques telles que les médulloblastomes, les rétinoblastomes, les neuroblastomes sympatho-surrénaliens et les phéochromocytomes, l'expression de la β III-t est constitutive puisque déjà exprimée dans les neurones. Elle est associée à des modifications morphologiques évoquant une différenciation neuronale : neuritogenèse, baisse de la prolifération cellulaire (Katsetos *et al.*, 2003b, 2003c, 2003a). En revanche, la surexpression de la β III-t dans les tumeurs solides non neuronales est associée à une évolution tumorale vers les hauts-grades (Figure 35) et à un faible pronostic clinique. Cela concerne de très nombreuses tumeurs telles que les tumeurs épithéliales du poumon, le cancer du poumon à petites cellules (Katsetos *et al.*, 2000), le cancer du poumon non à petites cellules (Katsetos *et al.*, 2000; Zalcman *et al.*, 2011; Levallet *et al.*, 2012; McCarroll *et al.*, 2015a), les cancers ovariens (Kavallaris *et al.*, 1997a; Raspaglio *et al.*, 2014), les cancers du sein (Galmarini *et al.*, 2008; Katsetos & Dráber, 2012), les cancers digestifs (Carles *et al.*, 1999a; Urano *et al.*, 2006; Portyanko *et al.*, 2009), le cancer de la prostate (Ranganathan *et al.*, 1997; Terry *et al.*, 2009; Egevad *et al.*, 2010; Tsourlakis *et al.*, 2014), et le cancer du rein (Quaas *et al.*, 2015). La β III-t est aussi retrouvée dans les gliomes, notamment dans les gliomes de haut grade (Katsetos *et al.*, 2003a). De manière intéressante et à l'inverse de ce qui est décrit précédemment, si une présence élevée de β III-t est retrouvée dans les mélanocytes, son expression baisse dans les tumeurs associées : les mélanomes. La perte d'expression de la β III-t dans ces tumeurs est associée à une progression tumorale avec un chimiosensibilité aux taxanes (Akasaka *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2016).

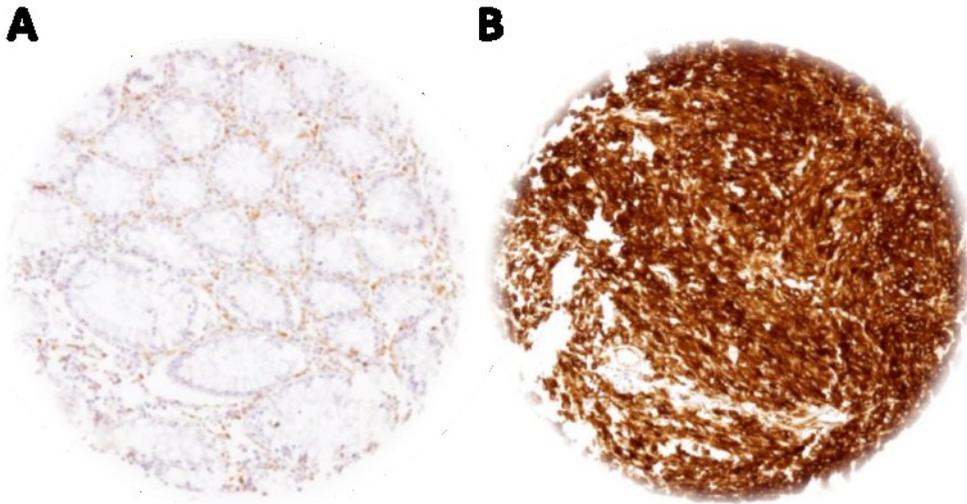


Figure 35 : Images représentative d'un marquage de β III-t dans un tissu normal de colon (A) et dans une tumeur gastro-intestinale (B). D'après Person *et al.*, 2017

Ainsi, pour de nombreuses tumeurs, l'augmentation de la β III-t est associée à un grade histologique élevé et à un pronostic clinique défavorable. En conséquence, l'expression de la β III-t dans les tumeurs neuronales est constitutive et dépendante de la différenciation, alors que dans la plupart des tumeurs non neuronales, elle est fondamentalement aberrante, associée aux phénotypes cancéreux, et déclenchée par des facteurs toxiques liés au microenvironnement tumoral (Katsetos *et al.*, 2003b, 2003c, 2003a, 2011).

III.2. β III-tubuline & résistance aux traitements

La résistance aux traitements dans les cancers, et en particulier dans les cancers de hauts-grades, est pratiquement toujours observée. En effet, il apparaît que la composition en β -tubuline dans les tumeurs jouerait un rôle sur les phénomènes de résistance observés. Comme décrit précédemment, les TBA comme les taxanes ou les épothilones, inhibent la mitose et la prolifération cellulaire en ciblant la β -tubuline et bloquant ainsi la dynamique des MTs. En 1993, Ludueña et collaborateurs ont été les premiers à démontrer que la présence de β III-t inhibait l'action du paclitaxel (Lu & Ludueña, 1993). Kavallaris et collaborateurs ont observé que les lignées de cancer ovariens résistantes aux traitements surexpriment les isotypes I, III et IVa de β -tubuline (Kavallaris *et al.*, 1997a). D'autres études ont ainsi démontré que la surexpression de β III-t dans des tumeurs épithéliales représentait un mécanisme de résistance majeur de l'interaction taxanes-MTs et Vinca alcaloïdes-MTs (Kavallaris *et al.*, 1999; Kamath *et al.*, 2005; Mozzetti *et al.*, 2005; Ferlini *et al.*, 2005).

La surexpression de la β III-t est impliquée, au moins en partie, dans la résistance aux traitements des cancers du poumon non à petites cellules, des tumeurs de l'ovaire et du sein traitées en association avec des TBA et des agents alkylants de l'ADN. C'est pourquoi, les niveaux d'expression de β III-t dans les tumeurs pourraient être un indicateur important pour l'amélioration et le ciblage du traitement de ces tumeurs solides (Gan *et al.*, 2007). Toutes ces données semblent indiquer un rôle prépondérant de la β III-t dans les cancers de hauts-grades. Des niveaux élevés en β III-t peuvent constituer la base du développement de la résistance aux taxanes observée chez les patients atteints de tumeurs d'origine épithéliale (Mozzetti *et al.*, 2005; Sève *et al.*, 2005; Dumontet *et al.*, 2009).

Par ailleurs, il a été montré que la liaison du paclitaxel était affectée lorsque le résidu sérine en position 275 était remplacé par une alanine dans la β III-t (Freedman *et al.*, 2009). La β III-t constitue un facteur de survie tumoral important. Son expression est augmentée dans la tumorigenèse et la progression tumorale indépendamment du type de chimiothérapies utilisées (McCarroll *et al.*, 2010; De Donato *et al.*, 2012; Karki *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2014).

De manière intéressante, la suppression de l'expression de la β III-t dans des lignées de cancer du poumon n'aboutit pas à un changement de la dynamique de MTs, mais augmente l'apoptose dans ces lignées après un traitement aux vinca-alcaloïdes (vincristine) ou avec des taxanes (paclitaxel) à faibles doses. Cependant, l'augmentation de l'apoptose observée à de faibles concentrations, semble être indépendante d'un arrêt mitotique. Pour de hautes concentrations de vinca-alcaloïdes et de taxanes, l'arrêt mitotique et l'apoptose sont observés. Ces données suggèrent que la suppression de l'expression de la β III-t pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des TBA grâce à deux mécanismes :

- La suppression de la dynamique des MTs
- La mort cellulaire indépendante de l'arrêt mitotique

De plus, la suppression de l'expression de la β III-t affecte aussi l'efficacité des agents chimiothérapeutiques ciblant l'ADN. Cela suggère un rôle bien plus large de la β III-t dans les mécanismes de la résistance aux traitements (Kavallaris, 2010).

La sensibilité accrue des cellules aux TBA et aux agents endommageant l'ADN après suppression de la β III est associée à une augmentation de l'apoptose induite par ces médicaments. Cette découverte a suggéré que la β III-t puisse être un facteur de survie cellulaire, notamment vis-à-vis de la chimiothérapie. Ces découvertes ont révélé un nouveau rôle pour la β III-tubuline, qui pourrait avoir d'importantes répercussions sur l'amélioration du ciblage et du traitement des cancers résistants aux traitements et surexprimant cet isotype (Kavallaris, 2010).

Le rôle potentiel de la β III-t en tant que facteur de survie cellulaire est renforcée par des études montrant qu'il peut être induit dans des conditions de stress cellulaire telles que l'hypoxie (Kavallaris, 2010; Bordji *et al.*, 2014).

III.3. La β III-tubuline, un facteur de survie induit par l'hypoxie tumorale ?

L'hypoxie, comme nous l'avons vu, est une caractéristique majeure de la plupart des tumeurs solides. Les cellules s'adaptent à la baisse en apport en oxygène, conséquence d'une augmentation de la masse tumorale et de l'éloignement des vaisseaux sanguins. En plus des conséquences décrites précédemment, des travaux ont montré que l'hypoxie entraîne une augmentation du taux de β III-t dans les MTs.

Ces dernières années, plusieurs auteurs ont notamment décrit la β III-t comme étant un facteur de survie pour la cellule (Karki *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2014; Mariani *et al.*, 2015; McCarroll *et al.*, 2015a). Ainsi, il a été suggéré que la β III-t fait partie d'une voie de signalisation moléculaire complexe activée par un stress lié à un microenvironnement hypoxique et une privation nutritionnelle (Raspaglio *et al.*, 2014). En clinique, l'activation des voies de survie liées à un environnement hypoxique sont souvent corrélées à un phénotype tumoral agressif, même s'il existe des exceptions notables (Karki *et al.*, 2013; Mariani *et al.*, 2015). Une analyse des séquences de régulation du gène *TUBB3* a permis d'identifier une séquence HRE consensus du type 5'-RCGTG-3' située sur la partie 3' UTR du gène *TUBB3* susceptible de fixer HIF-1 ou HIF-2. (Raspaglio *et al.*, 2008; Bordji *et al.*, 2014). Ainsi, des travaux récents, dont des travaux de l'équipe, ont permis d'apporter plus de preuves sur la régulation de la β III-t par HIF-2 en conditions hypoxiques dans des lignées de GB et de tumeur ovarienne humaines (Bordji *et al.*, 2014; Raspaglio *et al.*, 2014). Le microenvironnement hypoxique activant des voies de survie cellulaire, dont celles qui induisent la β III-t, rendraient les cellules cancéreuses résistantes aux taxanes et aux autres chimiothérapies (Raspaglio *et al.*, 2003, 2014; Karki *et al.*, 2013; McCarroll *et al.*, 2015a). De plus, il apparaît que l'augmentation de l'expression de β III-t pourrait être, en partie, induite par une réponse adaptative au stress oxydatif et à la production de radicaux libres (Katsetos *et al.*, 2009). En effet, une étude de Ludueña & Banerjee a montré que les rares tissus normaux qui expriment la β III-t sont également riches en radicaux libres et en espèces réactives de l'oxygène. Les auteurs ont suggéré un lien entre les deux et proposé qu'une des fonctions de la β III-t serait de protéger les MTs des effets délétères des radicaux libres. De plus, les auteurs suggèrent que l'absence de résidu Cys239 dans la β III-t, connu pour être très sensible à l'oxydation, permet une meilleure résistance des MTs aux radicaux libres présents en quantité importante dans les tumeurs (Ludueña & Banerjee, 2008). Il a été

aussi démontré que le fait d'inhiber l'expression de la β III-t dans les cellules cancéreuses augmente la sensibilité de celles-ci non seulement aux composés qui ciblent la tubuline mais également aux antioxydants. Les données de cette étude suggèrent que la β III-t agirait comme facteur de survie pour les cellules tumorales ciblées par diverses classes d'agents chimiothérapeutiques qui ciblent l'ADN comme le cisplatine, la doxorubicine et l'étoposide (Gan *et al.*, 2007).

III.4. β III-tubuline et gliomes

Dans le système nerveux central, la β III-t est principalement exprimée dans les neurones (Person *et al.*, 2017). L'expression de la β III-t est retrouvée dans les tumeurs neuroblastiques tel que les médulloblastomes (Katsetos *et al.*, 1989, 1995, 2003c). Dans la mesure où la β III-t n'est physiologiquement pas exprimée dans la glie, l'expression de cet isotype dans les gliomes est considérée comme un phénomène aberrant ou un phénomène de « dédifférenciation » associé à l'acquisition de phénotypes analogues à des cellules souches. Les cellules souches cancéreuses, surtout dans le cas des gliomes, sont regroupées dans des « niches ». Il semblerait que la déprivation en oxygène soit un régulateur important du maintien du caractère souche des cellules contenues dans ces niches. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I.5, ces niches hypoxiques sont surtout localisées dans des zones palissadiques qui bordent la nécrose. Au niveau de ces niches, les facteurs HIFs sont stabilisés, les voies moléculaires de la progression tumorale sont activées (Seidel *et al.*, 2010) et un fort marquage pour la β III-t est observé (Katsetos *et al.*, 2001). En revanche, l'étude de Katsetos et collaborateurs montre qu'à proximité des vaisseaux ou dans les zones d'angiogenèse, il n'y a pratiquement aucun marquage positif à la β III-t.

La β III-t est diversement exprimée dans tous les types et grades histologiques de gliomes humains, y compris les astrocytomes diffus et les oligodendrogliomes (Katsetos *et al.*, 2001, 2002, 2003c, 2003a, 2009, 2011; Dráberová *et al.*, 2008). Toutefois, l'expression de cette protéine est significativement plus importante dans les gliomes de haut grade, et particulièrement dans les GB (Figure 36). La β III-t fait partie des 6 protéines marqueurs pour observer des différences significatives entre les gliomes de haut grade et de bas grade dans une étude immunohistochimique (microarrays tissulaires) sur 378 tumeurs cérébrales utilisant 37 anticorps (Ikota *et al.*, 2006). Cependant, l'absence de spécificité de type cellulaire exprimant des niveaux aberrants de β III-t dans un contexte tumoral souligne la limite de l'utilisation de cet isotype comme marqueur dans le diagnostic (Laggner *et al.*, 2007).

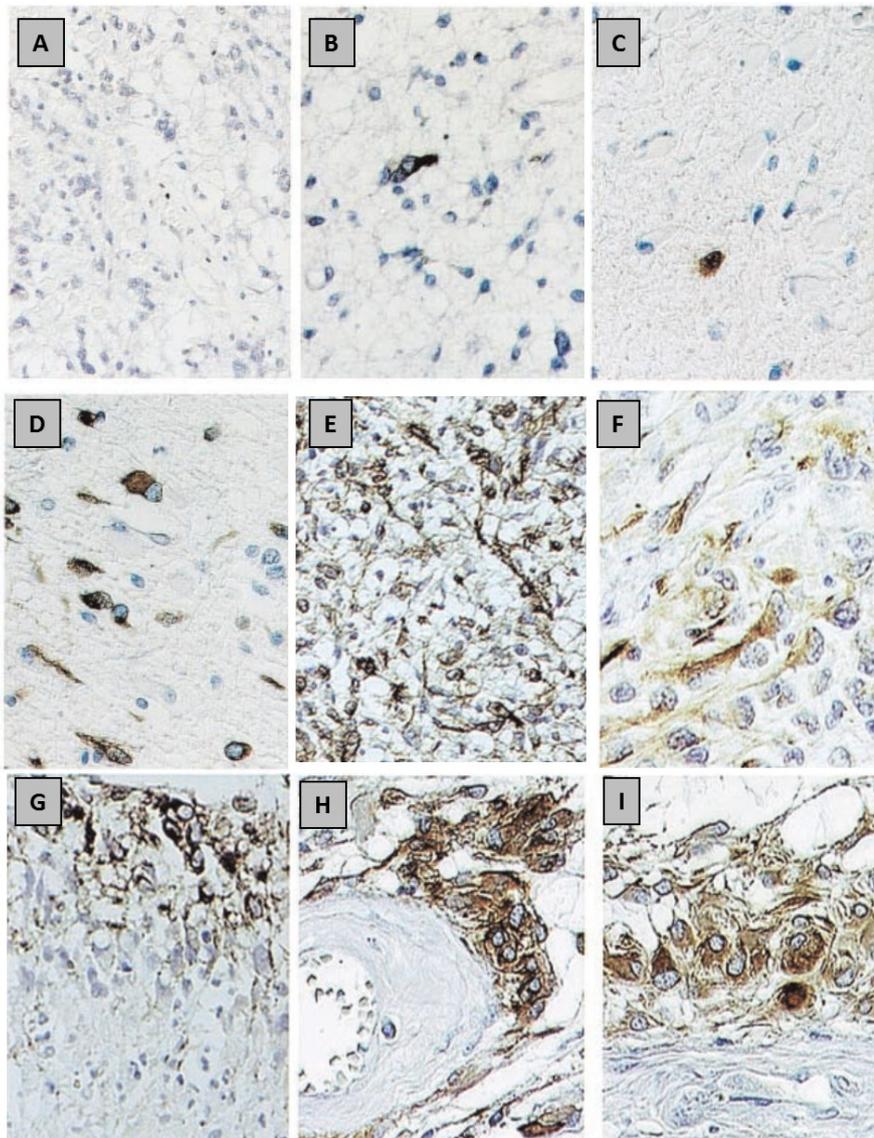


Figure 36 : Panneau décrivant la distribution cellulaire de la β III-tubuline.

A. Astrocytome pilocytique (WHO I)

B. Astrocytome diffus (WHO II)

C, D. Astrocytome diffus (WHO II) Différentes zones de la même tumeur illustrant l'hétérogénéité de la distribution cellulaire de la β III-t.

E, F. Astrocytome anaplasiques (WHO III). L'immunoréactivité de la β III-t est très répandue dans les cellules tumorales et présente divers signes morphologiques.

G à I. Glioblastome (WHO IV).

G. Un ensemble de petites cellules anaplasiques positive à la β III-t ressemblant à des cellules souches dans le voisinage de la nécrose tumorale (zones palissadiques).

H, I. Groupes de cellules positives dans des zones péri-vasculaires. Cependant, les vaisseaux associés à la tumeur sont β III-t négatifs.

Grossissements : [A, B, E, G] X200 ; [F] X400 ; [C, D, H, I] X 1000

Adapté d'après Katsetos *et al.*, 2001

III.5. β III-tubuline : cible thérapeutique dans les glioblastomes ?

Comme pour beaucoup d'autres tumeurs, les tumeurs gliales (astrocytomes et les oligodendrogliomes) présentent une expression élevée de la β III-t, alors qu'elle est absente dans la glie normale. Une augmentation significative de cette expression dans les gliomes de haut grade (grades III et IV) est même documentée par rapport aux gliomes de bas grade (grades I et II). L'hypoxie étant une caractéristique majeure des gliomes de haut grade, et notamment des GB, un lien a été établi entre une expression élevée de β III-t dans les GB et l'hypoxie. Ce lien a été souligné par de nombreux auteurs (Raspaglio *et al.*, 2008, 2014; Bordji *et al.*, 2014), même si d'autres études dans des gliomes humains n'ont pas fait état des mêmes observations (Yan *et al.*, 2011). Dans différents type tumoraux, une expression élevée de β III-t est souvent associée à un développement tumoral avancé, à l'hypoxie ainsi qu'à un mécanisme de résistance à la chimiothérapie (Katsetos *et al.*, 2011). En revanche, peu de données existent encore sur le rôle de la β III-t dans les tumeurs cérébrales en général et dans les gliomes en particulier. Celles-ci sont quelques fois contradictoires ou demandent à être confirmées par d'autres études. L'implication potentielle de la β III-t dans la résistance aux traitements chimiothérapeutiques des tumeurs gliales est particulièrement peu documentée dans la mesure où la plupart des TBA ont été peu ou pas utilisés pour ce type de tumeurs.

En effet, au contraire des autres organes ou tissus, le tissu cérébral possède la particularité d'être protégé par une BHE. Composée de cellules endothéliales aux jonctions serrées, d'une membrane basale, de péricytes et de pieds astrocytaires, elle est particulièrement efficace pour protéger le cerveau de substances indésirables potentiellement présentes dans la circulation sanguine. Cette propriété essentielle de la BHE fait qu'elle empêche également de nombreux agents pharmacologiques, dont beaucoup agents antitumoraux, d'atteindre le parenchyme cérébral. Il en est ainsi des molécules de la famille des vinca-alcaloïdes (vinblastine, vincristine, vinorelbine...), de la famille des taxanes (paclitaxel, docétaxel...), et de quelques épothilones (ixabepilone). Ainsi, même si l'on sait que dans les GB la BHE est rompue, la perméabilité à des agents pharmacologiques est souvent partielle et ne concerne pas toutes les zones tumorales, rendant les traitements moins efficaces.

La découverte de la capacité de certaines molécules de la famille des épothilones (la patupilone et la sagopilone) à traverser la BHE a donc permis d'envisager de les utiliser pour traiter les tumeurs cérébrales. Cela avait été réalisé dans des études précliniques d'implantation de GB humain chez le rongeur (Hoffmann *et al.*, 2009) et dans des études cliniques de phase I et II (Oehler *et al.*, 2012). La patupilone a par ailleurs été décrite comme un radiosensibilisateur efficace sur des cellules de médulloblastome (Oehler *et al.*, 2011). La patupilone peut être administrée sans danger avant et

après l'opération. Le médicament s'accumule dans le tissu tumoral. Le traitement entraîne une survie sans aggravation à long terme chez certains patients.

De plus, quoique les épothilones aient montré une activité importante sur des cellules de tumeur ovarienne exprimant la β III-t (Ferrandina *et al.*, 2012), une extinction de cette protéine a rendu ces cellules encore plus sensibles aux TBA (Narvi *et al.*, 2013). La même observation a été réalisée sur des cellules tumorales de poumon (Gan *et al.*, 2011).

Ainsi, l'ensemble de ces observations pourraient indiquer que le niveau d'expression de la β III-t pourraient déterminer à la fois le degré de développement tumoral des gliomes et leur sensibilité à la chimiothérapie (Kavallaris, 2010). L'étude de la β III-t dans les cellules de GB semble ainsi être particulièrement pertinente pour déterminer si cette protéine a un rôle dans le développement tumoral de cellules gliales et dans la sensibilité à la chimiothérapie. Par ailleurs, une étude réalisée dans l'équipe sur des cellules de GB humains (U87MG et GL15) a montré que l'expression de la β III-t était induite par l'hypoxie et que cette induction était spécifiquement médiée par HIF-2 (Bordji *et al.*, 2014). Il s'avère donc également intéressant d'étudier si une stratégie anti-HIF-2 permettrait d'inhiber l'expression de la β III-t dans ces lignées de GB humaines.

Objectifs

Objectifs

En dépit des traitements actuellement utilisés contre les GB, ces tumeurs présentent toujours une évolution rapide et un pronostic sombre. Les données présentées au cours de cette étude bibliographique mettent en avant le caractère invasif et la capacité de ces tumeurs à échapper aux traitements grâce à de nombreux mécanismes.

Parmi ces mécanismes, la composante hypoxique est une donnée essentielle de la physiopathologie des GB. Le microenvironnement hypoxique active de nombreuses voies de signalisation qui déterminent la progression tumorale. L'hypoxie est donc responsable en grande partie de l'évolution rapide de ces tumeurs vers un phénotype agressif et de l'échec des thérapies actuelles.

Les facteurs HIFs sont des médiateurs principaux de l'hypoxie qui vont activer les voies de signalisation responsables du développement tumoral. Même si le rôle spécifique des deux isoformes les plus étudiées (HIF-1 α et HIF-2 α) reste discuté, il semblerait que l'isoforme HIF-2 joue un rôle de premier ordre dans de nombreuses tumeurs solides. Plusieurs travaux ont en effet mis en lumière certains gènes cibles qui sembleraient être spécifiques de HIF-2 α . L'induction de l'expression de ces gènes cibles serait essentielle à la progression tumorale et participerait de manière importante au développement des phénomènes de résistance aux traitements. C'est pourquoi des stratégies anti-HIF-2 α sont actuellement étudiées et développées dans le but de proposer des traitements anti-tumoraux novateurs.

Dans cette optique, différents travaux, y compris dans notre Laboratoire, ont montré que l'expression de la β III-t est induite par l'hypoxie et que HIF-2 est l'isoforme qui contrôle cette induction par l'hypoxie. Cela a été montré dans les tumeurs ovariennes et dans des lignées de GB humaines (Bordji *et al.*, 2014; Raspaglio *et al.*, 2014). Par ailleurs, les données de la littérature montrent que, pour de nombreuses tumeurs, la β III-t est associée à un stade tumoral avancé. Ceci est particulièrement vrai pour les gliomes où la β III-t est très exprimée dans les gliomes de haut grade, notamment dans les zones hypoxiques ou de nécrose.

Les études menées lors de ces travaux de thèse ont donc un double objectif :

Il s'agit dans un premier temps d'évaluer le rôle de la β III-t dans le développement tumoral en utilisant des stratégies d'inhibition de l'expression de la β III-t. Ce travail a été réalisé sur des modèles cellulaires (lignées de GB humaines) et sur des modèles expérimentaux d'implantation orthotopique de cellules humaines chez la souris *nude*.

Dans un deuxième temps, à l'image de ce qui est décrit dans d'autres modèles cellulaires, nous avons souhaité évaluer l'intérêt d'une stratégie anti-HIF-2 α pour inhiber l'activité de cette isoforme de HIF dans des lignées de GB.

Pour cela, nous avons initié une collaboration avec le CERMN (Centre d'études et de recherche sur le médicament de Normandie, EA 4258, Université de Caen-Normandie) afin d'identifier *in silico* dans un premier temps des molécules candidates pour l'inhibition de HIF-2 α . Il s'agissait ensuite de tester ces molécules, ainsi qu'une des molécules de référence décrite dans la littérature (PT2385) quant à leur capacité à inhiber la dimérisation de HIF-2 α avec HIF-1 β dans nos modèles cellulaires.

Comme nous l'avons vu la β III-t est retrouvée dans les gliomes et son niveau d'expression est directement corrélée avec le grade tumoral. De plus, il semble que cette isoforme de β -tubuline soit en relation étroite avec la pression tissulaire en oxygène au niveau de la tumeur. Les observations sur les conséquences des niveaux élevés en β III-t sont analogues à celles exposées pour HIF-2 α . Cependant, très peu d'études ont ciblé la β III-t afin de déterminer si son implication dans les différents processus tumoraux était active ou passive.

L'objectif des travaux qui vont être exposés dans la suite de ce manuscrit est donc de préciser le rôle de la β III-t dans les GB et d'identifier des inhibiteurs spécifiques de HIF-2 α qui auraient donc la capacité d'inhiber sa dimérisation, son activité transcriptionnelle et notamment l'expression de la β III-t.

Matériels & méthodes

I. Méthodologie *in vitro*

I.1. Culture cellulaire

I.1.1. Lignées humaines

Les lignées humaines de GB (GL15, U87MG et U251MG) utilisées dans cette étude sont toutes issues de biopsies réalisées sur des patients atteints de GB. La lignée GL15 (obtenue par le professeur J.S. Guillamo, Caen, France) est issue d'une tumeur d'origine astrocytaire localisée au niveau du lobe frontal chez un patient de 59 ans atteint d'un GB. Cette lignée cellulaire présente des propriétés très invasives. La lignée U87-MG (Malignant Glioma, *American Type Culture Collection*, ATCC), d'origine astrocytaire également, a une morphologie épithéliale et une capacité de prolifération élevée. Enfin, la lignée U251-MG (French National Cancer Institut, Paris, France) a une morphologie astrocytaire. Les caractéristiques génétiques de ces trois lignées vis-à-vis des gènes p53, PTEN et IDH1/2 sont résumées dans le [Tableau 6](#).

	<i>p53</i>	<i>PTEN</i>	<i>IDH1/2</i>
GL15	Muté	Inconnu	Non muté
U251	Muté	Muté	Non muté
U87	Non muté	Muté	Non Muté

[Tableau 6](#) : Caractéristiques génétiques des 3 lignées humaines de GB utilisées.

Les cellules sont maintenues en culture dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium-1g/L de glucose (DMEM, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (dSVF, Eurobio), 2mM de glutamine (Sigma-Aldrich) et de la pénicilline (1000 U/ml)/ stréptomycine (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich) sous atmosphère humide, à 5% de CO₂ et à 37°C. À confluence, les cellules sont rincées avec du tampon phosphate à 0,01M (PBS, Sigma-Aldrich) puis détachées de leur support de culture à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (trypsine 0,25% ; EDTA 0,02%, Sigma-Aldrich) pendant 5 min à 37°C. L'action de la trypsine est par la suite inhibée par ajout d'un excès de milieu de culture contenant du dSVF. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300g pendant 5 min, resuspendues dans du milieu de culture frais etensemencées sur de nouveaux supports de culture avec une densité plus faible.

1.1.2. Transfections transitoires et infections lentivirales

1.1.2.1. Transfections transitoires

Les transfections transitoires ont été réalisées par la technique des lipides cationiques (Lipofectamine 2000, Thermofisher Scientific). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24-puits à une densité de 40 000 cellules/puits. Vingt-quatre heures plus tard, les transfections par les ARN interférents (siRNA, Stealth RNAi™, Invitrogen) indiqués dans le [Tableau 7](#) ont été réalisées. Pour chaque transfection, 1µL de Lipofectamine 2000 est dilué dans 50µL de milieu Opti-MEM (Gibco) et 6pmol de siRNA sont dilués séparément dans 50µL d'Opti-MEM. Les deux suspensions sont mélangées et déposées sur les cellules pendant six heures avant changement du milieu. Les cellules sont ensuite cultivées 48h au minimum avant évaluation de l'effet des siRNA.

[Tableau 7](#) : Séquences des siARN utilisés pour les transfections transitoires

Séquences siARN		
HIF-1α	sens	5'-CAC CUA UGA CCU GCU UGG UGC UGA U-3'
	anti-sens	5'-AUC AGC ACC AAG CAG GUC AUA GGU G-3'
HIF-2α	sens	5'-CAG GUG GAG CUA ACA GGA CAU AGU A-3'
	anti-sens	5'-UAC UAU GUC CUG UUA GCU CCA CCU G-3'
βIII-t	sens	5'-GAG AAC ACG GAU GAG ACC UAC UGC A-3'
	anti-sens	5'-CUC UUG UGC CUA CUC UGG AUG ACG U-3'
si-Scr	sens	5'-AAA UGG GUG GAG CUC UUG AUU UAG U-3'
	anti-sens	5'-ACU AAA UCA AGA GCU CCA CCC AUU U-3'

1.1.2.2. Infections lentivirales

Les particules lentivirales, commercialisées par la société Sigma-Aldrich, permettent l'expression d'un vecteur plasmidique (pLKO.1) porteur d'un gène de résistance à un antibiotique de cellules eucaryotes (puromycine, Invitrogen) et codant pour un shARN de βIII-t. 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 %.

Dans un premier temps, les infections sont réalisées à plusieurs MOI (Multiplicity of infection = nombre de particules lentivirales/cellule) avec une construction surexprimant la GFP afin de choisir le MOI minimal le plus efficace. Dans notre cas, nous avons choisi un MOI de 3.

Une fois la transfection effectuée, les cellules sont cultivées avec un antibiotique de sélection : la puromycine (5µg/mL). Lorsque la sélection est établie, les cellules sont amplifiées afin de caractériser par RT-qPCR l'inhibition des 5 clones.

Ainsi les séquences ayant été retenue sont :

sh-βIII-t : 5'-CCGGCGAGATGTACGAAGACGACGACTCGAGTCGTCGTCTTCGTACATCTCGTTTTT-3'

shScr : 5'-CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTTT-3'

I.2. Traitements cellulaires

I.2.1. Hypoxie

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

I.2.2. Exposition aux molécules anti HIF-2α

Deux composés ont été choisis pour cette étude. Le premier est identifié comme un inhibiteur de la dimérisation de HIF-2α avec HIF-1β (PT2385, Wallace *et al.*, 2016, cf. paragraphe I.5.2.4 de l'étude bibliographique). Le deuxième (SR2933) a été sélectionné sur ses capacités à se lier dans la cavité du PAS-B de HIF-2α après criblage de la chimiothèque du CERMN (CERMN, Université de Caen). Ces deux molécules sont dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) à une concentration de 10 mM. Les cellules sontensemencées entre 18h et 24h avant l'exposition aux molécules. Les deux molécules sont ensuite utilisées à 3 concentrations : 0,1 ; 1 et 10 μM diluées dans du milieu de culture complet. Les cellules sont incubées en présence des composés pendant 18h.

I.2.3. Irradiation

Les cellulesensemencées en plaques 6 puits à une densité très faible (500 cellules/mL) sont irradiées avec un irradiateur cellulaire aux rayons X (CellRad, Faxitron ; Edimex 2012 ; 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. Les cellules sont irradiées à des doses de 0, 4, 6 et 8 Gy et sont ensuite maintenues en culture sur une période allant de 7 à 10 jours. Après rinçage au PBS, les colonies formées sont incubées avec une solution de Crystal Violet (Sigma-Aldrich)

pendant 30 minutes. Les colonies colorées sont ensuite rincées à l'eau distillée. Le comptage des colonies est réalisé avec le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

I.2.4. Traitements chimiothérapeutiques

Les cellules sontensemencées en plaques 24 puits à une densité faible (10 000 cellules/mL). Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par un milieu de culture frais contenant les chimiothérapies. Le Témazolomide (Sigma-Aldrich) est utilisé à la concentration de 100 μ M et le Cabazitaxel (LC Laboratories) est utilisé à deux concentrations 1 et 5 nM. Les cellules sont cultivées en normoxie ou hypoxie pendant 72h. Le tapis cellulaire est ensuite rincé au PBS avant fixation et coloration au cristal violet. 400 μ L d'une solution d'acide acétique 10% est ajoutée sur le tapis cellulaire pendant 10 minutes sous agitation. Une lecture de densité optique (DO) à 560 nm est effectuée afin de déterminer la prolifération cellulaire.

I.2.5. Technique des gènes rapporteurs

Les plasmides HRE-pGL3SV40-Luciférase (comportant 4 séquences HRE en amont du promoteur SV40), pGL3SV40-luciférase (vecteur vide) et pRL-TK ont été fournis par le Pr. Florent Soubrier (Hôpital Pitié-Salpêtrière Paris). Toutes ces constructions ont été amplifiées par transformation bactérienne en utilisant la souche *One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells* (Invitrogen). La sélection a été réalisée grâce à l'ajout d'ampiciline (Sigma-Aldrich). L'extraction des plasmides a ensuite été réalisée en utilisant le kit Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel). La quantité et la pureté de l'ADN ont été mesurées par mesure de l'absorbance à 260, 280 et 230 nm.

Les cellules sont co-transfectées par un mélange composé de 500 ng de plasmide HRE-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 du milieu opti-MEM. Seize heures après transfection, les cellules sont traitées à la déferoxamine (150 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 selon les instructions du fournisseur (*Dual-Luciferase® Reporter Assay System*, Promega) avec un luminomètre *Spark* (Tecan Life Sciences Home). L'activité luciférase relative est calculée selon la formule : signal luciférase firefly/signal luciférase renilla.

I.3. Modèles d'études

I.3.1. Technologie xCELLigence

Pour évaluer la prolifération et l'invasion cellulaire, la technologie xCELLigence® RTCA (*Real Time Cell Analyser*, ACEA Biosciences, Plate-forme ImpedanCELL, Plateau technique de la SF 4206 ICORE, Université de Caen-Normandie) a été utilisée. Cette technologie permet de suivre en temps réel et en continu la prolifération et l'invasion cellulaire dans des plaques 96 puits. Ce suivi repose sur une mesure d'impédance générée par le contact des cellules avec des électrodes situées sur le fond des puits des plaques de culture et réalisée à intervalles courts et réguliers. Ces mesures d'impédance permettent ainsi de suivre avec une grande précision aussi bien les événements précoces que tardifs de la réponse cellulaire. Pour la mesure de l'invasion cellulaire, le compartiment inférieur des puits est rempli de milieu de culture contenant 10% de SVF qui servira de chimioattractant. Le compartiment supérieur des puits est, au préalable, rempli de Matrigel™ que les cellules vont devoir digérer pour pouvoir établir un contact avec les électrodes et générer ainsi un signal d'impédance (Figure 37).

Pour les expériences de prolifération cellulaire, 5000 cellules sont déposées dans chaque puits de plaques 96 puits. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont transfectées avec des siARN anti- β III-t ou des siARN-Scr (20 nM ou 3 pmol/puits) par la technique de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). La plaque est ensuite fixée sur la station xCELLigence dans une atmosphère humide à 37°C en présence de 5% de CO₂. La prolifération est suivie en continu pendant plusieurs jours avec une mesure d'impédance toutes les 20 minutes.

Pour les expériences d'invasion cellulaire, 10⁵ cellules/puits sont mises en culture dans des plaques 6 puits. Vingt-quatre heures après, les cellules sont transfectées avec des siARN anti- β III-t ou des siARN-Scr (20 nM) par Lipofectamine 2000 avant d'être incubées pendant 48h à 37°C dans un incubateur. Les cellules sont ensuite trypsinées, lavées et déposées dans des puits de plaques xCELLigence (50000 cellules / puits) préalablement remplis de Matrigel (100 μ l / puits) dans 100 μ l de milieu de culture. L'invasion cellulaire est ensuite suivie sur un temps de 24h avec une mesure d'impédance toutes les 20 min.

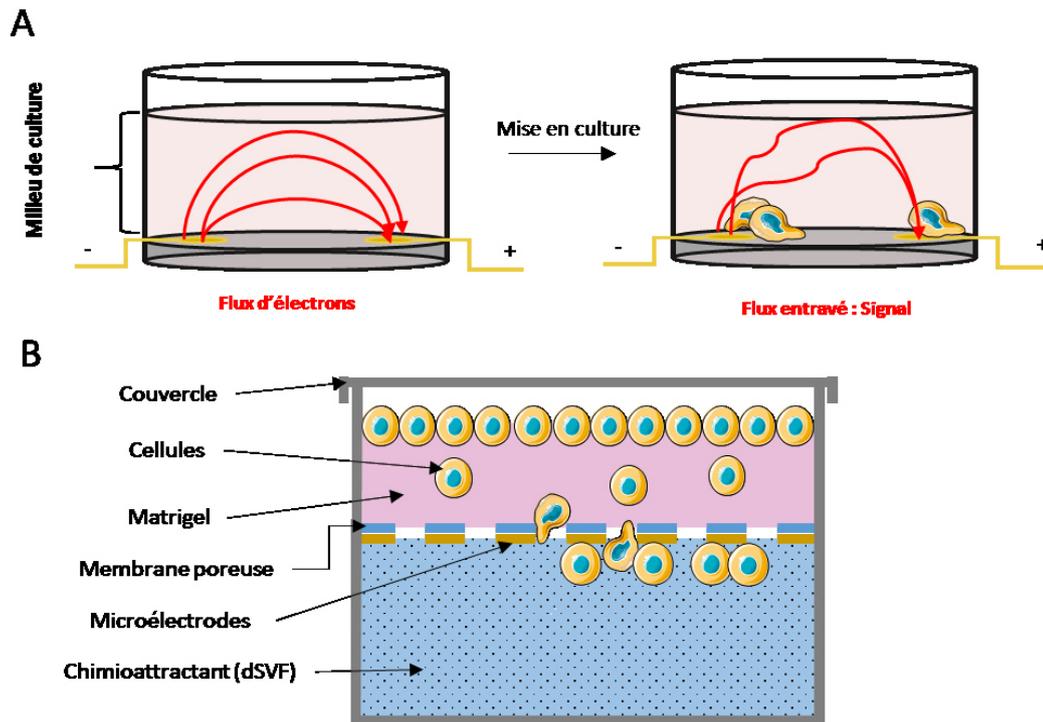


Figure 37 : Principe de fonctionnement de la technologie xCELLigence.

A. La Prolifération. Lorsque les cellules sont mises en culture et qu'elles prolifèrent le flux d'électrons est entravé par la résistance que les cellules génèrent.

B. L'invasion. Lorsque les cellules, attirées par chimiotactisme, passent à travers la membrane poreuse, elles génèrent un signal grâce aux microélectrodes situées sous les pores.

1.3.2. Test de blessure

Les cellules sont ensemencées (300 000 cellules/mL, 3 mL) dans des puits de plaque 6 puits. Le lendemain, les cellules sont transfectées avec des siRNA (siRNA- β III-t ou siRNA-Scr). Quarante-huit heures après, le tapis cellulaire est lésé à l'aide d'un cône de pipette P200, rincé au PBS et le milieu de culture est remplacé par du nouveau milieu contenant 0,5% de SVF. Le suivi au cours du temps du comblement de la blessure, est réalisé à l'aide d'un microscope à champ large Leica DM6000B équipé d'une chambre climatique. Celle-ci permet de mimer les conditions de culture dans un incubateur en atmosphère humide, permettant des acquisitions (4 photos par puits) des mêmes champs aux temps 0, 24, 36 et 48h. Trois mesures de la distance entre les deux bords de la blessure sont effectuées à l'aide du logiciel ImageJ. La même expérience a été renouvelée en présence de mitomycine (1 μ g/ μ l), à une concentration qui théoriquement inhibe la prolifération cellulaire sans tuer les cellules. Ceci afin d'éliminer un effet comblement qui serait dû à une prolifération cellulaire.

I.3.3. Test de clonogénicité : Analyse de la survie cellulaire

Le test de clonogénicité est le test de référence afin d'étudier la survie cellulaire consécutive à une irradiation. Ce test a été réalisé sur les modèles cellulaires GL15 et U251MG après les irradiations décrites en I.2.3. À 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* (PE, 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 (SF) 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), correspondant 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.3.4. Etude 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 Gallios™ (Beckman Coulter SAS, France) et analysées avec le logiciel Kaluza® (Beckman Coulter SAS, France). Ces équipements sont 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 (λ_{ex} = 540 nm ; λ_{em} = 620 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.3.5. Expression protéique

I.3.5.1. 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 µg/mL). Après centrifugation (10 000 g, 30 min), les surnageants sont collectés puis dosés à l'aide du kit *BCA™ 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 sur une membrane de polyvinylidène (PVDF) en conditions semi-sèches (7 min, 3,2 A, température ambiante). 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 en présence 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, pendant 1 h à température ambiante. La détection se fait à l'aide du kit *Pierce ECL Plus Western blotting substrate* (Fisher Scientific) à l'aide d'une caméra CCD (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare). La quantification du signal est réalisée grâce au logiciel ImageJ. Les anticorps utilisés sont récapitulés dans le [Tableau 9](#).

1.3.5.2. Immunoprécipitation du dimère HIF-2 α /HIF-1 β

Les protéines sont extraites selon la même méthode décrite précédemment. 100 μ g de protéines sont mélangées avec 1 μ g d'anticorps anti-HIF2 α (NB100-122, Novus) dans un volume final de 500 μ L de tampon RIPA. Ce mélange protéines/anticorps est mis à agiter à 4°C pendant 18h. Le lendemain, 50 μ L de billes *Dynabeads™ protein A* (Invitrogen) sont ajoutées et le mélange est agité pendant 90 min à température ambiante. Après 3 rinçages, les billes sont resuspendues avec le tampon de charge afin de décrocher les complexes protéiques des billes *Dynabeads*. Les protéines sont ensuite déposées sur gel selon la même méthode décrite précédemment et une révélation du partenaire d'hétérodimérisation HIF-1 β est réalisée en utilisant l'anticorps primaire anti-HIF-1 β (NB100-110, Novus).

1.3.6. Expression des ARNm

1.3.6.1. Extraction d'ARN

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.

1.3.6.1. Transcription inverse et PCR en temps réel

La transcription inverse est réalisée à partir d'1 μ g d'ARN total en utilisant une transcriptase inverse (M-MLV Reverse transcriptase, Invitrogen), dans un volume de 20 μ L contenant du MgCl₂ (50 mM), des désoxyribonucléotides (dNTP, 1 mM), 0,5 mg/ml d'oligo-dT, 0,5 μ L de RNase inhibitor et 2,5 mM DTT. Les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus après une incubation d'une heure à 37°C suivi d'une étape de dénaturation enzymatique de 15 min à 70°C.

Les ADNc sont dilués 40 fois puis amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne quantitative (PCRq) en temps réel dans un volume final de 20 μ L sur un appareil QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 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 $\Delta\Delta$ Ct (*Cycle threshold*). Les amorces utilisées sont récapitulées dans le [Tableau 8](#).

Tableau 8 : Amorces utilisées en RT-qPCR

Séquences des amorces		
βIII-t	sens	5'-GAC CGC ATC ATG AAC ACC TTC AG -3'
	anti-sens	5'- AGT AGG TCT CAT CCG TGT TCT CC -3'
CA-IX	sens	5'-TAT CTG CAC TCC TGC CCT CTG -3'
	anti-sens	5'-CAC AGG GTG TCA GAG AGG GTG -3'
Cyclophiline A	sens	5'-TAT TCC AGG ATT CAT GTG CCA GG -3'
	anti-sens	5'-ACA AGA TGC CAG GAC CTG TAT GC -3'

1.3.7. Etude de la morphologie cellulaire

Les cellules, préalablement transfectées avec les siRNA βIII-t/scrambled, sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 % et marquées au réactif de Hoechst et à la phalloïdine couplée au TRITC, permettant de marquer respectivement les noyaux cellulaires et l'actine. Des photos sont réalisées à l'aide d'un microscope inversé (Leica DM6000B) et les images sont analysées grâce au logiciel ImageJ.

1.3.8. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

On parle de FRET lorsqu'un fluorophore « donneur » transfère son énergie un autre fluorophore « receveur » situé à proximité. Pour être dans les meilleures conditions, il faut que le couple de fluorophores choisi possède des courbes d'excitation et d'émissions bien spécifiques (Figure 38). Dans cette étude nous avons choisi le couple « Clover/mRuby » (Lam *et al.*, 2012)

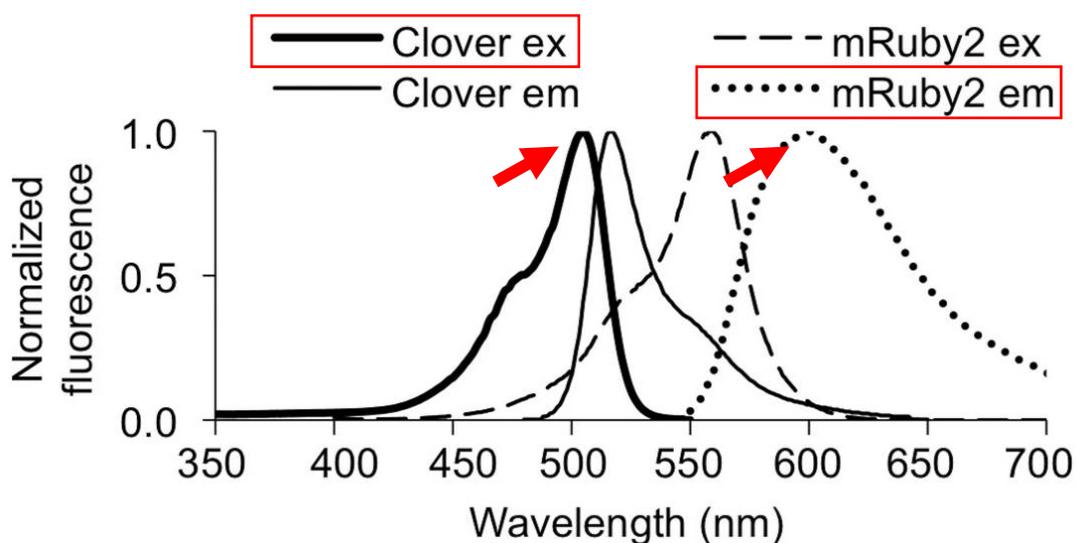


Figure 38 : Spectres d'excitations et d'émissions du couple Clover/mRuby2.

Trois constructions plasmidiques ont été réalisées, d'après les travaux réalisés par l'équipe de Kim et collaborateurs. Dans les deux premières, les gènes de HIF-1 α et de HIF-2 α ont été clonés dans le plasmide pcDNA3-mRuby2 (Addgene, Cambridge, MA) en aval du promoteur SV40. Dans la troisième et de la même manière, HIF-1 β a été cloné dans le plasmide pcDNA3-Clover (Addgene, Cambridge, MA). Dans les trois plasmides, les fluorophores ont été clonés en N-terminal de la protéine HIF de manière à ce qu'ils soient le plus rapproché lors de la formation du dimère pour obtenir un signal de FRET (Kim *et al.*, 2015). Ces travaux de clonage ont été réalisés par recombinaison homologue à l'aide du kit *In-Fusion[®] Advantage PCR Cloning* (Clontech).

Pour cela, les gènes HIFs (1 α , 2 α et 1 β) ont été amplifiés par PCR à l'aide de la *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) à partir de ADNc extraits à partir de cellules cultivées en hypoxie (1 % d'O₂ pendant 24h). Les produits de PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% avant d'être extraits du gel grâce au kit *Nucleospin[®] gel and PCR Clean up* (Macherey-Nagel).

Les plasmides ainsi obtenus sont nommés :

- HIF-1 β -Clover
- HIF-1 α -mRuby
- HIF-2 α -mRuby

Toutes les constructions générées ont été vérifiées par digestion enzymatique suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1% puis par séquençage (Genoscreen, Lille, France). Une fois validées, les constructions plasmidiques ont été amplifiées par transformation bactérienne en utilisant la souche *One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cells* (Invitrogen). La sélection des plasmides a été réalisée en présence d'ampicilline (Sigma-Aldrich). L'extraction des plasmides a ensuite été réalisée en utilisant le kit *Nucleospin[®] Plasmid* (Macherey-Nagel). La quantité et la pureté de l'ADN ont été mesurées par mesure de l'absorbance à 280, 260 et 230 nm.

Les plasmides sont transfectés selon le protocole précédemment décrit. 18h après la transfection les cellules sont placées en condition hypoxique pendant 24h. Les cellules sont ensuite fixées au PFA 4% pendant 20 minutes à température ambiante et sont ensuite rincées 3 fois avec 1 mL de PBS ([Figure 39](#)).

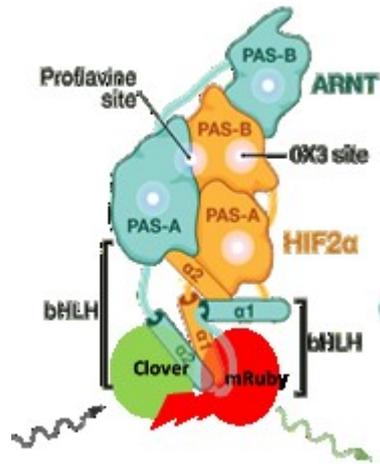


Figure 39 : Schéma illustrant le principe du FRET.

Lorsque le dimère (ARNT/HIF-2 α) est formé, le donneur (Clover) excité transmet l'énergie de son émission (éclair rouge) à l'accepteur (mRuby) qui émet dans sa propre longueur d'onde.

Les acquisitions ont été réalisées sur le microscope confocal à large spectre Leica TCS SP5. Les analyses des signaux FRET ont été réalisées grâce à une collaboration mise en place avec Magalie Bénard de la Plate-forme de Recherche en IMagerie CELLulaire de Normandie (PRIMACEN) située à Rouen.

II. Méthodologie *in vivo*

II.1. Modèle orthotopique d'implantation de glioblastome humain chez la souris

Les cellules U87-sh β III-t et U87-shScr obtenues après infection lentivirale ont été testées pour évaluer le niveau d'inhibition de l'expression de la β III-t au niveau de l'ARNm et de la protéine. Les cellules sont suspendues dans une solution de PBS-Glutamine 2 mM à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules sous 3 μ L pour l'implantation dans le striatum droit de souris *Swiss Nude* (femelles 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. 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. Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées dans le cadre d'une autorisation de projet APAFIS n° 1282-2015072412554183 obtenue le 15/06/2016 et après acceptation du comité régional d'éthique et du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation.

II.2. Etude longitudinale 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 préréglages 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/TE effectif = 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. Analyse de la survie des animaux

Le poids limite (*P lim*) des animaux est déterminé par la formule se :

$$P \text{ lim} = P \text{ max} - (10\% \times P \text{ max})$$

Où *P max* est déterminé par une mesure du poids quotidienne de chaque animal. Lorsque l'animal a atteint la limite de poids, il est mis à mort par perfusion intracardiaque de sérum physiologique hépariné sous anesthésie générale. La survie des animaux en fonction du temps est représentée par les courbes de Kaplan-Meier réalisée à l'aide du logiciel Statistica.

III. Méthodologie *ex vivo*

III.1. Coupes histologiques

Afin d'effectuer des études immunohistologiques, il est nécessaire d'obtenir de fines coupes de cerveau. La technique utilisée dans ces travaux est la coupe par cryostat. Le cerveau est congelé après la perfusion intracardiaque de l'animal de sérum physiologique hépariné. Le cerveau est ensuite fixé sur un présentoir et une lame effectue des coupes coronales de 30 μ m. Ces coupes sont ensuite fixées sur des lames adhésives SuperFrost (Thermo Fisher Scientific) permettant ainsi de plonger les coupes dans des solutions permettant les immunomarquages.

III.2. Immunohistochimie

L'immunomarquage commence par la fixation des coupes déposées sur la lame avec du paraformaldéhyde (PFA 4%, Sigma-Aldrich) pendant 20 min à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS (Sigma-Aldrich) afin d'éliminer toute trace de PFA. Une étape de saturation à la BSA 3% (+ PBS + Tween 0,1% / Triton 0,5%) pendant deux heures permet de diminuer le nombre de liaisons aspécifiques. L'anticorps primaire est mis au contact des lames (500 μ l par lame) avec une solution de PBS + Tween 0,1% / Triton 0,5% + 1% de BSA. Les lames sont ensuite recouvertes d'un parafilm et sont placées dans une boîte humide pour éviter l'évaporation. L'anticorps primaire est appliqué sur la nuit à 4°C. Les lames sont ensuite rincées avec du PBS + Tween 0,1% / Triton 0,5%. L'anticorps secondaire et le réactif de Hoechst 33342 (10 μ g/mL, Invitrogen) sont appliqués (500 μ l par lame) avec une solution de PBS + Tween 0,1% / Triton 0,5% + 1% de BSA pendant 90min recouvert là aussi d'un parafilm et à l'abri de la lumière. Les lames sont plongées trois fois dans des solutions de PBS + Tween 0,1% / Triton 0,5% puis trois fois dans du PBS seul afin de les rincer et sont montées entre lames et lamelles avec une solution d'Aqua-Poly/Mount (Dutscher). Les anticorps utilisés sont récapitulés dans le [Tableau 9](#).

Tableau 9 : Anticorps utilisés en immunomarquage

Western Blot/Immunoprécipitation			
Cibles	Dilution	Fournisseur	Référence
β III-t	1/1000 ^e	BioLegend	801202
HIF-2 α	1/300 ^e	Novus	NB-100-122
HIF-1 β	1/1000 ^e	Novus	NB-100-110
Actine	1/1000 ^e	Cell Signaling	3700S
Immunohistochimie			
Cibles	Dilution	Fournisseur	Référence
CD31	1/300 ^e	BD Pharmigen	550274
CD68	1/800 ^e	Abcam	ab53444
Ki67	1/1000 ^e	Abcam	ab15580
β III-t	1/1000 ^e	Abcam	ab18207
CD133	1/200 ^e	Abcam	ab19898
Pimonidazole	1/50 ^e	Hypoxyprome incorporation	1MAB1

IV. Analyses 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 ainsi que le seuil de significativité retenu.

Résultats

I. Etude de l'effet de l'extinction de la β III-tubuline sur des lignées humaines de glioblastomes

I.1. Caractérisation des modèles d'études

Pour l'ensemble des études *in vitro*, nous avons utilisé trois lignées humaines de GB : GL15, U251MG et U87MG. Les cellules U87MG sont d'origine astrocytaire, ont une morphologie fibroblastique avec des prolongements cytoplasmiques prononcés. Elles ont une capacité de prolifération élevée. Ces cellules ne présentent pas de mutation pour les gènes *TP53*, *IDH1* et *IDH2* (Figure 40). En revanche, cette lignée présente une mutation pour le gène *PTEN* (Furnari *et al.*, 1997).

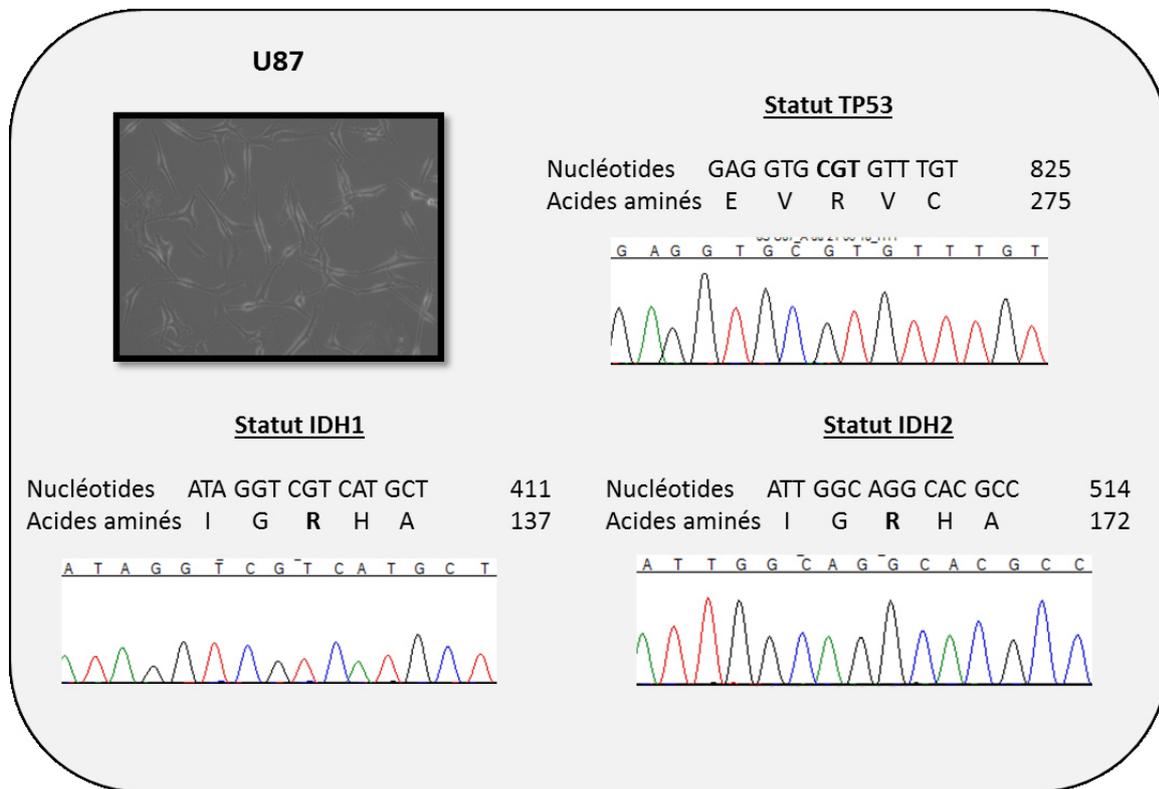


Figure 40 : Analyse des statuts des gènes *TP53*, *IDH1* et *IDH2* des cellules U87MG.
 Observation en microscopie optique, grossissement X20
 Pas de mutations observées sur ces trois gènes.

Les cellules GL15 ont une morphologie astrocytaire qui correspond à leur tissu d'origine et ont des capacités infiltrantes importantes *in vivo*. Ces cellules présentent une mutation dans le gène *TP53* sur le codon 273 de l'exon 8 (CGT → CAT), mais pas de mutation sur les gènes *IDH1* et *IDH2* (Figure 41). A notre connaissance, aucune donnée sur le statut de *PTEN* de la lignée GL15 n'est disponible dans la littérature.

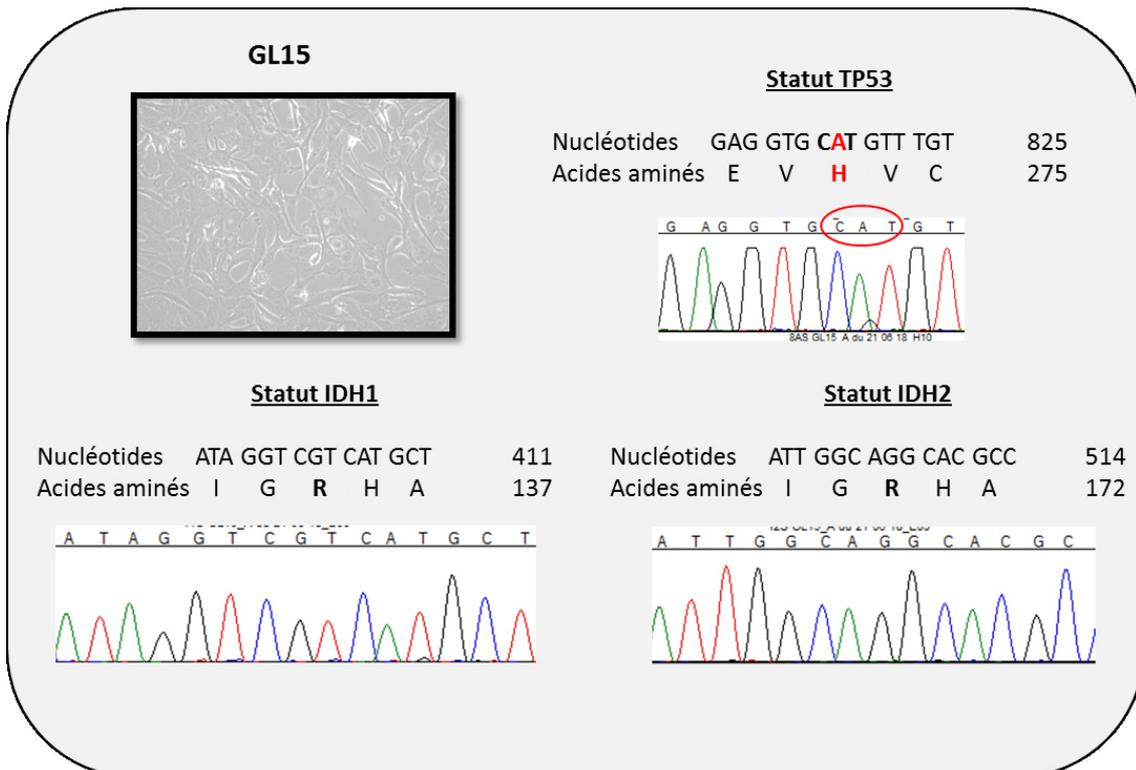


Figure 41 : Analyse des statuts des gènes *TP53*, *IDH1* et *IDH2* des cellules GL15.

Observation en microscopie optique, grossissement X20

Mise en évidence de présence d'une mutation du gène *TP53* du type c,818G>A ; p,Arg273His homozygote et d'une absence de mutation des gènes *IDH1* et *IDH2*.

Les cellules U251MG présentent une mutation identique aux cellules GL15 sur le gène *TP53* (codon 273, CGT → CAT) et aucune mutation sur les gènes *IDH1* et *IDH2* (Figure 42). Des données issues de la littérature indiquent une mutation sur le gène *PTEN* (Schmidt *et al.*, 1999).

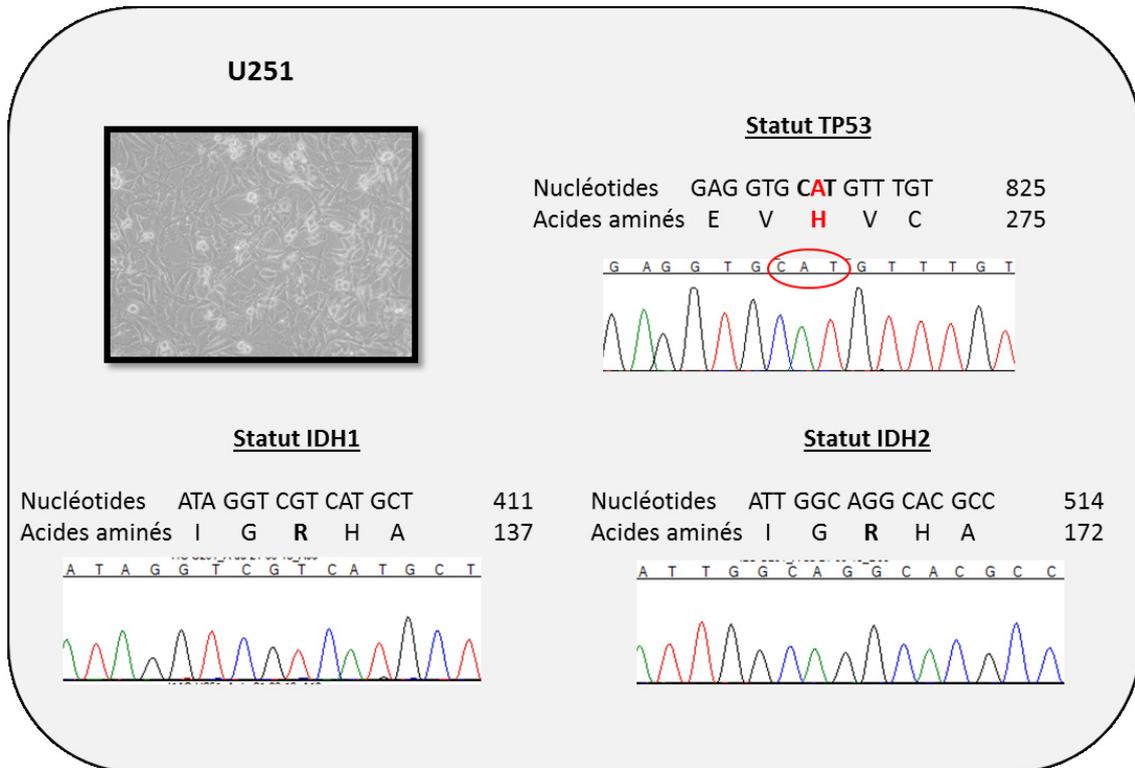


Figure 42 : Analyse des statuts des gènes TP53, IDH1 et IDH2 des cellules U251MG.
 Observation en microscopie optique, grossissement X20
 Mise en évidence de présence d’une mutation du gène TP53 du type c,818G>A ; p,Arg273His homozygote et d’une absence de mutation des gènes IDH1 et IDH2.

1.2. Expression de la βIII-tubuline et de HIF-2α dans les glioblastomes

Avant de s’intéresser au rôle spécifique de la βIII-t dans les GB, une étude antérieure, réalisée au sein de l’unité, s’est intéressée à l’expression de la βIII-t dans des échantillons cliniques de gliomes. Cette étude a portée sur 22 prélèvements de gliomes humains de grade II à IV recueillis dans le service d’anatomie pathologique du CHU de Caen.

La **Figure 43** montre un immunomarquage important de la βIII-t dans les gliomes de haut grade (B et C), et particulièrement dans les GB (grade IV). En revanche, cette expression est bien moins importante dans le gliome de grade II (A). La βIII-t est détectée essentiellement au niveau cytoplasmique (en périnucléaire) et dans les prolongements cellulaires. Par ailleurs, le marquage au niveau des vaisseaux et des cellules inflammatoires est presque toujours négatif. De plus, l’expression est très hétérogène au sein d’une même tumeur.

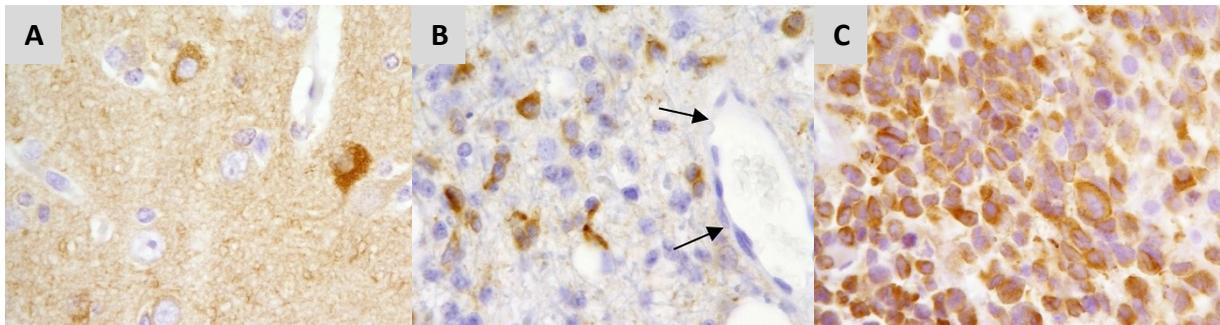


Figure 43 : Immunomarquage de la β III-tubuline dans des gliomes humains de différents grades.

(A) Oligodendrogliome grade II

(B) Oligodendrogliome anaplasique grade III

(C) Glioblastome grade IV.

Marquage cytoplasmique des cellules gliales tumorales avec une expression plus élevée dans les gliomes de haut grade. Les vaisseaux tumoraux n'expriment pas la β III-tubuline (flèches).

Grossissement x400

Concernant HIF-2 α , un immunomarquage important est observé dans les cellules tumorales de GB. Ce marquage est colocalisé avec la β III-t et est particulièrement retrouvé au niveau des zones palissadiques bordant la nécrose (**Figure 44**). L'expression de HIF-2 α est essentiellement nucléaire.

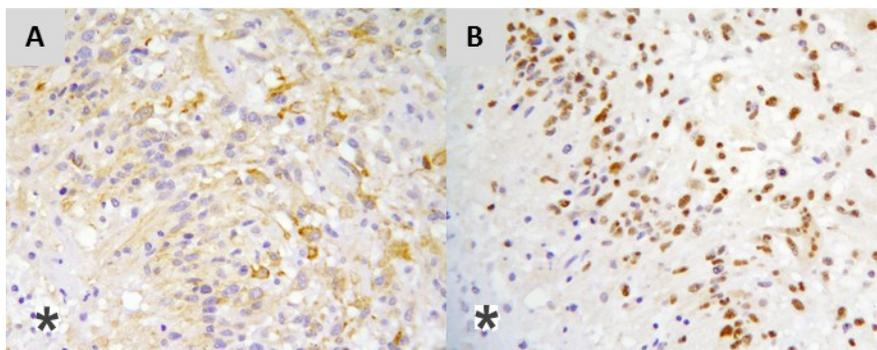


Figure 44 : Zone de pseudo palissade périnécrotique.

(A) β III-tubuline

(B) HIF-2 α

Immunomarquages sur des coupes histologiques immédiatement adjacentes d'un glioblastome (grade IV). Le marquage de la β III-tubuline est cytoplasmique et HIF-2 α est nucléaire.

* : nécrose

Grossissement x400

Pour chaque échantillon et pour chaque protéine, le H-score a été calculé. Le H-score correspond à la somme des produits du pourcentage de cellules dans chaque catégorie d'intensité par l'intensité de la coloration pondérée :

$$\text{H-score} = \sum P_i \times (i + 1)$$

où i représente l'intensité de coloration (0, 1 ou 2) et P_i le pourcentage de cellules tumorales marquées à chaque intensité (0 à 100%) (Sève *et al.*, 2007).

Les H-scores de la β III-t ont été comparés aux H-scores de HIF-2 α et cela a permis de mettre en évidence une corrélation positive significative entre la β III-t et HIF-2 α . En revanche, aucune corrélation n'a été trouvée avec les deux autres isoformes de HIF (HIF-1 α et HIF-3 α) (Tableau 10).

	rho*	p-value**
β III - HIF-1 α	+0,29	0,175
β III - HIF-2 α	+0,50	0,017
β III - HIF-3 α	+0,17	0,436

Tableau 10 : Analyses de corrélation entre la β III-t et les facteurs HIF α avec le coefficient de corrélation de Spearman

* coefficient ρ (rho) de Spearman

** Valeur p pour le coefficient rho calculé (en gras, les résultats significatifs pour un seuil de risque $\alpha=5\%$)

Le coefficient rho de Spearman sert à déterminer une relation qui existe entre deux séries de données et indique s'il existe une corrélation positive ou négative.

1.3. Mesure de l'extinction de la β III-tubuline par ARN interférents

Afin de disposer de lignées cellulaires exprimant de manière stable des faibles taux de β III-t, les trois lignées de GB humain ont été infectées avec des particules lentivirales qui expriment une séquence de shARN dirigée contre la β III-t humaine. Cinq séquences de shARN β III-t ont été testées selon les indications du fournisseur (Sigma-Aldrich). Après une étape de sélection à la puromycine, nous avons évalué le niveau d'extinction de la β III-t au niveau de l'ARNm et de la protéine, respectivement par qPCR et par immunoempreinte. De manière comparable, des cellules de ces trois lignées ont été infectées avec des particules exprimant une séquence *scrambled* ne reconnaissant aucun ARNm humain connu afin d'évaluer les effets potentiels d'une infection lentivirale.

En parallèle des infections lentivirales, nous avons utilisé des siARN dirigés contre la β III-t afin d'inhiber de manière transitoire l'expression de cette protéine dans les lignées cellulaires en culture. De la même manière, nous avons évalué le niveau d'extinction de la β III-t en comparaison avec un siARN *scrambled* (si-Scr) sur les trois lignées cellulaires (Figure 45, Figure 46 et Figure 47).

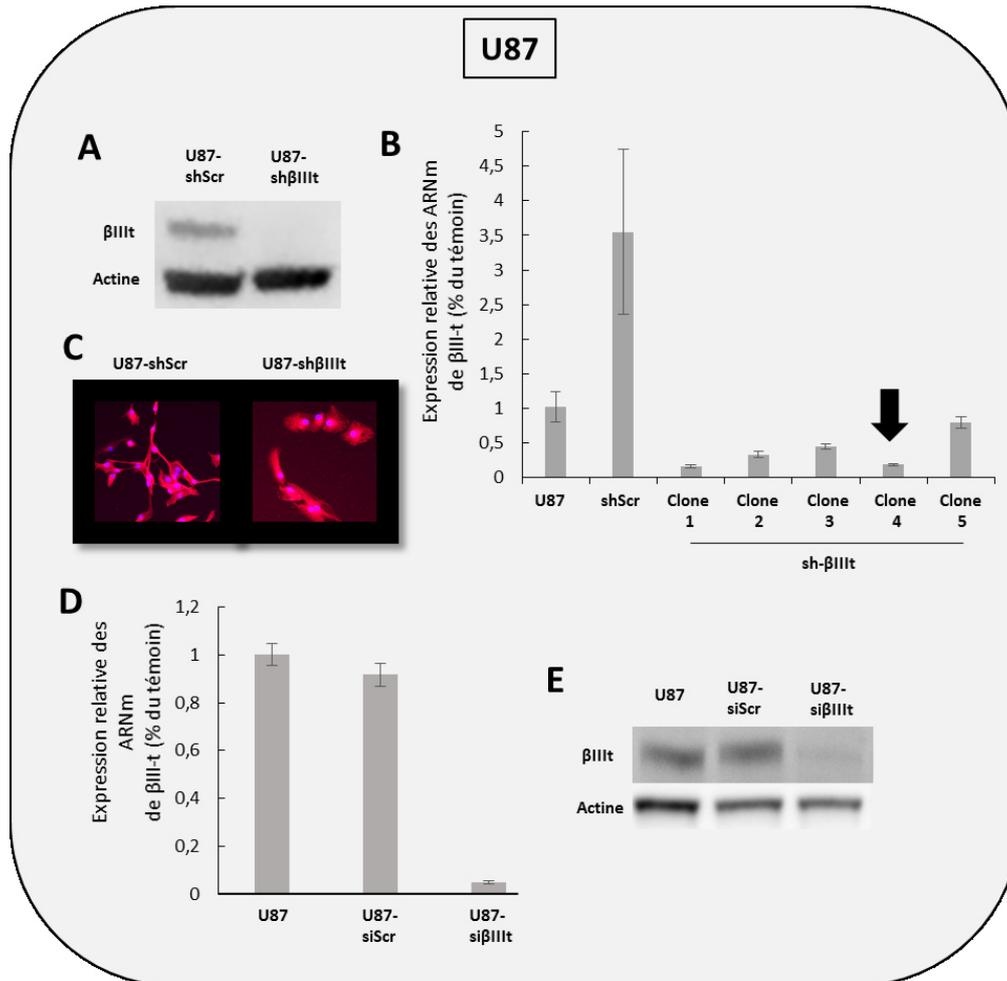


Figure 45 : Caractérisation de l’extinction de la βIII-t sur les cellules U87-MG par stratégie shARN (A, B et C) ou siARN (D et E).

- A. Inhibition de l’expression protéique de la βIII-t comparée aux U87-shScr.
- B. Détermination des niveaux relatifs d’ARNm de βIII-t dans les 5 clones et sélection du clone n°4.
- C. Morphologie cellulaire après marquage du cytosquelette à la phalloïdine (rouge) et des noyaux au réactif de Hoechst (bleu) au grossissement X200
- D. Détermination des niveaux relatifs d’ARNm de βIII-t 48h après transfection des cellules avec des siRNA dirigés contre la βIII-t et siScr montrant la diminution des ARNm de βIII-t.
- E. Expression protéique de la βIII-t après traitement aux siARN.

L’analyse de l’expression des ARNm de βIII-t montre, de manière surprenante, une augmentation de la βIII-t dans les cellules U87-shScr par rapport aux cellules U87 naïves d’environ 3,5 fois. Néanmoins, l’écart-type est élevé en comparaison des autres échantillons, ce qui suggère une variabilité importante de la mesure. De fait, le clone 4 qui présente la meilleure inhibition par rapport aux cellules naïves, éteint d’environ 95% l’expression de la βIII-t comparé aux cellules U87-shScr qui servent de référence. Ce résultat est confirmé au niveau protéique dans les cellules U87-shScr et U87-shβIII-t (clone 4) (Figure 45A et Figure 45B). De plus, l’inhibition de la βIII-t semble induire un changement de morphologie cellulaire. Les cellules U87-shβIII-t présentent un aspect plus arrondi et étalé comparé aux cellules U87-shScr (Figure 45C)

Concernant l’inhibition de l’expression de la β III-t avec des siARN, l’analyse des ARNm de β III-t n’a montré aucune modification entre les cellules U87 et U87-siScr (Figure 45D). Une inhibition d’environ 90% est mesurée dans les cellules U87-si- β III-t par rapport aux cellules U87-siScr. Cette inhibition est également confirmée au niveau protéique (Figure 45E).

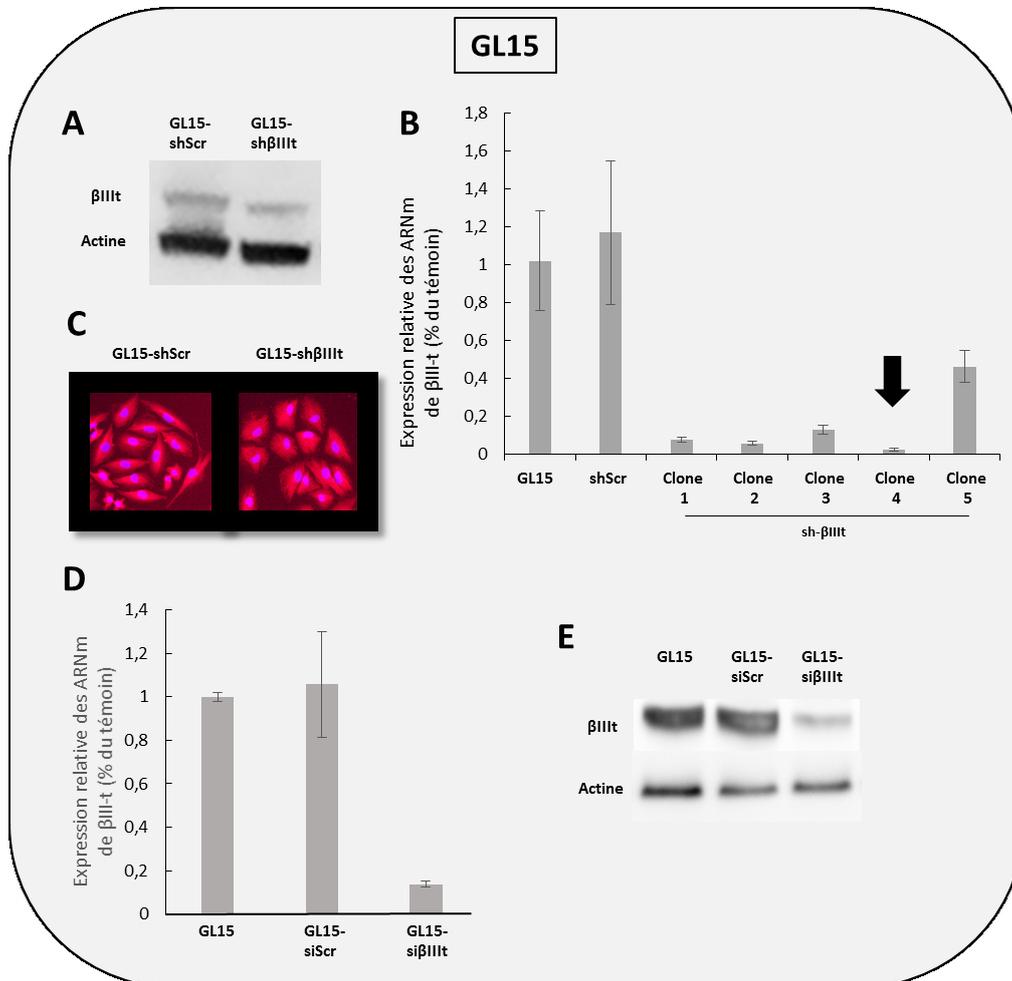


Figure 46 : Caractérisation de l’extinction de la β III-t sur les cellules GL15.

- A. Inhibition de l’expression protéique de la β III-t comparée aux GL15-shScr.
- B. Détermination des niveaux relatifs d’ARNm de β III-t dans les 5 clones et sélection du clone n°4.
- C. Morphologie cellulaire après marquage du cytosquelette à la phalloïdine (rouge) et des noyaux au réactif de Hoechst (bleu) au grossissement X200
- D. Détermination des niveaux relatifs d’ARNm de β III-t 48h après transfection des cellules avec des siRNA dirigés contre la β III-t et siScr montrant la diminution des ARNm de β III-t.
- E. Expression protéique de la β III-t après traitement aux siARN.

L’analyse de l’expression des ARNm de β III-t ne montre pas de différence entre les cellules GL15 et GL15-shScr. L’analyse de l’expression de la β III-t des 5 clones révèle ici aussi que le clone 4 présente la meilleure inhibition de la β III-t avec 95% environ par rapport aux cellules GL15-shScr. Une baisse moins importante est observée au niveau protéique (Figure 46A et Figure 46B). Comme observé

précédemment sur la lignée U87-MG, l'inhibition de la β III-t induit un changement de morphologie cellulaire par rapport aux cellules GL15-shScr (Figure 46C).

Concernant l'inhibition de la β III-t avec des siARN, une diminution de 90% de l'expression des ARNm de β III-t est observée. Aucune différence significative de l'expression de l'ARNm de β III-t n'est mesurée entre GL15 et GL15-siScr (Figure 46D). Cette inhibition est également confirmée au niveau protéique (Figure 46E).

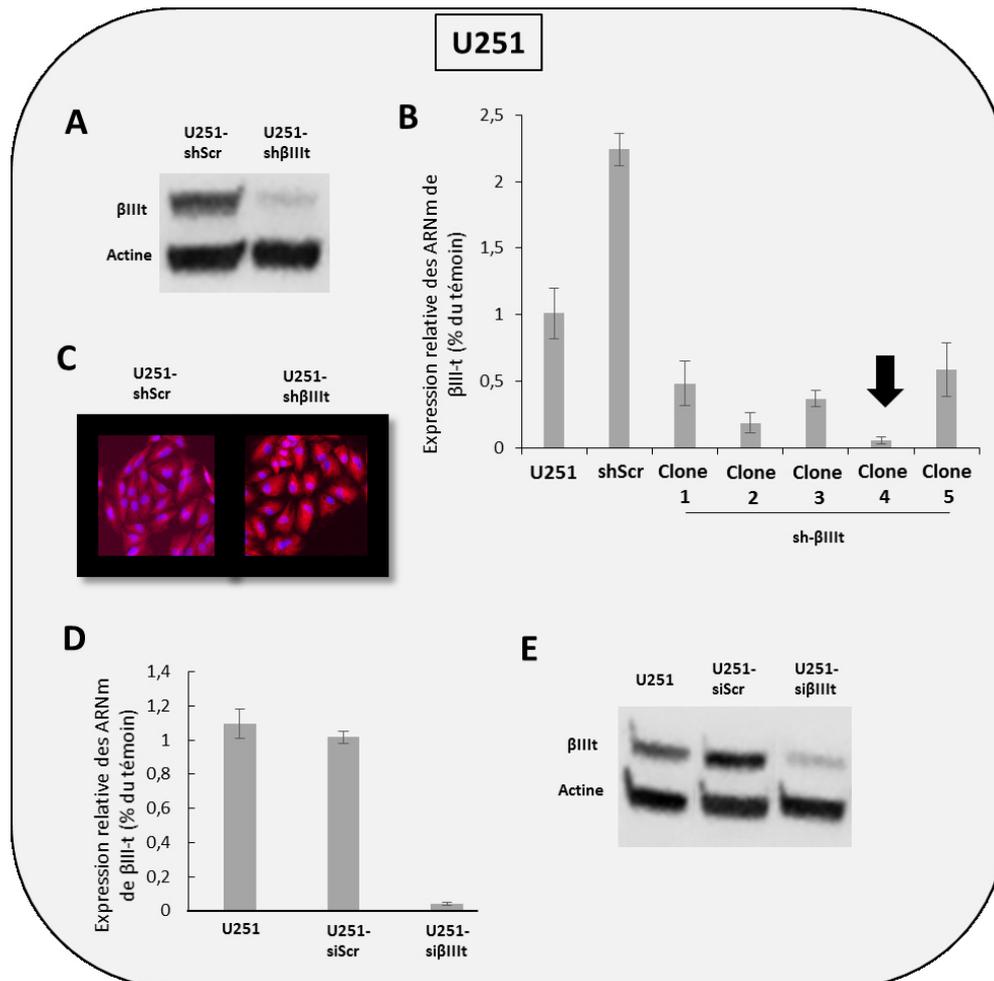


Figure 47 : Caractérisation de l'extinction de la β III-t sur les cellules U251-MG.

- A. Inhibition de l'expression protéique de la β III-t comparée aux U87-shScr.
- B. Détermination des niveaux relatifs d'ARNm de β III-t dans les 5 clones et sélection du clone n°4.
- C. Morphologie cellulaire après marquage du cytosquelette à la phalloïdine (rouge) et des noyaux au réactif de Hoechst (bleu) au grossissement X200
- D. Détermination des niveaux relatifs d'ARNm de β III-t 48h après transfection des cellules avec des siRNA dirigés contre la β III-t et siScr montrant la diminution des ARNm de β III-t.
- E. Expression protéique de la β III-t après traitement aux siARN.

L'analyse de l'expression des ARNm de β III-t montre une induction de la β III-t dans les cellules U251-shScr par rapport aux cellules U251 naïves d'environ 2,2 fois. Comme pour les deux lignées précédentes, le clone 4 présente la meilleure extinction avec une inhibition des ARNm de β III-t d'environ 95% par rapport aux cellules U251-shScr. Ce résultat est aussi confirmé au niveau protéique ([Figure 47A](#) et [Figure 47B](#)). Comme pour les deux autres lignées cellulaires, nous observons là aussi un changement de morphologie cellulaire ([Figure 47C](#)).

Concernant l'inhibition de la β III-t avec des siARN, une diminution d'environ 90% de l'expression des ARNm de β III-t est observée. Aucune différence significative de l'expression de l'ARNm de β III-t n'est mesurée entre U251MG et U251-siScr ([Figure 47D](#)). Cette inhibition est également confirmée au niveau protéique ([Figure 47E](#)).

1.4. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la prolifération cellulaire

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, la β III-t est exprimée dans les gliomes et particulièrement dans les gliomes de haut grade, comme les GB (Katsetos *et al.*, 2003a) ([Figure 43](#)). Nous avons donc recherché si l'extinction de la β III-t pouvait influencer la prolifération des lignées cellulaires humaines de GB. Nous avons utilisé la technologie xCELLigence de mesure d'impédance en temps réel afin de suivre en continue la prolifération cellulaire des lignées en fonction de leur statut génétique (contrôle, si-Scr et si- β III-t).

Tout d'abord, il est intéressant de noter qu'aucune différence n'est observée entre les conditions témoin et si-Scr et cela, sur les trois lignées ([Figure 48](#)). Cela montre que la technique de transfection cellulaire proprement dite n'a pas d'influence sur la prolifération des trois lignées. Ensuite, nous avons pu observer que sur les lignées U87-MG et GL15, les cellules si- β III-t ont une cinétique de prolifération significativement diminuée par rapport aux conditions contrôles et si-Scr ([Figure 48A](#) et [Figure 48B](#)).

Néanmoins, il faut noter que cette inhibition n'apparaît qu'après 90-100 heures de culture pour les GL15 et 80 heures pour les U87. Cet effet retardé correspond sans doute au temps nécessaire pour que l'inhibition de la β III-t ait un effet biologique visible (prolifération cellulaire).

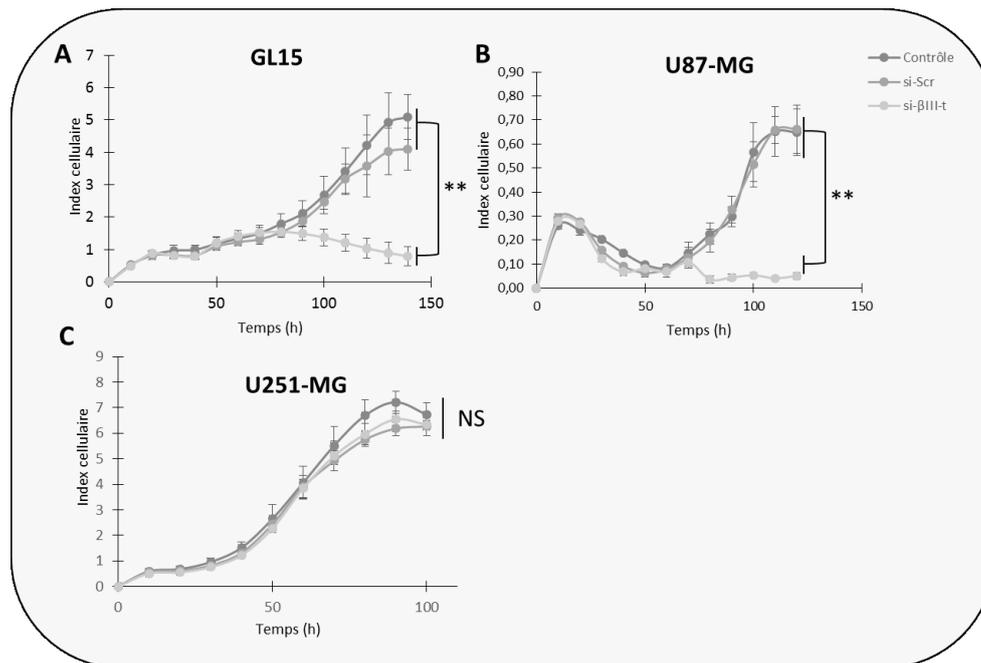


Figure 48 : L’extinction de la βIII-t diminue la prolifération cellulaire des lignées U87-MG et GL15.

A. Courbes de prolifération en fonction du statut génétique des cellules GL15.

B. Courbes de prolifération en fonction du statut génétique des cellules U87-MG.

C. Courbes de prolifération en fonction du statut génétique des cellules U251-MG.

L’index cellulaire est la mesure de l’impédance à différents temps reflétant la prolifération cellulaire.

On peut remarquer que l’index cellulaire mesuré avec les U87MG est très faible comparé à celui relevé pour les deux autres types cellulaires. Ceci traduit sans doute une surface de contact cellulaire avec le support bien plus faible pour les U87MG que pour les U251 et les GL15. En effet, de par leur morphologie, les U87 ont une surface de contact très réduite avec leur support. Par ailleurs, les courbes en cloche obtenues dans les premières heures sont surprenantes et traduisent peut-être des phénomènes d’adhésion propres à ce type cellulaire (Figure 48B). Enfin, les résultats obtenus pour la lignée U251 montre qu’une inhibition de la βIII-t ne modifie pas sa cinétique de prolifération cellulaire, même 100 heures après la transfection (Figure 48C).

La comparaison des différentes cinétiques de prolifération nous permet de déduire que la βIII-t joue un rôle dans la prolifération cellulaire des lignées U87-MG et GL15 *in vitro*.

Les GB sont des tumeurs qui sont caractérisées par un fort index prolifératif et qui possèdent de fortes capacités d’invasion. Nous avons donc recherché si l’extinction de la βIII-t pouvait influencer l’invasion cellulaire.

I.5. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur l'invasion cellulaire

Comme pour l'évaluation de la prolifération, l'étude de l'invasion cellulaire a été réalisée en temps réel grâce à la technologie xCELLigence. Les cellules ont étéensemencées sur du Matrigel®. Elles doivent dans un premier temps digérer ce cocktail protéique mimant la matrice extracellulaire. Un témoin négatif a été réalisé (-SVF) qui confirme que les cellules sont attirées par un gradient chimiotactique produit par le SVF (Figure 49B).

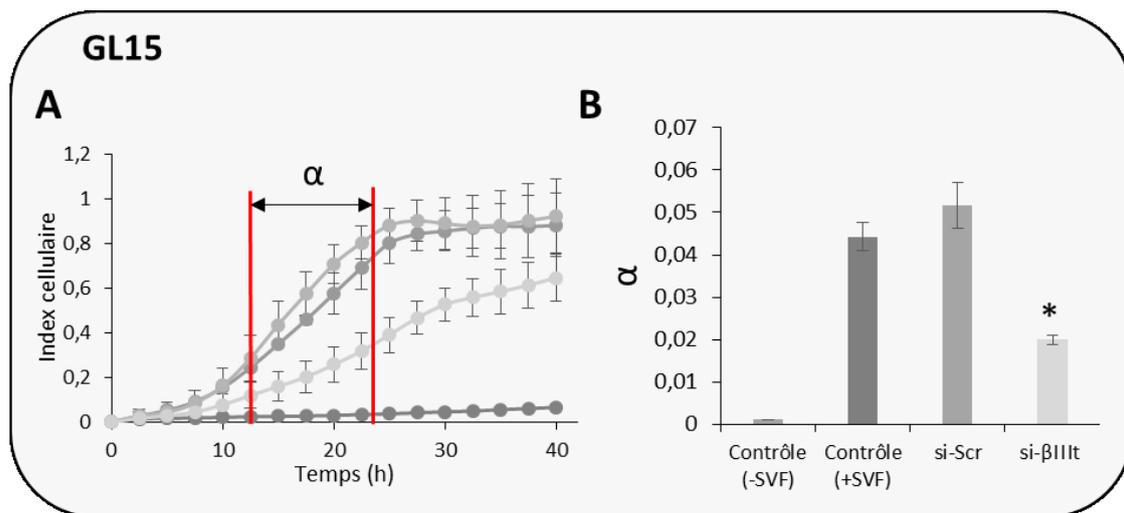


Figure 49 : Analyse en temps réel de l'invasion cellulaire de la lignée GL15.

A. Courbes d'invasion cellulaire

B. Histogramme représentant la pente (α) de la courbe dans sa phase exponentielle.

N=3 Analyse de variance à deux facteurs suivi d'un test de Tuckey. * $P < 0,05$

Le témoin négatif confirme que les cellules nécessitent un gradient de chimiotactisme (assuré par le SVF) pour pouvoir digérer le Matrigel® afin de pouvoir passer dans le compartiment inférieur de la chambre (Figure 37). Ce passage permet ainsi d'établir un contact entre les cellules et les électrodes et ainsi générer un signal d'impédance (Figure 49A). L'étude de la pente de la courbe montre que la capacité d'invasion des cellules GL15-si- β III-t est significativement diminuée en comparaison des cellules GL15 et GL15-siScr (Figure 49B).

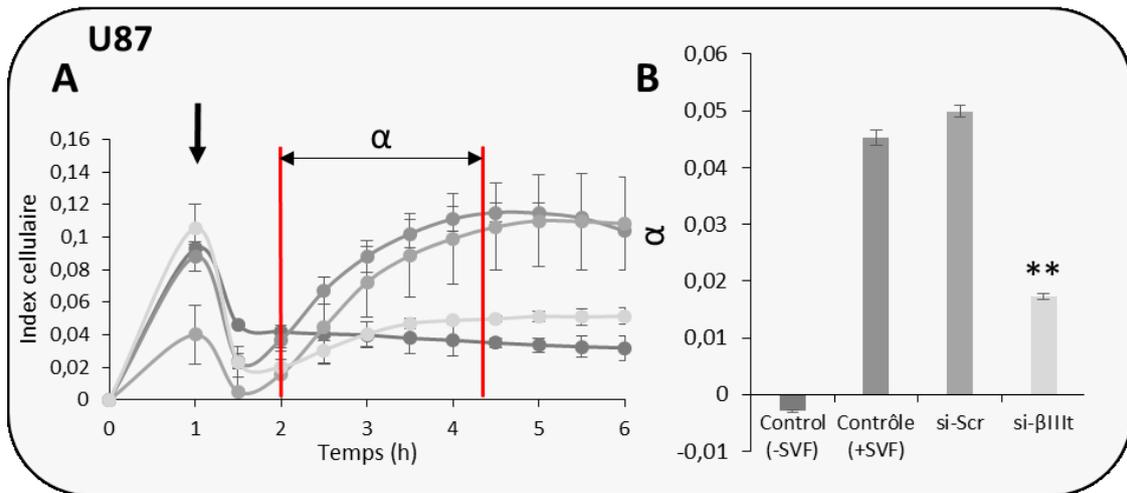


Figure 50 : Analyse en temps réel de l’invasion cellulaire de la lignée U87-MG.

A. Courbes d’invasion cellulaire

B. Histogramme représentant la pente (α) de la courbe dans sa phase exponentielle.

N=3 Analyse de variance à deux facteurs suivi d’un test de Tuckey. ** $P < 0,01$

De manière comparable à la lignée GL15, l’analyse de la pente de la partie linéaire des courbes obtenues pour la lignée U87-MG montre que les cellules U87-si-βIII-t ont des capacités invasives significativement diminuées par rapport aux deux groupes contrôles (U87 et U87-siScr) (Figure 50B). Le pic observé avant la phase d’invasion exponentielle (flèche noire) est lié à la morphologie fibroblastiques de ces cellules et correspond sans doute au phénomène d’adhésion déjà observé lors des tests de prolifération (Figure 50A).

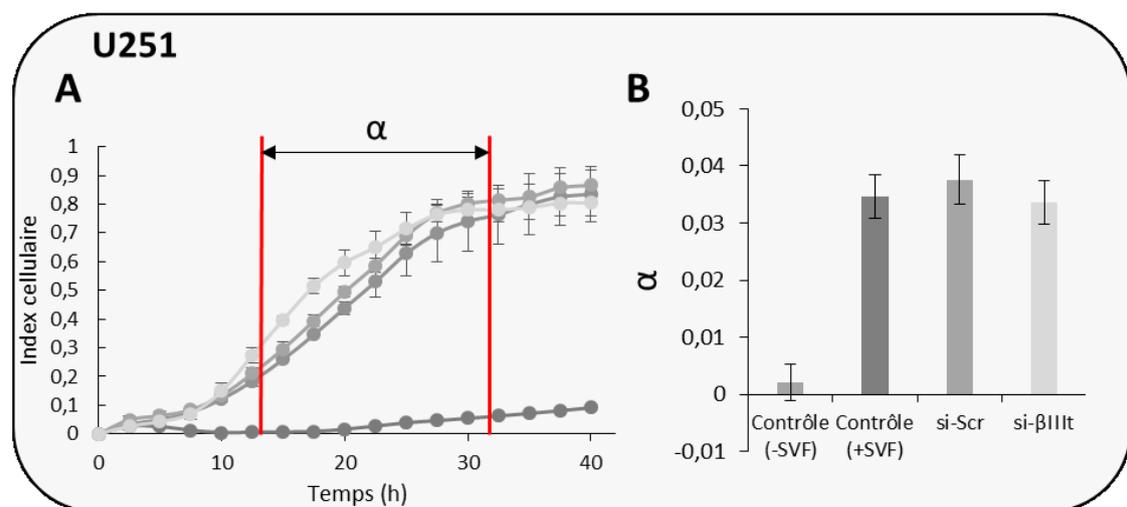


Figure 51 : Analyse en temps réel de l’invasion cellulaire de la lignée U251-MG.

A. Courbes d’invasion cellulaire

B. Histogramme représentant la pente (α) de la courbe dans sa phase exponentielle

Comme pour la prolifération cellulaire, l'inhibition de la β III-t ne semble pas affecter l'invasion cellulaire des cellules U251-si- β III-t ([Figure 51A](#)). En effet, la pente α de la partie exponentielle des courbes ne montre aucune différence entre les trois conditions ([Figure 51B](#)).

Cette expérience montre que la β III-t peut jouer un rôle dans l'invasion cellulaire. Cependant, comme pour la prolifération, l'inhibition de la β III-t n'affecte que les lignées GL15 et U87-MG.

1.6. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la migration cellulaire : Test de blessure

Les GB sont des tumeurs qui possèdent également un fort potentiel de migration. Comme nous l'avons vu dans la partie I.3.1 de l'étude bibliographique, l'infiltration tumorale dépasse très nettement les limites tumorales estimées à l'aide de l'imagerie et jugées par le chirurgien. Cette caractéristique explique, en partie, la récurrence tumorale pratiquement toujours observée chez les patients atteints de GB. Nous avons donc recherché si l'extinction de la β III-t pouvait conduire à un ralentissement de la migration cellulaire.

La blessure est réalisée sur le tapis cellulaire à environ 80% de la confluence, puis des acquisitions régulières ont été faites jusqu'à 48h ([Figure 52A](#)). L'analyse quantitative montre un ralentissement significatif de la vitesse de comblement sur les cellules U87-si- β III-t à 36h (-15% ($p < 0.05$)) environ par rapport aux cellules U87-siScr. Cet effet n'est pas retrouvé à 48h ([Figure 52B](#)). En effet, nous avons vu dans la partie I.5 des résultats, la morphologie de ces cellules ne permet pas d'évaluer de façon précise le comblement de la blessure. En revanche, nous pouvons constater sur la [Figure 52A](#) que même si le comblement de la brèche des cellules U87-si- β III-t est comparable aux conditions U87 et U87-siScr, la densité cellulaire des cellules U87-si- β III-t semble inférieure aux contrôles.

Concernant la lignée GL15, nous observons un ralentissement du comblement de la brèche significatif à partir de 36h avec environ -25% ($p < 0.01$) de comblement comparé aux cellules GL15-siScr ([Figure 52A](#) et [Figure 52C](#)).

De façon surprenante, et malgré une absence de conséquences de l'inhibition de β III-t sur la prolifération et l'invasion des U251 ([Figure 48C](#) et [Figure 51](#)), nous observons un ralentissement du comblement de brèche significatif dès 24h (-48% ($p < 0.01$)) par rapport aux cellules U251-siScr) et cela jusqu'à 48h (-28% ($p < 0.01$)) comparé aux cellules U251-siScr) pour les cellules U251-si- β III-t ([Figure 52D](#)).

Afin de pouvoir déterminer si le comblement de la brèche est le résultat d’une migration et non d’une prolifération cellulaire, nous avons ensuite réalisé ces expériences en présence de mitomycine C à une concentration (1µg/µl) empêchant la prolifération cellulaire mais sans entraîner de mort cellulaire. Pour les trois lignées cellulaires, nous avons néanmoins observé une cytotoxicité dans de nombreux puits, ce qui ne nous a pas permis de mener l’expérience à son terme.

Dans le but d’expliquer comment l’extinction de la βIII-t conduit à un ralentissement de la prolifération, de l’invasion et du comblement de brèche sur, au moins, deux des trois lignées cellulaires de GB, nous avons étudié le cycle cellulaire après inhibition de la βIII-t.

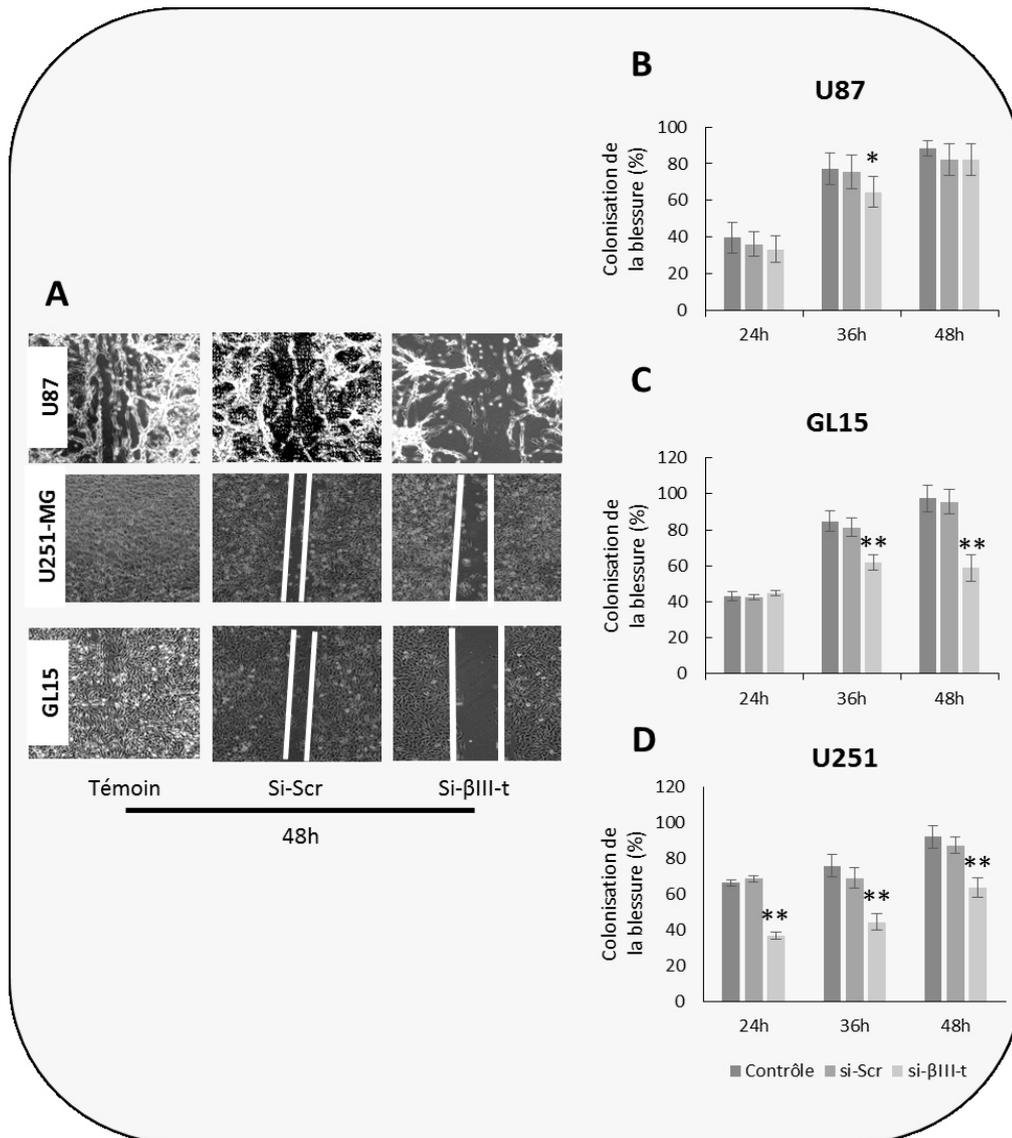


Figure 52 : Test de blessure réalisé sur les trois lignées cellulaires.

A. Photos illustratives des 3 statuts génétiques différents prises à 48h.

B. Quantification du test sur la lignée U87-MG

C. Quantification du test sur la lignée GL15

D. Quantification du test sur la lignée U251-MG

N=3 ; n=4. Analyse de variance à un facteur suivi d’un test de Tuckey. *P<0,05 ; **P<0,01

1.7. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur le cycle cellulaire

Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire montrent que des modifications du comportement cellulaire (prolifération, migration...) sont souvent reliées à une perturbation du cycle cellulaire et notamment, à une accumulation des cellules dans la phase G2/M (Pérès *et al.*, 2015).

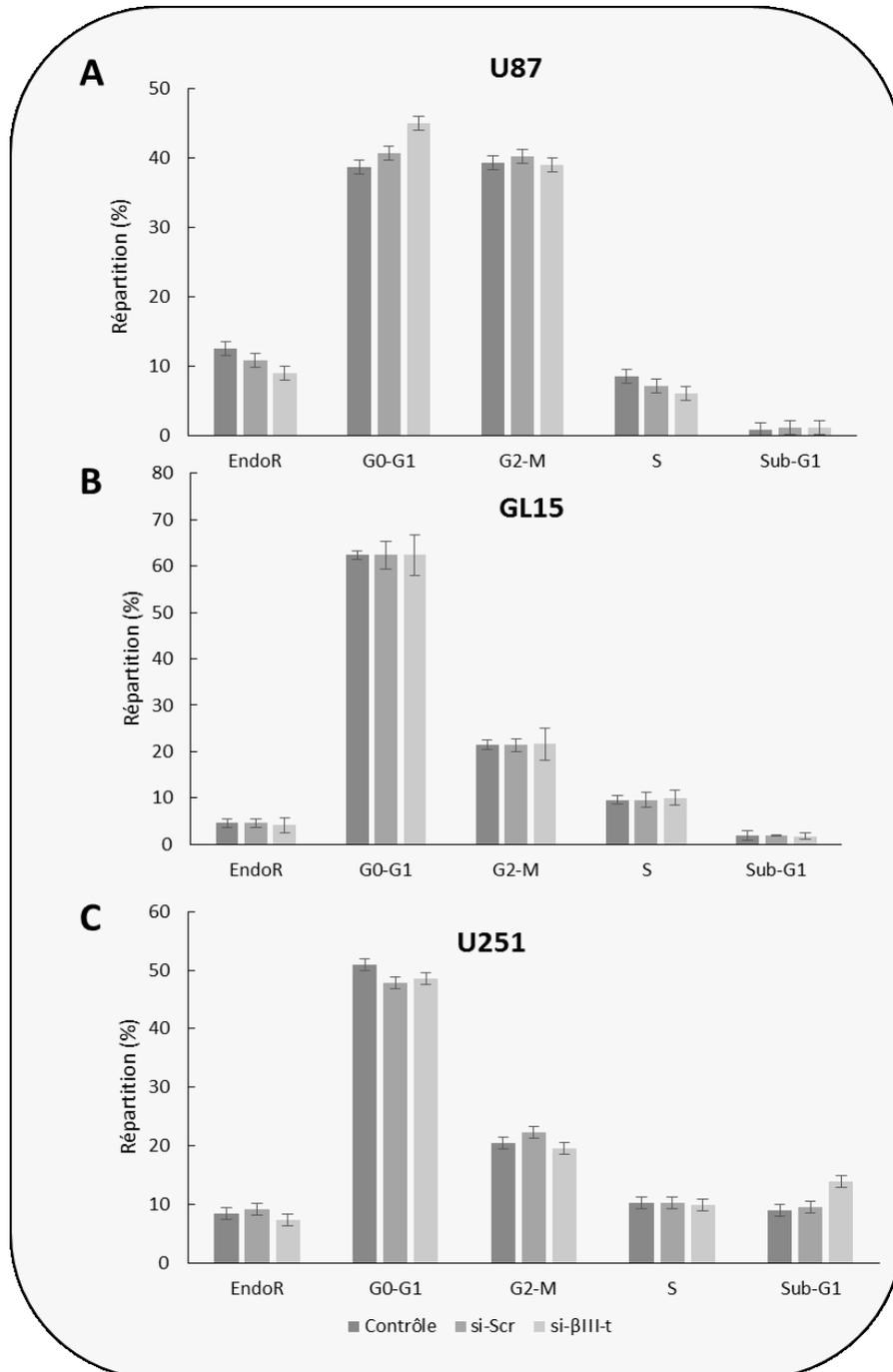


Figure 53 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire après transfections aux siARN. Répartition des cellules U87 (A), GL15 (B) et U251 (C) dans les différentes phases du cycle cellulaire.

La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a donc été quantifiée par cytométrie en flux. Après 48h d'exposition aux siARN, l'ADN des cellules a été marqué au iodure de

propidium En effet, nous savons que l'extinction de la β III-t est maximale 48h après la transfection (Partie I.3 des résultats). De façon inattendue, l'extinction de la β III-t ne modifie pas significativement le cycle cellulaire après 48h de transfection aux siARN (si- β III-t et siScr) dans les trois lignées cellulaires ([Figure 53](#)). Ces résultats indiquent que les changements induits par l'inhibition de la β III-t sur la prolifération, l'invasion et la migration cellulaires ne sont pas imputables à des modifications du cycle cellulaire.

I.8. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la morphologie cellulaire

La β III-t est un constituant des microtubules dont l'importance sur les propriétés cellulaires (mitose, adhésion, migration, forme cellulaires...) a été souligné plus haut. C'est pourquoi nous avons recherché si l'extinction de la β III-t pouvait conduire à un changement de la morphologie cellulaire qui pourrait expliquer les résultats obtenus précédemment.

Les expériences de transfection initiales pour valider l'extinction de β III-t avec des siARN avaient suggéré un changement de morphologie cellulaire sur les trois lignées avec un étalement plus important des cellules. Ici, nous avons cherché à confirmer et à quantifier cette observation initiale en mesurant l'aire cellulaire moyenne.

Les images présentées sur la [Figure 54A](#) montrent que les cellules transfectées par des si- β III-t ont un aspect plus étalé et sont en moyenne plus grandes que les cellules si-Scr ou non transfectées. Cette observation est particulièrement évidente sur les GL15. Une quantification de l'aire cellulaire a été effectuée sur au moins 30 cellules réparties sur l'ensemble de la surface du puits. Elle montre qu'une inhibition de la β III-t entraîne une augmentation significative de la surface cellulaire pour les trois lignées.

La grandeur des écart-types montre une hétérogénéité importante des tailles cellulaires sur une même population. Cela est sans doute un reflet de l'efficacité des transfactions qui ne concerne pas l'ensemble de la population cellulaire. Cette observation est la même sur nos trois lignées cellulaires ([Figure 54B](#)).

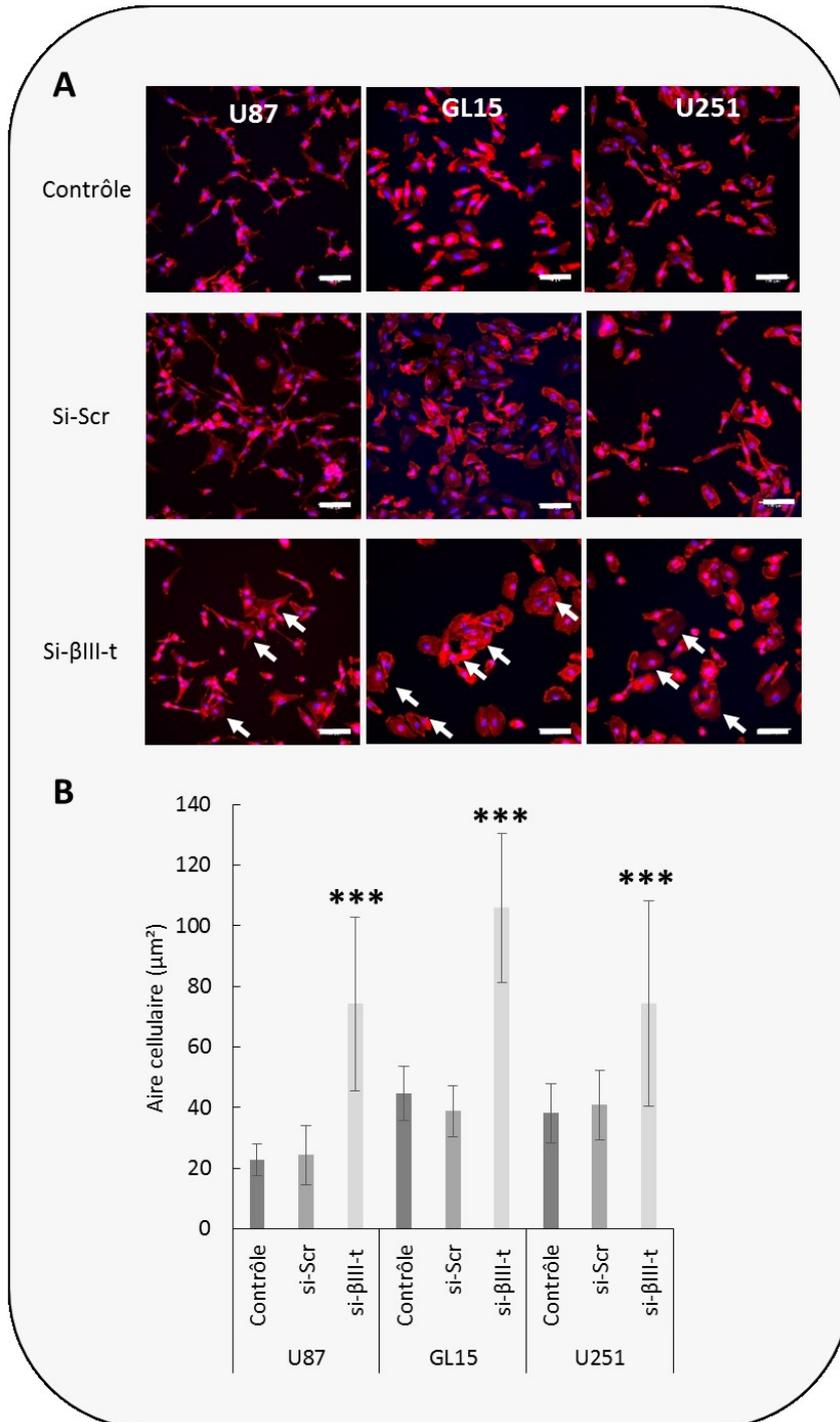


Figure 54 : Etude de la morphologie des trois lignées cellulaires de GB 48h après transfection par les siARN indiqués

A. Illustrations des cellules marquées à la phalloïdine (rouge) et au réactif de Hoechst 33342 (bleu). Barre d'échelle : 100 μM

B. Quantification de l'aire cellulaire n=30 ***P<0,001 Test de Kruskal-Wallis

1.9. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la sensibilité des cellules de glioblastomes aux chimiothérapies

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes intéressés à la résistance des GB pour les traitements conventionnels. En effet, nous avons vu dans l'étude bibliographique que ces tumeurs sont très résistantes aux traitements chimio- et radiothérapeutiques. De plus, il semble que cette résistance pourrait être liée en partie à la surexpression de la β III-t.

Les cellules transfectées ont été exposées pendant 72h à deux traitements chimiothérapeutiques : le témozolomide (TMZ) à une concentration de [100] μ M ou le cabazitaxel (Caba) et ce en conditions normoxiques ou hypoxiques (1% d'O₂). Le Caba a été testé sur les lignées cellulaires à différentes concentrations allant de [0,1] à [10] nM. Nous avons constaté que ce traitement provoquait une mort cellulaire supérieure à 95% à partir de [1] nM. C'est pourquoi les doses choisies pour cette étude sont [0,1] et [0,5] nM. Les résultats obtenus sur les cellules si-Scr et si- β III-t sur les 3 lignées sont exprimés en pourcentage par rapport à la condition contrôle qui est fixée à 100%.

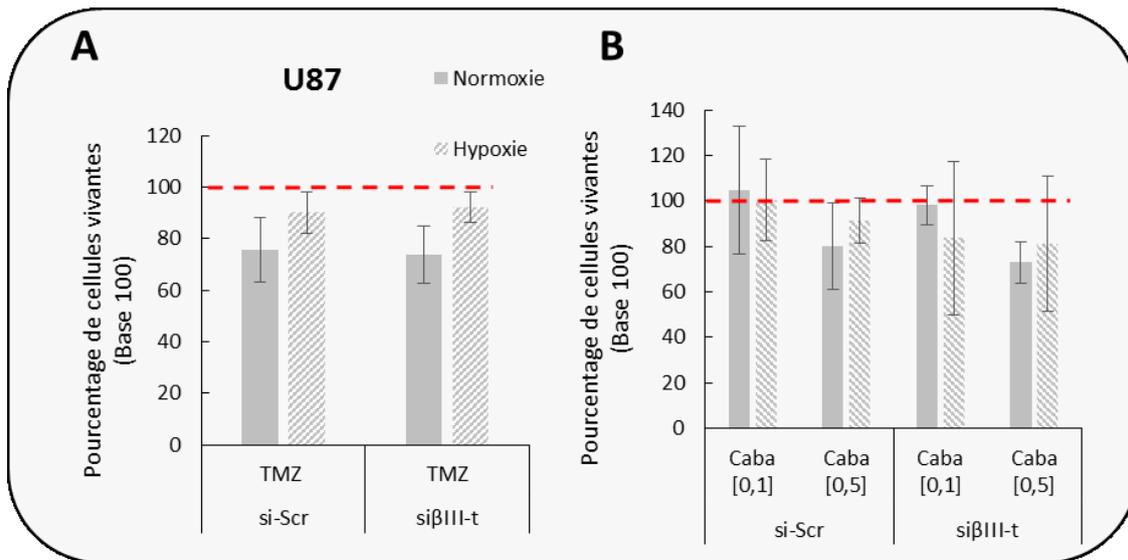


Figure 55 : Analyse de la chimiorésistance sur la lignée U87-MG.

A. Après 72h d'exposition au témozolomide (TMZ).

B. Après 72h d'exposition à deux concentrations de cabazitaxel (Caba) [0,1] nM et [0,5] nM

L'analyse de l'exposition aux différents traitements montre, d'une part, qu'il n'y a aucune différence d'efficacité du TMZ entre les cellules transfectées ou non avec les si- β III-t que cela soit en normoxie ou en hypoxie (Figure 55A). Le caba à [0,1] nM et à [0,5] nM ne montre aucune différence significative par rapport aux cellules non traitées et entre les cellules transfectées ou non avec les si- β III-t (Figure 55B).

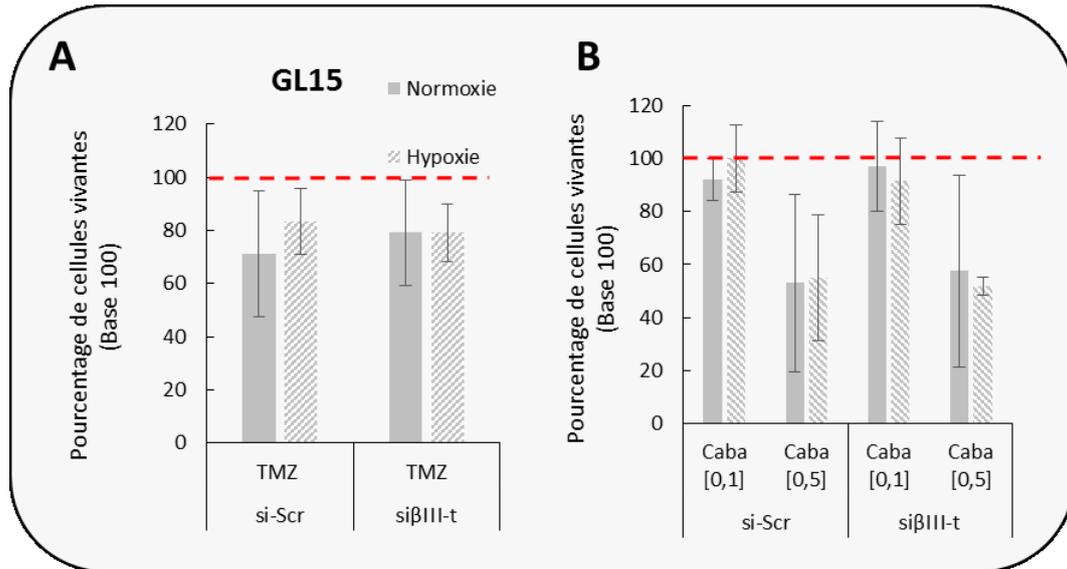


Figure 56 : Analyse de la chimiorésistance sur la lignée GL15.
 A. Après 72h d'exposition au témozolomide (TMZ)
 B. Après 72h d'exposition à deux concentrations de cabazitaxel (Caba) [0,1] nM et [0,5] nM

L'analyse de l'exposition au TMZ ne montre aucune différence d'efficacité entre les cellules GL15-si-Scr et GL15-si-βIII-t que cela soit en normoxie ou en hypoxie (Figure 56A). Concernant l'exposition au Caba, comme pour la lignée U87MG, nous n'observons aucune différence d'efficacité aux deux concentrations que les cellules soient transfectées aux si-βIII-t ou non (Figure 56B).

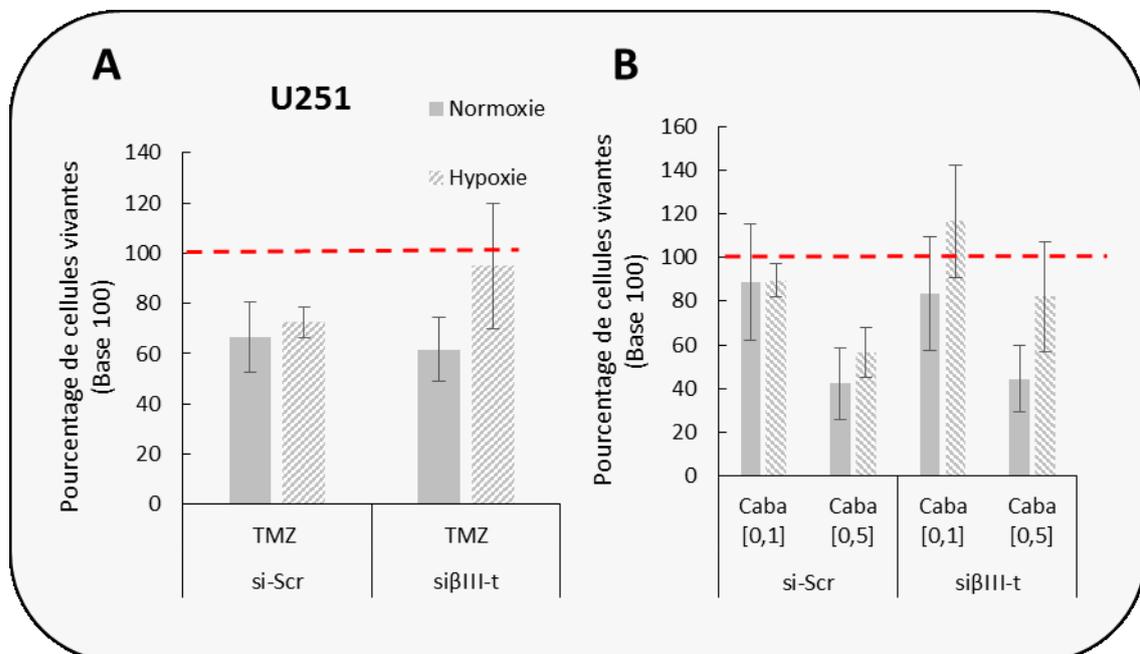


Figure 57 : Analyse de la chimiorésistance sur la lignée U251-MG.
 A. Après 72h d'exposition au témozolomide
 B. Après 72h d'exposition à deux concentrations de cabazitaxel [0,1] nM et [0,5] nM

L'analyse de l'exposition au TMZ montre aucune différence d'efficacité entre les cellules U251-si-Scr et U251-si- β III-t en normoxie ou en hypoxie (Figure 57A). Concernant l'exposition au Caba, comme pour les deux autres lignées, nous n'observons aucune différence d'efficacité en normoxie et en hypoxie aux deux concentrations entre les cellules U251-si-Scr et U251-si- β III-t (Figure 57B).

Ces données montrent que malgré l'efficacité propre des différentes chimiothérapies, la β III-t ne semble pas jouer un rôle fondamental dans la résistance aux traitements. En effet, que cela soit en normoxie ou en hypoxie, l'inhibition de la β III-t ne sensibilise pas les lignées cellulaires au TMZ ou au Caba.

I.10. Etude *in vitro* de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la sensibilité des cellules de glioblastomes à la radiothérapie

Afin de déterminer l'impact de la β III-t sur la radiosensibilité des cellules de GB, une analyse de la cytotoxicité des rayons X (RX), évaluée par test clonogénique, a été réalisée sur les cellules modifiées ou non génétiquement. Le test de clonogénicité vise à évaluer la capacité des cellules à former des colonies après des doses d'irradiation croissantes aux RX. Ce test a été effectué sur deux des trois lignées cellulaires de GB. En effet, les cellules U87 n'ont pas la capacité à former des colonies dans nos conditions expérimentales. Les lignées GL15 et U251,ensemencées à très faible densité (500 cellules/puits) et cultivées en condition de normoxie (21% O₂) ou d'hypoxie (1% O₂), ont été exposées à des doses croissantes de RX (0 à 8 Gy). Après irradiation, ces cellules sont remises en culture pendant une semaine, toujours en atmosphère de normoxie ou d'hypoxie. Les cellules ayant survécu à l'irradiation se développent en formant des colonies comme illustré sur la Figure 58.

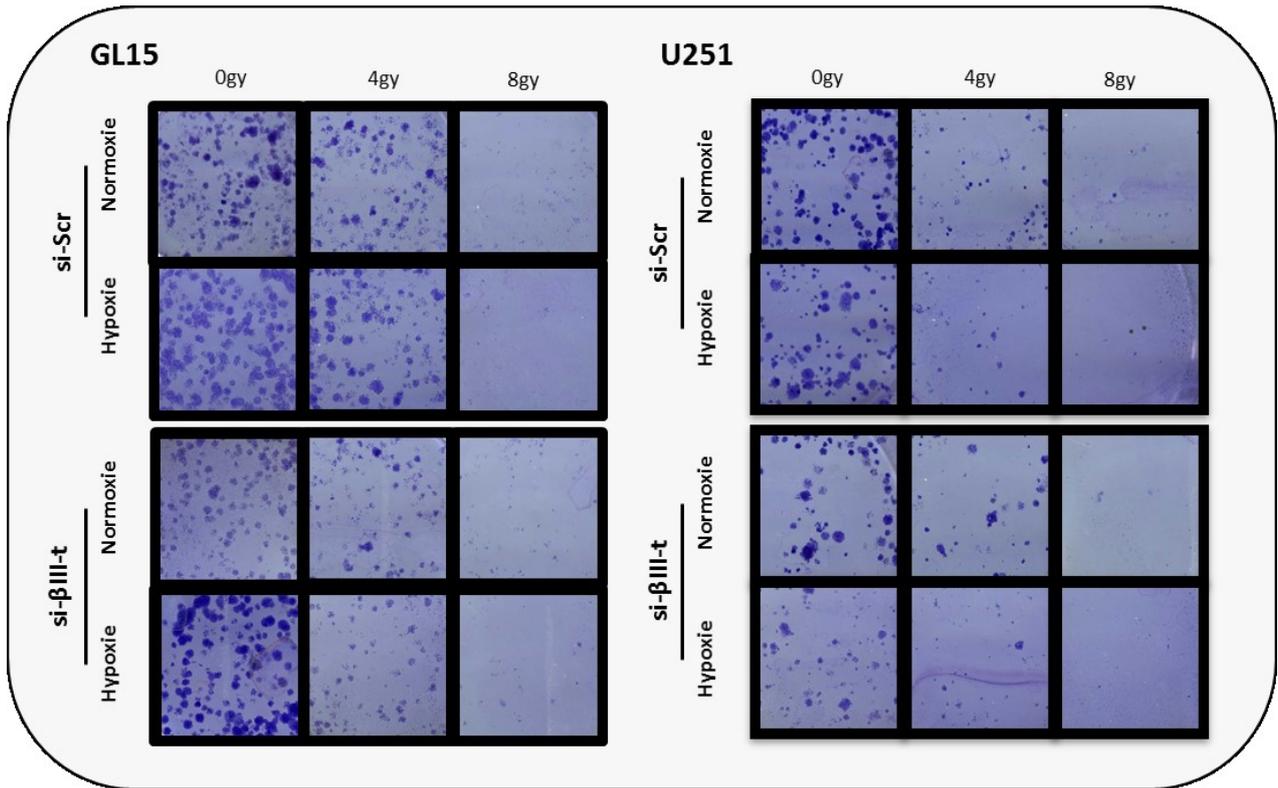


Figure 58 : Illustration des colonies obtenues 7 jours après l'irradiation des cellules à des doses de 0 à 8 Gy.

La quantification du nombre de colonies en fonction de la dose d'irradiation permet ainsi d'établir les courbes de survie pour chaque type cellulaire (Figure 59 et Figure 60).

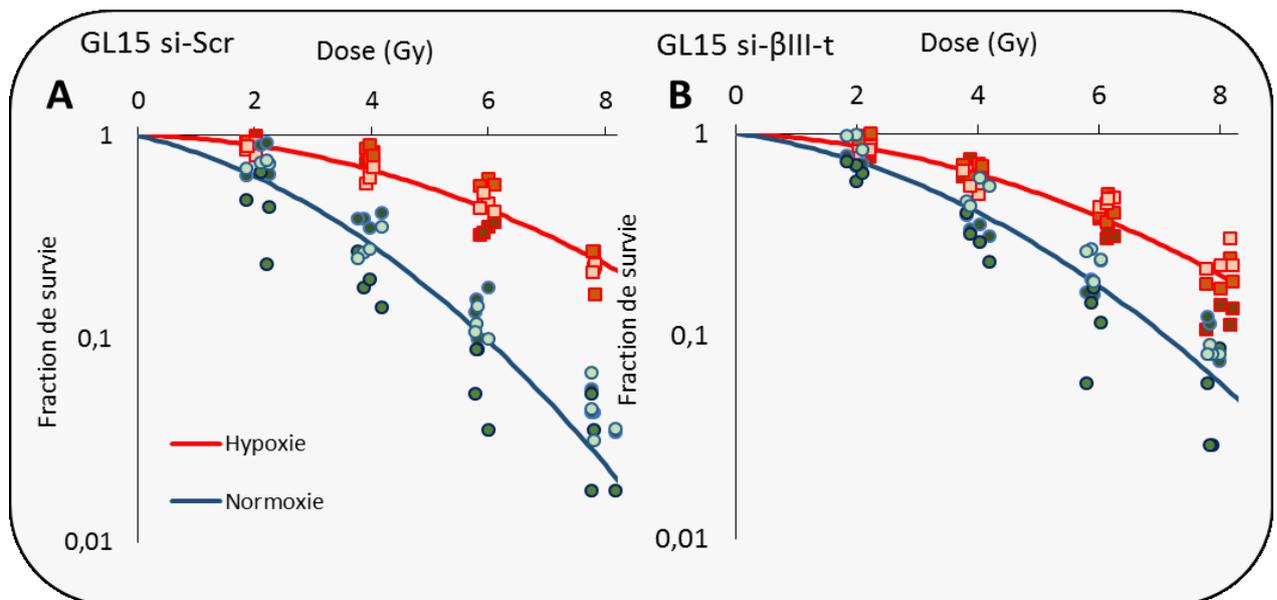


Figure 59 : Effets de l'irradiation par RX sur la survie des cellules GL15-siScr et GL15-siβIII-t.

A. Courbes de survie en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleue) des cellules GL15-siScr

B. Courbes de survie en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleue) des cellules GL15-siβIII-t.

En condition de normoxie, les courbes de survie obtenues semblent montrer une résistance plus élevée des cellules GL15-si-βIII-t comparée aux cellules GL15-siScr. Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative. Lorsque ces cellules sont placées à 1% d'O₂ avant et après l'exposition aux RX, l'analyse des courbes de survie montre que l'hypoxie est un facteur de résistance sur cette lignée cellulaire. L'induction d'une résistance par l'hypoxie, bien connu sur d'autres lignées, n'avait, à notre connaissance, n'a pas été documentée sur les cellules GL15. De plus, comme en normoxie, aucune différence significative n'est observée entre les cellules GL15-siScr et GL15-si-βIII-t (Figure 59). Ces données montrent que la sensibilité des cellules GL15 à l'irradiation n'est pas modifiée par l'extinction de la βIII-t.

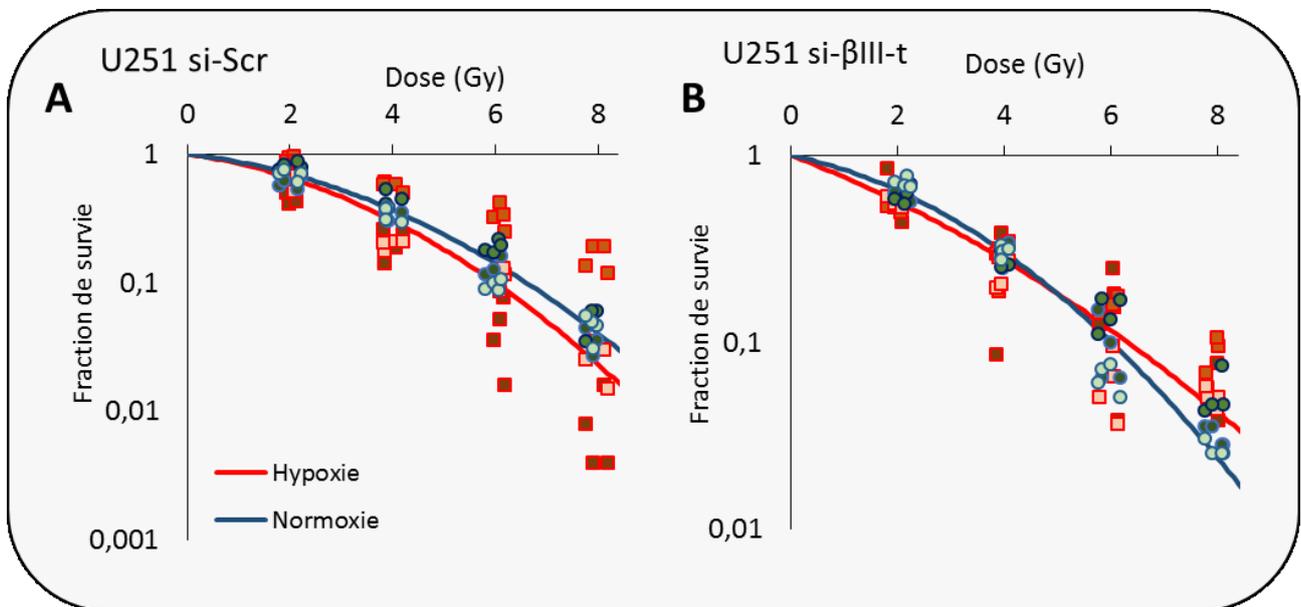


Figure 60 : Effets de l'irradiation par RX sur la survie des cellules U251-siScr et U251-si-βIII-t.
 A. Courbes de survie en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleue) des cellules U251-siScr
 B. Courbes de survie en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleue) des cellules U251-si-βIII-t

En revanche, dans nos conditions expérimentales, la résistance liée à l'hypoxie n'est pas observée sur les cellules U251, que la βIII-t soit inhibée ou non. Ce résultat est très surprenant et ne confirme pas des données obtenues préalablement sur ce même type cellulaire au laboratoire (Pères *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'inactivation de la βIII-t ne modifie pas la sensibilité des cellules U251 par rapport à l'irradiation aux rayons X, quelle que soit la dose (Figure 60).

L'interprétation des courbes de survie est confirmée par la quantification des différents paramètres radiobiologiques (Tableau 11). Ces paramètres sont calculés à partir des représentations graphiques obtenues pour chacune des lignées, avec l'équation $SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ qui correspond au

modèle quadratique généralement utilisé pour ce type d'irradiation. Elle permet de calculer 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*) pour les cellules cultivées en normoxie ou en hypoxie. Ce dernier paramètre, lorsqu'il est supérieur à 1, indique que l'hypoxie induit une radiorésistance sur les cellules.

La SF2 est le paramètre de radiobiologie le plus fréquemment utilisé pour comparer la sensibilité des différentes populations 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 ainsi 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 d' « effet oxygène », l'OER est calculé en faisant le rapport entre les doses d'irradiation délivrées en normoxie et en hypoxie. Ainsi, dans notre étude, l'OER est déterminé par le rapport suivant : OER = D37 hypoxie / D37 normoxie.

Tableau 11 : Paramètres radiobiologiques de SF2, D37 et OER obtenus à partir de l'équation de chaque courbe correspondante ($SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$). Moyenne \pm EC ; N=3, n=3

		SF2		D37		OER (D37)
		Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Hypoxie	
GL15	si-Scr	64,6 \pm 16,6	89,5 \pm 3,3	3,45 \pm 0,86	6,64 \pm 0,75	2,05 \pm 0,81
	si- β III-t	73,4 \pm 10,7	86,8 \pm 5,2	4,3 \pm 0,71	6,22 \pm 0,39	1,46 \pm 0,23
U251	si-Scr	71 \pm 9,2	67,6 \pm 2	3,99 \pm 0,48	3,87 \pm 1,61	0,94 \pm 0,27
	si- β III-t	65,2 \pm 6,1	56,7 \pm 3,2	3,54 \pm 0,08	3,25 \pm 0,23	0,91 \pm 0,08

Les données présentées dans le Tableau 11 traduisent quantitativement les observations faites sur les courbes de survie. La radiorésistance liée à l'hypoxie est évidente pour les cellules GL15-siScr (OER = 2,05) et à un degré inférieur pour les cellules GL15-si- β III-t (OER = 1,46). En revanche, l'OER proche de 1 ne montre aucune radiorésistance induite par l'hypoxie pour les cellules U251-siScr ou U251-si- β III-t.

Enfin, les valeurs de SF2 et de D37 présentées dans le Tableau 11 montrent que l'extinction de la β III-t ne modifie pas la sensibilité des cellules à la RT, quel que soit le type cellulaire. Les cellules GL15-si- β III-t semblent même plus résistantes que les GL15-siScr (D37 = 4,3 vs 3,45 respectivement) en conditions normoxiques. Cette différence n'est néanmoins pas statistiquement significative. Par ailleurs, cette tendance n'est pas observée en conditions hypoxiques.

Comme pour la chimiothérapie, ces résultats ne semblent donc pas désigner la β III-t comme étant une cible pertinente pour limiter la radiorésistance des lignées de GB aux RX, que cela soit en normoxie ou en hypoxie.

I.11. Etude *in vivo* de l'effet de l'inhibition de la β III-t sur la croissance tumorale et la survie des animaux

L'ensemble des expériences réalisées *in vitro* a montré un rôle important de la β III-t sur certains paramètres tumoraux (prolifération, invasion et migration cellulaires) des GB sur deux des trois lignées de GB utilisées (U87MG et GL15). C'est pourquoi il nous a semblé intéressant d'explorer le rôle de la β III-t dans le développement tumoral dans un modèle *in vivo* de GB. Pour cela, nous avons choisi un modèle orthotopique d'implantation de cellules U87 en région intra-striatale chez la souris *nude* (Figure 61).

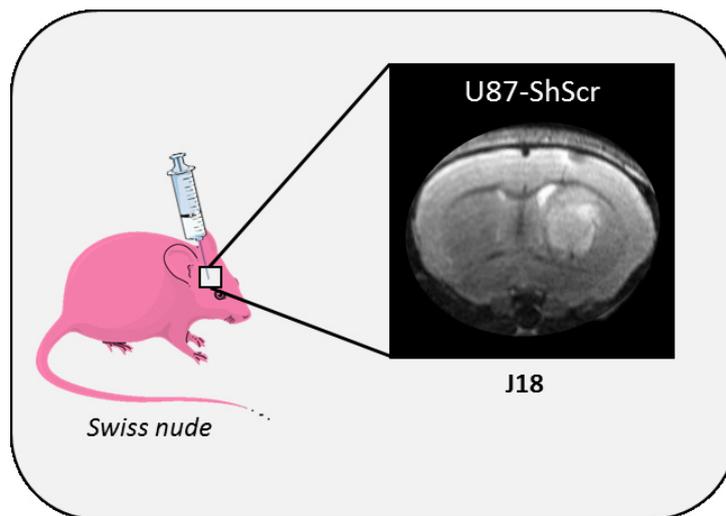


Figure 61 : Tumeur issue de l'implantation intra-striatale de cellules U87-ShScr.

Imagerie T2 à J18 post implantation chez une souris *Swiss nude*.

Les cellules U87-sh- β III-t, ainsi que les U87-shScr, ont été implantées dans le striatum de souris *nude* et une étude longitudinale par IRM T2 pondérée (T2w, IRM 7T) a été réalisée. Cette étude a permis d'évaluer l'effet de l'extinction de la β III-t sur la croissance tumorale et sur la survie des animaux (Figure 62).

Les images obtenues par IRM montrent pour les deux groupes des tumeurs très denses, les cellules U87MG étant connues pour avoir une composante proliférative élevée *in vivo* (Figure 62A).

Les mesures de volume tumoral faites à partir des données d'imageries ([Figure 62A](#)) montrent que l'extinction de la β III-t induit un retard de la croissance tumorale significatif dès 23 jours ([Figure 62B](#)) avec un retard d'environ une semaine. Les tumeurs U87-sh- β III-t sont ainsi moins agressives que les tumeurs U87-shScr. En accord avec les résultats obtenus sur la croissance tumorale ([Figure 62A](#) et [Figure 62B](#)), les courbes de Kaplan-Meier montrent que la médiane de survie des animaux est significativement augmentée de 8 jours ([Figure 62C](#)). L'augmentation de la survie des animaux pour le groupe U87-sh- β III-t semble bien être corrélée avec un volume tumoral significativement diminué par rapport au groupe témoin (U87-shScr).

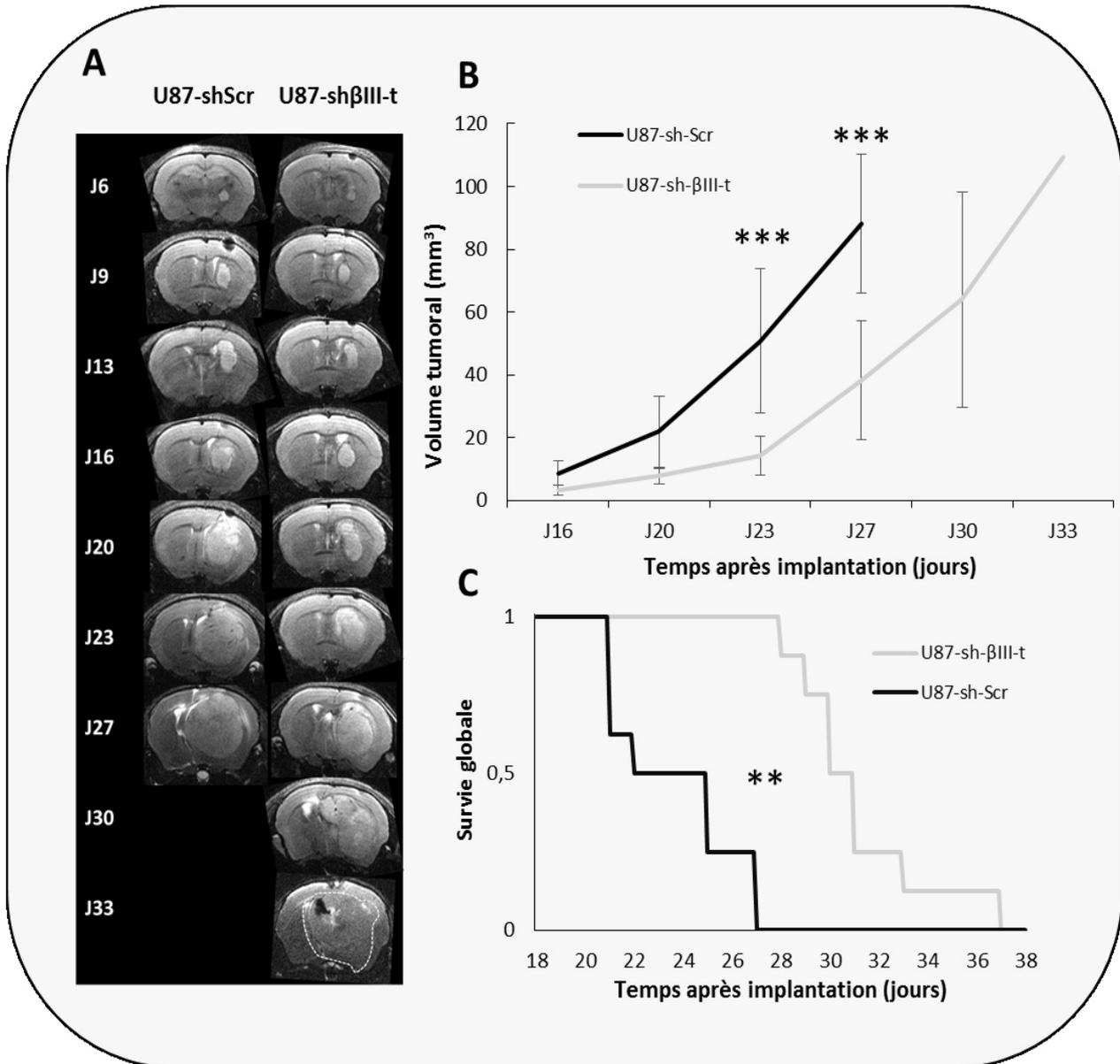


Figure 62 : L’inhibition de la βIII-t retarde la croissance tumorale des cellules U87 implantées dans le striatum de souris *nude*.

A. Imageries pondérées T2w des groupes U87-shScr et U87-shβIII-t (n=8).

B. Etude longitudinale par IRM des volumes tumoraux (mm³). *** P<0,005 [HSD de Tukey après une ANOVA à 2 facteurs (groupes et temps) significative]

C. Courbes de survie de Kaplan-Meier des souris implantées (n=8 par groupes) ** P<0,01

En résumé, les tumeurs issues de l’implantation de cellules U87-sh-βIII-t ont une croissance significativement plus lente et confèrent aux animaux une survie globale significativement améliorée.

I.12. Etude immunohistologique des tumeurs en fin de croissance

Une fois que les animaux ont atteint leur limite de perte de poids (10% de perte de poids maximal), les cerveaux ont été prélevés afin de réaliser une étude immunohistologique de différents paramètres permettant de caractériser les tumeurs. Cette étude a été réalisée sur des tumeurs de fort volume issues d'animaux dont le suivi de la croissance tumorale par IRM n'a pas pu être réalisé pour des raisons techniques.

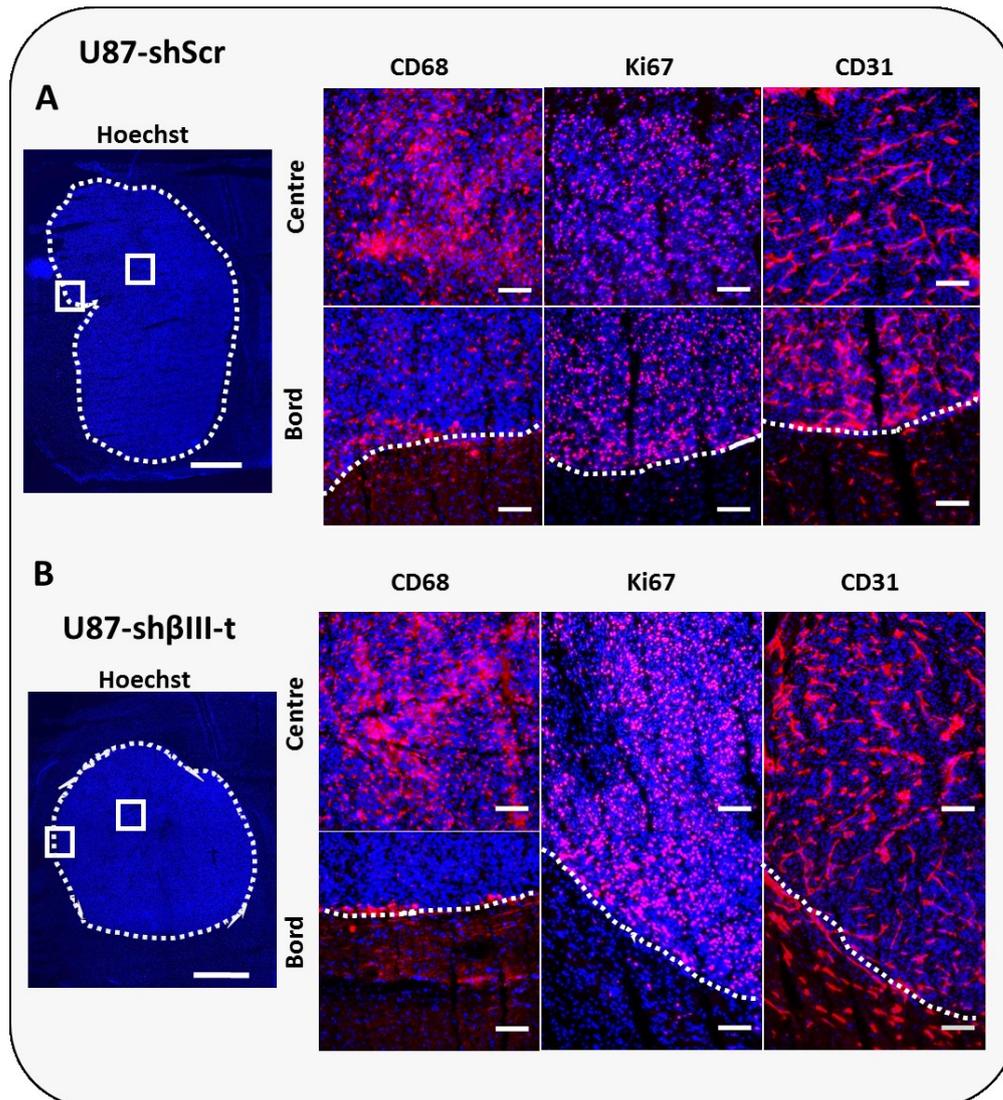


Figure 63 : Etudes immunohistologiques de l'inflammation (CD68), de la prolifération (Ki67) et de la vascularisation (CD31) de tumeurs U87-shScr et U87sh-βIII-t

A. Panel représentatif du groupe U87-shScr.

B. Panel représentatif du groupe U87sh-βIII-t.

Barres d'échelles : photos Hoechst : 1000 μm ; Autres photos : 100 μm

La Figure 63 illustre les caractéristiques de l'inflammation, de la prolifération et de la vascularisation. Ces paramètres sont mis en évidence par les marqueurs CD68 pour l'inflammation,

Ki67 pour la prolifération et CD31 pour la composante vasculaire. Dans un premier temps, le marquage des noyaux cellulaires par le réactif de Hoechst permet de visualiser la forte densité cellulaire ainsi que la différence de volume observé en IRM ([Figure 62A](#)). Malgré les différences de volume et de survie constatées entre les groupes U87-shScr et U87-sh β III-t, les trois paramètres (inflammation, prolifération et vascularisation) illustrés dans la [Figure 63](#) ne montrent pas de différence significative entre ces deux groupes. En effet, si l'immunodétection de la réaction inflammatoire est plus intense au centre qu'au bord de la tumeur, cette caractéristique est identique pour les deux groupes d'animaux ([Figure 63A et B](#)). Les tumeurs issues de l'implantation de cellules U87MG sont des tumeurs très prolifératives et souvent utilisées pour l'étude de stratégies anti-angiogéniques (Jacobs *et al.*, 2011a). En accord avec la description des caractéristiques retrouvées dans la littérature, les tumeurs des groupes U87-shScr et U87- β III-t ne montrent pas de différence significative de prolifération et d'arborescence vasculaire. En effet, on peut observer une forte immunodétection de la prolifération au cœur comme sur les bords de la tumeur dans les deux groupes. De même pour la composante vasculaire, on observe une forte densité vasculaire caractéristique de ces tumeurs et qui ne diffère pas dans les deux groupes de notre étude.

Nous avons aussi cherché si les tumeurs U87-shScr et U87- β III-t présentaient des différences pour trois autres cibles : la β III-t, la présence de cellules souches (CD133) ainsi que la composante hypoxique. L'hypoxie est détectée après une injection intrapéritonéale de pimonidazole 2h avant le prélèvement des cerveaux des animaux puis révélée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le pimonidazole (Corroyer-Dulmont *et al.*, 2013).

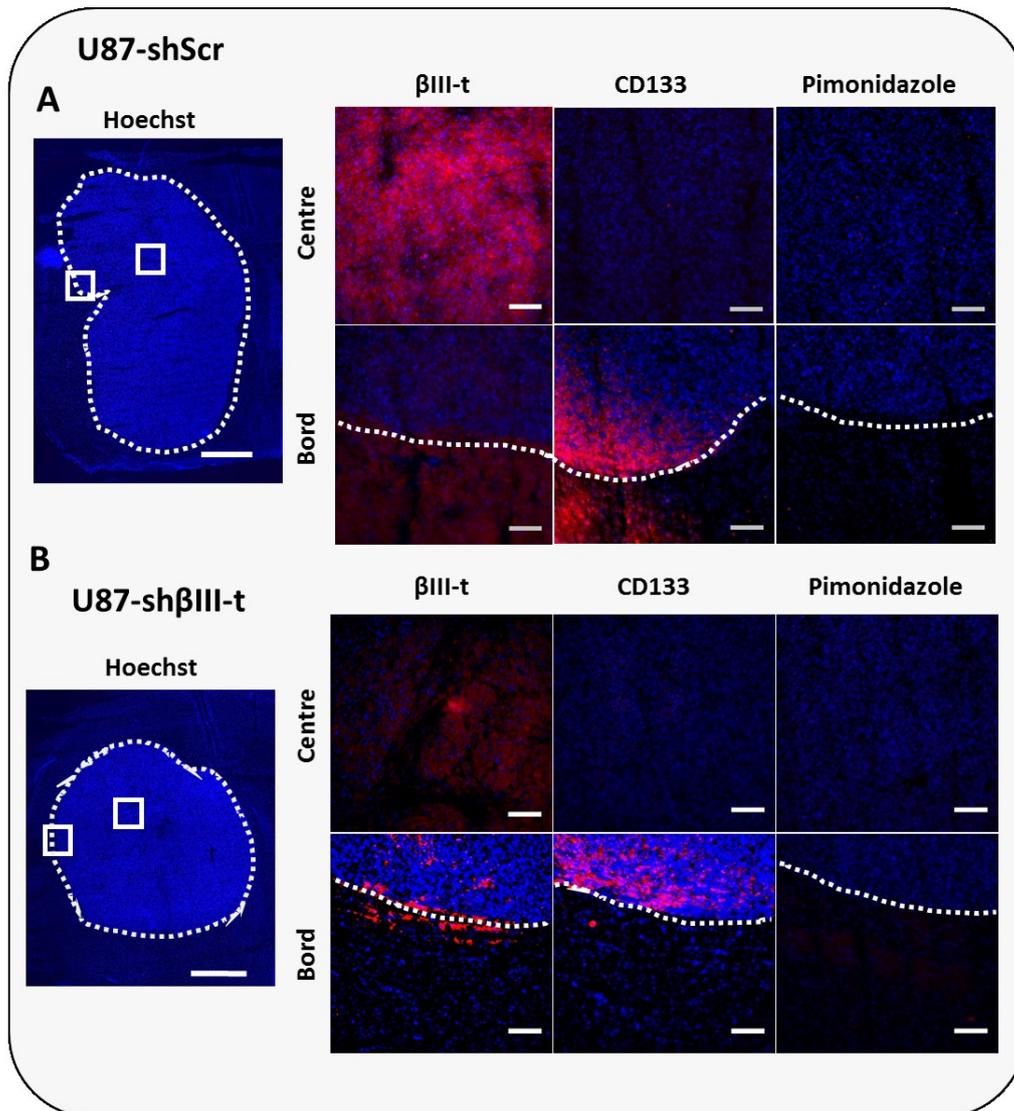


Figure 64 : Etudes immunohistologiques de la β III-t, d'un marqueur de cellules souches (CD133) et de l'hypoxie (Pimonidazole) de tumeurs U87-shScr et U87sh- β III-t

A. Panel représentatif du groupe U87-shScr.

B. Panel représentatif du groupe U87sh- β III-t.

Barres d'échelles : photos Hoechst : 1000 μ m ; Autres photos : 100 μ m

Comme pour les trois premiers paramètres étudiés, l'immunodétection du marqueur de cellules souches (CD133) et de l'hypoxie ne montre aucune différence entre les deux groupes. En effet, un fort immunomarquage de cellules souches est détecté en périphérie de la tumeur dans nos deux groupes alors que nous n'observons pratiquement aucun marquage dans le centre de la tumeur ([Figure 64A](#) et [B](#)). En accord avec les données de la littérature sur l'implantation de tumeurs issue de cellules U87MG, nous n'observons aucune région hypoxique que ce soit au centre ou au bord de la tumeur et cela pour les deux groupes. La lignée U87MG est, en effet, connue pour présenter une composante

très proliférative mais peu hypoxique *in vivo* (Jacobs *et al.*, 2011*b*). Cela est confirmé dans cette étude et par la densité vasculaire élevée observée ci-dessus dans les deux groupes. Enfin, la figure 64 montre une différence importante entre les deux groupes pour l'immunodétection de la β III-t. En effet, on remarque un marquage intense au centre de la tumeur dans le groupe U87-shScr par rapport au groupe U87-sh- β III-t malgré l'apparition de quelques spots en périphérie de la tumeur dans le groupe U87-sh- β III-t. Cette observation confirme que l'extinction de la β III-t dans les cellules U87-sh- β III-t a été maintenue et est toujours importante en fin d'expérience, plus de 3 semaines après l'implantation intracrânienne. Néanmoins, l'ensemble des résultats de cette étude montre que l'extinction de la β III-t ne modifie pas de manière significative les paramètres histologiques étudiés (inflammation, prolifération, vascularisation, cellules souches et hypoxie).

II. Recherche de ligands spécifiques de HIF-2 α

II.1. Caractérisation des ligands *in silico*

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique (partie I.5.2), les GB sont des tumeurs qui possèdent un fort index prolifératif. Cette croissance rapide va conduire à l'apparition de zones hypoxiques caractéristiques des GB. Le rôle de l'hypoxie et en particulier celui de HIF-2 α semble être d'une importance cruciale au sein de ces tumeurs. De plus, HIF-2 α préférentiellement stabilisé dans des zones d'hypoxie chronique est impliqué dans le maintien du phénotype des cellules souches cancéreuses. D'autre part, HIF-2 α a été décrit comme facteur de mauvais pronostic chez les patients. Par ailleurs, nous avons pu constater que HIF-2 α est corrélé significativement à la β III-t (Tableau 10).

Les données concernant HIF-2 α et son implication probable dans les GB nous ont conduit à rechercher des ligands spécifiques de cette isoforme afin d'inhiber sa dimérisation et son activité transcriptionnelle (Figure 65).

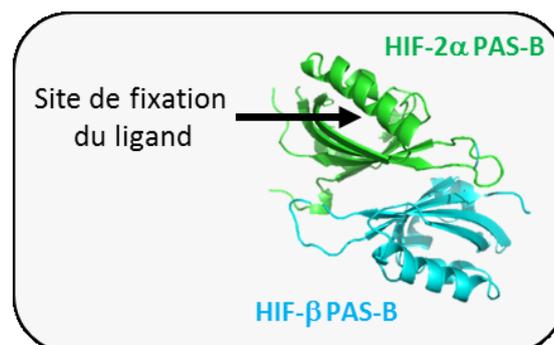


Figure 65 : Structures cristallographiques des domaines PAS-B de HIF-2 α et HIF 1 β nécessaires à la dimérisation du complexe.

Des travaux antérieurs, réalisés au sein de l'équipe, ont visé à identifier *in silico* de nouveaux composés pouvant se lier dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α (flèche noire, Figure 65). Tout d'abord, cette recherche a été réalisée à partir des ligands issus de la littérature connus pour se fixer dans cette cavité et inhiber l'activité transcriptionnelle de HIF-2 (Scheuermann *et al.*, 2013). Les différentes contraintes physico-chimiques nécessaires à la liaison des composés dans la cavité ont pu être caractérisées. Ceci a permis d'optimiser les paramètres de docking qui permettent de retrouver la position des ligands dans la cavité, et de les classer dans l'ordre de leurs affinités expérimentales.

Ensuite, un criblage virtuel de la chimiothèque du CERMN a été effectué en dockant les 10 000 molécules de cette collection dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α .

Ces travaux ont permis de sélectionner les 7 meilleurs composés quant à leurs capacités à se fixer dans la cavité et pour leurs affinités théoriques (Figure 66).

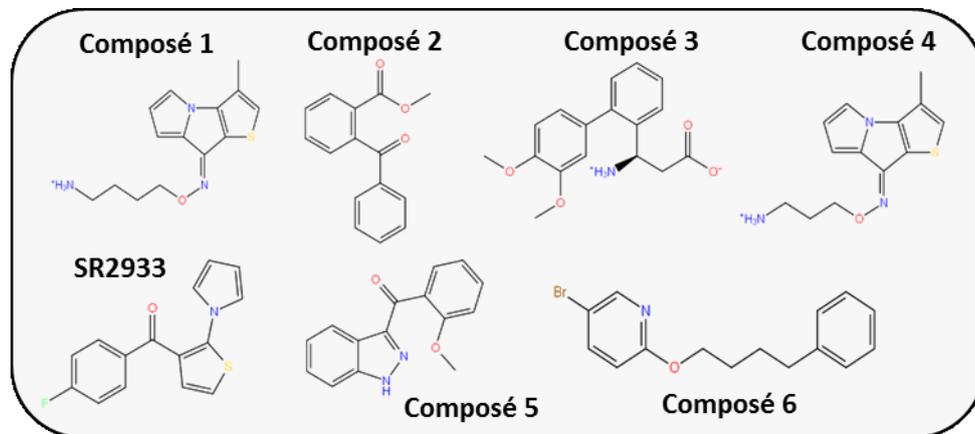


Figure 66 : Les 7 composés retenus après le criblage virtuel des 10 000 molécules issues de la chimiothèque du CERMN dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α

Par la suite, nous avons évalué de manière indirecte l'effet de ces composés sur l'activité transcriptionnelle de HIF-2 α , au travers de l'expression des ARNm de la β III-t, qui est un gène cible spécifique de HIF-2 α , dans les deux lignées cellulaires, GL15 et U87MG.

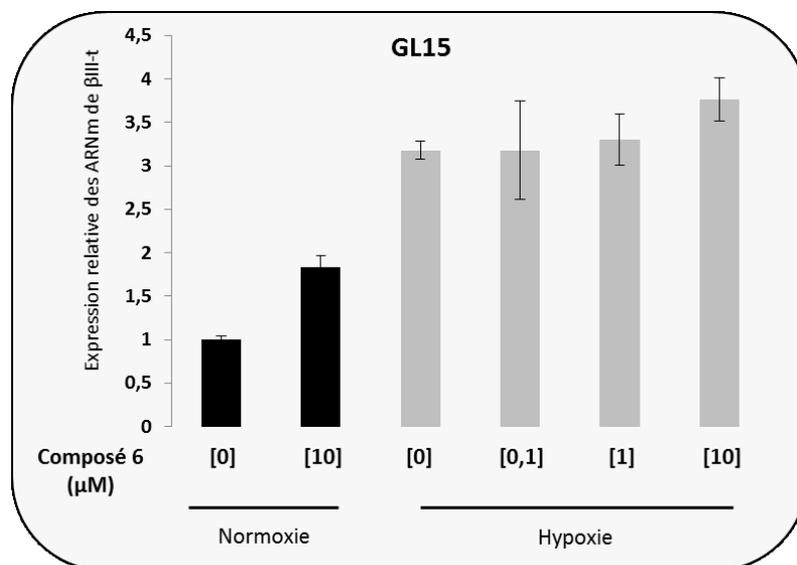


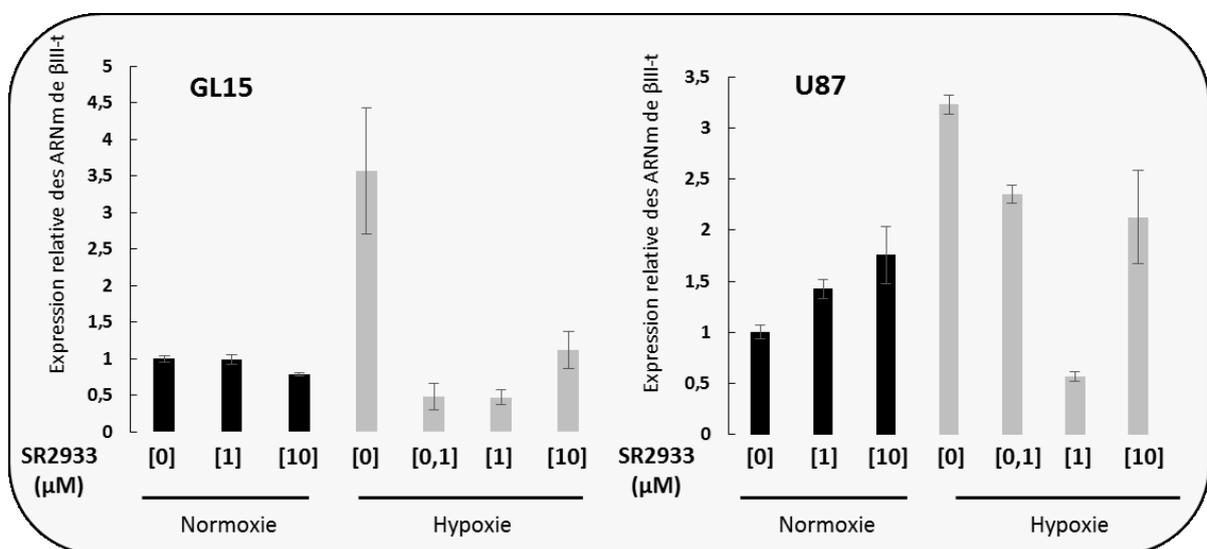
Figure 67 : Etude par qPCR de l'expression des ARNm de β III-t obtenus sur la lignée GL15 après l'exposition du composé 6 pendant 18h en normoxie ou en hypoxie.

(N=1 ; n=3 moyenne \pm E-T)

Quatre des composés testés (Composés 2, 3, 5 et 6 ; Figure 66) ont montré un profil de qPCR comparable à celui présenté ci-dessus (Figure 67). De plus, ce profil est très similaire dans les deux lignées cellulaires. D'une part, ces composés ont tous une activité propre en normoxie avec une

tendance à surexprimer des ARNm de β III-t. D'autre part, aucune inhibition de l'induction de l'ARNm de la β III-t n'est observée en hypoxie quelle que soit la concentration.

Deux des composés testés (composé 1 et 4 ; [Figure 66](#)) ont montré une inhibition de l'induction de l'ARNm de la β III-t en hypoxie dans les deux lignées, mais pas à toutes les concentrations testées (données non présentées). Le dernier composé testé est le SR2933. Ce composé a montré une inhibition de l'induction des ARNm de β III-t en hypoxie à toutes les concentrations sur la lignée GL15 et à la concentration de [1] μ M sur la lignée U87MG. De plus, cette molécule ne présente aucune activité propre en normoxie sur la lignée GL15 ([Figure 68](#)).



[Figure 68](#) : Etude par qPCR de l'expression des ARNm de β III-t obtenus sur les lignées GL15 et U87MG après l'exposition du composé SR2933 pendant 18h en normoxie ou en hypoxie
(N=1 ; n=3 moyenne \pm E-T)

Ce résultat a pu être confirmé au niveau protéique sur la lignée GL15. Il est intéressant d'observer que l'effet inhibiteur du SR 2933 est retrouvé aux doses [0,1], [1] et [10] μ M sur l'expression de la protéine de β III-t (-64% à 0,1 μ M ; -38% à 1 μ M ; -56% à 10 μ M par rapport au témoin hypoxique non traité ([Figure 69](#)). Dans la lignée U87MG, les effets de la molécule SR2933 sur l'induction de la β III-t au niveau protéique ont été trop aléatoires et non reproductibles. Ces résultats sur cette lignée n'ont donc pas pu être exploités dans les analyses en Western-Blot.

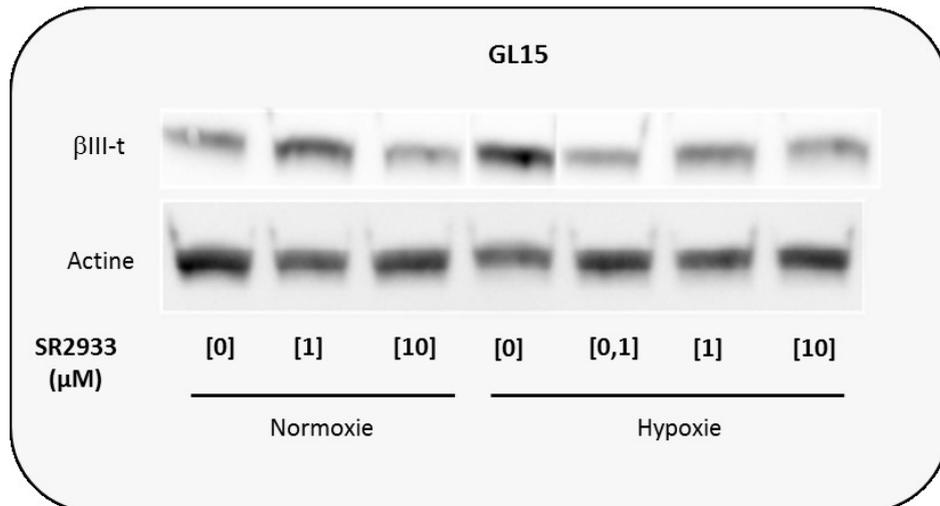


Figure 69 : Immunoempreinte illustrant l'inhibition de l'induction de la β III-t après une exposition au SR2933 en hypoxie sur la lignée GL15.

Cette étude a été réalisée en comparant ces composés au ligand de référence, le JN-128-022, décrit dans les travaux de Scheuermann et collaborateurs (Scheuermann *et al.*, 2013). L'étude de la conformation du JN-128-022 a permis d'analyser les interactions de ce dernier avec les acides aminés bordant la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α . Il est maintenu par deux liaisons hydrogène avec l'His 248 et l'Asn 341. Son cycle phényl pointe en direction d'une poche hydrophobe (P1) constituée des chaînes latérales des acides aminés : Phe 244, Phe 254, Ala 277, Phe 280, Met 309 et Leu 319. Le cycle à cinq atomes à l'autre extrémité pointe vers une autre poche hydrophobe (P2) constituée des chaînes latérales des acides aminés Met 289, Leu 296, Ile 337 et des carbones β des acides aminés Ser 292 et Ser 304 (Figure 70).

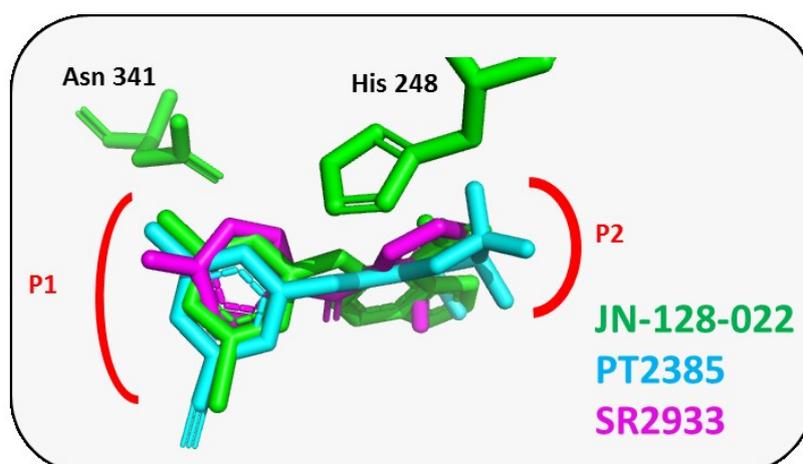


Figure 70 : Superposition des trois composés étudiés dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α entourés des deux poches hydrophobes P1 et P2.

De manière comparable à la molécule de référence, le cycle phényl du SR2933 est maintenu par des liaisons hydrogènes et pointe vers la poche P1 alors que l'autre extrémité, composé d'un cycle à cinq atomes, pointe vers la poche P2. Ces interactions favorables dans la cavité du PAS-B de HIF-2 α peuvent, en partie, expliquer les résultats obtenus avec cette molécule.

Par la suite, le composé SR2933 a été comparé à la nouvelle molécule de référence, le PT2385, caractérisé plus récemment et décrite dans la partie I.5.2.4 de l'étude bibliographique, et qui interagit de manière similaire avec les résidus de HIF-2 α (Wallace *et al.*, 2016b) (Figure 70).

Nous avons ensuite cherché à confirmer l'effet du SR2933 sur l'expression d'un gène cible de HIF-1 et de HIF-2 sur les trois lignées de GB. Le gène cible choisi de HIF-1 est l'anhydrase carbonique 9 (CA-IX) (Kaluz *et al.*, 2009) et le gène cible de HIF-2 est la β III-t (Bordji *et al.*, 2014).

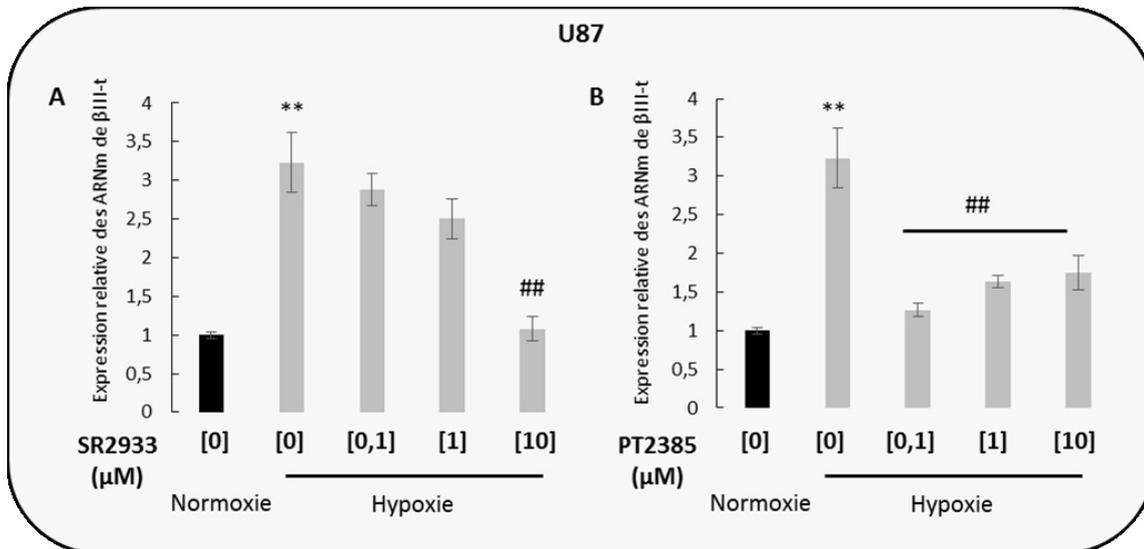


Figure 71 : Etude de l'expression de la β III-t par qPCR sur la lignée U87MG.

A Effets du SR2933 en hypoxie sur les ARNm de β III-t.

B. Effets du PT2385 en hypoxie sur les ARNm de β III-t.

N=3 moyenne +/- E-T Analyse de la variance suivi d'un test de t de Student

(** P <0.01 par rapport au témoin normoxique ## P <0.01 par rapport au témoin hypoxique)

Comme le montre la Figure 71, nous observons un effet du SR2933 sur l'expression de la β III-t sur la lignée U87MG, avec une inhibition totale de l'induction de la β III-t à la concentration la plus forte, les deux concentrations les plus faibles étant inefficaces (Figure 71A). Concernant le PT2385, une inhibition est observée aux trois concentrations y compris la concentration la plus faible (0,1 μ M) (Figure 71B).

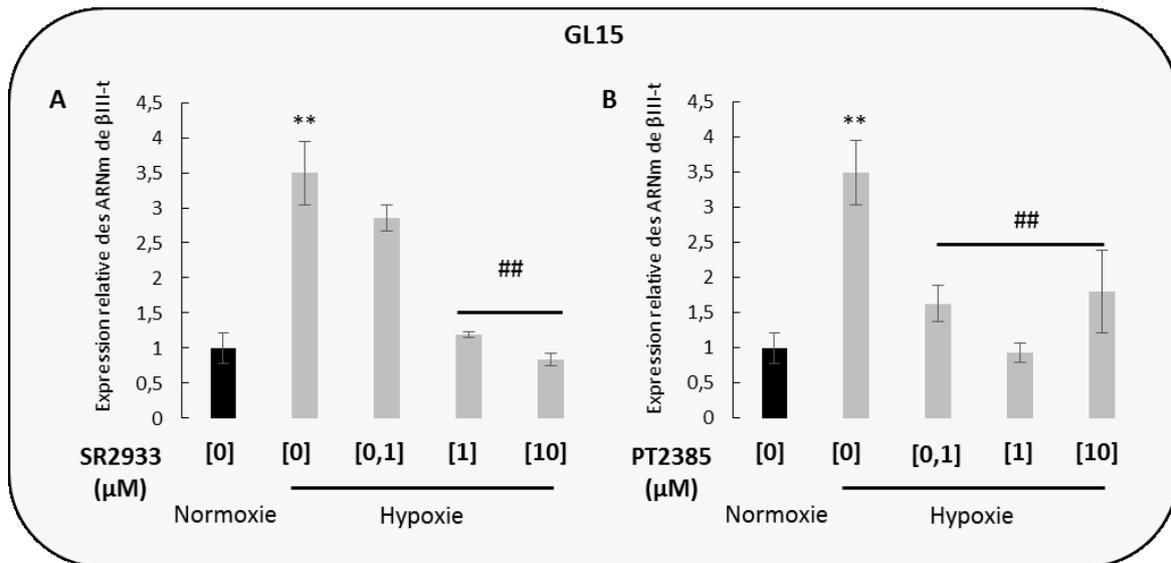


Figure 72 : Etude de l'expression de la $\beta\text{III-t}$ par qPCR sur la lignée GL15.

A Effets du SR2933 en hypoxie sur les ARNm de $\beta\text{III-t}$.

B. Effets du PT2385 en hypoxie sur les ARNm de $\beta\text{III-t}$. N=3 moyenne +/- E-T Analyse de la variance suivi d'un test *t* de Student (** $P < 0.01$ par rapport au témoin normoxique ## $P < 0.01$ par rapport au témoin hypoxique)

Sur la lignée GL15, on retrouve un effet inhibiteur total du SR2933 sur l'expression de la $\beta\text{III-t}$ aux deux plus fortes concentrations. En effet, pour ces concentrations l'effet de l'hypoxie n'est plus identifiable (Figure 72A). Concernant la molécule de référence, nous retrouvons un effet inhibiteur aux trois concentrations. Il est tout de même intéressant de noter qu'une fois de plus la meilleure inhibition est observée pour la concentration intermédiaire de 1 μM pour laquelle l'effet de l'hypoxie n'est plus observable (Figure 72B).

Pour évaluer de manière indirecte la spécificité des deux composés testés pour HIF-2 α , nous nous sommes intéressés à un gène dont l'expression est connue pour être sous le contrôle de HIF-1 α , l'anhydrase carbonique 9 (CA-IX) (Kaluz *et al.*, 2009). Dans nos trois types cellulaires nous avons une induction de CA-IX liée à l'hypoxie d'environ 15 fois par rapport au témoin normoxique (Figure 73).

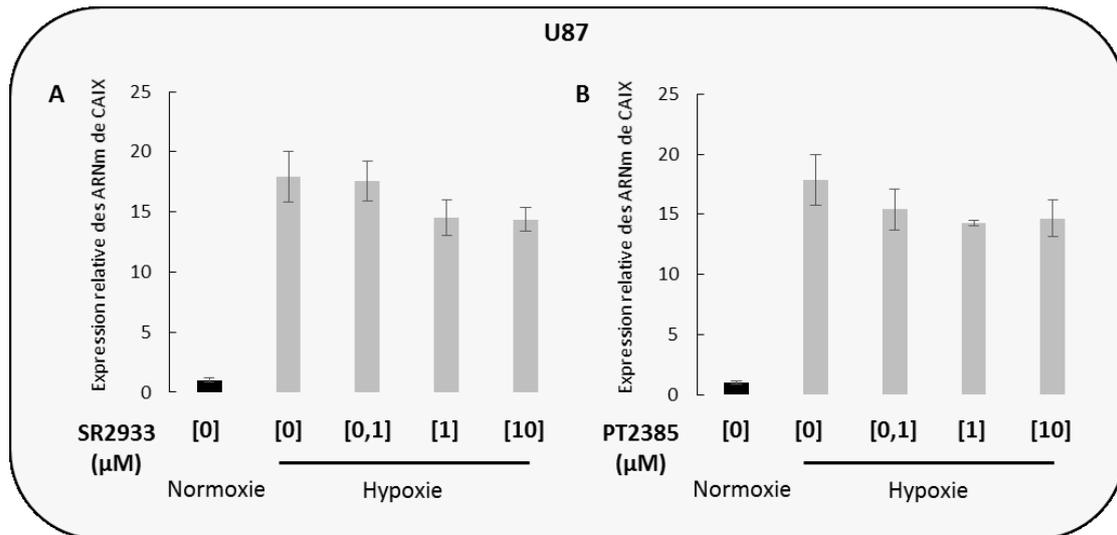


Figure 73 : Etude de l’expression de CA-IX par qPCR sur la lignée U87MG.
 A Effets du SR2933 en hypoxie sur les ARNm de CAIX.
 B. Effets du PT2385 en hypoxie sur les ARNm de CAIX. (N=3 moyenne +/- E-T)

La Figure 73 montre que le SR2933 n’a aucune action inhibitrice sur l’expression de l’ARNm de la CA-IX induite par l’hypoxie, quelle que soit sa concentration (Figure 73A). De manière comparable, aucune inhibition n’est observée après le traitement au PT2385 aux trois concentrations (Figure 73B). Ces données montrent que les deux composés semblent avoir une action spécifique sur HIF-2 sur cette lignée cellulaire.

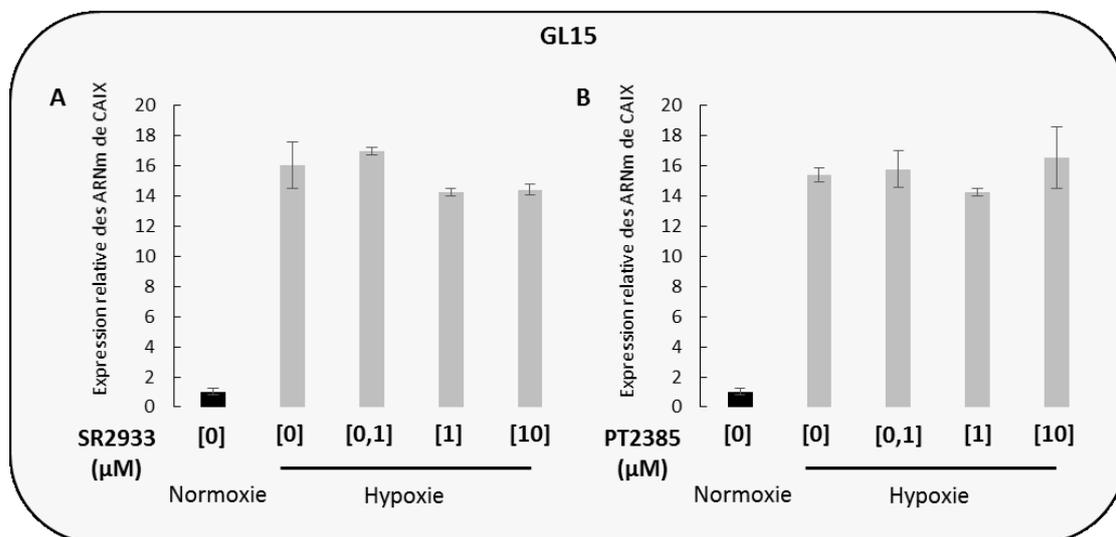


Figure 74 : Etude de l’expression de CA-IX par qPCR sur la lignée GL15.
 A Effets du SR2933 en hypoxie sur les ARNm de CAIX.
 B. Effets du PT2385 en hypoxie sur les ARNm de CAIX. (N=3 moyenne +/- E-T)

De façon comparable aux résultats obtenus sur la lignée U87MG, aucune inhibition des ARNm de CA-IX n’est observée aux trois concentrations après un traitement au SR2933 (Figure 74A). De la même

manière, le traitement au PT2385 ne semble pas affecter les niveaux relatifs d'ARNm de CA-IX ([Figure 74B](#)). Comme sur la lignée précédente, ces données montrent que ces deux composés semblent être, là aussi, spécifiques de HIF-2.

Ces données, évaluant la capacité des molécules à inhiber sélectivement HIF-2, ont montré que la molécule SR2933 issue du screening *in silico* a des effets comparables à la molécule de référence PT2385, actuellement en phase d'essais cliniques dans le cancer du rein. Par ailleurs, le SR2933 a montré de meilleurs résultats à sa concentration la plus forte dans sa capacité à inhiber la β III-t, un gène cible de HIF-2 ([Bordji et al., 2014](#)), comparé à la molécule de référence dans les trois lignées cellulaires.

Les travaux exposés dans les paragraphes suivants ont eu pour objectif de montrer que l'inhibition observée de manière indirecte était due à une inhibition directe de la dimérisation du complexe HIF-2 α /HIF-1 β . Comme précédemment, les effets de la molécule SR2933 ont été comparés à ceux de la molécule de référence, le PT2385.

II.2. Évaluation de l'inhibition par le SR2933 et le PT2385 de la formation du dimère HIF-2 α /HIF-1 β par immunoprécipitation

Nous avons cherché à mettre en évidence l'action du SR2933 sur la dimérisation du complexe HIF-2 α /HIF-1 β par immunoprécipitation, comme cela avait été montré dans la littérature avec le composé PT2385 ([Wallace et al., 2016b](#)). La première expérience visant à mettre en évidence l'hétérodimérisation du complexe HIF-2 α /HIF-1 β a montré un profil d'immunoempreinte peu exploitable ([Figure 75](#)). Nous avons incubé deux extraits protéiques avec des billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre HIF-1 β . L'un des deux échantillons de protéines est issu de cellules cultivées en hypoxie à 1% pendant 18h. L'autre provient de cellules cultivées en normoxie. Ce profil montre un fort marquage aspécifique qui ne permet pas de visualiser la formation du dimère attendue lorsque les cellules sont cultivées en hypoxie.

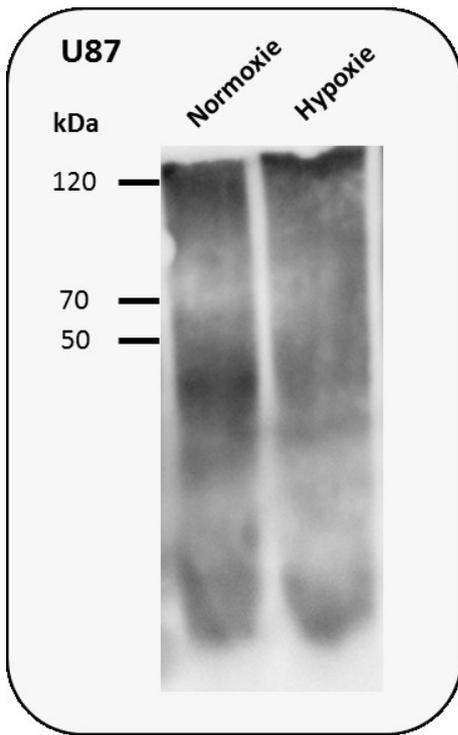


Figure 75 : Immunoempreinte réalisée sur HIF-2 α après avoir immunoprécipité HIF-1 β à partir de 50 μ g de protéines extraites des cellules U87MG cultivées en normoxie ou en hypoxie.

Après plusieurs essais infructueux, nous avons donc décidé par la suite d'adapter le protocole en choisissant tout d'abord, d'immunoprécipiter HIF-2 α avant de révéler HIF-1 β . Après des mises au point successives, nous avons obtenu un profil d'immunoempreinte satisfaisant selon la méthode expliquée dans la partie I.3.5.2 du chapitre matériels et méthodes. Nous avons, au préalable, recherché à mettre en évidence la formation du dimère attendu dans différentes conditions d'hypoxie. La Figure 76 montre que le protocole opératoire de l'immunoprécipitation semble être fonctionnel pour donner des profils électrophorétiques satisfaisants, notamment au niveau de la spécificité du signal et de l'absence de bruit de fond. En revanche, sur un plan scientifique, les signaux obtenus ne nous permettent pas de

tester les composés. En effet, on peut observer un signal fort en normoxie, très peu voire aucune induction en hypoxie et d'après les autres profils obtenus une forte hétérogénéité des résultats (données non présentées).

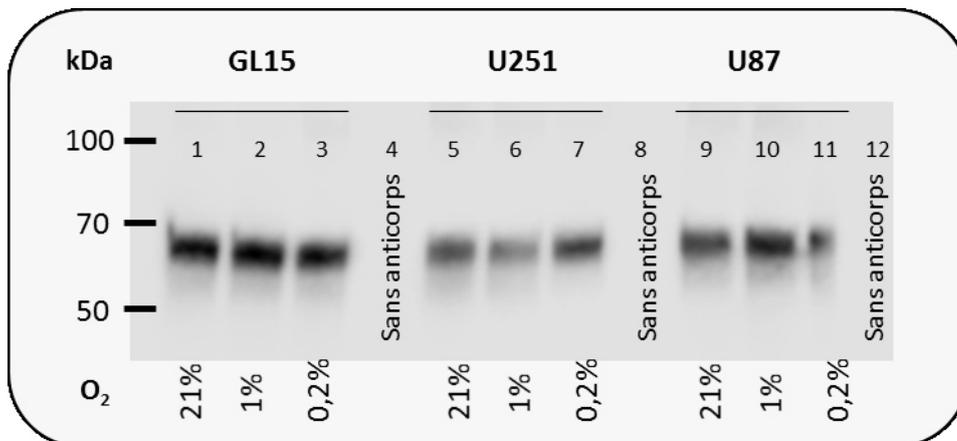
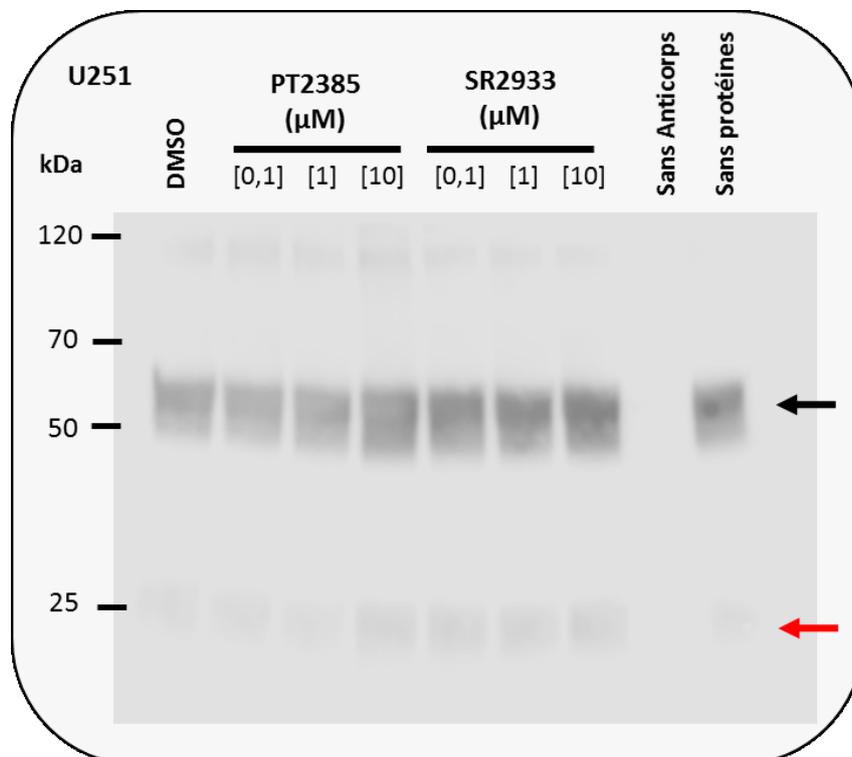


Figure 76 : Révélation de HIF-1 β après immunoprécipitation de HIF-2 α . Les hypoxies à 1% ou à 0,2% sont réalisées pendant 24h.

Dans l'exemple présenté en [Figure 76](#), nous avons déposé 50 µg de protéines. Tout d'abord les trois contrôles sans anticorps d'immunoprécipitation (pistes 4, 8 et 12) semblent indiquer que les signaux obtenus sont spécifiques. Pour la lignée GL15, nous n'avons aucune différence entre nos 3 conditions (21%, 1% ou 0,2% d'O₂). Nous arrivons à détecter une bande plus intense sur la lignée U251MG après une hypoxie à 0,2% pendant 24h (piste 7 versus piste 5), et une bande plus intense sur la lignée U87MG, après une hypoxie à 1% (piste 10 versus piste 9). Cependant, lorsque nous avons répété cette expérience, nous n'avons jamais réussi à obtenir des signaux homogènes et reproductibles. De plus, le poids moléculaire (PM) des signaux observés dans l'exemple présenté [Figure 76](#) est bien inférieur au PM théorique de HIF-1β (92 kDa).

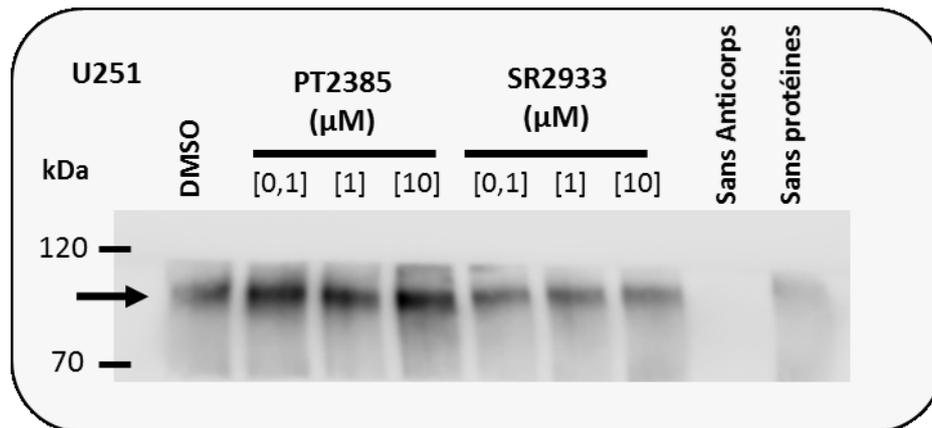
En comparant nos profils avec ceux présentés dans la littérature (Scheuermann *et al.*, 2013; Wallace *et al.*, 2016b), nous avons noté que les immunoempreintes n'étaient présentées que pour la condition où HIF-2 était stabilisé. Nous avons donc poursuivi avec des immunoprécipitations réalisées uniquement sur des échantillons protéiques extraits à partir de cellules cultivées en hypoxie.

Comme précédemment ([Figure 76](#)), nous avons obtenu des résultats contradictoires et peu reproductibles. En effet, nous observons toujours un signal entre 50 et 70 kDa mais qui ne semble pas correspondre à la taille attendue pour HIF-1β ([Figure 77](#)).



[Figure 77](#) : Révélation de HIF-1β après immunoprécipitation de HIF-2α sur la lignée U251MG après exposition aux molécules pendant 18h.

Par ailleurs, et de façon inattendue, nous obtenons un signal comparable dans la condition contrôle sans protéines (dernière piste). Ce résultat indique que la bande observée entre 50 et 70 kDa (flèche noire) correspond à la chaîne lourde de l'anticorps dirigé contre HIF-2 α qui permet de réaliser l'immunoprécipitation. De plus, nous pouvons observer un signal plus léger autour de 25 kDa (flèche rouge, [Figure 77](#)) confirmant que ces deux signaux proviennent de l'anticorps utilisé. C'est pourquoi, nous nous sommes concentrés sur la partie supérieure de la membrane ([Figure 78](#)).



[Figure 78](#) : Révélation de HIF-1 β après immunoprécipitation de HIF-2 α sur la lignée U251MG cultivée en hypoxie (1% O₂) après exposition aux molécules pendant 18h. Partie supérieure de la membrane

La partie supérieure de la membrane montre un signal qui se situe aux alentours de 100 kDa. Ce signal semble correspondre au PM attendu de HIF-1 β . Cependant, il ne semble pas y avoir de baisse d'intensité par rapport à la première piste (DMSO) qui correspond à l'extrait protéique de cellules U251 cultivées en hypoxie à 1%. En présence de PT2385, le signal est même plus intense que sur la piste témoin ([Figure 78](#)).

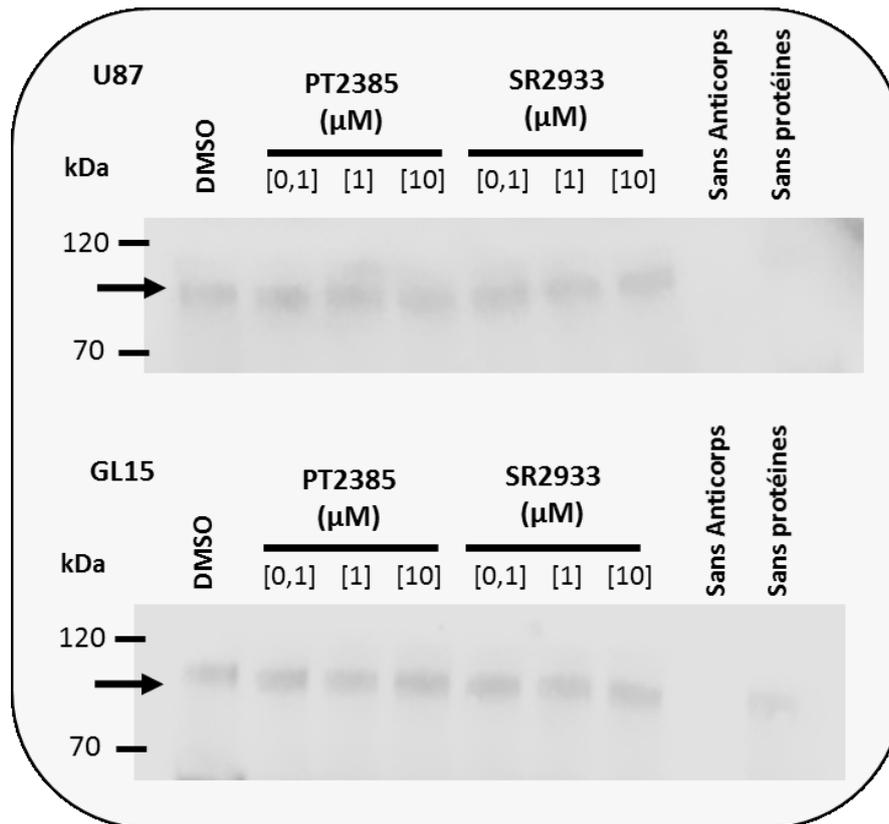


Figure 79 : Révélation de HIF-1 β après immunoprécipitation de HIF-2 α sur les lignées U87MG et GL15 après exposition aux molécules pendant 18h.

De manière comparable aux résultats obtenus sur la lignée U251MG, nous n'observons aucune différence entre les signaux issus des échantillons traités comparé au témoin « DMSO » sur les lignées U87MG et GL15 (Figure 79). Face à ces échecs répétés de la mise en évidence de l'inhibition directe de l'hétérodimérisation avec les immunoprécipitations, nous avons cherché à mettre en place une autre technique pour visualiser l'inhibition de HIF-2.

II.3. Évaluation de l'inhibition du dimère HIF-2 α /HIF-1 β par F.R.E.T

Afin de pouvoir mettre en place les expériences de FRET, il nous a fallu générer des outils plasmidiques. Pour cela, nous avons réalisé des constructions moléculaires en fusionnant les protéines HIF avec un l'un ou l'autre membre d'un couple de fluorophores adapté à l'analyse de FRET. Une fois les constructions réalisées (HIF-1 β -Clover, HIF-1 α -mRuby et HIF-2 α -mRuby), nous les avons validées par digestion enzymatique et dépôt sur gel puis par séquençage.

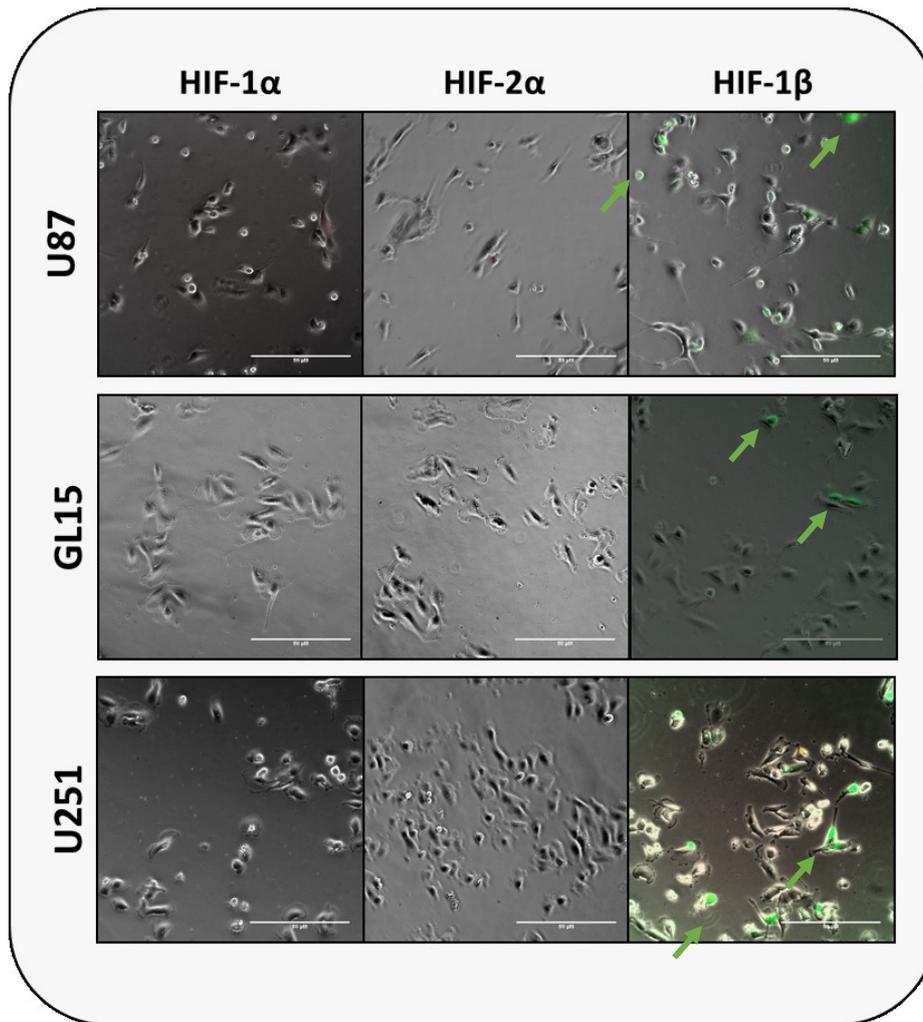


Figure 80 : Validation des 3 constructions plasmidiques sur trois lignées cellulaires de GB (U87MG, GL15, U251MG) cultivées en normoxie après 24h de transfection par HIF-1 α -mRuby, HIF-2 α -mRuby ou HIF- 1 β -Clover.

Barre d'échelle : 50 μ m.

Ces constructions ont ensuite été testées individuellement en montransfection de cellules cultivées en normoxie (Figure 80) ou en hypoxie (Figure 81). Il s'agissait dans un premier temps de vérifier la fonctionnalité des plasmides obtenus et de tester si une fluorescence était observable dans nos conditions expérimentales.

Nous pouvons constater que la construction HIF-1 β -Clover, sous-unité constitutive, est visible dans tous nos types cellulaires (flèches vertes). De manière intéressante, on constate que pour les deux constructions inductibles (HIF-1 α -mRuby et HIF-2 α -mRuby), nous n'obtenons aucun signal fluorescent rouge en normoxie (Figure 80). En revanche, lorsque les 3 lignées cellulaires sont cultivées en hypoxie, un signal fluorescent rouge (flèches rouges ; excitation 561 nm ; émission 595-670 nm) est bien visible après avoir cultivé les cellules transfectées pendant 24h à 0,2% d'oxygène (Figure 81).

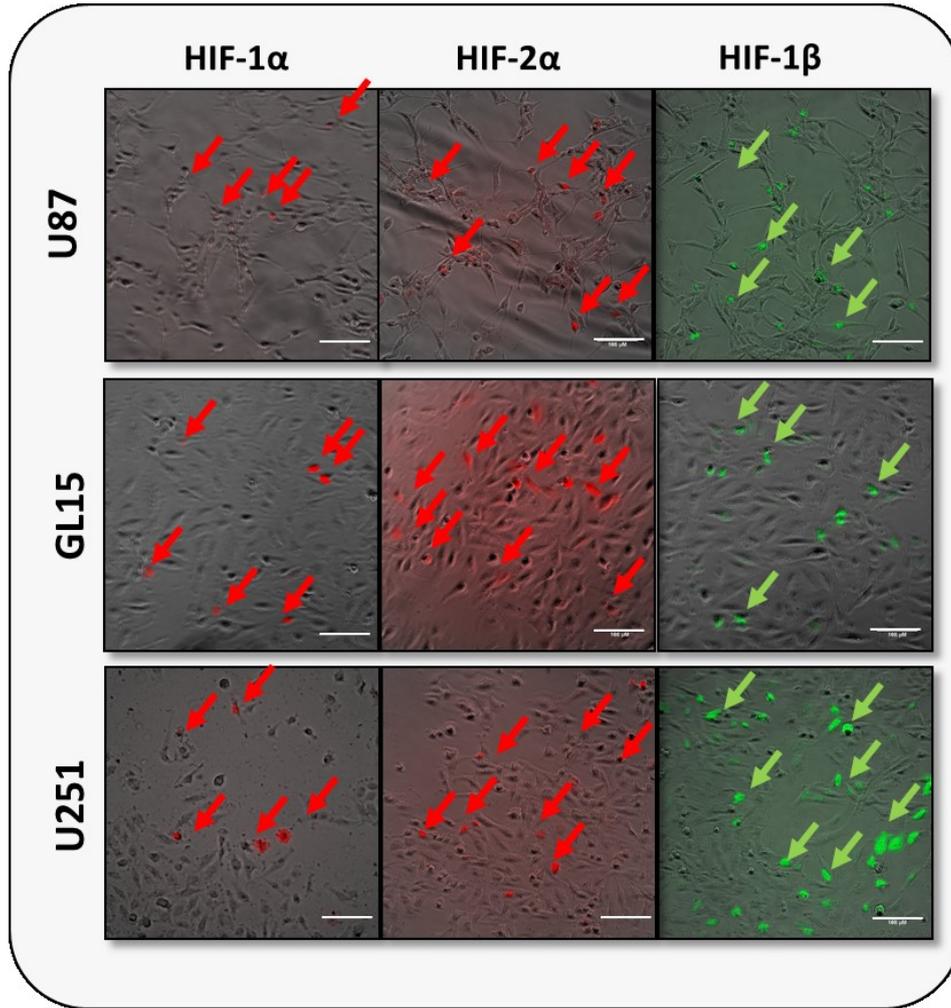


Figure 81 : Validation des constructions en monotransfections (HIF-1 α -mRuby, HIF-2 α -mRuby ou HIF-1 β -Clover) après 24h d'hypoxie à 0,2% d'O₂ sur les trois lignées cellulaires de GB.

Barre d'échelle : 100 μ m

Les [Figure 80](#) et [Figure 81](#) montrent que les outils générés sont fonctionnels et utilisables. Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence le FRET dans les cellules cultivées en hypoxie.

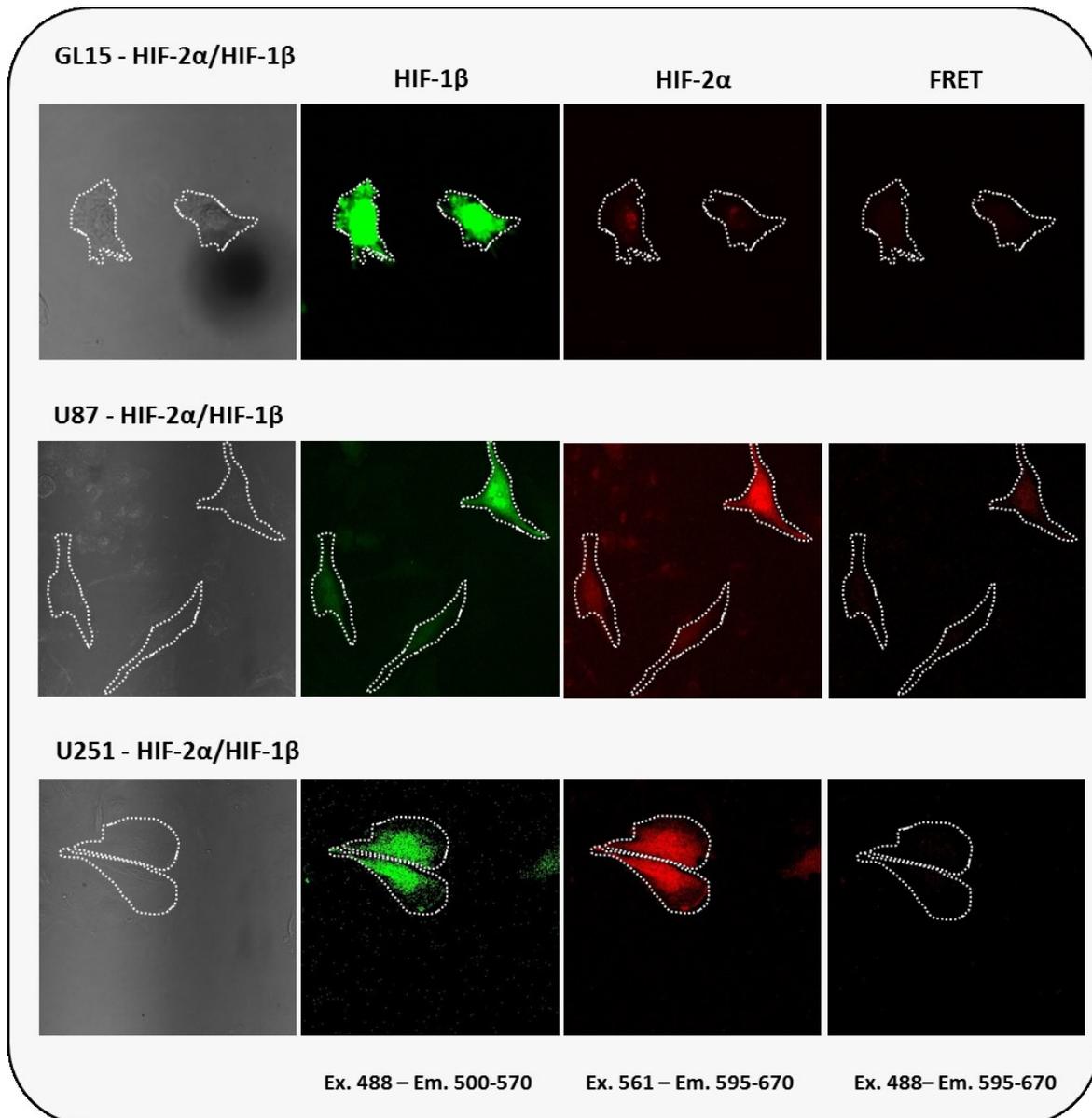


Figure 82: Acquisitions des signaux de fluorescence sur les trois lignées cellulaires (U87MG, GL15, U251MG) cotransfectées HIF-2 α -mRuby/HIF1 β -clover cultivées en hypoxie à 1% pendant 24h.

Ex. : Excitation

Em. : Emission

Grossissement 2000 X

L'étape suivante a été de réaliser les doubles transfections avec les couples de plasmides suivants : HIF-1 α -Ruby/HIF-1 β -Clover ou HIF-2 α -Ruby/HIF-1 β -Clover. Les cellules (GL15, U87MG ou U251MG) ont ensuite été placées en hypoxie (1% O₂) pendant 24h afin de tester si les expériences de FRET sont réalisables. Dans un premier temps, chaque fluorophore est excité et son propre signal d'émission est vérifié. La Figure 82 montre que les signaux sont bien visibles même si le signal de HIF-1 β est bien plus

important que le signal de HIF-2 α . Dans un deuxième temps, l'expérience de FRET proprement dite est réalisée en excitant le fluorophore donneur (Ex 488) et en cherchant à capter le signal d'émission de l'accepteur (Em. 595-670). Nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis de capter un signal de FRET de l'accepteur ([Figure 82](#), FRET). L'absence de signaux de FRET a été constatée sur les trois lignées cellulaires de GB. Seuls de faibles signaux en condition FRET ont été enregistrés. Cependant, l'analyse de ces signaux de fluorescence montre qu'ils sont le résultat d'un échappement du spectre d'émission du fluorophore Clover (donneur, vert) qui déborde dans le canal d'émission du fluorophore rouge. Les acquisitions et les analyses des données issues de cotransfections de cellules cultivées en hypoxie ne nous ont ainsi jamais permis d'enregistrer un signal de FRET.

Ainsi, malgré la validation initiale des outils plasmidiques ([Figure 80](#) et [Figure 81](#)) nous n'avons pas été en mesure, dans nos conditions expérimentales, de mettre en évidence des signaux de FRET sur les 3 lignées cellulaires de GB transfectées et cultivées en conditions hypoxiques.

II.4. Évaluation de l'inhibition par les molécules du dimère HIF-2 α /HIF-1 β par activité luciférase

Après les échecs successifs des immunoprécipitations et des expériences de FRET pour évaluer la formation des dimères HIF α /HIF-1 β , une autre stratégie a consisté à utiliser une technique de gène-rapporteur. Une construction contenant le gène de la luciférase sous le contrôle de quatre séquences HRE (HRE(4X)-pGL3SV40-Luciférase) a donc été utilisée pour rendre compte de l'activité de HIF. Un tel outil ne permettant pas de discriminer l'activité de HIF-1 ou de HIF-2, nous avons utilisé des siARN dirigés contre l'une ou l'autre isoforme dans cette expérience. Ces siARN ont été validés au préalable dans une étude antérieure réalisée au sein de l'équipe (Bordji *et al.*, 2014). Les lignées de GB ont été transfectées comme indiqué, et traitées par de la déferoxamine (DFX, 150 μ M) afin de stabiliser les facteurs HIFs

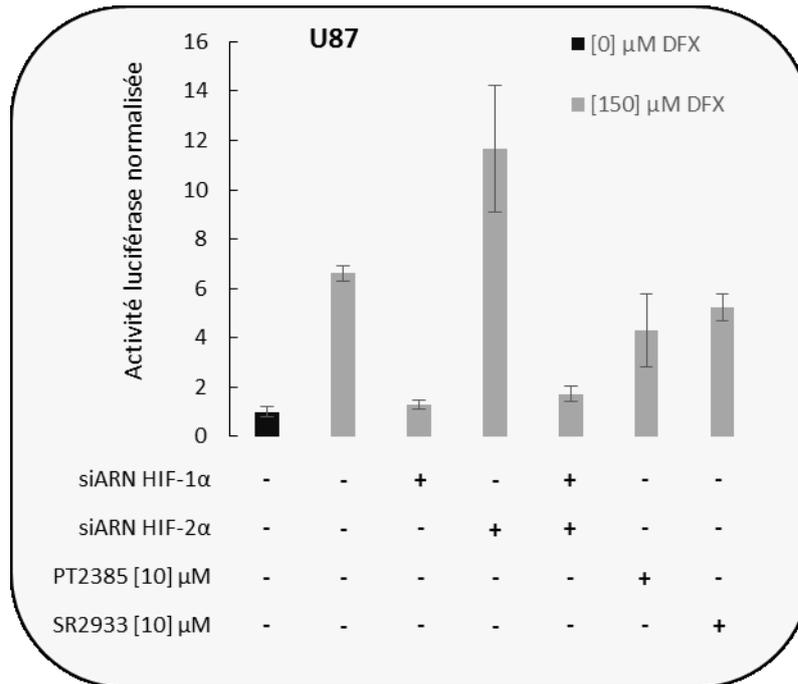


Figure 83 : Activité de la luciférase Firefly normalisée avec le contrôle interne d’activité de la luciférase Renilla après traitement DFX (150 μM ; 24h). Valeurs normalisées par rapport à la condition sans DFX. (N=1 ; n=6 Moyenne ± E-T)

La Figure 83 montre une induction d’environ 7 fois de l’activité luciférase après un traitement à la DFX. Les siARN dirigés contre HIF-1α permettent d’inhiber totalement l’induction de l’activité luciférase par la DFX. De manière étonnante, lorsque les cellules sont transfectées avec des siARN anti HIF-2α on observe une induction de l’activité luciférase d’environ 12 fois par rapport à la condition sans DFX. Les cellules qui ont été transfectées à la fois avec des siARN anti HIF-1α et HIF-2α ont une activité luciférase identique aux cellules transfectées aux siARN anti-HIF-1α. Ces résultats semblent donc indiquer que l’activité luciférase induite par la DFX serait entièrement due à HIF-1 et que HIF-2 ne serait pas impliqué. Cette observation est une surprise dans la mesure où les séquences HRE sont susceptibles de fixer HIF-1 ou HIF-2 indistinctement. Nous attendions donc que l’activité luciférase mesurée dans nos modèles cellulaires soit la conséquence de l’activité relative des 2 complexes (HIF-1 et HIF-2). De plus, l’augmentation de l’activité luciférase en présence d’un siARN anti-HIF-2α semble indiquer que l’extinction de l’expression de HIF-2 pourrait s’accompagner d’une compensation d’activité de HIF-1. Cet outil de gène-rapporteur ne semble donc pas être approprié pour évaluer une action éventuelle de molécules sur HIF-2.

De plus, les cellules qui ont été traitées avec le SR2933 ou le PT2385 (10 μM) ne montrent pas de différence significative d’activité luciférase comparée aux cellules incubées avec 150 μM de DFX. Ces observations sont les mêmes pour les cellules GL15 et U251MG (données non présentées).

Discussion générale – Perspectives

En dépit des traitements actuellement utilisés pour traiter les GB, ces tumeurs demeurent toujours incurables et, les patients ont une médiane de survie très faible qui n'excède pas 15 mois (Chinot *et al.*, 2014). L'une des caractéristiques principales des GB est leur composante hypoxique. En effet, nous avons vu que la vascularisation imparfaite et en remaniement constant ne permettait pas une perfusion sanguine adéquate et est à l'origine de l'apparition de ces zones hypoxiques retrouvées chez les patients (Kawai *et al.*, 2014). Les nombreuses réponses moléculaires à l'hypoxie sont à la base de nombreux phénomènes d'adaptations cellulaires qui conduisent à la résistance et à l'agressivité souvent observées au sein de ces tumeurs (Erlor *et al.*, 2004; Vaupel, 2004; Henze & Acker, 2010; Wilson & Hay, 2011). Comme nous l'avons vu, ces réponses moléculaires sont orchestrées en majorité par les facteurs de transcriptions HIFs. De plus, plusieurs études ont montré que dans certains cancers, HIF-2 aurait un rôle majeur (Koukourakis *et al.*, 2002; Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006; Helczynska *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Cet isotype de HIF est pratiquement toujours corrélé avec un phénotype tumoral agressif et participe à l'échappement au traitement.

Par ailleurs, dans une étude antérieure, nous avons montré le lien entre l'hypoxie et la β III-t qui un gène cible spécifique de HIF-2 α (Bordji *et al.*, 2014). La β III-t est retrouvée dans les gliomes de haut grade, principalement dans les GB. L'équipe de Katsetos a montré dans plusieurs études le lien entre des niveaux élevés en β III-t et les phénomènes de résistance aux traitements (Katsetos *et al.*, 2011).

L'inhibition de la β III-t et de HIF-2 α semblent être des stratégies innovantes dans l'étude de la compréhension du développement tumoral et dans la résistance aux traitements observés dans les GB.

I. Inhibition de la β III-t

Les MTs sont des composants essentiels du cytosquelette et jouent un rôle majeur dans de nombreux processus clés. La β III-t, qui compose les MTs, est très exprimée dans les GB (Katsetos *et al.*, 2001). Plusieurs études ont établi un lien entre la β III-t avec l'évolution des tumeurs vers des hauts grades et à un faible pronostic clinique (Katsetos *et al.*, 2000; Levallet *et al.*, 2012; McCarroll *et al.*, 2015b; Person *et al.*, 2017). De plus, la β III-t apparaît comme un facteur de survie induit par l'environnement au niveau cellulaire. En effet, il est désormais clairement établi que l'une des caractéristiques majeures des GB est l'hypoxie (Kawai *et al.*, 2014). L'hypoxie, *via* l'isoforme HIF-2 α , joue un rôle dans la régulation de la β III-t (Bordji *et al.*, 2014). En plus des conséquences de l'hypoxie sur l'efficacité des traitements (Wilson & Hay, 2011), l'augmentation de l'expression de la β III-t participe aux phénomènes de résistance aux traitements (Kavallaris, 2010; Katsetos *et al.*, 2011). Il convient toutefois de rappeler une exception majeure. Les mélanomes, tumeurs dérivées des

mélanocytes, une baisse d'expression de la β III-t est associée à la progression tumorale (Akasaka *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2016).

La majeure partie des études font néanmoins état de la β III-t comme d'une protéine associée à la progression tumorale et au phénotype agressif. Toutefois, elles ne mettent pas en avant dans quelle mesure et par quels mécanismes, la β III-t est impliquée dans les phénomènes cités ci-dessus.

C'est dans ce contexte que la première partie ces travaux de thèse se sont inscrits. L'objectif de cette première partie a été d'évaluer les caractéristiques tumorales de trois lignées cellulaires humaines de GB de statut génétiques différents (PTEN, TP53, IDH1/2) après avoir inhibé la β III-t. Les outils utilisés dans ce travail nous ont permis d'étudier la réponse cellulaire sur des lignées présentant une extinction transitoire ou stable de la β III-t d'environ 90-95% pour les trois lignées, ce qui est une inhibition importante. Divers paramètres qui caractérisent le développement et l'agressivité tumorale ainsi que la résistance aux traitements des GB ont été étudiés.

Les résultats *in vitro* de cette étude, ont montré l'importance de cette protéine dans la prolifération, l'invasion et la migration cellulaire.

Les conséquences de l'inhibition de la β III-t sur ces paramètres, montrent qu'elle semble être fondamentale dans la progression tumorale. De manière inattendue, nous avons montré que l'inhibition de la β III-t induit un changement de morphologie cellulaire sur les trois lignées. Or, nous avons vu que le cytosquelette de la cellule, et notamment les microtubules, joue un rôle fondamental dans le comportement cellulaire (Etienne-Manneville, 2013). Que l'inhibition d'une isoforme de β -tubuline induise un changement de morphologie et puisse ainsi impacter des paramètres tumoraux comme la prolifération et l'invasion cellulaires est cohérent avec les propriétés des microtubules.

De manière générale, nous avons constaté qu'une inhibition importante de la même protéine du cytosquelette n'entraîne pas les mêmes effets sur les trois lignées de GB. En effet, la prolifération et l'invasion cellulaires sont significativement impactées sur les GL15 et les U87MG alors qu'elles ne sont pas modifiées sur les U251MG. En revanche, l'extinction de la β III-t modifie la morphologie cellulaire (augmentation de la taille des cellules) et la vitesse de comblement de blessure pour les trois lignées. Cependant, aucune donnée obtenue au laboratoire ne nous permet d'expliquer ces différences constatées entre les lignées sur certains paramètres. Dans une étude antérieure, nous avons pu mettre en évidence que les niveaux endogènes de β III-t dans les U251MG sont bien supérieurs aux deux autres lignées utilisées dans ces travaux. De plus, l'induction de la β III-t dans cette lignée n'est pas significative contrairement aux lignées U87MG et GL15 (Bordji *et al.*, 2014). Au vu des résultats de

notre travail, il apparait donc que la β III-t ne semble pas déterminer la vitesse de prolifération et d'invasion des cellules U251MG.

Des études montrent que d'autres acteurs moléculaires, en partie régulés par l'hypoxie, sont impliqués dans la prolifération et l'invasion dans ce type cellulaire (Qu *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014). C'est le cas du facteur de transcription *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). Nrf2 est un composant essentiel de défense contre une grande variété de stress endo- ou exogènes, en particulier dans les GB. Les auteurs montrent que la suppression de ce facteur entraîne, sur les cellules U251MG, l'inhibition de la prolifération *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* (Zhu *et al.*, 2014). De plus, Nrf2 interagit avec les facteurs HIFs. Il a été montré qu'une surexpression de Nrf2 est corrélée avec une haute tolérance à des faibles concentrations en oxygène. Nrf2 possède aussi des propriétés anti-apoptotiques. En effet, ce facteur de transcription contrôle, via les *antioxydant response element* (ARE), l'expression de gènes cytoprotecteurs et antioxydants. Ces données, non exhaustives sur ce facteur, pourraient expliquer que les cellules U251MG soient moins sensibles à l'inhibition de la β III-t (Zhu *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces premiers résultats montrent donc que la β III-t semble jouer un rôle important dans les caractéristiques tumorales des cellules de GB, même si des différences marquantes existent entre les lignées.

Des études préalables effectuées au laboratoire ou rapportées dans la littérature montrent que les modifications de la prolifération, de l'invasion et de la morphologie cellulaires peuvent être expliquées par une modification du cycle cellulaire (Pérès *et al.*, 2015). En règle générale, lorsqu'une baisse de la prolifération est observée, un arrêt dans la phase de transition G2/M du cycle cellulaire est observé. Cependant, les études du cycle cellulaire réalisées sur les trois lignées cellulaires ne révèlent aucune différence significative entre les groupes si-Scr et si- β III-t. Ce résultat suggère d'une part que la β III-t et les MAPs qui lui sont associées ne semblent pas impliquées dans la progression du cycle cellulaire des GB. D'autre part, cela indiquerait aussi que la β III-t ne possède pas un rôle central dans la dynamique fonctionnelle du cytosquelette nécessaire à la poursuite des différentes étapes du cycle cellulaire. L'étude de Panda et collaborateurs a montré que les MTs composés du dimère α/β III-t ont une dynamique de polymérisation plus grande (Panda *et al.*, 1994). Cela pourrait expliquer les effets obtenus sur la prolifération, l'invasion et la migration sans pour autant induire des changements dans le cycle cellulaire. Toutefois, il est important de noter que les MAPs interagissent avec le domaine C-terminal de la tubuline. Or, nous avons vu que les différences structurales entre les isoformes de β -tubulines sont localisées dans leur extrémité C-terminale (Wade, 2009). En effet, le

recrutement des MAPs associées peuvent jouer un rôle fondamental dans les processus oncogéniques (Carles *et al.*, 1999b; Shi & Sun, 2017).

Dans la suite de ce travail, nous avons cherché à explorer si une inhibition de l'expression de la β III-t peut sensibiliser les lignées de GB à l'action de molécules chimiothérapeutiques ou à l'irradiation. Les données de la littérature montrent qu'une surexpression de la β III-t dans de nombreuses tumeurs différentes participe de manière importante aux phénomènes de résistance aux traitements (Kavallaris, 2010). Dans nos conditions expérimentales, il semble par ailleurs que l'efficacité du TMZ est moins puissante comparée aux études précédemment réalisées au sein de l'équipe (Pérès *et al.*, 2015).

Les résultats de notre travail montrent que l'extinction de la β III-t ne sensibilise pas les cellules de GB à la chimiothérapie (TMZ ou Caba). Nos données sur les trois lignées cellulaires montrent que l'inhibition de la β III-t n'affecte pas la réponse cellulaire que ce soit en présence de TMZ (agent alkylant utilisé en clinique) ou alors de Caba (taxane de nouvelle génération).

Par ailleurs, il est à noter que l'absence de sensibilisation des cellules au TMZ ou au Caba suite à une extinction de la β III-t est observée pour des cellules cultivées en normoxie ou en hypoxie. L'hypoxie est connue pour induire une résistance cellulaire aux traitements, ce que nous observons ici. Cette résistance induite par l'hypoxie n'est donc pas modifiée par l'inhibition de la β III-t dans les lignées. Au regard des données de la littérature sur l'importance de la β III-t dans les phénomènes de résistance, ce résultat est surprenant.

Pour tenter de l'expliquer, il est important de considérer que l'inhibition des cellules par des siARN anti- β III-t reste transitoire. Dans nos conditions expérimentales, les cellules sont mises en présence des chimiothérapies 48h après avoir été transfectées. A la fin de l'exposition aux différentes drogues, les cellules sont transfectées depuis 120 heures. Il est donc possible qu'à ce stade les cellules qui ont résisté aux chimiothérapies soient celles qui ont échappé à la transfection. Car, comme nous l'avons vu, ces cellules prolifèrent plus vite que les cellules pour lesquelles la β III-t est absente. Il serait intéressant d'une part de reproduire cette expérience en utilisant les lignées invalidées de façon stable pour la β III-t et d'autre part d'évaluer l'inhibition de la β III-t dans les trois lignées cellulaires après 120 heures de transfection aux siARN. Cela n'a pu être réalisé dans le cadre de cette étude en raison de l'obtention tardive des lignées sh- β III-t.

Toutefois, il a été montré que la β III-t interagit avec deux MAPs : MAP2 (Gan *et al.*, 2007) et Tau (Yu *et al.*, 2014). Ces deux MAPs sont associées à la résistance à la chimiothérapie dans les cancers du sein et ovariens (Tanaka *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2010; Gurler *et al.*, 2015; Shi & Sun, 2017). Ces études

mettent en avant la corrélation entre la présence de la β III-t, MAP2 et Tau. Cependant, aucune de ces études n'indiquent que la β III-t est impliquée dans la régulation de ces dernières. Il semble donc que, même si la β III-t est décrite comme impliquée dans les phénomènes de résistance aux traitements, sa surexpression soit le reflet de la présence d'autres acteurs moléculaires. L'établissement d'un phénotype tumoral résistant aux traitements serait donc le résultat de l'expression de nombreux facteurs, comme la protéine Nrf2 citée ci-dessus, qui agissent comme des facteurs de survie dans de nombreuses tumeurs.

De la même manière, l'évaluation de la sensibilité des cellules à l'irradiation n'a montré aucune différence significative entre les cellules témoins et traitées au préalable avec des siARN- β III-t. Comme nous l'avons évoqué, l'absence de résistance liée à l'hypoxie observée sur la lignée U251MG est surprenante au regard de résultats antérieurs obtenus au sein de l'équipe (Pérès *et al.*, 2015). Comme pour l'étude des effets des chimiothérapies, l'inhibition de la β III-t ne sensibilise pas les cellules à l'irradiation, quelle que soit la lignée (GL15 ou U251) et la dose d'irradiation (de 2 à 8 Gy), en normoxie ou en hypoxie. Nous avons là aussi utilisé des siARN afin d'inhiber la β III-t. Or, même si les cellules sont irradiées lorsque l'efficacité des siARN est maximale, nous nous intéressons aux réponses tardives liées à l'irradiation. Là encore, la principale limite des siARN est que leur efficacité est transitoire. Cette limite est d'autant plus importante lorsque l'on prend en compte qu'il faut 7 jours de culture pour pouvoir dénombrer des colonies. Dans cette optique, et comme pour les expériences faites avec les chimiothérapies, il serait intéressant d'effectuer ces tests sur des lignées où la β III-t est inhibée de façon stable.

Les données obtenues *in vitro* sur l'étude de l'inhibition de la β III-t indique que la lignée U87 est celle sur laquelle nous obtenons les résultats les plus d'effet intéressants. Même si les résultats sur ces cellules sont comparables à ceux obtenus sur la lignée GL15, nous avons choisi ce type cellulaire pour la mise en place d'un modèle de xéno greffe sur des souris *nude*. En effet, très peu de données issue de la littérature présente des modèles de xéno greffes utilisant la lignée GL15. De plus, ce modèle de xéno greffe avec la lignée U87MG est très bien étudié et documenté. Les résultats obtenus sur ce modèle *in vivo* montrent que les tumeurs U87-sh- β III-t se développent bien plus lentement et les animaux porteurs présentent une survie globale significativement améliorée. Cependant, les résultats de l'étude immunohistologique ne nous permettent pas d'identifier les mécanismes sous-jacents qui expliqueraient le retard de croissance tumoral. La principale limite de cette étude est que les cerveaux ont été prélevés sur des animaux qui n'ont pas pu bénéficier d'un suivi en IRM, en raison d'une panne prolongée de cet imageur après les implantations cellulaires chez les animaux. C'est pourquoi les tumeurs issues de cette étude sont des tumeurs de fort volume extraites d'animaux arrivés en fin de protocole. Afin de pouvoir observer d'éventuelles différences sur les paramètres étudiés, une

perspective immédiate sera de réaliser une étude immunohistologique sur des tumeurs de plus faible volume sur des animaux euthanasiés 20 à 25 jours après implantation.

II. Recherche d'inhibiteurs sélectifs de HIF-2 α

La seconde partie des travaux de thèse exposés dans ce manuscrit fait référence à la recherche d'inhibiteurs sélectifs de HIF-2 α . Le rôle de HIF-2 α dans de nombreuses tumeurs solides ainsi que sa spécificité dans la régulation de la β III-t en font une cible de choix dans le cadre d'une approche innovante de traitement des GB.

Le criblage virtuel est une technique rapide qui permet de travailler sur des composés qui ne sont pas synthétisés. Cependant, la principale limite est que la structure de la cible est considéré comme rigide, donc ne s'adaptant pas à certains ligands. L'étude *in silico* effectuée à partir de la chimiothèque du CERMN a permis d'identifier 7 molécules pouvant théoriquement se lier dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α avec une bonne affinité. L'évaluation de ces 7 composés effectuée *in vitro* a abouti à la sélection d'un composé : le SR2933. Les étapes de caractérisation ont permis de valider les effets de ce composé en le comparant à la molécule choisie comme référence : le PT2385 (Wallace *et al.*, 2016b). Les qPCRs réalisées sur nos lignées ont permis d'une part de confirmer un effet potentiel sur HIF-2 α en s'intéressant à un gène cible spécifique, la β III-t. D'autre part, nous avons évalué la spécificité de la molécule pour HIF-2 α en quantifiant les taux relatifs d'ARNm de la protéine CA-IX, un gène cible de HIF-1 α (Kaluz *et al.*, 2009). Même si ces résultats paraissent prometteurs, ils nous permettent uniquement de discriminer l'effet potentiel de la molécule sur HIF-2 α de manière indirecte et seulement au niveau des ARNm. Il était néanmoins nécessaire de démontrer de manière directe, l'action de la molécule choisie (SR2933) comparée à la molécule de référence (PT2385) sur la dimérisation HIF-2 α / HIF-1 β .

Pour mettre en évidence les effets des composés sur la dimérisation HIF-2 α / HIF-1 β , nous avons choisi d'appliquer la technique d'immunoprécipitation utilisée par Scheuermann et collaborateurs (Scheuermann *et al.*, 2013), qui semble parfaitement indiquée dans le cas de l'étude de protéines hétérodimériques comme le sont les protéines HIFs. C'est pourquoi nous avons cherché à reproduire cette technique dans notre étude afin de pouvoir identifier l'action du SR2933 et le comparer au composé de référence (PT2395 ; (Wallace *et al.*, 2016b)) dans nos lignées cellulaires de GB. Comme nous l'exposons dans la partie II.2 des résultats, les premiers profils d'immunoprécipitation issus de la précipitation du partenaire HIF-1 β suivi de la révélation de HIF-2 α étaient inexploitable à cause d'un fort signal aspécifique. Nous avons donc cherché à adapter le protocole expérimental en effectuant l'immunoprécipitation de HIF-2 α suivi de la révélation du partenaire HIF-1 β . Même si les premiers profils issus de ce nouveau protocole présentaient eux aussi un signal aspécifique, nous avons

cependant pu identifier une bande qui semblait spécifique. Par la suite nous sommes arrivés à obtenir un profil d'immunoempreinte qui ne présentait qu'une seule bande qui semblait spécifique grâce au protocole d'immunoprécipitation décrit dans la partie 1.3.5.2 du chapitre Matériels & méthodes.

Comme nous l'avons vu, l'interprétation des signaux obtenus n'était jamais reproductible d'un profil à l'autre. Nous avons donc cherché à déterminer si le signal obtenu était spécifique de HIF-1 β . Pour cela nous avons déposé sur le gel un échantillon qui ne contenait pas de protéines. De façon inattendue, nous avons obtenu un résultat surprenant dans les pistes « contrôle sans protéines » avec un signal comparable aux échantillons qui contenaient un lysat protéique.

Ce résultat nous a permis de comprendre que le signal observé dans les profils d'immunoprécipitation correspondait à la chaîne lourde de l'anticorps anti-HIF-2 α . En effet, dans le profil exposé en Figure 77 nous pouvons également détecter la chaîne légère de l'anticorps. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur la partie supérieure de la membrane dans la suite de nos travaux. En effet, nous parvenons à obtenir un signal au poids moléculaire attendu pour HIF-1 β . Cependant, et comme précédemment, les différents profils obtenus n'ont jamais pu nous permettre de fournir une interprétation fidèle des résultats. Les signaux obtenus ne varient que très peu entre les différentes conditions testées nous avons émis l'hypothèse que les *Dynabeads* ayant fixé l'anticorps étaient saturées en protéines. Nous avons donc tenté de faire varier la quantité de protéines contenues dans le volume réactionnel mais là encore nos résultats ne présentaient que peu de différences entre les conditions.

Face aux échecs répétés des expériences d'immunoprécipitations, nous avons développé des outils pour visualiser la dimérisation de HIF-2 α / HIF-1 β et son inhibition par les deux composés testés par FRET. Comme nous l'avons vu, les expériences de montransfections ont permis de valider les trois constructions plasmidiques et, en accord avec la littérature, ont confirmées le caractère inductible des sous-unités HIF- α et le caractère constitutif de HIF-1 β . En revanche, les expériences de cotransfections, devant nous permettre d'obtenir un signal FRET, n'ont jamais pu aboutir. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons donc pas été en mesure d'obtenir des signaux de FRET exploitables. Il est possible que les fluorophores, fusionnés dans la partie N-terminale des protéines HIFs, ne soient pas assez proches lorsque le dimère HIF- α /HIF-1 β est formé. Les parties N-terminale des protéines HIFs sont pourtant les domaines qui offrent la plus grande proximité et donc le plus de chance d'observer un transfert d'énergie caractéristique du FRET (Kim *et al.*, 2015). Néanmoins, et selon toute vraisemblance au regard des résultats obtenus en montransfection, il semblerait que la distance séparant les deux fluorophores lorsque le dimère est formé soit encore trop importante.

La dernière stratégie que nous avons mise en place pour évaluer l'effet inhibiteur potentiel des composés sur la dimérisation des protéines HIFs a été d'utiliser une technique de gène-rapporteur. La construction utilisée contient le gène de la luciférase sous le contrôle de quatre séquences HRE. L'intégration de ce plasmide dans les cellules permet de rendre compte de l'activité des protéines HIF lorsque les cellules sont cultivées avec [150] μM de DFX. Cependant, comme nous l'avons vu, la distinction entre l'activité attribuable soit à HIF-1 soit à HIF-2 n'est pas possible avec cet outil. Pour remédier à cette contrainte, nous avons utilisé des siARN dirigés contre chaque sous-unité α . Comme attendu, l'activité de la luciférase augmente lorsque les cellules sont cultivées avec de la DFX. Concernant le traitement aux deux siARN, on observe que l'activité de la luciférase consécutive à l'activité des protéines HIFs est uniquement liée à HIF-1. Nos résultats suggèrent que HIF-2 ne semble pas impliqué et aurait même un effet inhibiteur sur cette activité. Même si, pour des raisons techniques, cette expérience n'a pu être analysée qu'une seule fois, elle expose la dépendance presque totale des séquences HRE pour HIF-1. Il serait en effet nécessaire de recommencer ces expériences en cultivant les cellules dans une atmosphère hypoxique pendant plus de 24h car comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, HIF-2 est stabilisé après des temps d'hypoxie prolongés (>24h).

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis tout d'abord de révéler que la $\beta\text{III-t}$ a une action importante dans la croissance tumorale issue de cellules de GB humaines dans des modèles *in vitro* mais aussi *in vivo*. Néanmoins, même si l'inhibition de la $\beta\text{III-t}$ semble être une stratégie intéressante pour limiter le développement des GB, ces travaux n'ont pas permis de suggérer les mécanismes d'action de la $\beta\text{III-t}$ dans la progression tumorale. En effet, notre travail reste à ce stade essentiellement descriptif et il convient de mettre en place d'autres stratégies pour élucider les mécanismes sous-jacents.

Par ailleurs, de façon surprenante et en contradiction avec les données évoquées dans l'étude bibliographique, l'inhibition de la $\beta\text{III-t}$ n'a pas d'effet sensibilisateur vis-à-vis des traitements chimiothérapeutiques et de l'irradiation dans les lignées cellulaires de GB.

Enfin, inhiber la signalisation induite par HIF-2 semble être une stratégie prometteuse. Cependant, malgré les stratégies développées (immunoprécipitation, FRET, luciférase), nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet inhibiteur direct des composés étudiés sur la formation du dimère HIF-2 α /HIF-1 β . Seule une méthode indirecte, sur un gène cible, a pu montrer un effet des molécules candidates. L'étude des conséquences de la stabilisation de HIF-2 dans un contexte tumoral, souligne l'importance et la nécessité d'évaluer l'action directe de ces composés. L'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'hypoxie dans les GB pourraient permettre de mieux traiter ces tumeurs.

Bibliographie

- Abbott NJ, Rönnbäck L & Hansson E (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41–53.
- Akasaka K, Maesawa C, Shibazaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T & Masuda T (2009). Loss of Class III β -Tubulin Induced by Histone Deacetylation Is Associated with Chemosensitivity to Paclitaxel in Malignant Melanoma Cells. *J Invest Dermatol* **129**, 1516–1526.
- Akhmanova A & Steinmetz MO (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 309–322.
- Alifieris C & Trafalis DT (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* **152**, 63–82.
- Altmann KH, Wartmann M & O'Reilly T (2000). Epothilones and related structures--a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity. *Biochim Biophys Acta* **1470**, M79-91.
- Azarenko O, Smiyun G, Mah J, Wilson L & Jordan MA (2014). Antiproliferative Mechanism of Action of the Novel Taxane Cabazitaxel as Compared with the Parent Compound Docetaxel in MCF7 Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* **13**, 2092–2103.
- Baas PW & Ahmad FJ (2013). Beyond taxol: microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system. *Brain* **136**, 2937–2951.
- Baeriswyl V & Christofori G (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*; DOI: 10.1016/j.semcancer.2009.05.003.
- Bauer JA, Chakravarthy AB, Rosenbluth JM, Mi D, Seeley EH, De Matos Granja-Ingram N, Olivares MG, Kelley MC, Mayer IA, Meszoely IM, Means-Powell JA, Johnson KN, Tsai CJ, Ayers GD, Sanders ME, Schneider RJ, Formenti SC, Caprioli RM & Pietenpol JA (2010). Identification of Markers of Taxane Sensitivity Using Proteomic and Genomic Analyses of Breast Tumors from Patients Receiving Neoadjuvant Paclitaxel and Radiation. *Clin Cancer Res* **16**, 681–690.
- 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.
- 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.
- Bersten DC, Sullivan AE, Peet DJ & Whitelaw ML (2013). bHLH–PAS proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**, 827–841.
- Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, Lam JC & Ditsworth D (2009). HIF2 α inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. **106**, 14391–14396.
- Bhattacharya R & Cabral F (2004). A ubiquitous beta-tubulin disrupts microtubule assembly and inhibits cell proliferation. *Mol Biol Cell* **15**, 3123–3131.
- Bloch O, Han SJ, Sun MZ, Aghi MK, Mcdermott MW, Berger MS, Parsa AT & Cha S (2012). Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: Clinical article. *J Neurosurg*; DOI: 10.3171/2012.9.JNS12504.
- 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.
- Brahimi-Horn MC & Pouyssegur J (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett*; DOI: 10.1016/j.febslet.2007.06.018.
- 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.
- Cabrini G, Fabbri E, Lo Nigro C, Dehecchi MC & Gambari R (2015). Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). *Int J Oncol*; DOI: 10.3892/ijo.2015.3026.
- Caccamo D, Katsetos CD, Herman MM, Frankfurter A, Collins VP & Rubinstein LJ (1989). Immunohistochemistry of a spontaneous murine ovarian teratoma with neuroepithelial differentiation. Neuron-associated beta-tubulin as a marker for primitive neuroepithelium. *Lab Invest* **60**, 390–398.
- Carles G, Braguer D, Dumontet C, Bourgarel V, Gonçalves A, Sarrazin M, Rognoni JB & Briand C (1999a). Differentiation of human colon cancer cells changes the expression of β -tubulin isotypes and MAPs. *Br J Cancer* **80**, 1162–1168.
- Carles G, Braguer D, Dumontet C, Bourgarel V, Gonçalves A, Sarrazin M, Rognoni JB & Briand C (1999b). Differentiation of human colon cancer cells changes the expression of beta-tubulin isotypes and MAPs. *Br J Cancer* **80**, 1162–1168.
- Carmeliet P (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*; DOI: 10.1159/000088478.
- Cassimeris L, Pryer NK & Salmon ED (1988). Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J Cell Biol* **107**, 2223–2231.
- Chakhoyan A, Corroyer-Dulmont A, Leblond MM, Gérault A, Toutain J, Chazaviel L, Divoux D, Petit E, MacKenzie ET, Kauffmann F, Delcroix N, Bernaudin M, Touzani O & Valable S (2017). Carbogen-induced increases in tumor oxygenation depend on the vascular status of the tumor: A multiparametric MRI study in two rat glioblastoma models. *J Cereb Blood Flow Metab* **37**, 2270–2282.
- 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.
- Chen W et al. (2016). Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* **539**, 112–117.
- Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Migneco G, Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Tanowitz HB, Casimiro MC, Wang C, Pestell RG, Grieshaber P, Caro J, Sotgia F & Lisanti MP (2010). HIF1-alpha functions as a tumor promoter in cancer-associated fibroblasts, and as a tumor suppressor in breast cancer cells. *Cell Cycle* **9**, 3534–3551.
- Chien AJ & Moasser MM (2008). Cellular Mechanisms of Resistance to Anthracyclines and Taxanes in Cancer: Intrinsic and Acquired. *Semin Oncol* **35**, S1–S14.
- 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. *N Engl J Med* **370**, 709–722.
- Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W, Carvo I, Signoretti S, Bruick R, Josey JA, Wallace EM & Kaelin WG (2016a). On-Target Efficacy of a HIF2 α Antagonist in Preclinical Kidney Cancer Models. *Nature*; DOI: 10.1038/nature19795.
- Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W, Carvo I, Signoretti S, Bruick RK, Josey JA, Wallace EM, Kaelin WG & Jr. (2016b). On-target efficacy of a HIF-2 α antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature* **539**, 107–111.
- Christen T, Lemasson B, Pannetier N, Farion R, Segebarth C, Rémy C & Barbier EL (2010). Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation. *NMR Biomed* **24**, n/a-n/a.
- Christen T, Schmiedeskamp H, Straka M, Bammer R & Zaharchuk G (2012). Measuring brain oxygenation in humans using a multiparametric quantitative blood oxygenation level dependent MRI approach. *Magn Reson Med* **68**, 905–911.
- Christensen K, Schrøder HD & Kristensen BW (2008). CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *J Neurooncol* **90**, 157–170.
- Cicchillitti L, Penci R, Di Michele M, Filippetti F, Rotilio D, Donati MB, Scambia G & Ferlini C (2008). Proteomic characterization of cytoskeletal and mitochondrial class III beta-tubulin. *Mol Cancer Ther* **7**, 2070–2079.
- Clarke JL, Molinaro AM, Cabrera JR, DeSilva AA, Rabbitt JE, Prey J, Drummond DC, Kim J, Noble C, Fitzgerald JB, Chang SM, Butowski NA, Taylor JW, Park JW & Prados MD (2017). A phase 1 trial of intravenous liposomal irinotecan in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer Chemother Pharmacol* **79**, 603–610.
- 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*; DOI: 10.1002/path.4332.
- Collet S, Valable S, Constans JM, Lechapt-Zalcman E, Roussel S, Delcroix N, Abbas A, Ibazizene M, Bernaudin M, Barré L, Derlon JM & Guillamo JS (2015). [(18)F]-fluoro-L-thymidine PET and advanced MRI for preoperative grading of gliomas. *NeuroImage Clin* **8**, 448–454.
- Conde C & Cáceres A (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* **10**, 319–332.
- 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-[18 F]-fluoro-1-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-propanol ([18 F]-FMISO): A PET study in two experimental models of human glioma. *Biol Chem*; DOI: 10.1515/hsz-2012-0318.
- Courtney KD, Infante JR, Lam ET, Figlin RA, Rini BI, Brugarolas J, Zojwalla NJ, Lowe AM, Wang K, Wallace EM, Josey JA & Choueiri TK (2018). Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2 α Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* **36**, 867–874.
- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC & Keith B (2006). HIF-2 α regulates Oct-4: Effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*; DOI: 10.1101/gad.1399906.
- Daneman R & Prat A (2016). The Blood–Brain Barrier. *Conn's Transl Neurosci* 141–146.

- Das S & Marsden PA (2013). Angiogenesis in Glioblastoma ed. Phimister EG. *N Engl J Med* **369**, 1561–1563.
- David H (1988). Rudolf Virchow and Modern Aspects of Tumor Pathology. *Pathol Res Pract*; DOI: 10.1016/S0344-0338(88)80138-9.
- Davis ME (2018). Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin Oncol Nurs* **34**, 420–429.
- Denoulet P, Eddé B & Gros F (1986). Differential expression of several neurospecific β -tubulin mRNAs in the mouse brain during development. *Gene* **50**, 289–297.
- Dimova EY & Kietzmann T (2010). Hypoxia-inducible factors: post-translational crosstalk of signaling pathways. *Methods Mol Biol* **647**, 215–236.
- Dische S, Anderson PJ, Sealy R & Watson ER (1983). Carcinoma of the cervix--anaemia, radiotherapy and hyperbaric oxygen. *Br J Radiol* **56**, 251–255.
- De Donato M, Mariani M, Petrella L, Martinelli E, Zannoni GF, Vellone V, Ferrandina G, Shahabi S, Scambia G & Ferlini C (2012). Class III β -tubulin and the cytoskeletal gateway for drug resistance in ovarian cancer. *J Cell Physiol* **227**, 1034–1041.
- Dráberová E, Del Valle L, Gordon J, Marková V, Šmejkalová B, Bertrand L, de Chadarevian J-P, Agamanolis DP, Legido A, Khalili K, Dráber P & Katsetos CD (2008). Class III β -Tubulin Is Constitutively Coexpressed With Glial Fibrillary Acidic Protein and Nestin in Midgestational Human Fetal Astrocytes: Implications for Phenotypic Identity. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 341–354.
- Dumontet C & Jordan MA (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 790–803.
- Dumontet C, Jordan MA & Lee FFY (2009). Ixabepilone: targeting III-tubulin expression in taxane-resistant malignancies. *Mol Cancer Ther* **8**, 17–25.
- Dutcher SK (2003). Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr Opin Microbiol* **6**, 634–640.
- Eales KL, Hollinshead KER & Tennant DA (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* **5**, e190.
- Egevad L, Valdman A, Wiklund NP, Sève P & Dumontet C (2010). Beta-tubulin III expression in prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol* **44**, 371–377.
- Erbel PJA, Card PB, Karakuzu O, Bruick RK & Gardner KH (2003). Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix--loop--helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15504–15509.
- Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ & Dive C (2004). Hypoxia-Mediated Down-Regulation of Bid and Bax in Tumors Occurs via Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and -Independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance. *Mol Cell Biol*; DOI: 10.1128/mcb.24.7.2875-2889.2004.
- Eseonu CI, ReFaey K, Garcia O, Raghuraman G & Quinones-Hinojosa A (2017). Volumetric Analysis of Extent of Resection, Survival, and Surgical Outcomes for Insular Gliomas. *World Neurosurg*; DOI: 10.1016/j.wneu.2017.04.002.
- Etienne-Manneville S (2013). Microtubules in Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 471–499.
- Fan J, Griffiths AD, Lockhart A, Cross RA & Amos LA (1996). Microtubule Minus Ends can be Labelled

- with a Phage Display Antibody Specific to Alpha-Tubulin. *J Mol Biol* **259**, 325–330.
- Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, Matus A & Schliwa M (1997). Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol*; DOI: 10.1083/jcb.138.5.1067.
- Feng Z, Zou X, Chen Y, Wang H, Duan Y & Bruick RK (2018). Modulation of HIF-2 α PAS-B domain contributes to physiological responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 13240–13245.
- Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, Cicchillitti L, Filippetti F, Gallo D, Fattorusso C, Campiani G & Scambia G (2005). The Seco-Taxane IDN5390 Is Able to Target Class III β -Tubulin and to Overcome Paclitaxel Resistance. *Cancer Res* **65**, 2397–2405.
- Ferrandina G, Mariani M, Andreoli M, Shahabi S, Scambia G & Ferlini C (2012). Novel Drugs Targeting Microtubules: the Role of Epothilones. *Curr Pharm Des* **18**, 2793–2803.
- Fojo AT & Meneffee M (2005). Microtubule Targeting Agents: Basic Mechanisms of Multidrug Resistance (MDR). *Semin Oncol* **32**, 3–8.
- Freedman H, Huzil JT, Luchko T, Lidueña RF & Tuszynski JA (2009). Identification and Characterization of an Intermediate Taxol Binding Site Within Microtubule Nanopores and a Mechanism for Tubulin Isozyme Binding Selectivity. *J Chem Inf Model* **49**, 424–436.
- 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.
- Furnari FB, Lin H, Huang HS & Cavenee WK (1997). Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12479–12484.
- Galmarini CM, Treilleux I, Cardoso F, Bernard-Marty C, Durbecq V, Gancberg D, Bissery M-C, Paesmans M, Larsimont D, Piccart MJ, Di Leo A & Dumontet C (2008). Class III β -Tubulin Isozyme Predicts Response in Advanced Breast Cancer Patients Randomly Treated Either with Single-Agent Doxorubicin or Docetaxel. *Clin Cancer Res* **14**, 4511–4516.
- Gan PP, McCarroll JA, Byrne FL, Garner J & Kavallaris M (2011). Specific β -tubulin isoforms can functionally enhance or diminish epothilone B sensitivity in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* **6**, e21717.
- Gan PP, Pasquier E & Kavallaris M (2007). Class III β -Tubulin Mediates Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* **67**, 9356–9363.
- De Gendt K, Denolet E, Willems A, Daniels VW, Clinckemalie L, Denayer S, Wilkinson MF, Claessens F, Swinnen J V. & Verhoeven G (2011). Expression of Tubb3, a Beta-Tubulin Isozyme, Is Regulated by Androgens in Mouse and Rat Sertoli Cells. *Biol Reprod* **85**, 934–945.
- Gerlowski LE & Jain RK (1986). Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc Res* **31**, 288–305.
- Gerth K, Bedorf N, Höfle G, Irschik H & Reichenbach H (1996). Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **49**, 560–563.
- Ghoochani A, Hatipoglu Majernik G, Sehm T, Wach S, Buchfelder M, Taubert H, Eyupoglu IY & Savaskan N (2016). Cabazitaxel operates anti-metastatic and cytotoxic via apoptosis induction and stalls brain tumor angiogenesis. *Oncotarget* **7**, 38306–38318.
- Giannakakou P, Poy G, Zhan Z, Knutsen T, Blagosklonny M V & Fojo T (2000). Paclitaxel selects for mutant or pseudo-null p53 in drug resistance associated with tubulin mutations in human cancer.

- Oncogene* **19**, 3078–3085.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, Gatter KC & Harris AL (2001). Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer*; DOI: 10.1054/bjoc.2001.2018.
- Gilbert MR et al. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* **370**, 699–708.
- Girard E, Ditzler S, Lee D, Richards A, Yagle K, Park J, Eslamy H, Bobilev D, Vrignaud P & Olson J (2015). Efficacy of cabazitaxel in mouse models of pediatric brain tumors. *Neuro Oncol* **17**, 107–115.
- Goodin S, Kane MP & Rubin EH (2004). Epothilones: mechanism of action and biologic activity. *J Clin Oncol* **22**, 2015–2025.
- Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE, Greenberg RA, Flaherty KT, Rathmell WK, Keith B, Simon MC & Nathanson KL (2008). HIF- α Effects on c-Myc Distinguish Two Subtypes of Sporadic VHL-Deficient Clear Cell Renal Carcinoma. *Cancer Cell*; DOI: 10.1016/j.ccr.2008.10.016.
- Gottesman MM (2002). Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Med* **53**, 615–627.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW & Giaccia AJ (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*; DOI: 10.1038/379088a0.
- Greene-Schloesser D, Robbins ME, Peiffer AM, Shaw EG, Wheeler KT & Chan MD (2012). Radiation-induced brain injury: A review. *Front Oncol*; DOI: 10.3389/fonc.2012.00073.
- Gurler H, Yu Y, Choi J, Kajdacsy-Balla A & Barbolina M (2015). Three-Dimensional Collagen Type I Matrix Up-Regulates Nuclear Isoforms of the Microtubule Associated Protein Tau Implicated in Resistance to Paclitaxel Therapy in Ovarian Carcinoma. *Int J Mol Sci* **16**, 3419–3433.
- Guyotat J (2013). Prise en charge chirurgicale des glioblastomes: les évolutions technologiques Surgical management for glioblastoma: technological evolutions. *e-mémoires l'Académie Natl Chir* **12**, 067–072.
- 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.
- Hambardzumyan D, Gutmann DH & Kettenmann H (2015). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*; DOI: 10.1038/nn.4185.
- Hammond JW, Cai D & Verhey KJ (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 71–76.
- Hardee ME & Zagzag D (2012). Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* **181**, 1126–1141.
- Helczynska K, Larsson A & Mengelbier LH (2008). Hypoxia-Inducible Factor-2 α Correlates to Distant Recurrence and Poor Outcome in Invasive Breast Cancer Hypoxia-Inducible Factor-2A Correlates to Distant Recurrence and Poor Outcome in Invasive Breast Cancer. 9212–9220.
- Henze AT & Acker T (2010). Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle*; DOI: 10.4161/cc.9.14.12249.
- Hoffmann J, Fichtner I, Lemm M, Lienau P, Hess-Stumpp H, Rotgeri A, Hofmann B & Klar U (2009). Sagopilone crosses the blood–brain barrier in vivo to inhibit brain tumor growth and metastases.

- Neuro Oncol* **11**, 158–166.
- Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg Å, Gradin K, Poellinger L & Pålman S (2006). Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* **10**, 413–423.
- Horio T & Hotani H (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* **321**, 605–607.
- Hossain A, Gumin J, Gao F, Figueroa J, Shinojima N, Takezaki T, Priebe W, Villarreal D, Kang SG, Joyce C, Sulman E, Wang Q, Marini FC, Andreeff M, Colman H & Lang FF (2015). Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. *Stem Cells*; DOI: 10.1002/stem.2053.
- Howard J & Hyman AA (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**, 753–758.
- Ikota H, Kinjo S, Yokoo H & Nakazato Y (2006). Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol* **111**, 475–482.
- Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF & De Leo JA (2011a). Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* **3**, e00063.
- Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF & De Leo JA (2011b). Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* **3**, e00063.
- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG & Batchelor TT (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* **8**, 610–622.
- Ji X-J et al. (2013). Knockdown of NF-E2-related factor 2 inhibits the proliferation and growth of U251MG human glioma cells in a mouse xenograft model. *Oncol Rep* **30**, 157–164.
- Kaluz S, Kaluzová M, Liao S-Y, Lerman M & Stanbridge EJ (2009). Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta* **1795**, 162–172.
- Kamath K, Wilson L, Cabral F & Jordan MA (2005). β -III-Tubulin Induces Paclitaxel Resistance in Association with Reduced Effects on Microtubule Dynamic Instability*. ; DOI: 10.1074/jbc.M414477200.
- Karavelioglu E, Gonul Y, Aksit H, Boyaci MG, Karademir M, Simsek N, Guven M, Atalay T & Rakip U (2016). Cabazitaxel causes a dose-dependent central nervous system toxicity in rats. *J Neurol Sci* **360**, 66–71.
- Karki R, Mariani M, Andreoli M, He S, Scambia G, Shahabi S & Ferlini C (2013). β III-Tubulin: biomarker of taxane resistance or drug target? *Expert Opin Ther Targets* **17**, 461–472.
- Katsetos CD & Dráber P (2012). Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside. *Curr Pharm Des* **18**, 2778–2792.
- Katsetos CD, Draber P & Kavallaris M (2011). Targeting β III-tubulin in glioblastoma multiforme: from cell biology and histopathology to cancer therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem* **11**, 719–728.
- Katsetos CD, Dráberová E, Legido A, Dumontet C & Dráber P (2009). Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III β -tubulin. *J Cell Physiol* **221**, 505–513.

- Katsetos CD, Herman MM, Frankfurter A, Gass P, Collins VP, Walker CC, Rosemberg S, Barnard RO & Rubinstein LJ (1989). Cerebellar desmoplastic medulloblastomas. A further immunohistochemical characterization of the reticulin-free pale islands. *Arch Pathol Lab Med* **113**, 1019–1029.
- Katsetos CD, Herman MM & Mörk SJ (2003a). Class III β -tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* **55**, 77–96.
- Katsetos CD, Kontogeorgos G, Geddes JF, Herman MM, Tsimara-Papastamatiou H, Yu Y, Sakkas LI, Tsokos M, Patchefsky AS, Ehya H, Cooper HS, Provencio J, Spano AJ & Frankfurter A (2000). Differential distribution of the neuron-associated class III beta-tubulin in neuroendocrine lung tumors. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 535–544.
- Katsetos CD, Krishna L, Frankfurter A, Karkavelas G, Wolfe DE, Valsamis MP, Schiffer D, Vlachos IN & Urich H (1995). A cytomorphological scheme of differentiating neuronal phenotypes in cerebellar medulloblastomas based on immunolocalization of class III beta-tubulin isotype (beta III) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Clin Neuropathol* **14**, 72–81.
- Katsetos CD, Legido A, Perentes E & Mörk SJ (2003b). Class III β -Tubulin Isotype: A Key Cytoskeletal Protein at the Crossroads of Developmental Neurobiology and Tumor Neuropathology. *J Child Neurol* **18**, 851–866.
- Katsetos CD, Reginato MJ, Baas PW, D'Agostino L, Legido A, Tuszyński JA, Dráberová E & Dráber P (2015). Emerging microtubule targets in glioma therapy. *Semin Pediatr Neurol* **22**, 49–72.
- Katsetos CD, Del Valle L, Geddes JF, Aldape K, Boyd JC, Legido A, Khalili K, Perentes E & Mörk SJ (2002). Localization of the Neuronal Class III β -Tubulin in Oligodendrogliomas: Comparison with Ki-67 Proliferative Index and 1p/19q Status. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 307–320.
- Katsetos CD, Del Valle L, Geddes JF, Assimakopoulou M, Legido A, Boyd JC, Balin B, Parikh NA, Maraziotis T, de Chadarevian JP, Varakis JN, Matsas R, Spano A, Frankfurter A, Herman MM & Khalili K (2001). Aberrant localization of the neuronal class III beta-tubulin in astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med* **125**, 613–624.
- Katsetos CD, Del Valle L, Legido A, de Chadarevian J-P, Perentes E & Mörk SJ (2003c). On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pio del Rio Hortega and Moises Polak. *Acta Neuropathol* **105**, 1–13.
- Kavallaris M (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* **10**, 194–204.
- Kavallaris M, Burkhart CA & Horwitz SB (1999). Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer* **80**, 1020–1025.
- Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M & Horwitz SB (1997a). Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* **100**, 1282–1293.
- Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M & Horwitz SB (1997b). Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* **100**, 1282–1293.
- Kawai N, Lin W, Cao W-D, Ogawa D, Miyake K, Haba R, Maeda Y, Yamamoto Y, Nishiyama Y & Tamiya T (2014). Correlation between ^{18}F -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.
- Keith B, Johnson RS & Simon MC (2012). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and

- progression. *Nat Rev Cancer* **12**, 9–22.
- Kempf H, Bleicher M, Meyer-Hermann M & Rocha S (2015). Spatio-temporal dynamics of hypoxia during radiotherapy. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0133357.
- Kessler J, Hohmann T, Güttler A, Petrenko M, Ostheimer C, Hohmann U, Bache M, Dehghani F & Vordermark D (2019). Radiosensitization and a Less Aggressive Phenotype of Human Malignant Glioma Cells Expressing Isocitrate Dehydrogenase 1 (IDH1) Mutant Protein: Dissecting the Mechanisms. *Cancers (Basel)*; DOI: 10.3390/cancers11060889.
- Kim M-C, Hwang S-H, Kim N-Y, Lee H-S, Ji S, Yang Y & Kim Y (2018). Hypoxia promotes acquisition of aggressive phenotypes in human malignant mesothelioma. *BMC Cancer* **18**, 819.
- Kim SH, Hwang D, Park H, Yang EG, Chung HS & Kim SY (2015). The action of HIF-3 α variants on HIF-2 α –HIF-1 β heterodimer formation is directly probed in live cells. *Exp Cell Res* **336**, 329–337.
- Koh MY & Powis G (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* **37**, 364–372.
- Kondo K, Kim WY, Lechpammer M & Kaelin WG (2003). Inhibition of HIF2 α is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol*; DOI: 10.1371/journal.pbio.0000083.
- 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*; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3260.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter KC & Harris AL (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol* **53**, 1192–1202.
- Lacroix M et al. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*; DOI: 10.3171/jns.2001.95.2.0190.
- Laggner U, Pipp I, Budka H, Hainfellner JA & Preusser M (2007). Immunohistochemical detection of class III β -tubulin in primary brain tumours: variable expression in most tumour types limits utility as a differential diagnostic marker. *Histopathology* **50**, 949–952.
- Lam AJ, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, McKeown MR, Wiedenmann J, Davidson MW, Schnitzer MJ, Tsien RY & Lin MZ (2012). Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat Methods*; DOI: 10.1038/nmeth.2171.
- Lampson LA (2011). Monoclonal antibodies in neuro-oncology: Getting past the blood-brain barrier. *MAbs* **3**, 153–160.
- Leandro-García LJ, Leskelä S, Landa I, Montero-Conde C, López-Jiménez E, Letón R, Cascón A, Robledo M & Rodríguez-Antona C (2010). Tumoral and tissue-specific expression of the major human β -tubulin isotypes. *Cytoskeleton* **67**, 214–223.
- Leblond MM, G rault AN, Corroyer-Dulmont A, MacKenzie ET, Petit E, Bernaudin M & Valable S (2016). Hypoxia induces macrophage polarization and re-education toward an M2 phenotype in U87 and U251 glioblastoma models. *Oncoimmunology*; DOI: 10.1080/2162402X.2015.1056442.
- Lee FY, Borzilleri R, Fairchild CR, Kim SH, Long BH, Reventos-Suarez C, Vite GD, Rose WC & Kramer RA (2001). BMS-247550: a novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy. *Clin Cancer Res* **7**, 1429–1437.
- Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW & Frankfurter A (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* **17**, 118–132.

- Levallet G et al. (2012). High TUBB3 Expression, an Independent Prognostic Marker in Patients with Early Non-Small Cell Lung Cancer Treated by Preoperative Chemotherapy, Is Regulated by K-Ras Signaling Pathway. *Mol Cancer Ther* **11**, 1203–1213.
- Levine AJ & Puzio-Kuter AM (2010). The control of the metabolic switch in cancers. *Science*; DOI: 10.1126/science.1193494.
- Li G, Qin Z, Chen Z, Xie L, Wang R & Zhao H (2017). Tumor microenvironment in treatment of glioma. *Open Med*; DOI: 10.1515/med-2017-0035.
- 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.
- Linhartová I, Dráber P, Dráberová E & Viklický V (1992). Immunological discrimination of beta-tubulin isoforms in developing mouse brain. Post-translational modification of non-class-III beta-tubulins. *Biochem J* **288** (Pt 3, 919–924.
- Liu Y V. & Semenza GL (2007). RACK1 vs. HSP90: Competition for HIF-1 α degradation vs. stabilization. *Cell Cycle*; DOI: 10.4161/cc.6.6.3981.
- Louis DN (2006). MOLECULAR PATHOLOGY OF MALIGNANT GLIOMAS. *Annu Rev Pathol Mech Dis* **1**, 97–117.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P & Ellison DW (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**, 803–820.
- Lu Q & Ludueña R (1993). Removal of β (III) isotype enhances taxol induced microtubule assembly. *Cell Struct Funct* **18**, 173–182.
- Ludueña RF & Banerjee A (2008). The Isoforms of Tubulin. In *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, pp. 123–175. Humana Press, Totowa, NJ. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-336-3_6 [Accessed September 6, 2019].
- Maeda H & Matsumura Y (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*; DOI: 10.1021/bc100070g.
- Maeda H, Nakamura H & Fang J (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 71–79.
- 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*; DOI: 10.1038/35107085.
- Mandelkow EM, Lange G, Jagla A, Spann U & Mandelkow E (1988). Dynamics of the microtubule oscillator: role of nucleotides and tubulin-MAP interactions. *EMBO J* **7**, 357–365.
- Mandelkow EM, Mandelkow E & Milligan RA (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol* **114**, 977–991.
- Mariani M, Karki R, Spennato M, Pandya D, He S, Andreoli M, Fiedler P & Ferlini C (2015). Clas- III β -tubulin in normal and cancer tissues. *Gene* **563**, 109–114.
- Masoud GN, Li W & Pharmaceutica Sinica AB (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. ; DOI: 10.1016/j.apsb.2015.05.007.

- McCarroll JA, Gan PP, Erlich RB, Liu M, Dwarte T, Sagnella SS, Akerfeldt MC, Yang L, Parker AL, Chang MH, Shum MS, Byrne FL & Kavallaris M (2015a). *TUBB3* / β III-Tubulin Acts through the PTEN/AKT Signaling Axis to Promote Tumorigenesis and Anoikis Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* **75**, 415–425.
- McCarroll JA, Gan PP, Liu M & Kavallaris M (2010). β III-tubulin is a multifunctional protein involved in drug sensitivity and tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **70**, 4995–5003.
- McCarroll JA, Sharbeen G, Liu J, Youkhana J, Goldstein D, McCarthy N, Limbri LF, Dischl D, Ceyhan GO, Erkan M, Johns AL, Biankin A V, Kavallaris M & Phillips PA (2015b). β III-tubulin: a novel mediator of chemoresistance and metastases in pancreatic cancer. *Oncotarget* **6**, 2235–2249.
- McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN & McCann A (2008). Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1785**, 96–132.
- Mitchison T & Kirschner M (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242.
- Mitchison TJ (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**, 1044–1047.
- Mitchison TJ & Kirschner MW (1985). Properties of the kinetochore in vitro. II. Microtubule capture and ATP-dependent translocation. *J Cell Biol* **101**, 766–777.
- Modi S, DiGiovanna MP, Lu Z, Moskowitz C, Panageas KS, Van Poznak C, Hudis CA, Norton L, Tan L, Stern DF, Carter D & Seidman AD (2005). Phosphorylated/Activated HER2 as a Marker of Clinical Resistance to Single Agent Taxane Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer. *Cancer Invest* **23**, 483–487.
- Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, Filippetti F, Raspaglio G, Prislei S, Gallo D, Martinelli E, Ranelletti FO, Ferrandina G, Scambia G & Dumontet C (2005). Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**, 298–305.
- Narvi E, Jaakkola K, Winsel S, Oetken-Lindholm C, Halonen P, Kallio L & Kallio MJ (2013). Altered TUBB3 expression contributes to the epothilone response of mitotic cells. *Br J Cancer* **108**, 82–90.
- Nogales E (2001). Structural Insights into Microtubule Function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**, 397–420.
- Nogales E, Grayer Wolf S, Khan IA, Ludueña RF & Downing KH (1995). Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* **375**, 424–427.
- Nogales E, Wolf SG & Downing KH (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203.
- Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* (80-); DOI: 10.1126/science.959840.
- Oehler C, von Bueren AO, Furmanova P, Broggini-Tenzer A, Orłowski K, Rutkowski S, Frei K, Grotzer MA & Pruschy M (2011). The microtubule stabilizer patupilone (epothilone B) is a potent radiosensitizer in medulloblastoma cells. *Neuro Oncol* **13**, 1000–1010.
- Oehler C, Frei K, Rushing EJ, McSheehy PMJ, Weber D, Allegrini PR, Weniger D, Lütolf UM, Knuth A, Yonekawa Y, Barath K, Broggini-Tenzer A, Pruschy M & Hofer S (2012). Patupilone (Epothilone B) for Recurrent Glioblastoma: Clinical Outcome and Translational Analysis of a Single-Institution Phase I/II Trial. *Oncology* **83**, 1–9.
- 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*; DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.12.070.
- Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM & Barnholtz-sloan JS (2015). Epidemiology of Gliomas. 1–14.
- Paller CJ & Antonarakis ES (2011). Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Des Devel Ther* **5**, 117–124.
- Panda D, Miller HP, Banerjee a, Ludueña RF & Wilson L (1994). Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11358–11362.
- Parker AL, Kavallaris M & McCarroll JA (2014). Microtubules and Their Role in Cellular Stress in Cancer. *Front Oncol* **4**, 153.
- Parness J & Horwitz SB (1981). Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol* **91**, 479–487.
- Peng XH, Karna P, Cao Z, Jiang BH, Zhou M & Yang L (2006). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.M603414200.
- Pérès EA et al. (2015). Silencing erythropoietin receptor on glioma cells reinforces efficacy of temozolomide and X-rays through senescence and mitotic catastrophe. *Oncotarget* **6**, 2101–2119.
- Perez EA (2009). Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol Cancer Ther* **8**, 2086–2095.
- Person F, Wilczak W, Hube-Magg C, Burdelski C, Möller-Koop C, Simon R, Noriega M, Sauter G, Steurer S, Burdak-Rothkamm S & Jacobsen F (2017). Prevalence of β III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. *Tumor Biol* **39**, 101042831771216.
- Pons-Tostivint E, Latouche A, Vaflard P, Ricci F, Loirat D, Hescot S, Sablin M-P, Rouzier R, Kamal M, Morel C, Lecerf C, Servois V, Paoletti X & Le Tourneau C (2019). Comparative Analysis of Durable Responses on Immune Checkpoint Inhibitors Versus Other Systemic Therapies: A Pooled Analysis of Phase III Trials. *JCO Precis Oncol*; DOI: 10.1200/po.18.00114.
- Portyanko A, Kovalev P, Gorgun J & Cherstvoy E (2009). β III-tubulin at the invasive margin of colorectal cancer: possible link to invasion. *Virchows Arch* **454**, 541–548.
- Pouysségur J, Dayan F & Mazure NM (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*; DOI: 10.1038/nature04871.
- Prasetyanti PR & Medema JP (2017). Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer* **16**, 41.
- Qing G & Simon MC (2009). Hypoxia inducible factor-2 α : a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 60–66.
- Qu C, Dwyer T, Shao Q, Yang T, Huang H & Liu G (2013). Direct binding of TUBB3 with DCC couples netrin-1 signaling to intracellular microtubule dynamics in axon outgrowth and guidance. *J Cell Sci* **126**, 3070.
- Quaas A, Rahvar A-H, Burdelski C, Koop C, Eichelberg C, Rink M, Dahlem R, Schlomm T, Tsourlakis MC, Simon R, Minner S, Sauter G & Steurer S (2015). β III-tubulin overexpression is linked to aggressive tumor features and shortened survival in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol* **33**, 1561–1569.

- Ranganathan S, Salazar H, Benetatos CA & Hudes GR (1997). Immunohistochemical analysis of β -tubulin isotypes in human prostate carcinoma and benign prostatic hypertrophy. *Prostate* **30**, 263–268.
- Raspaglio G, Ferrandina G, Ferlini C, Scambia G & Ranelletti FO (2003). Epidermal Growth Factor-Responsive Laryngeal Squamous Cancer Cell Line Hep2 Is More Sensitive Than Unresponsive CO-K3 One to Quercetin and Tamoxifen Apoptotic Effects. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* **14**, 83–91.
- Raspaglio G, Filippetti F, Prislei S, Penci R, De Maria I, Cicchillitti L, Mozzetti S, Scambia G & Ferlini C (2008). Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1 α binding to its 3' flanking region. *Gene* **409**, 100–108.
- Raspaglio G, Petrillo M, Martinelli E, Li Puma DD, Mariani M, De Donato M, Filippetti F, Mozzetti S, Prislei S, Zannoni GF, Scambia G & Ferlini C (2014). Sox9 and Hif-2 α regulate TUBB3 gene expression and affect ovarian cancer aggressiveness. *Gene* **542**, 173–181.
- Redeker V (2010). Mass Spectrometry Analysis of C-Terminal Posttranslational Modifications of Tubulins. In *Methods in cell biology*, pp. 77–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466131> [Accessed August 25, 2019].
- Saillour Y, Broix L, Bruel-Jungerman E, Lebrun N, Muraca G, Rucci J, Poirier K, Belvindrah R, Francis F & Chelly J (2014). Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown. *Hum Mol Genet* **23**, 1516–1526.
- Sanson M (2016). Marqueurs tumoraux des gliomes. *J Neuroradiol* **43**, 74–75.
- Santarosa C, Castellano A, Conte GM, Cadioli M, Iadanza A, Terreni MR, Franzin A, Bello L, Caulo M, Falini A & Anzalone N (2016). Dynamic contrast-enhanced and dynamic susceptibility contrast perfusion MR imaging for glioma grading: Preliminary comparison of vessel compartment and permeability parameters using hotspot and histogram analysis. *Eur J Radiol* **85**, 1147–1156.
- Scheuermann TH, Li Q, Ma H-W, Key J, Zhang L, Chen R, Garcia JA, Naidoo J, Longgood J, Frantz DE, Tambar UK, Gardner KH & Bruick RK (2013). Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat Chem Biol* **9**, 271–276.
- Scheuermann TH, Tomchick DR, Machius M, Guo Y, Bruick RK & Gardner KH (2009). Artificial ligand binding within the HIF2 α PAS-B domain of the HIF2 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 450–455.
- Schiff PB & Horwitz SB (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1561–1565.
- Schmid MC & Varner JA (2010). Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment: Modulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Inflammation. *J Oncol* **2010**, 1–10.
- Schmidt EE, Ichimura K, Goike HM, Moshref A, Liu L & Collins VP (1999). Mutational Profile of the PTEN Gene in Primary Human Astrocytic Tumors and Cultivated Xenografts. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 1170–1183.
- Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD & Wrensch M (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *J Neurooncol* **2**, 494–503.
- Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, Von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze AT, Nistér M, Reifenberger G, Lundeborg J, Frisén J & Acker T (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . *Brain* **133**, 983–995.

- Semenza G & Wang G (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*; DOI: 10.1128/MCB.12.12.5447.
- Sémiond D, Sidhu SS, Bissery M-C & Vrignaud P (2013). Can taxanes provide benefit in patients with CNS tumors and in pediatric patients with tumors? An update on the preclinical development of cabazitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol* **72**, 515–528.
- Sève P, Lai R, Ding K, Winton T, Butts C, Mackey J, Dumontet C, Dabbagh L, Aviel-Ronen S, Seymour L, Whitehead M, Tsao M-S, Shepherd FA & Reiman T (2007). Class III beta-tubulin expression and benefit from adjuvant cisplatin/vinorelbine chemotherapy in operable non-small cell lung cancer: analysis of NCIC JBR.10. *Clin Cancer Res* **13**, 994–999.
- Sève P, Mackey J, Isaac S, Trédan O, Souquet P-J, Pérol M, Lai R, Voloch A & Dumontet C (2005). Class III beta-tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther* **4**, 2001–2007.
- Shi X & Sun X (2017). Regulation of paclitaxel activity by microtubule-associated proteins in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **80**, 909–917.
- Shimizu A, Kaira K, Yasuda M, Asao T & Ishikawa O (2016). Decreased expression of class III β -tubulin is associated with unfavourable prognosis in patients with malignant melanoma. *Melanoma Res* **26**, 29–34.
- Simon MC (2016). The Hypoxia Response Pathways - Hats Off! *N Engl J Med* **375**, 1687–1689.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD & Dirks PB (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*; DOI: 10.1038/nature03128.
- Sonnenschein C & Soto AM (2008). Theories of carcinogenesis: An emerging perspective. *Semin Cancer Biol*; DOI: 10.1016/j.semcancer.2008.03.012.
- 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 [18 F] fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: Correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res*; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4995.
- Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH & Aneja R (2011). Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev* **31**, 443–481.
- Stupp R et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**, 459–466.
- 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. In *Cancer Research*.
- Sydney E, Kevin J, Isaac C, Timothy J, Kevin J, Wei-Ting H, Robert L, Alexander J, Sean G, Stephen H & Cameron K (2010). The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study. *Transl Oncol*; DOI: 10.1593/tlo.09265.

- Tanaka S, Nohara T, Iwamoto M, Sumiyoshi K, Kimura K, Takahashi Y & Tanigawa N (2009). Tau expression and efficacy of paclitaxel treatment in metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**, 341–346.
- Terry S, Ploussard G, Allory Y, Nicolaiew N, Boissière-Michot F, Maillé P, Kheuang L, Coppolani E, Ali A, Bibeau F, Culine S, Buttyan R, de la Taille A & Vacherot F (2009). Increased expression of class III β -tubulin in castration-resistant human prostate cancer. *Br J Cancer* **101**, 951–956.
- Thomas ES, Gomez HL, Li RK, Chung H-C, Fein LE, Chan VF, Jassem J, Pivot XB, Klimovsky J V., de Mendoza FH, Xu B, Campone M, Lerzo GL, Peck RA, Mukhopadhyay P, Vahdat LT & Roché HH (2007). Ixabepilone Plus Capecitabine for Metastatic Breast Cancer Progressing After Anthracycline and Taxane Treatment. *J Clin Oncol* **25**, 5210–5217.
- Toso RJ, Jordan MA, Farrell KW, Matsumoto B & Wilson L (1993). Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine. *Biochemistry* **32**, 1285–1293.
- Tsourlakis MC, Weigand P, Grupp K, Kluth M, Steurer S, Schlomm T, Graefen M, Huland H, Salomon G, Steuber T, Wilczak W, Sirma H, Simon R, Sauter G, Minner S & Quaas A (2014). β III-tubulin overexpression is an independent predictor of prostate cancer progression tightly linked to ERG fusion status and PTEN deletion. *Am J Pathol* **184**, 609–617.
- Tuszynski JA, Carpenter EJ, Huzil JT, Malinski W, Luchko T & Luduena RF (2006). The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *Int J Dev Biol* **50**, 341–358.
- Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, Kim SJ, Miyoshi Y, Noguchi S, Miyata H, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M & Monden M (2006). Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer. *Int J Oncol* **28**, 375–381.
- Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Kennedy AS, Novotny DB, Fowler WC & Raleigh JA (1998). Pimonidazole: A Novel Hypoxia Marker for Complementary Study of Tumor Hypoxia and Cell Proliferation in Cervical Carcinoma. *Gynecol Oncol* **71**, 270–277.
- Vartanian A, Singh SK, Agnihotri S, Jalali S, Burrell K, Aldape KD & Zadeh G (2014). GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. *Neuro Oncol* **16**, 1167–1175.
- Vaupel P (2004). The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *Oncologist*; DOI: 10.1634/theoncologist.9-90005-10.
- Villasante A, Wang D, Dobner P, Dolph P, Lewis SA & Cowan NJ (1986). Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isoforms: testis-specific expression of two sister genes. *Mol Cell Biol* **6**, 2409–2419.
- Vrignaud P, Semiond D, Lejeune P, Bouchard H, Calvet L, Combeau C, Riou J-F, Commercon A, Lavelle F & Bissery M-C (2013). Preclinical Antitumor Activity of Cabazitaxel, a Semisynthetic Taxane Active in Taxane-Resistant Tumors. *Clin Cancer Res* **19**, 2973–2983.
- Wade RH (2009). On and around microtubules: An overview. *Mol Biotechnol* **43**, 177–191.
- Wallace EM et al. (2016a). A Small-Molecule Antagonist of HIF2 α Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* **76**, 5491–5500.
- Wallace EM et al. (2016b). A Small-Molecule Antagonist of HIF2 α Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* **76**, 5491–5500.
- Wang D, Villasante A, Lewis SA & Cowan NJ (1986). The mammalian beta-tubulin repertoire:

- hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J Cell Biol* **103**, 1903–1910.
- 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 Pacific J Cancer Prev*; DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.1.427.
- 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. *J Clin Oncol* **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. *Nat Rev Neurol*; DOI: 10.1038/nrneurol.2017.64.
- Westermann S & Weber K (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 938–948.
- Wilson WR & Hay MP (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; DOI: 10.1038/nrc3064.
- Yan T, Skaftnesmo KO, Leiss L, Sleire L, Wang J, Li X & Enger PT (2011). Neuronal markers are expressed in human gliomas and NSE knockdown sensitizes glioblastoma cells to radiotherapy and temozolomide. *BMC Cancer*; DOI: 10.1186/1471-2407-11-524.
- Yanagisawa T, Hasegawa S & Mohri H (1968). The bound nucleotides of the isolated microtubules of sea-urchin sperm flagella and their possible role in flagellar movement. *Exp Cell Res* **52**, 86–100.
- Yang J, Zhang L, Erbel PJA, Gardner KH, Ding K, Garcia JA & Bruick RK (2005). Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.M501755200.
- 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*; DOI: 10.3390/ijms131113949.
- Yoon SJ, Shim JK, Chang JH, Moon JH, Roh TH, Sung KS, Lee JH, Kim EH, Kim SH, Hong YK, Lee SJ, Huh YM & Kang SG (2016). Tumor Mesenchymal Stem-Like Cell as a Prognostic Marker in Primary Glioblastoma. *Stem Cells Int*; DOI: 10.1155/2016/6756983.
- Yoshikawa T, Mori Y, Feng H, Phan KQ, Kishimura A, Kang JH, Mori T & Katayama Y (2019). Rapid and continuous accumulation of nitric oxide-releasing liposomes in tumors to augment the enhanced permeability and retention (EPR) effect. *Int J Pharm*; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.043.
- Yu J, Gao J, Lu Z, Gong J, Li Y, Dong B, Li Z, Zhang X & Shen L (2014). Combination of microtubule associated protein-tau and β -tubulin III predicts chemosensitivity of paclitaxel in patients with advanced gastric cancer. *Eur J Cancer* **50**, 2328–2335.
- 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.
- Yvon A-MC, Wadsworth P & Jordan MA (1999). Taxol Suppresses Dynamics of Individual Microtubules in Living Human Tumor Cells ed. Kirschner MW. *Mol Biol Cell* **10**, 947–959.
- Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, Xu H, Lu YC, Zheng Z, Pasetto A, Langhan M, Shelton T, Prickett T, Gartner J, Jia L, Trebska-Mcgowan K, Somerville RP, Robbins PF, Rosenberg SA, Goff SL &

- Feldman SA (2018). Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med*; DOI: 10.1038/s41591-018-0040-8.
- Zalcman G, Bergot E, Creveuil C, Levallet G & Lechapt E (2011). Integrating biomarkers into clinical trials: methodological issues for a new paradigm in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* **23**, 106–111.
- Zhu J, Wang H, Fan Y, Lin Y, Zhang L, Ji X & Zhou M (2014). Targeting the NF-E2-related factor 2 pathway: a novel strategy for glioblastoma (review). *Oncol Rep* **32**, 443–450.

Évaluation préclinique de stratégies inhibitrices sélectives de HIF-2 α et de la β III-tubuline pour limiter le développement des glioblastomes et la résistance aux traitements

L'hypoxie est une caractéristique majeure des glioblastomes (GB). Elle est la cause principale de la résistance aux traitements observée dans ces tumeurs. Les conséquences de la baisse en oxygène au niveau tumoral, sont médiées par les facteurs de transcription *Hypoxia Inducible Factors* (HIF). Ces facteurs sont des protéines hétérodimériques HIF- α /HIF-1 β responsables de la transcription de nombreux gènes cibles. Certaines de ces cibles participent à la progression tumorale et à la mise en place d'un phénotype agressif. L'une des cibles de l'isoforme HIF-2 α , est la β III-tubuline (β III-t). Cette protéine, qui compose les microtubules, est décrite comme surexprimée dans les gliomes de haut grade, comme les GB. Ces travaux de thèse s'intéressent au rôle de la β III-t dans la progression tumorale ainsi qu'au développement de stratégies permettant d'inhiber l'expression de HIF-2 α . Les résultats obtenus montrent que la β III-t a une importance centrale dans le développement tumoral. En effet, les tumeurs issues de l'implantation de cellules humaines de GB invalidées pour la β III-t, se développent significativement moins vite comparées aux tumeurs contrôles. *In vitro*, nous avons montré que cette protéine est impliquée dans la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires. En revanche, nous n'avons pas pu confirmer que la β III-t est impliquée dans la résistance aux traitements (chimio- ou radiothérapeutiques). Les deux composés testés comme inhibiteurs de HIF-2 α (SR2933 et PT2385) ont montré des résultats prometteurs sur la β III-t, gène cible spécifique de HIF-2 α . Cependant, malgré les stratégies développées, nous n'avons pas pu évaluer l'efficacité directe de ces deux composés sur l'hétérodimérisation de HIF-2 α avec HIF-1 β .

Preclinical evaluation of selective inhibitory strategies of HIF-2 α and β III-tubulin to limit the development of glioblastoma and the resistance to treatments.

Hypoxia is a major feature of glioblastoma (GB). It is the main cause of the resistance to treatments observed in these tumors. The consequences of the decrease in oxygen at the tumor level, is mediated by the Hypoxia Inducible Factors (HIF). These transcription factors are heterodimeric proteins HIF- α /HIF-1 β responsible for the transcription of many target genes. Some of these targets are responsible for setting up an aggressive phenotype and in tumor progression. One of the targets of the HIF-2 α isoform is β III-tubulin (β III-t). This protein, which is a constituent of microtubules, is described as overexpressed in high grade gliomas, such as GB. In the present thesis, we examined the role of β III-t in tumor progression and we developed strategies to inhibit the expression of HIF-2 α . Our results show that β III-t is of central importance in tumor development. Indeed, tumors resulting from the implantation of GB human cells invalidated for β III-t, developed significantly less rapidly compared to control tumors. *In vitro*, we have shown that this protein is involved in cell proliferation, migration and invasion. However, we could not confirm that β III-t is involved in resistance to treatments (chemotherapeutic or radiotherapeutic). The two compounds tested as inhibitors of HIF-2 α (SR2933 and PT2385) showed promising results on β III-t, a specific target gene of HIF-2 α . However, despite the different tested strategies, we could not evaluate the direct inhibitory action of these two compounds on the heterodimerization of HIF-2 α with HIF-1 β .

Mots clés : glioblastomes, β III-tubuline, HIF-2 α , hypoxie, chimiothérapie, radiothérapie

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Adresse du laboratoire : ISTCT, UMR 6030 – CNRS, CEA, Université de Caen-Normandie

GIP Cyceron,
Boulevard Henri Becquerel,
14000 Caen, France