HAL open science

Rôle de la chimiokine CXCL12 et action de molécules chalcones dans l'autorenouvellement et la survie des cellules initiatrices de glioblastome

Farah Hajjar

To cite this version:

Farah Hajjar. Rôle de la chimiokine CXCL12 et action de molécules chalcones dans l'autorenouvellement et la survie des cellules initiatrices de glioblastome. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ062 . tel-03589056

HAL Id: tel-03589056

https://theses.hal.science/tel-03589056v1

Submitted on 25 Feb 2022

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED414)

LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE ET SIGNALISATION CELLULAIRE (UMR 7242)

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

soutenue par

Farah HAJJAR

le 16 DECEMBRE 2020

RÔLE DE LA CHIMIOKINE CXCL12 ET ACTION DE MOLÉCULES CHALCONES DANS L'AUTORENOUVELLEMENT ET LA SURVIE DES CELLULES INITIATRICES DE GLIOBLASTOME

MEMBRES DU JURY

Directrice de thèse		
PR. Marie-Claude KILHOFFER	Professeur	Université de Strasbourg
Rapporteurs		
DR. Catherine LECLERC	Chargé de Recherche	Université P. Sabatier
PR. Christos ROUSSAKIS	Professeur	Université de Nantes
Examinateur		
PR. Philippe BOUCHER	Professeur	Université de Strasbourg

RESUME

La chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et ACKR3 ou (CXCR7), constituent une voie de signalisation dont l'importance est reconnue dans le développement des glioblastomes (tumeurs primaires les plus malignes du cerveau). L'axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 intervient dans le fonctionnement des cellules cancéreuses, y compris les cellules initiatrices du glioblastome (CI-GBM). Dans notre projet, nous avons étudié le rôle de la chimiokine CXCL12 produite de manière endogène dans l'autorenouvellement et la survie de CI-GBM soit en utilisant des molécules neutraligands de CXCL12, soit par l'interruption du gène qui exprime cette chimiokine. Les membres des UMR 7200 et 7242 ont développé des molécules chalcones neutraligands de CXCL12 testées dans des modèles inflammatoires. Ces molécules à activité neutraligand se fixent sur la chimiokine et inhibent son interaction avec ses récepteurs. Le mécanisme d'action de molécules chalcones a été testé sur la prolifération des CI-GBM. Les résultats ont montré un effet inhibiteur de la molécule chalcone 4 neutraligand de CXCL12 à 5 µM sur la croissance et la formation des tumorosphères clonales des CI-GBM. Cependant, cet effet est indépendant de la voie CXCL12. L'interruption du gène *CXCL12* dans les cellules CI-GBM par la technologie CRISPR/Cas9 a montré que la chimiokine n'etait pas indispensable à la croissance des cellules, mais qu'elle la favorisait, notamment lorsque les cellules étaient à l'état de cellule unique ou en petit nombre.

Mots clés : Glioblastome, Cellule souche cancéreuse, Cellule initiatrice du glioblastome, Chalcone, CXCL12, CXCR4, ACKR3 ou (CXCR7).

ABSTRACT

The chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and ACKR3 or (CXCR7), constitute a signaling pathway whose importance is recognized in the development of glioblastomas (the most malignant primary tumors of the brain). The CXCL12/CXCR4/ACKR3 axis is involved in the functioning of cancer cells, including glioblastoma initiator cells (CI-GBM). In our project, we investigated the role of the endogenously produced chemokine CXCL12 in the self-renewal and survival of CI-GBM either by using neutraligand molecules of CXCL12 or by disrupting the gene that expresses this chemokine. Members of UMR 7200 and 7242 developed neutraligand chalcone molecules of CXCL12 that were tested in inflammatory models. These molecules bind to the chemokine and inhibit its interaction with its receptors. The mechanism of action of chalcone molecules was tested on the proliferation of CI-GBM. The results showed an inhibitory effect of the chalcone 4 neutraligand molecule of CXCL12 at 5 µM on the growth and formation of clonal tumorospheres of CI-GBM. However, this effect is independent of the CXCL12 pathway. The interruption of the CXCL12 gene in CI-GBM cells by CRISPR / Cas9 technology showed that the chemokine was not essential for cell growth, but that it promoted it, especially when the cells were in the single cell or in small numbers.

Keywords: Glioblastoma, Cancer stem cell, Gliobasltoma initiator cells, Chalcone, CXCL12, CXCR4, ACKR3 or (CXCR7).

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, Pr Marie-Claude KILHOFFER, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela. Je remercie également le Professeur Marcel Hibert, directeur de l'UMR 7200, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire d'innovation thérapeutique les deux premières années de ma thèse.

Je désire grandement remercier les membres de mon jury, Dr Catherine LECLERC, Pr Christos ROUSSAKIS et Pr Philippe BOUCHER de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ma thèse.

Je remercie chaleureusement mes chères collègues dans l'équipe, Dr Maria ZENIOU, Dr Wanyin CHEN et Dr Jihu Dong de m'avoir aidé beaucoup techniquement. J'ai beaucoup apprécié votre agréable ambiance durant nos journées de travail, votre bonne humeur et votre sympathie. Un grand merci également au Professeur Jacques Haiech pour son implication dans le projet, notamment lors de problématiques rencontrées dans nos expériences et sa disponibilité lors de nos réunions de travail.

Je remercie également tous les membres de l'équipe PCBIS (Plate-forme de Chimie Biologie Intégrative de Strasbourg), Pascal VILLA, Christel VALENCIA, Sophie GIORIA, Adeline OBRECHT, Romain HANY, Valérie CALCO, Patrick Gizzi et Sarah Benmalek. Merci à tous pour votre aide, votre soutien technique, votre disponibilité, vos conseils précieux et surtout votre bonne humeur communicative.

J'adresse de sincères remerciements à notre collaborateur à l'IGBMC (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire), Illkirch, Dr Bernardo Reina San Martin, et à son équipe particulièrement Vincent HEYER, de leur générosité dans la réalisation des plasmides nécessaires pour l'avancement de notre projet.

Je remercie également le Docteur Dominique Bonnet et son équipe de chimiste de nous avoir fourni les neutraligands.

Je tiens à remercier également le Docteur Jean-Luc Galzi, directeur de l'UMR 7242, laboratoire de Biotechnologie et signalisation cellulaire pour ses précieuses interventions et ses conseils.

Je souhaite également remercier le Dr Frédéric SIMONIN directeur de l'équipe RCPGs, douleur et inflammation (UMR 7242), et tous les membres de m'avoir accueilli au sein de leur équipe les deux dernières années de ma thèse. Je tiens particulièrement à remercier Valérie UTARD et Sandra LECAT pour leur aide précieuse, leur temps, leur disponibilité et leur bonne humeur.

Enfin, je voudrais remercier énormément mes parents ainsi que mes deux frères, pour leur soutien et leurs encouragements au cours de ces années, sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci beaucoup à ma mère d'avoir quitté plusieurs fois le Liban pour venir m'aider à avancer dans mon projet, merci ainsi à mon père d'avoir supporté son absence régulier sans jamais se plaindre…

Merci infiniment à la personne qui partage ma vie depuis des années, mon époux Nazih. Merci de me supporter tous les jours, et pour ton soutien indéfectible. Merci pour ton aide interminable, pour tes encouragements quand je baisse les bras et pour ta présence à mes côtés dans n’importe quelle circonstance. Merci à mes trois enfants Jamal, Youssef et Kinan, de m’avoir supporté durant ces années. Vous êtes mon grand bonheur. Sans vous et votre papa je n'en serais pas là aujourd'hui.

SOMMAIRE

INTRODUCTION **1**

I. GLIOMES 1

1 Les paramètres moléculaires *3*

1.1 Mutations des gènes IDH1 et IDH2 3

1.2 Codélétion 1p/19q 4

1.3 Mutations du promoteur de TERT et d'ATRX 4

1.4 Mutations des gènes des histones H3 5

1.5 Méthylation du promoteur de la O^6-méthylguanine-ADN-méthyltransférase 5

II. GLIOBLASTOMES 6

1 Type des glioblastomes *6*

1.1 Glioblastome primaire 7

1.2 Glioblastome secondaire 7

2 Caractérisation moléculaire du glioblastome *8*

2.1 Mutations IDH1/IDH2 8

2.2 G-CIMP 9

2.3 Méthylation du promoteur MGMT 9

2.4 Amplification EGFR (epidermal growth factor receptor) 9

2.5 Mutations TP53 10

2.6 Mutation d'ATRX 10

2.7 Mutation du promoteur TERT 11

2.8 Pertes et gains chromosomiques 11

3 Classification des sous-types de GBM basée sur des altérations génomiques *11*

3.1 IDH-non muté ou IDH type sauvage 12

3.2 IDH-muté 12

3.3 GBM NOS 12

4 Voies de signalisation altérées dans le GBM *12*

4.1 Voie RTK/RAS/PI3K 13

4.1.1 La cascade RAS/RAF/MAPK 13

4.1.2 La cascade PI3K/Akt/mTOR 13

4.2 Voie TP53 14

4.3 Voie de la protéine du rétinoblastome 14

5 Diagnostic et symptômes *16*

6 Traitement du glioblastome *16*

6.1 Traitement du GBM après la résection neurochirurgicale 16

6.2 Traitements de la récidive 17

6.3 Agents antiangiogéniques 18

6.4 Immunothérapie 18

7 Microenvironnement tumoral du GBM *19*

7.1 Composants majeurs du microenvironnement tumoral 19

7.1.1 Les cellules du microenvirennement tumoral 19

7.1.1.1 Cellules fibroblastiques associées au cancer 19

7.1.1.2 Cellules vasculaires angiogéniques 19

7.1.1.3 Cellules immunitaires infiltrantes 20

7.1.2 La matrice extracellulaire 20

7.2 Facteurs physico-chimiques 21

7.2.1 La vascularisation tumorale 21

7.2.2 Hypoxie 22

7.2.3 Acidité 22

III. CELLULES SOUCHES CANCEREUSES (CSCS) 23

1 Découverte des CSCs *25*

2 Propriétés des CSCs ... 26
3 Résistance des CSCs à la thérapie. ... 28
4 Cellules souches cancéreuses du Glioblastome (CSGs) ... 29
4.1 Conditions de culture et isolement des CSGs ... 30
4.2 Résistance des CSGs aux thérapies ... 31
IV. CHIMIOKINES ET RECEPTEURS DANS GBM ... 32
1 Généralités sur les chimiokines et les récepteurs ... 32
1.1 Les chimiokines ... 32
1.1.1 Nomenclature et classification des chimiokines ... 32
1.1.2 Structure des chimiokines ... 37
1.1.3 Les récepteurs de chimiokines ... 38
1.1.4 Liaisons des chimiokines aux glycosaminoglycanes (GAGs) ... 41
1.1.5 Interaction chimiokines – récepteurs et signalisation cellulaire en aval. ... 45
1.1.5.1 Signalisation protéine G dépendante ... 46
1.1.5.2 Signalisation β-arrestine dépendante ... 47
1.1.5.3 Autres voies d'activation ... 48
1.1.5.4 Rôle des récepteurs atypiques ACKR dans la modulation de la signalisation induite par les chimiokines. ... 48
2 La chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et ACKR3 (CXCR7) ... 49
2.1 CXCL12, isoformes et données cristallographiques ... 49
2.2 Sites de production CXCL12 ... 51
2.3 Activité de la chimiokine CXCL12 ... 52
2.4 Les deux récepteurs de la chimiokine CXCL12 ... 53
2.4.1 CXCR4 ... 53
2.4.2 Expression du récepteur CXCR4 ... 53
2.4.2.1 Voies de signalisation intracellulaire du couple CXCR4/CXCL12 ... 54
2.4.3 ACKR3 (CXCR7) ... 56
2.4.3.1 Signalisation ACKR3 ... 57
2.5 Pathologies associées à CXCL12, CXCR4, ACKR3 (CXCR7) ... 59
2.6 Propriétés oncogéniques du trio CXCL12/CXCR4-ACKR3 ... 59
2.6.1 Expression de CXCR4 dans les tumeurs ... 59
2.6.1.1 Dans le Glioblastome (GBM) ... 60
2.6.1.2 Dans les cellules souches cancéreuses (CSCs) ... 61
2.6.2 Expression de CXCL12 dans les tumeurs ... 62
2.6.3 Expression de ACKR3 dans le cancer ... 62
2.6.4 Axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans la régulation de cellules souches cancéreuses du GBM (CSGs) ... 63
2.6.4.1 Autorenouvellement ... 65
2.6.4.2 Angiogenèse ... 66
2.6.4.3 Migration ... 66
2.7 Les antagonistes de CXCR4, CXCL12 et ACKR3 ... 67
2.7.1 Antagoniste de CXCR4 ... 67
2.7.1.1 Antagonistes non peptidiques ... 67
2.7.1.2 Antagonistes peptidiques ... 68
2.7.1.3 Analogues de peptides CXCL12 ... 68
2.7.1.4 Anticorps ciblant CXCR4 ... 69
2.7.2 Antagonistes ACKR3 ... 69
2.7.3 Inhibiteurs CXCL12 ... 70
2.7.3.1 NOX-A12 ... 70
2.7.3.2 Les chalcones ... 71

OBJECTIFS DE LA THESE ... 73

MATERIELS ET METHODES ... 74

I. CARACTERISTIQUES DES CELLULES UTILISEES DANS NOTRE ETUDE ... 74
II. CULTURE DES CI-GBM ... 76

III. TEST DE CLONALITE 77
IV. EXTRACTION, PURIFICATION ET QUANTIFICATION DE L'ARN TOTAL 77
V. RETROTRANSCRIPTION ET PCR QUANTITATIVE (RT-QPCR) 78
1 Rétrotranscription 78
2 PCR quantitative 78
VI. EXTRACTION DE L'ADN 79
VII. DETECTION DE CXCL12 PAR ELISA 79
VIII. TEST DE LA VIABILITE CELLULAIRE 80
IX. INTERRUPTION DU GENE *CXCL12* 81
1 Système CRISPR/Cas9 commercial de la société Santa Cruz 81
2 Système CRISPR/Cas9 non commercial 82
2.1 Tri des cellules transfectées 83
2.2 Caractérisation des clones 84
2.2.1 Par PCR 84
2.2.2 Par ELISA 85
2.2.3 Par séquençage 85
X. ANALYSE DE L'ENTREE DES MOLECULES CHIMIQUES DANS LES CI-GBMS 85

RESULTATS 87

I. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNM DES GENES *CXCL12, CXCR4* ET *ACKR3* (*CXCR7*) DANS LES CELLULES CI-GBMS 87
II. IDENTIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE CXCL12 PAR LES CINQ TYPES DES CI-GBMS 88
III. ROLE DE LA CHIMIOKINE CXCL12 ET DE SON RECEPTEUR CXCR4 DANS LA PROLIFERATION DES CI-GBM. APPROCHE PHARMACOLOGIQUE. 90
1 Les Molécules 91
2 Effet des chalcones 1, 4, LIT-927 et de l'AMD3100 sur la formation des tumorosphères clonales 92
3 Effet des chalcones 1, 4, LIT-927 et de l'AMD3100 sur la prolifération de cellules CI-GBM TG1 93
4 Effet des molécules chalcone 4, 1, LIT-927 sur des CI-GBM autres que les cellules TG1 97
IV. EFFET DE LA CHIMIOKINE CXCL12 EXOGENE SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES TG1 EN ABSENCE ET EN PRESENCE DES MOLECULES CHALCONES ET DE L'AMD3100 102
V. ROLE DE LA CHIMIOKINE CXCL12 DANS LA PROLIFERATION DES CI-GBM. APPROCHE GENETIQUE PAR INTERRUPTION DU GENE CODANT LA CHIMIOKINE CXCL12 DANS LES CELLULES CI-GBM TG1 104
1 Interruption du gène CXCL12 des cellules TG1 avec la méthode CRISPR/Cas9 commerciale de la société Santa Cruz 104
2 Interruption du gène CXCL12 des cellules TG1 par une méthode CRISPR/Cas9 non commerciale 109
2.1 Obtention de clones après transfection avec le plasmide pX-851 codant la Cas9 "high fidelity" (HF) et les ARNg. 109
2.1.1 Caractérisation des tumorosphères clonales obtenues après transfection des cellules TG1 avec le plasmide pX-851 et identification des clones présentant une interruption du gène *CXCL12*. 111
2.1.1.1 Analyse par PCR des clones obtenus après transfection des cellules TG1 avec le plasmide pX-851 111
2.1.1.2 Expression de la protéine CXCL12 dans les clones de cellules TG1 transfectées avec le plasmide pX-851 114
2.1.1.3 Séquençage de clones de cellules TG1 transfectées avec le plasmide pX-851 115
2.2 Croissance des cellules TG1 CXCL12 KO 118
2.2.1 Culture dans des conditions non clonales 118
2.2.2 Formation des tumorosphères clonales 119
2.2.3 Effet des molécules chalcones sur la prolifération de cellules TG1 CXCL12 KO et la formation des sphères 119
2.2.3.1 Effet des chalcones sur la prolifération des clones des cellules TG1 CXCL12 KO 120
2.2.3.2 Effet des chalcones 1, 4, LIT-927 sur la formation des tumorosphères clonales des lignées TG1 CXCL12 KO 121
VI. ETUDE DE LA PERMEABILTE MEMBRANAIRE DES CELLULES TG1 VIS-A-VIS DES MOLECULES CHALCONES. 122

DISCUSSION **125**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **131**

BIBLIOGRAPHIE **132**

ANNEXES **162**

FIGURES

FIGURE 1. VOIES GENETIQUES VERS LES GLIOBLASTOMES PRIMAIRES ET SECONDAIRES D'APRES OHGAKI AND KLEIHUES 2013. 8
FIGURE 2. LES ALTERATIONS GENETIQUES DU GLIOBLASTOME SE PRODUISENT FREQUEMMENT DANS 3 VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2008). 15
FIGURE 3. DIFFERENTS MODELES TUMORAUX DE GBM D'APRES LAKS ET AL. 2010. 23
FIGURE 4. LES PROPRIETES DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES D'APRES SUTTER ET AL. 2007. 28
FIGURE 5. NOUVEAUX MODELES POUR LE TRAITEMENT DU CANCER, MODIFIE D'APRES DE SOUSA E MELO ET AL. 2011. 29
FIGURE 6. MOTIFS STRUCTURAUX DANS LA STRUCTURE PRIMAIRE DES CHIMIOKINES. 33
FIGURE 7. STRUCTURE DES CHIMIOKINES 37
FIGURE 8. CHIMIOKINES ET INTERACTION AVEC LEURS RECEPTEURS. 40
FIGURE 9. MODELE D'INTERACTION ENTRE CHIMIOKINE, RCPG ET GLYCOSAMINOGLYCANES (GAG). 44
FIGURE 10. RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G ET INTERACTION AVEC UNE CHIMIOKINE. 45
FIGURE 11. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA CHIMIOKINE CXCL12 (SDF-1). 49
FIGURE 12. STRUCTURE GENOMIQUE DU GENE *CXCL12* HUMAIN. 50
FIGURE 13. PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION DE L'AXE CXCR4/CXCL12. 56
FIGURE 14. VOIES DE TRANSDUCTION INTRACELLULAIRES LIEES A L'ACTIVATION DE ACKR3 (OU CXCR7) ET CXCR4 AFFECTANT LES PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION LIEES A LA SURVIE, A LA PROLIFERATION ET A LA MIGRATION DES CELLULES, D'APRES LOUNSBURY 2020. 58
FIGURE 15. SYSTEME CXCL12/CXCR4/ACKR3 DANS LA NICHE CSGS (D'APRES LE REVUE WÜRTH ET AL. 2014). 65
FIGURE 16. CELLULES DE CI-GBM EN CULTURE. 76
FIGURE 17. TEST DE VIABILITE CELLULAIRE BASE SUR LA MESURE DE L'ATP A L'AIDE DU CELLTITER-GLO DE PROMEGA. 80
FIGURE 18. EXPRESSION DE L'ARNM CODANT LES PROTEINES CXCR4, CXCR7/ACKR3 ET CXCL12 DANS DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES. 88
FIGURE 19. PRODUCTION DE CXCL12 DANS LE MILIEU DE CULTURE DES CELLULES TG1 EN FONCTION DU TEMPS. 89
FIGURE 20. EXPRESSION DE LA PROTEINE CXCL12 PAR LES CINQ TYPES DES CELLULES CI-GBM UTILISES. 90
FIGURE 21. LES DIFFERENTES MOLECULES UTILISEES POUR BLOQUER LA SIGNALISATION CXCL12/CXCR4/ACKR3. 92
FIGURE 22. EFFET DES MOLECULES CHALCONES ET DE L'AMD3100 SUR LE DEVELOPPEMENT D'UNE TUMOROSPHERE CLONALE DE CI-GBM TG1. 93
FIGURE 23. EFFET DES MOLECULES CHALCONES SUR LA CROISSANCE DES CELLULES TG1. 95
FIGURE 24. EFFET DE LA MOLECULE AMD3100 SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES TG1. 96
FIGURE 25. COURBES DOSES-REPONSES DES MOLECULES CHALCONES 4, 1, LIT-927 ET DE L'AMD3100 SUR LES CI-GBM TG1. 97
FIGURE 26. EFFET DES MOLECULES CHALCONES SUR LA PROLIFERATION DE CELLULES DE CI-GBM AUTRES QUE TG1. 101
FIGURE 27. EFFET DE LA CHIMIOKINE CXCL12 EXOGENE SUR LA CROISSANCE DES CELLULES TG1 EN ABSENCE ET EN PRESENCE MOLECULES CHALCONES 1, 4, LIT-927 ET L'AMD3100. 103
FIGURE 28. LES DEUX PLASMIDES CAS9 ET HDR DE LA SOCIETE SANTA CRUZ. 105
FIGURE 29. SCHEMA REPRESENTANT DES DIFFERENTES ETAPES DE LA TRANSFECTION DES CELLULES TG1 PAR LES DEUX PLASMIDES CAS9 ET HDR DE LA SOCIETE SANTA CRUZ. 105
FIGURE 30. SUIVI DES CELLULES TRANSFECTEES AVEC LES PLASMIDES DU SYSTEME COMMERCIAL SANTA CRUZ CIBLANT LE GENE CXCL12. 107

FIGURE 31. EXPRESSION DE CXCL12 DANS LES CELLULES TG1 TRANSFECTEES PAR LE SYSTEME CRISPR/CAS9 COMMERCIAL ET PRESENTANT UN PHENOTYPE NORMO-PROLIFERATIF. 108
FIGURE 32. PLASMIDE PX-851 UTILISE POUR L'INTERRUPTION GENIQUE DU GENE CXCL12 DANS LES CELLULES TG1. 110
FIGURE 33.TUMOROSPHERES CLONALES OBTENUES APRES TRANSFECTION DES CELLULES TG1 AVEC LE PLASMIDE PX-851. 111
FIGURE 34. ALIGNEMENT SUR L'ADN GENOMIQUE HUMAIN DES ARNG ET DES AMORCES DE PCR UTILISEES POUR TESTER L'INTERRUPTION GENIQUE DANS LES CLONES DE CELLULES TG1 TRANSFECTEES. 112
FIGURE 35. GENOTYPAGE DES CLONES ISSUS DE CELLULES TG1 TRANSFECTEES AVEC LE PLASMIDE PX-851. 114
FIGURE 36. MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE CXCL12 DANS LE SURNAGEANT DE CULTURES DES DIFFERENTS CLONES DE CELLULES TG1 TRANSFECTEES. 115
FIGURE 37. GENOTYPAGE PAR PCR DU GENE CXCL12 DES CLONES C15, C35 ET C36 DE CELLULES TG1 TRANSFECTEES AVEC LE PLASMIDE PX-851. 116
FIGURE 38. ANALYSE DES RESULTATS DU SEQUENÇAGE DES CLONES 35 ET 36 OBTENUS APRES TRANSFECTION DE CELLULES TG1 AVEC LE PLASMIDE PX-851. 117
FIGURE 39. TEMPS DE DOUBLEMENT DES CELLULES TG1 CXCL12 KO PAR RAPPORT AUX CELLULES TG1 WT. 118
FIGURE 40. TUMOROSPHERES DES CELLULES TG1 ET DES CLONES C35 ET C36 CXCL12 KO APRES TROIS SEMAINES DE CULTURE. 119
FIGURE 41. EFFET DES MOLECULES CHALCONES SUR LA CROISSANCE DES CLONES C35 (A) ET C36 (B) DE CELLULES TG1 CXCL12 KO. 121
FIGURE 42. EFFET DES MOLECULES CHALCONES SUR LE DEVELOPPEMENT DE TUMOROSPHERES CLONALES DE CELLULES TG1 ET TG1 CXCL12 KO. 122
FIGURE 43. SCHEMA DU PROTOCOLE POUR LA DETECTION DES MOLECULES TRAVERSANT LA MEMBRANE DES CELLULES CI-GBM. 123
FIGURE 44. DETECTION INTRACELLULAIRE DE MOLECULES CHALCONE 4 ET LIT-927 PAR LC-MS/MS. 124
FIGURE 45. EFFET DES MOLECULES CHALCONES SUR LA CROISSANCE DES CLONES C35 (A) ET C36 (B) DE CELLULES TG1 CXCL12 KO. 176

TABLEAUX

TABLEAU 1. CLASSIFICATION 2016 DES GLIOMES PAR L'OMS D'APRES BROULAND AND HOTTINGER 2017...... 3
TABLEAU 2. NOMENCLATURE, CLASSIFICATION ET PRINCIPALES FONCTIONS DES CHIMIOKINES HUMAINES. 36
TABLEAU 3. RECEPTEURS AUX CHIMIOKINES HUMAINS ET PRINCIPALES FONCTIONS...... 39
TABLEAU 4. RECEPTEURS RCPGS DE CHIMIOKINES AVEC UNE RECONNAISSANCE STRICTE VIS-A-VIS D'UNE CHIMIOKINE LIGAND...... 41
TABLEAU 5. APERÇU DES PROCESSUS AFFECTES PAR LES INTERACTIONS CHIMIOKINE-GAG. 44
TABLEAU 6. IMPACT DE ACKR3 DANS DIFFERENTS CANCERS...... 63
TABLEAU 7. CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DES CELLULES TG1...... 75
TABLEAU 8. MELANGE DES REACTIFS DU KIT « HIGH CAPACITY CDNA ARCHIVE KIT® » D'APPLIED BIOSYSTEMS™...... 78
TABLEAU 9. MELANGE DE REACTIFS DEPOSE PAR PUITS POUR UNE REACTION DE PCR QUANTITATIVE...... 79
TABLEAU 10. SEQUENCES DES ARN GUIDES CIBLANT LE GENE CXCL12...... 82
TABLEAU 11. CONDITIONS DE PCR POUR L'ANALYSE DES CLONES DE CI-GBM APRES INTERRUPTION DES GENES CXCL12...... 85
TABLEAU 12. SEQUENCES DES AMORCES DE PCR TESTEES ET TAILLE THEORIQUE DES AMPLIMERES. 112
TABLEAU 13. MESURE DE L'EXPRESSION DES GENES CXCL12, CXCR4 ET ACKR3 (OU CXCR7) PAR RT-QPCR. . 168
TABLEAU 14. COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE NS34. 170

ABREVIATIONS

ABC : ATP-binding cassette transporter

ABCG5/2 : ATP-binding cassette subfamily G member 5/2

ACKR : Atypical Chemokine Receptor

ALDH1 : aldehyde dehydrogenase 1

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ATP : adenosine triphosphate

ATRX : α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

bFGF : basic fibroblast growth factor

BSA : bovine serum albumin

BTC : β-cellulin

CA : carbonic anhydrase

CCND1 : cyclin D1 gene

CCNE2 : cyclin E2 gene

CDK : cyclin-dependent kinase

CDKN2A/B : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B

CI-GBM : cellules initiatrices de glioblastome

CSCs : cellules souches cancéreuses

CSGs : cellules souches cancéreuses de glioblastome

CT : Computed tomography

CTL : cytotoxic T lymphocytes

CXCL : C-X-C motif chemokine

CXCR : C-X-C motif chemokine receptor

DCs : dendritic cells

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

EC50 : half maximal effective concentration

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epidermal growth factor receptor

ELR : glutamate-leucine-argine

EpCAM : epithelial cell adhesion molecule, également connu sous le nom d'ESA (epithelial specific antigen) ou TROP1

ERKs : extracellular signal-regulated kinases

FACS : fluorescence-activated cell sorting

FBS : fetal bovine serum

FDA : Food and Drug Administration

FGF2 : fibroblast growth factor 2

G6PDH : glucose 6-phosphate dehydrogenase

GBM : glioblastoma

G-CIMP : glioma-CpG island methylator phenotype

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GLUT1/3 : glucose transporter type 1/3

GPCR : G protein-coupled receptor

GRKs : GPCR kinases

GSH : reduced glutathione

GTP : guanosine triphosphate

2-HG : 2-hydroxygutarate

HGF : hepatocyte growth factor

Hh : hedgehog

HIF : hypoxia-inducible factor

hTERT : human telomerase reverse transcriptase

IDH : isocitrate dehydrogenase

JAK : janus kinase

JNK : c-Jun N-terminal kinase

LOH : loss of heterozygosity

MAPKs : mitogen activated protein kinases

MDM2/4 : mouse double-minute 2/4

MDSCs : myeloid-derived suppressor cells

MEC : matrice extracellulaire

MEK : MAPK kinase

MGMT : O-6-methylguanine-DNA methyltransferase

MMP : matrix metalloproteinase

mTOR : mechanistic/mammalian target of rapamycin

mTORC1/2 : mammalian target of rapamycin complex 1/2

MYCN : proto-oncogene transcription factor gene

NADP+ : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH : reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF-1 : neurofibromin 1

NF-kB : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NOD/SCID : non-obese diabetic/severe combined immunodefeciency

OCT-3/4 : octamer-binding transcription factor 3/4

OLIG2 : oligodendrocyte transcription factor 2

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS : phosphate buffered saline

PD-1 : programmed cell death protein 1

PDGF : platelet-derived growth factor

PDGFRA : platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide

PDK1 : phosphoinositide-dependent kinase 1

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PKC : protein kinase C

PP1 : protein phosphatase 1

PTEN : phosphatase and tensin homolog

RB : retinoblastoma

RCPGs : récepteurs couplés aux protéines G

ROS : reactive oxygen species

RTK : receptor tyrosine kinase

SDF-1 : stromal cell-derived factor 1

SHH : sonic hedgehog

SOX2 : sex determining region Y-box 2

STAT : signal transducer and activator of transcription

TAMs : tumor-associated macrophages

TCA : tricarboxylic acid

TEMs : TIE-2 expressing monocytes

TERT : telomerase reverse transcriptase

TG1 (WT) : cellules CI-GBM (TG1) qui n'ont pas du tout été soumises au processus de transfection.

TG1 non transfectées : cellules CI-GBM (TG1) qui n’ont pas été transfectées avec le ou les plasmide(s).

TGF : transforming growth factor

TMZ : temozolomide

TNF : tumor necrosis factor

TP53 : Tumor protein 53

TSC1/2 : tuberous sclerosis proteins 1/2, également connu sous le nom hamartin/tuberin

TTF : tumor treating field

VEGF : vascular endothelial growth factor

Introduction

I. Gliomes

Les gliomes sont les tumeurs intrinsèques les plus fréquentes du système nerveux central et sont divisés en deux groupes principaux : les gliomes de haut grade très invasifs et très agressifs dont le pic de fréquence se situe entre 50 et 60 ans et les gliomes de bas grade qui touchent préférentiellement une population d'adultes plus jeunes. Ces derniers évoluent en général lentement, mais une progression beaucoup plus rapide peut parfois être observée. Chez l'adulte, les gliomes constituent les plus fréquentes et les plus graves des tumeurs cérébrales primitives, avec une prévalence d'environ 5 à 8 cas pour 100 000 habitants par an. En France, 2 500 à 3 000 nouveaux cas sont diagnostiqués par an. 75 % des gliomes diagnostiqués sont de haut grade (III ou IV de la classification de l'Organisation mondiale de la santé OMS).

La classification de 2007 des gliomes par l'OMS, était essentiellement basée sur un concept histogénétique, c'est-à-dire sur la ressemblance microscopique des cellules tumorales avec un constituant du tissu cérébral normal et leur degré de différenciation. Cette caractérisation était fondée sur des critères morphologiques en coloration standard (Hématoxyline-Eosine, HE), souvent complétés par des études immunohistochimiques (IHC), voire ultrastructurales. Selon l'OMS, les gliomes étaient donc classés suivant les caractéristiques morphologiques en oligodendrogliomes (O), astrocytomes (A) ou gliomes mixtes (oligoastrocytomes = OA) et suivant leur degré d'agressivité en 4 grades (grade I à grade IV ou glioblastome) : les gliomes de grade I sont des tumeurs bénignes et la résection chirurgicale de cette tumeur est curative. Les gliomes de grade II sont de « bas-grade », avec une récurrence probable de la tumeur. Les gliomes de grade III et de grade IV sont des tumeurs malignes. Les gliomes de grade III sont caractérisés par des atypies nucléaires et une activité mitotique importante. Ils peuvent progresser vers des gliomes de grade IV.

En 2016, suite aux avancées majeures dans le domaine de la génétique des tumeurs, une nouvelle classification des gliomes par l'OMS a été effectuée, en se basant non seulement sur des critères morphologiques, mais incorpore également des paramètres moléculaires aboutissant à un « diagnostic intégré » en plusieurs strates (Louis et al. 2016). Cette nouvelle classification de 2016 des gliomes sépare les tumeurs diffuses astrocytaires ou oligodendrogliales et les autres tumeurs astrocytaires (astrocytome pilocytique, astrocytome pilomyxoïde, astrocytome à cellules géantes épendymaires et xanthoastrocytomes pléomorphes). Les tumeurs épendymaires et celles glioneuronales sont également reclassées (tableau 1).

Type de tumeur caractéristiques moléculaires	Grade OMS
Tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogliales	
Astrocytome diffus, IDH muté Astrocytome gémistocytique, IDH muté	II
Astrocytome diffus, IDH non muté	*II*
Astrocytome diffus, NOS	II
Astrocytome anaplasique, IDH muté	III
Astrocytome anaplasique, IDH non muté	*III*
Astrocytome anaplasique, NOS	III
Glioblastome, IDH non muté Glioblastome à cellules géantes Gliosarcome *Glioblastome épithélioïde*	IV
Glioblastome, IDH-muté	IV
Glioblastome, NOS	IV
Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27M muté	IV
Oligodendrogliome, IDH muté et codélétion 1p/19q	II
Oligodendrogliome, NOS	II
Oligodendrogliome anaplasique, IDH muté et codélétion 1p/19q	III
Oligodendrogliome anaplasique, NOS	*III*
Oligoastrocytome anaplasique, NOS	*III*
Oligoastrocytome, NOS	*II*
Autres tumeurs astrocytaires	
Astrocytome pilocytique Astrocytome pilomyxoïde	I
Astrocytome subépendymaire à cellules géantes	I
Xanthoastrocytome pléomorphe	II
Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique	III
Tumeurs épendymaires	
Subépendymome	I
Ependymome myxopapillaire	I
Ependymome Ependymome papillaire Ependymome à cellules claires Ependymome tanacytique	I
Ependymome, *RELA* fusion positif	II ou III
Ependymome anaplasique	III
Autres gliomes	
Gliome choroïdes du 3e ventricule	II
Gliomes angiocentriques	I
Astroblastome	-

Tableau 1. Classification 2016 des gliomes par l'OMS d'après Brouland and Hottinger 2017. Cette classification est basée sur les caractéristiques moléculaires. En italique : entité provisoire ; NOS : not otherwise specified.

1 Les paramètres moléculaires

1.1 Mutations des gènes IDH1 et IDH2

La famille des isocitrate déshydrogénases (IDH) comprend trois enzymes dans les cellules humaines: IDH1, IDH2 et IDH3. Ces trois enzymes catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate pour produire de l'α-cétoglutarate. IDH1 et IDH2 sont des enzymes dépendantes du NADP+ (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), avec des localisations cytosolique/peroxysomale et mitochondriale, respectivement. L'IDH1 serait impliqué dans le métabolisme des lipides et la détection du glucose, tandis que l'IDH2 régule la respiration oxydative. IDH3 est une isoforme mitochondriale dépendante de NAD+ (nicotinamide adénine dinucléotide) qui joue un rôle essentiel dans la production d'énergie aérobie dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) (Dang and Su 2017).

Le NADPH (phosphate de nicotinamide adénine dinucléotide réduit) est un composé réducteur majeur dans les cellules nécessaires à la fois à la glutathion réductase et à la thiorédoxine réductase pour la génération de glutathion réduit (GSH) et de thiorédoxine réduite, qui sont la base de deux systèmes antioxydants cellulaires cruciaux. Le NADPH est principalement produit par G6PDH (glucose 6-phosphate déshydrogénase), la malate déshydrogénase et l'IDH. Les deux isoformes IDH1 et IDH2 dépendantes du $NADP^+$ forment des homodimères et génèrent du NADPH à partir du $NADP^+$ en catalysant la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α-cétoglutarate en dehors du cycle de Krebs (cycle TCA).

Les différents types de gliomes sont distingués, selon leur statut mutationnel de gènes, IDH1 et IDH2 (Reuss et al. 2015). La mutation IDH la plus courante est une mutation ponctuelle hétérozygote avec un changement de guanine en adénine en position 395 (G395A) conduisant au remplacement de l'arginine en position 132 par l'histidine (R132H, IDH1-R132H ou mIDH1) (Kalkan et al. 2015a). À l'inverse du type sauvage IDH1, la réaction produite par le mutant IDH1 catalyse la conversion du α-cétoglutarate en 2-hydroxygutarate « oncométabolite » (2-HG) et au cours de ce processus, il convertit le NADPH en NADP+. La mutation R132H entraîne alors une réduction des niveaux de α-cétoglutarate et de NADPH, qui va induire une réduction de la génération de glutathion réduit (GSH) et de thiorédoxine réduite qui sont la base de défense cellulaire contre les ROS. En conséquence, les cellules avec de faibles niveaux d'activité IDH en présence de la mutation R132H deviennent plus sensibles aux dommages oxydatifs lors de l'exposition aux radicaux libres et aux ERO (espèces réactives à l'oxygène) (Reitman and Yan 2010).

Les gliomes mutés pour IDH1 ou IDH2, sont regroupés sous le terme de « IDH-muté ». Ces mutations surviennent dans 87 % des gliomes de grades II, 83 % des gliomes de grades III et 85 % des glioblastomes secondaires (Yan et al. 2009). Le statut « IDH-muté » est un facteur de meilleur pronostic pour les gliomes de grades II, III et IV (Sanson et al. 2009). L'évaluation du statut IDH-muté est effectué par étude immunohistochimique (IHC) sur coupe de tissu fixé et inclus en paraffine mettant en évidence la protéine mutante IDH1-R132H qui est présente dans 94 % des tumeurs « IDH-muté » (van den Bent et al. 2013 ; Capper et al. 2009).

1.2 Codélétion 1p/19q

Les modifications des allèles des chromosomes 1 et 19 sont des événements fréquents dans les gliomes. La codélétion 1p/19q représente la suppression complète à la fois du bras court du chromosome 1 (1p) et du bras long du chromosome 19 (19q) et a prouvé être un indicateur puissant de la réponse thérapeutique à la fois à la chimiothérapie et à la chimioradiothérapie combinée et de la survie prolongée des patients atteints de gliomes diffus, en particulier ceux avec des composants oligodendrogliaux (Thakkar et al. 2014). L'oligodendrogliome est un sous-type de tumeurs cérébrales primaires représentant environ 10 à 15 % de tous les gliomes diffus chez les adultes.

Historiquement, la codélétion 1p/19q était présente dans jusqu'à 70 à 85 % des oligodendrogliomes et 50 % des oligoastrocytomes (Gadji et al. 2009 ; Jenkins et al. 2006). La récente classification de 2016 de l'OMS des tumeurs du SNC a mis en évidence l'importance de la codélétion 1p/19q en la rendant un biomarqueur diagnostique, pronostique et prédictif précieux pour la gestion des tumeurs oligodendrogliales. Elle est devenue la signature génétique moléculaire des oligodendrogliomes. Cette codélétion peut se mettre en évidence par la méthode d'hybridation in situ fluorescente (FISH).

1.3 Mutations du promoteur de TERT et d'ATRX

La télomérase transcriptase inverse (TERT) est la sous-unité catalytique de la télomérase. La télomérase est une enzyme qui permet de conserver la longueur du chromosome en ajoutant à chaque extrémité les télomères qui sont de longues séquences de répétitions d'ADN 5'-TTAGGG-3', permettant de protéger les chromosomes de la dégradation, de la fusion de bout en bout et de la recombinaison. Une importante activité télomérase caractérise la grande majorité des tumeurs malignes. On rapporte que plus de 85 à 90 % des cellules cancéreuses ont une régulation positive de l'activité de la télomérase, un mécanisme majeur pour surmonter le raccourcissement des télomères réplicatifs et pour donner une croissance illimitée des cellules cancéreuses (Mizukoshi and Kaneko 2019).

La protéine ATRX (α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) est une nucléoprotéine avec un rôle important dans la régulation du remodelage de la chromatine,

de l'assemblage des nucléosomes et de la maintenance des télomères (Liu et al. 2012b voir aussi Liu et al. 2019).

Dans l'oncogenèse des gliomes, deux mécanismes mutuellement exclusifs interviennent : les mutations du promoteur du gène TERT codant la télomérase (les plus signalées sont C288T et C250T) et les mutations d'ATRX (Amorim et al. 2016). Il a été observé dans certains tumeurs de type sauvage TERT que la longueur relative des télomères était significativement plus courte, ce qui suggère que d'autres mécanismes moléculaires peuvent être impliqués dans la régulation de la longueur des télomères. Une étude a montré qu'il existe une forte corrélation entre les mutations ATRX et le statut TERT puisque 92,9 % des gliomes de type sauvage TERT avaient une inactivation ATRX. Ces résultats suggèrent que la longueur relative des télomères peut également être régulée par l'inactivation de l'ATRX (Gao et al. 2016). La mutation d'ATRX peut être mise en évidence par étude immunohistochimique qui révèle une absence de marquage des cellules tumorales, reflétant la mutation du gène dans 80 % des cas.

1.4 Mutations des gènes des histones H3

Il s'agit de mutations des gènes H_3F_3A codant les histones $H_{3.3}$ et de mutations des gènes $HIST_1H_3B$ codant pour les histones $H_{3.1}$. Ces mutations portent sur des résidus très spécifiques : la lysine (K) en position 27, mutée en méthionine (M) (K27M) et entraîne une perte de l'expression des histones qui peut être visualisée par méthode d'IHC. Ces mutations sont observées surtout dans les gliomes diffus pédiatriques de la ligne médiane du tronc cérébral, thalamus, cervelet et / ou moelle épinière (Khuong-Quang et al. 2012 ; Wu et al. 2014). Dans la classification 2016 de l'OMS, le gliome médian diffus, mutant H3 K27M, a été ajouté à la liste des gliomes diffus et représente une tumeur de grade IV.

1.5 Méthylation du promoteur de la O^6-méthylguanine-ADN-méthyltransférase

Les agents alkylants tels que le témozolomide (TMZ) sont utilisés pour le traitement des gliomes en raison de leur effet dommageable pour l'ADN. Lors du traitement par TMZ, des groupements méthyles sont transférés sur certains atomes des purines (O6-guanine ; N7-guanine et N3-adenine), la formation de O6-methylguanine (O6-meG) étant la modification principale (Bobola et al. 2012). Cette modification induit un arrêt du cycle cellulaire (Bobola et al. 2012). Cependant, une résistance aux médicaments se produit, empêchant l'efficacité de ces agents chimiothérapeutiques. L'un des principaux mécanismes de résistance aux médicaments anticancéreux est une activité accrue d'une enzyme de réparation de l'ADN, la O6-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT), qui neutralise l'alkylation de l'ADN induite par la chimiothérapie. L'enzyme MGMT est un élément clé de la chimiorésistance, elle répare les lésions d'ADN induites par les agents alkylants en

transférant le groupe alkyle de la guanine sur un résidu de cystéine de l'enzyme MGMT pour donner naissance à une cystéine alkylée. Dans ce cas la guanine est libérée de l'adduit et redevient normale ce qui permet à la cellule de se répliquer normalement.

La méthylation du promoteur de cette enzyme entraîne son inactivation et par conséquence induit une meilleure efficacité de la chimiothérapie par une absence de réparation des dommages causés par les agents alkylants (Weller 2010a ; Weller et al. 2010b). Plusieurs stratégies sont actuellement en cours pour améliorer l'efficacité thérapeutique du TMZ *via* l'inhibition de la MGMT afin de réduire la chimiorésistance et d'améliorer la survie globale. La MGMT pourrait être une cible prometteuse pour le traitement des gliomes résistants au TMZ.

II. Glioblastomes

Le glioblastome (GBM) est la tumeur primaire cérébrale maligne la plus agressive et la plus fréquente chez l'adulte (grade IV selon la classification de l'OMS). Il représente 55 % des gliomes et 45,6 % (la forme la plus fréquente) de toutes les tumeurs primaires malignes du cerveau.

Son incidence annuelle est de 4 nouveaux cas pour 100 000 habitants, ce qui donne pour la France 2400 cas chaque année. C'est la deuxième cause de mortalité des cancers chez l'enfant et la troisième chez l'adulte. Il touche plus souvent l'homme que la femme. Ils surviennent à tout âge mais dans 70 % des cas entre 45 et 70 ans un pic à 58 ans. Le pronostic des patients atteints de GBM reste sombre avec une espérance de vie médiane de 15 à 17 mois (stupp et al. 2014 ; Hottinger et al. 2014) et un taux de survie de 5 % à cinq ans (Ostrom et al 2015).

Les GBMs surviennent le plus souvent dans les hémisphères cérébraux, en particulier dans les lobes frontaux et temporaux du cerveau. Ce sont souvent des lésions volumineuses, profondes, inopérables. Le pronostic est meilleur lorsque les tumeurs sont frontales. Plus les tumeurs sont situées vers l'arrière, pariétales, temporales et occipitales (noyaux gris) et plus le pronostic devient sombre. Les GBMs sont histologiquement distincts des autres astrocytomes en raison de la présence de zones nécrotiques et d'une vasculogenèse anormale accrue.

1 Type des glioblastomes

Les GBMs sont classés en deux sous-types primaires et secondaires en se basant sur leur présentation clinique. Le GBM primaire survient dans le cerveau « *de novo* » surgissant sans maladie antécédente discernable tandis que le GBM secondaire évolue à partir d'astrocytomes de bas grade (figure 1).

1.1 Glioblastome primaire

Les glioblastomes primaires sont très agressifs et peuvent rapidement se propager dans d'autres parties du cerveau. Ils sont beaucoup plus fréquents que les glioblastomes secondaires, ils représentent plus de 90 % des GBMs. Les GBMs primaires se produisent principalement dans le lobe temporal et sont principalement diagnostiqués chez les patients de plus de 62 ans avec une incidence plus élevée chez les hommes. Les altérations génétiques typiques de ces tumeurs comprennent l'amplification et/ou des mutations du gène *EGFR* (epidermal growth factor receptor), des mutations du gène *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) accompagnées d'une perte d'hétérozygotie (LOH) sur le bras long du chromosome 10 (10q), des délétions du gène *p16*, une fréquence élevée des mutations du promoteur hTERT (human telomerase reverse transcriptase), une faible fréquence de mutations de TP53 (tumor protein 53) et IDH1 (isocitrate dehydrogenase 1) et une amplification du gène *MDM2* (Mouse Double-Minute 2) exclusivement en l'absence de mutations TP53 (Jiang et al. 2017 ; Adamson et al. 2009).

1.2 Glioblastome secondaire

Les glioblastomes secondaires surviennent moins fréquemment que les GBM primaires, ils représentent 5 à 10 % des GBMs. À l'inverse des GBMs primaires, les GBMs secondaires sont présents à des taux plus élevés chez les patients plus jeunes (moins de 45 ans), avec une incidence plus élevée chez les femmes. Les GBMs secondaires se développent à partir d'astrocytomes diffus de bas grade (grade II) ou des astrocytomes anaplasiques (grade III). Les altérations génétiques des GBMs secondaires sont caractérisées par la présence de mutations IDH1, accompagnées de mutations TP53, ATRX (α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) et une perte d'hétérozygotie (LOH) 10q. Ils présentent aussi une faible fréquence de mutations PTEN et d'amplification EGFR (Parsons et al. 2008).

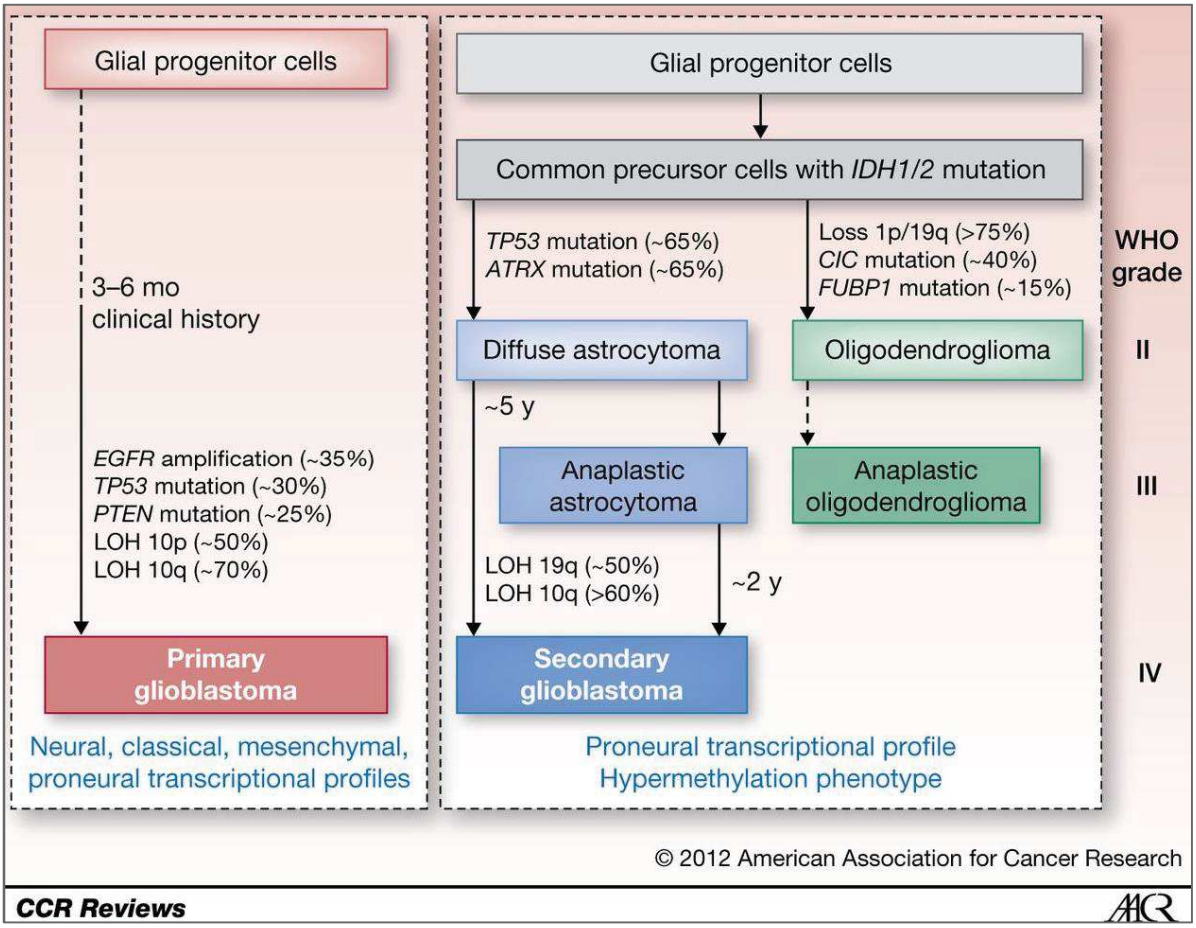


Figure 1. Voies génétiques vers les glioblastomes primaires et secondaires d'après Ohgaki and Kleihues 2013.

Seuls les glioblastomes secondaires partagent l'origine commune des cellules avec des oligodendrogliomes. Les glioblastomes primaires et secondaires diffèrent en ce qui concerne les altérations génétiques présentes dans les cellules cancéreuses. IDH: isocitrate dehydrogenase; ATRX: α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked; EGFR: epidermal growth factor receptor; PTEN: phosphatase and tensin homolog; LOH: loss of heterozygosity; CIC: capicua transcriptional repressor; FUBP1: far upstream element binding protein 1.

2 Caractérisation moléculaire du glioblastome

2.1 Mutations IDH1/IDH2

Les mutations IDH1 sont des marqueurs diagnostiques et pronostiques importants dans le GBM. Dans les GBMs primaires les mutations IDH1 sont rares (10 %), mais pour les GBM secondaires et les gliomes de grade II-III ces mutations surviennent à 80 %.

2.2 G-CIMP

Le G-CIMP (Glioma-CpG island methylator phenotype) est caractérisé par une hyperméthylation d'îlot CpG spécifique d'un gliome (Noushmehr et al. 2010). Il a été associé à l'inactivation transcriptionnelle de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs, dont le gène du rétinoblastome (RB1).

Il a été démontré que les G-CIMP peuvent entraîner un ajustement métabolique des cellules tumorales, permettant de maintenir leur état de prolifération et peuvent expliquer les processus tumorigènes dans les tumeurs G-CIMP positives. Cependant, le phénotype G-CIMP était également associé à des gènes impliqués dans les phénotypes cellulaires mésenchymateux et l'invasion tumorale. Les GBMs dont le G-CIMP est positif, portent souvent le statut muté IDH. Dans les GBMs secondaires le phénotype positif pour G-CIMP est significativement plus fréquent par rapport aux formes primaires de GBMs (Nakamura et al. 2001). Le statut positif à la mutation IDH/G-CIMP est un bon facteur pronostique chez les patients GBM (Suzuki et al. 2014).

2.3 Méthylation du promoteur MGMT

La méthylation du promoteur CpG entrainant une inhibition de l'expression du gène *MGMT* est couramment observé chez les patients GBM (45 %). Elle est associée à une sensibilité élevée au TMZ et à une augmentation de survie (survie médiane > 6 mois) (Hegi et al. 2005). Par conséquent, il est largement admis que la méthylation du promoteur *MGMT* dans les GBMs est un prédicteur de la réponse à la chimiothérapie alkylante.

2.4 Amplification EGFR (epidermal growth factor receptor)

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est un récepteur transmembranaire de tyrosine kinase, appartient à la famille ErbB des récepteurs tyrosine kinases (RTK), qui est un groupe hautement conservé de tyrosine kinases de type 1 structurellement homologues, qui transduisent des stimuli extracellulaires vers le noyau cellulaire pour favoriser la différenciation, la prolifération et la migration des cellules. Les ligands spécifiques de l'EGFR sont : le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance transformant-α (TGF-α), la bêtacelluline (BTC) et l'amphiréguline (AR) (Köstler et al. 2010). L'amplification, les mutations et les réarrangements du gène *EGFR* sont observés dans plus de 60 % des GBM avec une fréquence élevée (> 40 %) dans les GBM primaires. Ces défauts génétiques améliorent la croissance tumorale, la survie, la progression, l'invasion et la résistance à la thérapie par l'activation de plusieurs réseaux de signalisation et la reprogrammation métabolique (Furnari et al. 2015). La variante EGFR la plus courante dans les GBM, EGFRvIII, est caractérisée par une délétion dans le cadre des exons 2-7 qui conduit à une perte de 267 acides aminés dans le domaine extracellulaire entraînant une

dimérisation et une activité constitutive du récepteur indépendant du ligand (Zadeh et al. 2013 ; Gan et al. 2009).

2.5 Mutations TP53

Le gène TP53 est un gène suppresseur de tumeur et joue un rôle majeur dans la réponse au stress. La protéine TP53 est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la sénescence, la réparation de l'ADN et la néovascularisation en réponse à divers stress cellulaires.

Dans les cellules normales, en absence de tout stress, l'activité TP53 est régulée négativement par MDM2 et MDM4 *via* l'ubiquitination et la dégradation protéasomique de la protéine. Inversement, en situation de stress, le gène $p14^{ARF}$ qui fait partie du locus complexe CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A), code une protéine qui se lie directement à MDM2 et inhibe l'inhibition et la dégradation de TP53 médiée par MDM2, la protéine TP53 activera à son tour la transcription d'un grand nombre de gènes entraînant soit l'arrêt du cycle cellulaire, soit l'apoptose. L'arrêt du cycle cellulaire permet à la cellule de stimuler ses mécanismes de réparation, dont certains sont directement activés par Tp53. Lorsque la réparation est effectuée, le taux de p53 retourne à la normale et le cycle cellulaire reprend. Chez l'homme, dans la plupart des cancers, la voie régulatrice TP53 est altérée. Ces altérations représentent, par conséquent, une étape importante et peut-être requise, dans le développement tumoral.

Dans les plupart des tumeurs, la perte ou la modification de fonction du suppresseur de tumeur p53 (TP53) est un événement courant. Dans les GBMs, les mutations de TP53 se trouvent le plus souvent dans le domaine de liaison à l'ADN, à savoir dans six sites de mutation (correspondant aux codons 175, 245, 248, 249, 273 et 282). Ces modifications entraînent la perte ou le gain de fonction du TP53 muté et provoquent ainsi des effets négatifs dominants sur la protéine TP53 type sauvage endogène (England et al. 2013). Les mutations du gène TP53 surviennent moins fréquemment dans les GBMs primaires (25 % à 30 %) par rapports aux GBMs secondaires (60 % à 70 %) et surviennent plus fréquemment chez les patients plus jeunes (Thakkar et al. 2014). Cependant, l'utilisation des mutations TP53 comme marqueurs moléculaires des GBMs reste controversée en raison du manque d'association claire avec le pronostic des GBMs.

2.6 Mutation d'ATRX

Dans le GBM, les mutations ATRX ont été observées, et associées à une augmentation de la longueur des télomères, suggérant que cette protéine joue un rôle dans le maintien de la longueur des télomères (Ceccarelli et al. 2016). Les mutations ATRX se trouvent à 80 % dans les GBMs secondaires et 7 % dans les GBMs primaires et surviennent plus fréquemment chez

les patients plus jeunes. Ces mutations sont fortement associées aux mutations IDH et TP53. De plus, diverses tumeurs avec des télomères alternatifs présentent des mutations du gène ATRX, avec une incidence d'environ 75 % dans les gliomes de grade II-III (Liu et al. 2019).

2.7 Mutation du promoteur TERT

Des mutations du promoteur TERT ont été identifiées chez 55 % des patients GBM, dont 73 % avaient une mutation C228T et 27 % avaient la mutation C250T (Nonoguchi et al. 2013). Dans une autre étude en 2005, il a été démontré que 67,3 % de tous les GBMs étaient de type sauvage TERT, 21,2 % avaient la mutation C228T tandis que 11,5 % présentaient la mutation C250T.

De plus, il a été montré que l'expression TERT est plus fréquente dans les GBM primaires (82 %) que dans les GBM secondaires (35 %). Surtout, les patients présentant GBM primaires sans mutations TERT ont survécu considérablement plus longtemps que les patients présentant ces mutations (survie médiane de 27 contre 14 mois) (Killela et al. 2013).

2.8 Pertes et gains chromosomiques

La plupart des pertes génétiques entraînent des altérations de la fonction de gènes suppresseurs de tumeurs spécifiques ayant des effets directs sur la gliomagenèse. Les régions de perte les plus courantes sont : 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 17q, 18q, 19q, 22q et Y (Adamson et al. 2009 ; Parsons et al. 2008). Dans le GBM, la perte d'hétérozygotie (LOH) sur le chromosome 10, survenant dans 60 à 80 % des cas, entraînant la perte du suppresseur de tumeur PTEN.

Les altérations génomiques entrainant le gain d'expression génique comme les duplications chromosomiques et l'amplification extrachromosomique d'allèles spécifiques sont des événements beaucoup moins fréquents (Adamson et al. 2009). Dans le GBM, les gains d'expression génique les plus observés sont l'amplification des gènes CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) et MMD2 (murine double-minute 2) sur le chromosome 12, du gène PDGFRA (platelet derived growth factor receptor alpha) sur le chromosome 4 et du gène EGFR sur le chromosome 7 (Brennan et al. 2013). De plus, des gains fréquents de gènes tels que SOX2, MYCN, CCND1 et CCNE2 ont été également observés (Brennan et al. 2013).

3 Classification des sous-types de GBM basée sur des altérations génomiques

Les aberrations génétiques et les signatures d'expression génique ont permis de classer le GBM en quatre sous-types à savoir classique, proneural, neural et mésenchymateux (Verhaak et al. 2010). En se basant sur cette classification moléculaire des GBMs, des études plus approfondies ont été effectuées pour chercher des nouvelles

altérations permettant de trouver des thérapies ciblées plus efficaces pour les patients présentant différents sous-types de GBM. En 2016, l'OMS a intégré dans la classification des GBMs « le statut IDH ». Les GBMs ont été donc divisés en trois types principaux : IDH-non muté, IDH-muté et GBM NOS.

3.1 IDH-non muté ou IDH type sauvage

Les GBMs de type sauvage IDH sont répandus dans les lobes temporaux et frontaux (Jiang et al. 2017). Ce type de GBM présente de nombreuses altérations génétiques très hétérogènes. Les plus caractéristiques sont un gain de 7p et une perte de 10q, et/ou une amplification de l'EGFR. Cette dernière s'observe dans 40 % des GBM « IDH-non muté » (Aldape et al. 2015). D'autres voies peuvent être affectées, telles les voies du récepteur tyrosine kinase/Ras/PI3K, p53 et rétinoblastome, mais actuellement sans implication clinique. De nombreuses études cliniques ont montré que le GBM de type IDH1 sauvage est la forme la plus courante, représentant environ 90 % de ces tumeurs. Cela correspond au GBM primaire défini cliniquement et se retrouve principalement chez les patients de plus de 55 ans (Louis et al. 2016).

3.2 IDH-muté

Les GBMs IDH-mutés sont principalement distribués dans le lobe frontal (Jiang et al. 2017). Toutes les mutations IDH observées dans ce sous-type sont hétérozygotes et correspondent à la modification R132H. Dans les GBMs secondaires, les mutations IDH sont très fréquentes et représentent plus que 80 % des cas, par contre ces mutations sont rares dans les GBMs primaires surviennent à < 5 % des cas (Louis et al. 2016 ; Ohgaki and Kleihues 2013). Les statuts « IDH-muté » sont observés chez les patients les plus jeunes, avec un âge médian de 41 ± 5,06 ans.

3.3 GBM NOS

Une tumeur GBM sans mutation diagnostique, et qui ne présente pas suffisamment d'informations pour lui attribuer un code, reçoit la désignation NOS (Not Otherwise Specified), d'après la classification OMS 2016. Dans la plupart des cas, le sous-type NOS est attribué aux GBMs qui n'ont pas été entièrement testés pour les altérations génétiques pertinentes.

4 Voies de signalisation altérées dans le GBM

Dans le GBM, les principales aberrations génétiques et épigénétiques ont des répercussions dans les voies de signalisation cellulaire suivantes: dérégulation de voies de signalisation induisant la croissance cellulaire par amplification et activation mutationnelle des gènes des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK); activation de la voie PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) et inactivation des voies de suppression des tumeurs TP53

(tumor protein 53) et pRB (Protéine du rétinoblastome) (figure 2) (Cancer Genome Atlas Research Network 2008).

4.1 Voie RTK/RAS/PI3K

La liaison des facteurs de croissance tels que EGFR, ErbB2, PDGFR, c-met aux récepteurs tyrosine kinases (RTK), active les voies de signalisation**,** y compris les cascades RAS/RAF/MAPK et/ou PI3K/Akt/mTOR. L'activation de ces voies favorise la prolifération cellulaire, la survie et la motilité.

4.1.1 La cascade RAS/RAF/MAPK

Les protéines RAS peuvent être activées par les RTK alors qu'elles sont régulées négativement par la NF-1 (neurofibromine 1). RAS activé active ensuite la sérine/thréonine kinase RAF qui active ensuite MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase), qui à son tour active la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). MAPK activée se déplace dans le noyau, entraînant l'activation de divers facteurs de transcription favorisant ainsi la prolifération, la différenciation et la survie des cellules (Nakada et al. 2011).

Dans le GBM humain les mutations RAS sont rares (2 %). La dérégulation de la voie de signalisation RAS/RAF/MAPK dans ces tumeurs est attribuée à l'activation de ses régulateurs positifs en amont, dont EGFR et PDGFR, et aux mutations inactivantes de son régulateur négatif NF-1 (18 % des GBM) (Cancer Genome Atlas Research Network 2008).

4.1.2 La cascade PI3K/Akt/mTOR

L'interaction des facteurs de croissance avec les récepteurs RTK entraîne l'activation de la protéine kinase PI3K, qui catalyse ensuite la phosphorylation du PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate). A l'inverse, la protéine phosphatase PTEN suppresseur de tumeur, impliquée dans cette voie, transforme inversement PIP3 en PIP2 et régule négativement l'activation de la voie PI3K/AKT. Ensuite, PIP3 active PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) qui phosphoryle Akt sur la Thr308. mTOR kinase dans le complexe mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex) phosphoryle également Akt à Ser473. Ces deux événements de phosphorylation conduisent à l'activation d'Akt. Akt active à son tour mTORC1 en inactivant le complexe suppresseur TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis protein 1/2). Cette voie de signalisation affecte la survie, la prolifération et la motilité des cellules (Mao et al. 2012 ; Nakada et al. 2011).

Dans le GBM humain la voie RTK/PI3K/Akt est impliquée dans 88 % et joue un rôle important dans la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Les altérations génétiques (mutations/amplifications) les plus fréquentes sont observées pour l'EGFR (45 % des GBM), suivies des amplifications du gène PDGFR (13 %). De plus, des mutations PI3K sont observées dans 15 % des cas. La diminution de l'activité PTEN est un autre moyen important

d'activer la voie RTK/PI3K/Akt. Une délétion/mutation homozygote de PTEN a été trouvée dans 36 à 40 % des GBM (Cancer Genome Atlas Research Network 2008).

4.2 Voie TP53

Dans le GBM la voie de signalisation TP53 est altérée dans 87 % des cas. Outre la suppression/mutation homozygote de TP53 (dans 35 % des GBM), des délétions/mutations homozygotes dans $p14^{ARF}$ ont également été fréquemment observées dans le GBM (49 %) et des amplifications de MDM2 (14 %) et MDM4 (7 %) ont également été observées (Cancer Genome Atlas Research Network 2008 ; Nakada et al. 2011).

4.3 Voie de la protéine du rétinoblastome

Le gène *RB1* codant la protéine pRB fait partie d'une famille de gènes connus comme des gènes suppresseurs de tumeur qui ont pour propriété de régler le cycle cellulaire. La phosphoprotéine RB est essentielle à l'arrêt des cellules en phase G1 et joue un rôle fondamental dans la régulation du cycle cellulaire. Lors d'un stimulus de croissance cellulaire, la progression dans le cycle cellulaire survient lorsque RB est inactivé par phosphorylation. Cette phosphorylation est catalysée par les kinases dépendantes des cyclines CDK (CDK2, CDK4 et CDK6) complexées avec leur cycline partenaire régulatrice (cycline E, A ou D). A côté de son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, RB est aussi impliqué dans l'apoptose TP53-dépendante.

Dans la plupart des cancers, la voie régulatrice RB est altérée entraînant par conséquent le développement tumoral. Dans le GBM, l'altération la plus courante de la voie RB est une suppression du locus *CDKN2A/CDKN2B* dans le chromosome 9p21 codant les protéines p16INK4a et $p14^{ARF}$ (50 %), suivie d'une amplification du locus *CDK4* (14 %) et d'une délétion homozygote/mutation du gène RB1 (11 %) (Cancer Genome Atlas Research Network 2008).

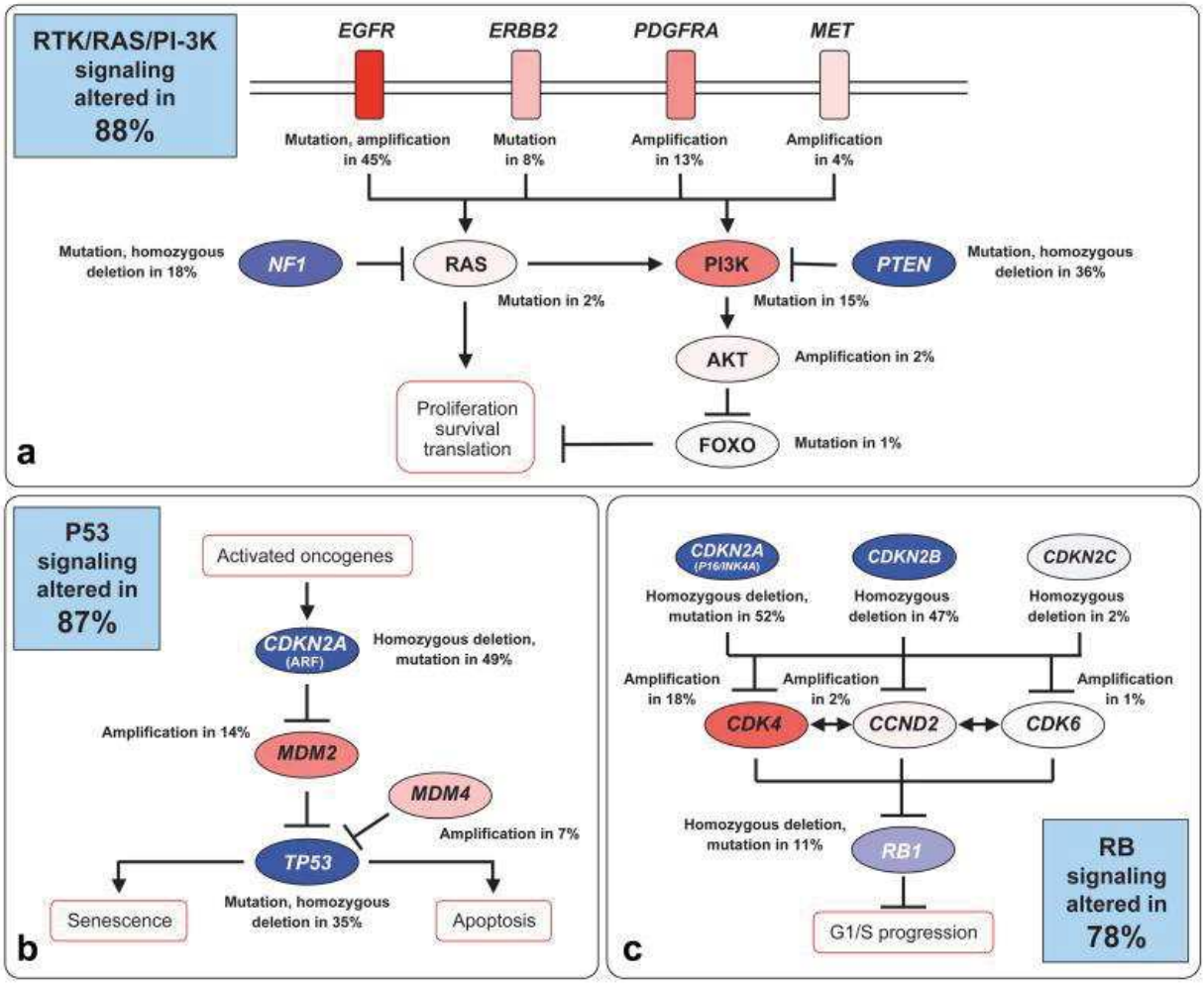


Figure 2. Les altérations génétiques du glioblastome se produisent fréquemment dans 3 voies de signalisation cellulaire (Cancer Genome Atlas Research Network 2008).
(a) la voie RTK/RAS/PI3K, (b) la voie suppresseur de tumeur p53 et (c) la voie suppresseur de tumeur Rb. Les altérations génétiques induisant une activation sont indiquées en rouge. Celles entraînant une perte de fonction sont indiquées en bleu. Dans chaque voie, les composants modifiés, le type d'altération et le pourcentage de tumeurs portant chaque altération sont indiqués. Akt: connue aussi sous le nom de protéine kinase B (PKB) ; CDND2: G1/S-specific cuclin-D2 ; CDK: cyclin-dependent kinase ; CDKN2: cyclin-dependent kinase inhibitor family ; EGFR: epidermal growth factor receptor ; FOXO: forkhead box O3 transcription factors ; ERBB2 (ou HER2): receptor tyrosine-protein kinase erbB-2; MDM2/4: mouse double minute 2/4 ; MET: receptor tyrosine kinase with high affinity for hepatocyte growth factor; NF1: neurofibromin 1 ; PDGFRA: platelet-derived growth factor receptor alpha; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; PTEN: phosphatase and tensin homolog ; RB: retinoblastoma.

5 Diagnostic et symptômes

Le diagnostic d'un glioblastome se déroule en plusieurs étapes : un examen neurologique et clinique complet permet d'évaluer le fonctionnement du système nerveux grâce à différents tests (réflexes, exercices musculaires, tests de langages …), puis un examen d'imagerie, par un scanner crânien et encore par une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), est pratiqué rapidement dès qu'il y a suspicion de tumeur cérébrale suite aux examens neurologiques. Cet examen, confirme le diagnostic et permet de localiser l'emplacement de la tumeur. Cependant, pour établir un diagnostic exact, un examen du tissu tumoral au microscope et une analyse moléculaire/génétique restent la seule façon de confirmer que la tumeur cérébrale est un GBM. Les estimations de la survie relative du GBM sont assez faibles ; moins de 10 % des patients survivent cinq ans après le diagnostic (Weller et al. 2013).

Les symptômes généraux observés chez les patients atteints d'un glioblastome sont : des nausées, des vomissements, des céphalées, des crises d'épilepsie, des troubles de la vigilance et une asthénie. Des troubles neurologiques moteurs, sensoriels, phasiques, de la déglutition ou de la vision peuvent également être observés, en fonction de la localisation et de la taille de la tumeur (Lin et al. 2012 ; Chang et al 2005).

6 Traitement du glioblastome

6.1 Traitement du GBM après la résection neurochirurgicale

Une résection chirurgicale seule de la tumeur n'est pas curative vu la nature infiltrante des glioblastomes, des traitements complémentaires sont donc proposés pour augmenter le taux de survie chez les patients.

Depuis 2005, le témozolomide, agent alkylant, en association avec la radiothérapie externe postopératoire est devenue le traitement standard des glioblastomes (Stupp et al. 2015). Une radiothérapie avec une dose totale de 60 Gy en 30-33 fractions de 1,8-2 Gy est administrée avec le témozolomide à une dose de 75 mg/m^2/jour par voie orale. Une IRM cérébrale est réalisée quatre semaines après la fin de la radiochimiothérapie, puis un traitement de consolidation avec du témozolomide 150-200 mg/m^2/jour pendant cinq jours, tous les 28 jours, est poursuivi pour un total de six cycles. Grace à ce traitement la médiane de survie des patients a été améliorée de 12,1 à 14,6 mois, avec une augmentation du taux de survie à deux ans passant de 10 à 27 % (Mirimanoff et al. 2007). Chez les patients *MGMT* méthylés, le témozolomide est plus efficace que chez les patients *MGMT* non méthylés. Cependant, en l'absence d'alternatives effectives, ce traitement reste le standard pour tous les patients.

Plusieurs études ont évalué des approches moins invasives pour traiter le glioblastome chez les personnes âgées, une radiothérapie hypofractionnée (10 x 3,4 ou 15 x 2,66 Gy) a montré des survies équivalentes à la radiothérapie standard (Roa et al. 2004). De plus, une autre étude chez ces patients fragiles a montré qu'un schéma hypofractionné est supérieur au schéma conventionnel (Malmström et al. 2012).

Un nouveau traitement pour le glioblastome a été validé récemment. Il s'agit de l'application de champs électriques alternés (CEA) ou tumor-treating fields (TTF). Ce traitement consiste à empêcher la division cellulaire par des champs électriques alternants de basse intensité et de fréquence intermédiaire (200 kHz). Des essais précliniques avec le CEA à des intensités de champs très basses (2 V/cm) et à des fréquences entre 100 et 200 kHz, ont montré une inhibition de la division cellulaire par blocage de la séparation des cellules filles pendant la mitose et par dégradation des membranes cellulaires (Kirson et al. 2004). Lorsque la tumeur est bien limitée au cerveau, et que les cellules cérébrales normales ne se divisent pas, cela représente une cible idéale pour valider ce traitement antimitotique. Une étude de phase III a été effectuée sur 700 personnes atteintes d'un glioblastome, un groupe des patients a reçu un traitement de radiochimiothérapie par témozolomide (groupe contrôle), un autre groupe des patients a reçu le même traitement avec addition de CEA L'utilisation de CEA n'a pas augmenté de manière significative les effets secondaires présentés par les patients, en dehors de problèmes cutanés liés à l'application des électrodes. Les résultats ont montré une survie à deux ans de 43 % pour le groupe sous CEA, comparée à 29 % pour le groupe sous chimiothérapie seule (Stupp et al. 2015). Sur la base de ces résultats, cette approche thérapeutique a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration).

6.2 Traitements de la récidive

La majorité des patients atteints de glioblastome vont présenter une récidive, suite aux traitements de première intention après une période médiane de 7 à 10 mois. Le traitement standard de deuxième intention n'existe pas encore, la stratégie thérapeutique va alors dépendre des thérapies de première intention et de la durée de l'intervalle libre depuis le dernier traitement.

En plus de la chimiothérapie avec témozolomide, d'autres agents alkylants comme les nitrosourées (carmustine « BCNU », lomustine « CCNU », …) soit en monothérapie, soit en combinaison avec la procarbazine et la vincristine, peuvent être envisagées. D'autres aussi comme les dérivés de platine et l'irinotécan, en raison de leur bonne pénétration de la barrière hémato-encéphalique, peuvent également être utilisés (Moura et al. 2016).

6.3 Agents antiangiogéniques

La surexpression du facteur de croissance épithélial vasculaire (VEGF) peut expliquer en partie la dysfonction de la barrière hématoencéphalique, ainsi que l'œdème et les zones hémorragiques dans les glioblastomes (Bergers and Benjamin 2003 ; Hottinger et al. 2014). Le VEGF est déterminant pour la prolifération des cellules endothéliales des GBMs (Huang et al. 2005). Le bévacizumab, est un anticorps monoclonal ciblant le VEGF utilisé pour le traitement des glioblastomes récurrents. Plusieurs études ont montré, que les traitements avec le bévacizumab soit en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques, utilisés soit en première intention ou en situation de récidive, augmentent le taux de réponse radiologique jusqu'à 40 % mais malheureusement sans amélioration de la survie des patients (Vredenburgh et al. 2007 ; Gilbert et al. 2014). Ces agents antiangiogéniques peuvent transitoirement normaliser la vascularisation tumorale et réduire l'œdème péritumoral.

6.4 Immunothérapie

Dans le microenvironnement tumoral GBM, le mécanisme utilisé par les cellules immunosuppressives, pour supprimer la réponse immunitaire antitumorale, consiste à perturber la surveillance immunitaire en bloquant l'activation des lymphocytes T, B et de cellules NK (natural killer). Au cours de la dernière décennie, la recherche en immunothérapie s'est développée rapidement pour le GBM. Les approches immunothérapeutiques actuellement évaluées dans les essais cliniques de GBM peuvent être divisées en deux catégories: 1) L'immunothérapie active : fait référence à l'utilisation d'antigènes étrangers pour activer le système immunitaire inné spécifique à la tumeur, comme la vaccination contre le cancer, la thérapie génique immunostimulante et le blocage des points de contrôle immunomodulateurs. Le but de la vaccination thérapeutique est de stimuler et de diriger le système immunitaire spécifiquement contre les cellules cancéreuses, en lui présentant un antigène tumoral capables de déclencher une réaction immunitaire efficace. Ces vaccins anticancers sont personnalisés et adaptés à la tumeur du patient, selon son profil moléculaire. La vaccination anti-cancer permet de déclencher une réponse immunitaire "mémoire" qui devrait théoriquement protéger le patient contre une rechute. 2) L'immunothérapie passive : fait référence à l'introduction de substances immunitaires exogènes contre les tumeurs directement dans le corps et qui ne nécessitent pas l'activation du système immunitaire du patient. L'immunothérapie passive comprend des approches telles que les thérapies cellulaires adoptives, la virothérapie oncolytique et l'administration d'anticorps (Zhou et al. 2015).

7 Microenvironnement tumoral du GBM

Le microenvironnement tumoral est l'environnement cellulaire dans lequel la tumeur existe. Il joue un rôle principal lors de l'initiation, de la progression et de l'invasion de la tumeur et aussi dans la résistance aux médicaments. Le microenvironnement tumoral est défini comme étant les composantes cellulaires, les composantes moléculaires et les contraintes mécaniques qui entourent les cellules tumorales et qui interagissent avec celles-ci (Swartz et al. 2012).

Le microenvironnement tumoral comprend diverses cellules non malignes comme les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules du système immunitaire, leurs composants extracellulaires comme les cytokines, les facteurs de croissance, les hormones et la matrice extracellulaire (MEC) et un réseau vasculaire entourant une tumeur (Wu and Dai 2017). Les cellules non-tumorales avoisinantes présentent des morphologies et des fonctionnements différents de ceux qu'elles auraient eus dans un tissu sain. Ces changements cellulaires impliquent une modification de la composition moléculaire du milieu extracellulaire.

7.1 Composants majeurs du microenvironnement tumoral

Les principaux composants du stroma tumoral sont :

7.1.1 Les cellules du microenvirennement tumoral

7.1.1.1 Cellules fibroblastiques associées au cancer

Les cellules fibroblastiques associées au cancer, constituent une grande proportion des cellules stromales au sein du microenvironnement tumoral. Ces fibroblastes associés au cancer sont des fibroblastes activés en myofibroblastes qui expriment l'actine α du muscle lisse en réponse au stress mécanique au niveau des tissus tumoraux (Das et al. 2008). La majorité de ces cellules est dérivée de fibroblastes résidant dans le tissu conjonctif près d'une tumeur. Ces cellules sont recrutées et activées en réponse à de nombreux facteurs de croissance et cytokines tels que TGF-β (transforming growth factor beta), FGF2 (fibroblast growth factor 2) et PDGF (platelet-derived growth factor) qui sont abondants dans ce microenvironnement. Ces cellules sont aussi une source de facteurs de croissance tels que le HGF (hepatocyte growth factor), le VEGF et le PDGF et les chimiokines CXCL8 et CXCL12. La sécrétion de ces facteurs favorise les réponses angiogéniques entraînant ainsi la croissance tumorale (Räsänen and Vaheri 2010) ainsi que la migration d'autres cellules dans le microenvironnement tumoral (Hanahan and Coussens 2012).

7.1.1.2 Cellules vasculaires angiogéniques

Les cellules vasculaires angiogéniques, principalement les cellules endothéliales sont essentielles à la formation des vaisseaux. Les cellules endothéliales sont des contributeurs

majeurs à l'angiogenèse pour soutenir l'apport sanguin d'oxygène et de nutriments dans les tumeurs. Ces cellules sont recouvertes de péricytes pour maintenir la maturité et la stabilité des vaisseaux.

7.1.1.3 Cellules immunitaires infiltrantes

L'accumulation d'une variété de cellules du système immunitaire et des cellules inflammatoires comme les lymphocytes T (CD4 et CD8), les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, et les monocytes, a été observée au sein de l'infiltrat péri-tumoral et du stroma (Balkwill and Mantovani 2001). Ces cellules peuvent avoir une action pro-ou anti-tumoral, et vont servir à reconnaitre et à éliminer les cellules tumorales. Cependant, des défauts dans la surveillance immunitaire vont provoquer la survie et la croissance des cellules tumorales.

L'infiltration des cellules du système immunitaire dans le microenvironnement tumoral est stimulée par deux facteurs importants, l'inflammation et la sécrétion des chimiokines par les cellules tumorales et les cellules stromales. Deux groupes de cellules immunitaires infiltrantes ont été impliqués dans la tumorigenèse et la progression tumorale: *i)* Les cellules de lignée lymphoïde comprennent essentiellement les cellules NK (natural killer), CTL (CD8 T), les cellules Th (helper T), les cellules B et les cellules T régulatrices (T_{reg}) qui sont une population de cellules T immunosuppressives. *ii)* Les cellules de la lignée myéloïde comprennent : les mastocytes, les macrophages associés à la tumeur qui facilitent la migration et l'invasion tumorales par la sécrétion d'EGF et induit également l'angiogenèse facilitant ainsi la fuite des cellules métastatiques (Joyce and Pollard 2009), les TEMs (TIE-2 expressing monocytes) favorisent l'invasion tumorale en augmentant les niveaux de MMP9 circulante (matrix metalloproteinase 9) et d'autres molécules de remodelage des tumeurs qui contribuent au caractère invasif des cellules de gliome (Gabrusiewicz et al. 2014) et les MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) sont des précurseurs immunosuppresseurs des cellules dendritiques, des macrophages et des granulocytes. Le mécanisme utilisé par les MDSCs et les cellules T_{reg} pour supprimer la réponse immunitaire antitumorale implique leur capacité à s'infiltrer dans la tumeur en croissance et à perturber la surveillance immunitaire en interférant avec les facteurs antigéniques tels que TGF-β, FGF ou PDGF, en bloquant la prolifération et l'activation des cellules T et B et en inhibant la cytotoxicité des cellules NK (Joyce and Pollard 2009).

7.1.2 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC), réseau de macromolécules et protéines associées, est un acteur clé et un composant majeur du microenvironnement tumoral. Plus qu'un support structural pour les cellules malignes et non-malignes, elle a été reconnue comme une structure dynamique régulant le comportement cellulaire en fournissant des signaux biochimiques et mécaniques. Ces signaux sont reçus et intégrés par la cellule *via* un

ensemble de récepteurs membranaires comprenant des intégrines, des protéoglycanes, CD44 (récepteur à l'acide hyaluronique), récepteurs à domaine discoïdine et autres. En plus des composants MEC de base (fibronectines, collagènes, laminines, etc.), la MEC est aussi un réservoir de facteurs de croissance et cytokines qui sont distribués aux cellules de manière spatio-temporelle. L'ensemble de ces signaux régulent et affectent l'expression génique, la prolifération, l'adhésion, la migration, la survie et la différentiation des cellules. Les cellules tumorales et les cellules stromales sont deux sources de composants distincts de MEC. La composition de la MEC influence le potentiel métastatique des cellules tumorales (Naba et al. 2012). Par conséquent, la composition de la MEC dans le microenvironnement tumoral peut aider à prédire les résultats cliniques.

7.2 Facteurs physico-chimiques

Les principales caractéristiques physico-chimiques du microenvironnement tumoral du GBM sont l'hypoxie, l'angiogenèse, et l'acidification. Ces facteurs microenvironnementaux sont impliqués dans le développement et la progression du GBM ainsi que dans la résistance thérapeutique.

7.2.1 La vascularisation tumorale

La formation d'un réseau vasculaire dédié à l'apport en oxygène et en nutriments fait partie intégrante de la signature tumorale. Le GBM se distingue des gliomes de bas grade par la présence d'une vascularisation élevée qui est primordiale pour le développement de la tumeur.

En effet, l'angiogenèse tumorale participe à l'augmentation de l'afflux en oxygène et en nutriments, dont l'apport par simple diffusion n'est plus suffisant à la croissance de la tumeur (l'oxygène ne peut diffuser passivement que sur de courtes distances, de l'ordre d'une centaine de micromètres). Cependant, à l'opposé du réseau vasculaire normal caractérisé par une organisation générale structurée et hiérarchisée, l'angiogenèse tumorale présente des anomalies structurelles et fonctionnelles telles que des dilatations, des membranes basales incomplètes ou absentes, une perméabilité élevée ainsi qu'une architecture irrégulière des vaisseaux. Toutes ces altérations conduisent à un flux sanguin irrégulier et donc à un apport insuffisant d'oxygène et de nutriments dans toute la tumeur et une distribution inégale des cellules immunitaires et des médicaments. Ces particularités du système vasculaire tumoral créent un environnement hostile caractérisé par une hypoxie, un pH bas, une faible teneur en nutriments et une pression de fluide élevée. De plus, les vaisseaux tumoraux qui fuient facilitent la migration des cellules cancéreuses ainsi que leur évasion des médicaments (Carmeliet and Jain 2011). L'environnement tumoral est donc enrichi en nombreux facteurs pro-angiogéniques, par exemple, en réponse à l'activation des voies d'hypoxie, au microenvironnement inflammatoire ou encore aux aberrations métaboliques ou génétiques que présentent les cellules tumorales.

7.2.2 Hypoxie

L'apparition de zones nécrotiques appauvries en oxygène dans les glioblastomes est l'une des modifications histologiques qui le distingue des tumeurs de bas grade. Ces zones hypoxiques sont l'une des caractéristiques microenvironnementales les plus étudiées dans les tumeurs solides.

Les tissus cérébraux normaux présentent des concentrations physiologiques en oxygène comprises entre 12,5 et 2,5 % (pO_2 = 200 à 100 mmHg). Dans le GBM en raison des irrégularités des réseaux vasculaires, la plupart de ces tumeurs présentent une hypoxie légère à modérée ou sévère. Pour une hypoxie légère, les concentrations en oxygène sont comprises entre 2,5 et 0,5 % (pO_2 = 20 à 4 mmHg) et pour une hypoxie modérée ou sévère entre 0,5 et 0,1 % (pO_2 = 4 à 0,75 mmHg) (Fidoamore et al. 2016 ; Spence et al. 2008). Les zones nécrotiques dans les GBM sont généralement caractérisées par une hypoxie sévère. Chez les patients atteints de glioblastome, l'hypoxie est associée à l'agressivité de tumeur et à un mauvais pronostic (Evans et al. 2010 ; Sathornsumetee et al. 2008).

L'hypoxie augmente les niveaux de la protéine HIF-1α (facteur inductible par l'hypoxie 1α). HIF-1α est un facteur de transcription crucial qui, en réponse à l'hypoxie, régule l'expression de ses gènes cibles, y compris ceux codant pour le VEGF, les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3, CA9 (carbonic anhydrase 9), plusieurs enzymes glycolytiques, l'érythropoïétine, etc. (Harris 2002 ; Spence et al. 2008). Ces protéines jouent un rôle central dans la survie, la résistance et l'invasion des GBMs.

L'environnement hypoxique du GBM joue un rôle important dans la résistance thérapeutique. Il a été démontré que le niveau d'expression du facteur de transcription HIF-1 est élevé dans les cellules tumorales après un traitement par radiothérapie, montrant l'importance de ce facteur dans la résistance au traitement (Zhao et al. 2009). De plus, les conditions hypoxiques favorisent un métabolisme cellulaire altéré qui réduit la cytotoxicité des médicaments ou conduit à une régulation positive de la pompe d'efflux médicamenteux comme la P-gp (P glycoprotein), entrainant ainsi une diminution des concentrations de médicaments dans les cellules tumorales.

7.2.3 Acidité

Dans plusieurs tumeurs solides y compris les GBMs, le microenvironnement tumoral est caractérisé par une acidification extracellulaire (Vaupel et al. 1989 ; Chiche et al. 2010). Cette acidité tumorale provient premièrement du métabolisme spécifique des cellules cancéreuses qui consiste à utiliser la glycolyse à la place de la phosphorylation oxydative pour la production de l'énergie. Ce changement métabolique est effectué même à des niveaux d'oxygène normaux et est connu sous le nom d'effet Warburg (Warburg 1956). La persistance des voies glycolytiques dans les cellules cancéreuses entraîne une production et une exportation élevées d'acide (c.-à-d. Acide lactique, protons) dans le

microenvironnement tumoral. En conséquence, le pH dans les tumeurs y compris les GBMs pouvait atteindre 5,9 avec une moyenne d'environ 6,8 tandis que le tissu cérébral normal a un pH de 7,1 (Fidoamore et al. 2016). Les cellules tumorales ont ainsi développé divers mécanismes pour maintenir un pH intracellulaire légèrement alcalin (pHi 7,2-7,4) et un pH extracellulaire légèrement acide (pHe) afin de préserver la prolifération cellulaire et la survie tumorale. Par exemple, ces cellules ont une capacité accrue d'exporter des catabolites acides (tels que le dioxyde de carbone, l'acide carbonique ou l'acide lactique) et d'importer des bases faibles (telles que les ions HCO3-) par l'intermédiaire de transporteurs.

Les conditions hypoxiques favorisent également l'induction de voies glycolytiques, qui fournissent des intermédiaires métaboliques à utiliser pour la biosynthèse des acides aminés, des nucléotides et des lipides, conférant ainsi un avantage sélectif aux cellules tumorales proliférantes (Neri and Supuran 2011).

III. Cellules souches cancéreuses (CSCs)

La masse tumorale est composée d'une grande hétérogénéité cellulaire, c'est un écosystème complexe comprenant non seulement des cellules tumorales mais aussi plusieurs types de cellules stromales. L'hétérogénéité tumorale est observée au niveau morphologique et dans l'expression de marqueurs moléculaires tels que des protéines exprimées à la surface des cellules tumorales, ou encore au niveau biologique comme la capacité proliférative de ces cellules. Cette diversité a longtemps été expliquée par la présence de différents clones acquérant des mutations génétiques au fur et à mesure que la tumeur progresse (Hanahan and Weinberg 2000). La conséquence est une sélection progressive du clone le plus agressif et le plus apte à survivre dans l'environnement tumoral. Dans ce modèle classique, appelé modèle stochastique, il n'existe peu ou pas de hiérarchie entre les différents clones et toutes les cellules peuvent contribuer de manière équivalente à la croissance de la tumeur (figure 3A). De plus, il est important de souligner que de multiples mutations sont nécessaires pour transformer une cellule normale en une cellule cancéreuse maligne.

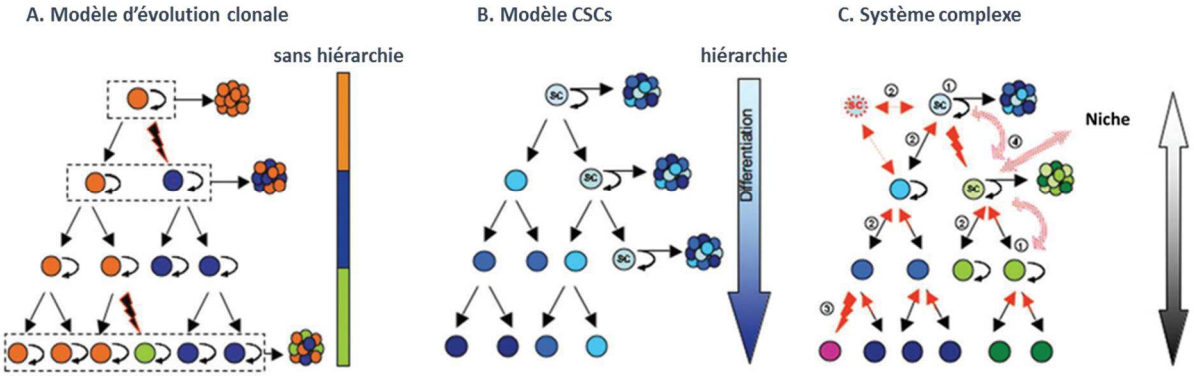


Figure 3. Différents modèles tumoraux de GBM d'après Laks et al. 2010.

A) Le modèle d'évolution clonale ne présente aucune hiérarchie de lignée, car les populations de cellules multiples sont le résultat de différentes mutations génétiques (flèches brisées). Il n'y a pas de hiérarchie cellulaire, car la plupart de ces sous-types cellulaires s'autorenouvellent et sont capables de former des tumeurs, ce qui fait de tous des cibles d'interventions thérapeutiques. B) Selon le modèle des cellules souches cancéreuses, une sous-population de cellules cancéreuses possède la capacité d'auto-renouvellement, la formation de sphères clonales et la formation de tumeurs *in vivo*, ainsi que la capacité de former une descendance avec un destin plus restreint. Cela forme un système de lignée hiérarchique où la cible cellulaire thérapeutique principale est la CSC elle-même. C) modèle de système complexe GBM. De multiples clones de CSCs avec différents altérations génétiques et épigénétiques peuvent coexister dans la même tumeur et ces CSCs subissent elles-mêmes la sélection naturelle et donc une évolution clonale. Des nouvelles populations de cellules tumorales (#3) sont produite par des mutations génétiques, les changements épigénétiques (#2) pourraient permettre aux cellules de produire des descendants avec un destin plus ou moins restreint . Une autre caractéristique importante d'un système complexe est que les populations de cellules individuelles interagissent (flèches rouges, # 4). Dans ce modèle, une thérapie réussie lorsque toutes les cellules tumorales potentielles sont être ciblées. De même l'interruption des interactions cellule-cellule et cellule-niche peut affaiblir le système tumoral dans son ensemble. GBM, glioblastome; CSC, cellule souche cancéreuse.

Cependant, depuis quelques années, un autre modèle alternatif, encouragé par des données expérimentales récentes, considère qu'il existe une hiérarchie cellulaire dans la tumeur (figure 3B). Ce modèle hiérarchique, explique l'hétérogénéité observée dans les tumeurs comme le résultat d'un gradient de différenciation. Une petite population de cellules tumorales possédant des propriétés des cellules souches sont à la base de cette théorie, ces cellules sont appelées cellules souches cancéreuses (CSCs). Selon ce modèle, les tumeurs sont organisées de façon hiérarchique avec des CSCs trouvées au sommet de cette hiérarchie. Dans ce cas, l'hétérogénéité tumorale résulte des divisions et différenciations symétriques et asymétriques des CSC qui génèrent progressivement des cellules progénitrices avec des capacités de différentiation plus restreintes, ce qui donne finalement des types de cellules matures qui perdent la capacité d'initiation de la tumeur (figure 3B). Il est important de souligner que le modèle CSC n'implique pas que les CSCs résultent de la transformation oncogénique des cellules souches normales puisque toute cellule de la hiérarchie à capacité proliférative pourrait être à l'origine des CSCs et donc des tumeurs (Islam et al. 2015 ; Visvader 2011).

Bien que ces deux théories soient différentes, elles ne sont pas mutuellement exclusives et il semble que certains types de tumeurs suivent préférentiellement l'un ou l'autre modèle (Shackleton et al. 2009).

Des modèles plus complexes dans lesquels les modèles d'évolution clonale et de hiérarchie CSC peuvent coexister ont été proposés. Dans ces systèmes complexes (figure 3C),

des changements génétiques et épigénétiques peuvent se produire au sein d'une seule tumeur, résultant en un système cellulaire à multiples facettes où plusieurs types de cellules souches cancéreuses peuvent coexister. Alors que les mutations génétiques peuvent produire de nouvelles populations de cellules tumorales, les changements épigénétiques peuvent permettre aux cellules de produire des descendants avec un destin plus ou moins restreint et également d'adopter temporairement différents états caractérisés par la résistance au traitement et l'expression de différents marqueurs cellulaires.

1 Découverte des CSCs

Grâce à la cytométrie de flux, différentes populations de cellules présentes dans une tumeur peuvent être triées selon l'expression spécifique de protéines à leur surface. En 1994, une organisation hiérarchique dans un type de leucémie myéloïde aiguë (LMA) a été suggérée pour la première fois, (Bonnet and Dick 1997). Plusieurs types de cellules tumorales ont été isolés à partir d'un patient atteint de LMA. La population de cellules qui exprime à leur surface le marqueur CD34 et n'exprime pas CD38 ($CD34^+/CD38^-$), était capable de reproduire la maladie une fois transplantées chez des souris immunodéficientes et de générer l'ensemble des différents types cellulaires présents dans la leucémie originale (Bonnet and Dick 1997). Les cellules $CD34^-/CD38^+$ quant à elles ne reproduisaient pas la pathologie chez les souris immunodéficientes. Ceci a suggéré la présence au sein d'une tumeur de cellules avec des potentiels différents et, pour certaines, celles de reproduire la tumeur d'origine. Etant donné que ces cellules avaient des marqueurs de cellules souches, le nom de cellules souches tumorales fut proposé pour les désigner.

En 2003, des cellules souches tumorales ont été isolées pour la première fois à partir de métastases issues de cancer du sein. Il a été démontré que seules les cellules exprimant à leur surface le marqueur CD44 et négatives pour le marqueur CD24 ($CD44^+/CD24^-$) pouvaient provoquer un adénocarcinome du sein lorsqu'elles étaient injectées dans le tissu adipeux de la glande mammaire des souris immunodéficientes (AL-Hajj et al. 2003). Cette petite population tumorale était la seule capable à la fois de propager efficacement la maladie et de reproduire l'ensemble de cellules présentes dans la tumeur parentale.

Puis des CSCs ont été identifiées et isolées à partir de nombreux types de tumeurs solides. Les profils d'expression d'antigènes de surface cellulaire ont été largement explorés pour l'identification et l'isolement des CSCs dans les tumeurs solides. Un certain nombre de marqueurs ont été associés aux CSCs dans plusieurs types de tumeurs solides. Ainsi la molécule d'adhésion CD44 a été associée aux phénotypes CSCs dans le cancer du sein ainsi que dans les cancers du côlon, de la prostate, du pancréas, de la tête et du cou, des ovaires, des poumons et du foie. L'expression de l'antigène CD133 a été décrite et utilisée pour l'isolement des CSCs de diverses tumeurs solides, notamment les GBM, les cancers de la prostate, du côlon, du poumon, du pancréas et de l'ovaire ainsi que le mélanome. D'autres

marqueurs de surface cellulaire utilisés pour caractériser les cellules souches cancéreuses dans plusieurs types de tumeurs solides incluent ABCG5 (ATP-binding cassette subfamily G member 5), CD90 (Thy-1) et EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) également connu sous le nom d'ESA (epithelial specific antigen) ou TROP1 (Visvader and Lindeman 2008 ; Visvader and Lindeman 2012).

En plus des marqueurs de surface cellulaire, des marqueurs fonctionnels, dont la plupart sont associés aux propriétés intrinsèques des CSCs, ont été utilisés pour l'isolement/caractérisation de cette sous-population de cellules tumorales. Par exemple, il a été démontré que l'expression de l'ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1) était augmentée dans les CSCs des tumeurs épidermoïdes du sein, de la vessie, du poumon, du côlon, de l'œsophage et de la tête et du cou (Liu et al. 2015). L'expression des facteurs de transcription OCT-4 (octamer-binding transcription factor 4), SOX2 (sex determining region Y-box 2) et Nanog ainsi que des composants des voies de signalisation Wnt/β-caténine, Notch et Hedgehog (Hh) a également été associée au phénotype souche des CSCs (Liu et al. 2013a ; Hadjimichael et al. 2015). Il est désormais largement admis que l'expression du marqueur doit être associée à la validation fonctionnelle pour définir définitivement une cellule cancéreuse en tant que CSC.

2 Propriétés des CSCs

Les propriétés des cellules souches cancéreuses sont résumées dans la figure 4. Les cellules souches cancéreuses partagent un certain nombre de caractéristiques avec les cellules souches tissulaires normales. Elles expriment les marqueurs de cellules souches et ont une capacité d'autorenouvellement à long terme *in vitro* et *in vivo* et peuvent se diviser en modes symétriques ou asymétriques. Cependant à la différence des cellules souches somatiques saines, elles présentent de nombreuses altérations génétiques. Les CSCs sont tumorigènes, car elles génèrent la tumeur originale lorsqu'elles sont transplantées dans des modèles animaux. Pour cette raison, elles sont également appelées cellules initiatrices de tumeur (CITs), afin de mettre en évidence leur potentiel tumorigène (Florio and Barbieri 2012).

Ces cellules sont également dotées d'une capacité de différenciation multi-lignage. Plusieurs études ont montré que les CSCs ont le potentiel de se différencier en plusieurs types de cellules cancéreuses, et aussi en plusieurs cellules stromales (Huang et al. 2015). *In vitro*, les cellules souches cancéreuses se développent en tant que sphères (sphères de cellules flottantes) dans un milieu relativement simple, sans sérum, avec l'addition du facteur de croissance épidermique (EGF) ou de facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF), ou les deux. Les CSCs sont aussi capables *in vitro* de se différencier après exposition à un milieu de culture contenant du sérum. Dans ces conditions, elles adhèrent au milieu de culture et perdent leur capacité de formation des sphères Les niveaux d'expression

des marqueurs de cellules souches et des marqueurs de différenciation (Zeniou et al. 2015) sont modifiés. De plus, à l'état différencié les propriétés tumorigènes des CSCs sont perdues.

Les CSCs sont résistantes aux dommages à l'ADN. Cela peut être induit grâce à l'activation préférentielle de l'arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle, à des réponses améliorées aux dommages à l'ADN et à des niveaux plus faibles de ROS dans ces cellules (Erasimus et al. 2016).

Les CSCs sont également caractérisées par leur capacité à entrer en quiescence. La quiescence cellulaire a été observée dans plusieurs tumeurs comme le cancer du sein, du côlon, du foie, de l'ovaire et du GBM. Au cours de ce phénomène, des mécanismes intrinsèques et/ou extrinsèques conduisent un petit groupe de cellules cancéreuses à entrer en quiescence, un état stable et non prolifératif qui peut être déterminé par l'absence de marqueurs de prolifération dans ces cellules et qui est réversible (Sosa et al. 2014). La quiescence représente une stratégie de survie adoptée par les CSCs pour résister aux conditions environnementales difficiles et aux insultes cytotoxiques. Les CSCs en division active entraînent la progression de la tumeur tandis que les CSCs quiescentes résistent aux insultes cytotoxiques et repeuplent la tumeur après la chimiothérapie (Chen et al. 2012). En effet, dans plusieurs cancers, dont les cancers du sein et du côlon, une rechute peut survenir après de longues périodes de latence. Cette récidive tardive peut s'expliquer par la survie et la persistance à long terme des CSC au repos après le traitement (Li and Bhatia 2011).

La plasticité des CSCs est une propriété très étudiée récemment pour caractériser ces cellules. Il a été montré que les CSCs ne provenaient pas seulement des cellules souches du tissu d'origine par l'acquisition de mutations géniques qui contribuent à la tumorigénicité, mais peuvent également provenir de cellules progénitrices engagées ou de cellules différenciées par de multiples événements mutagènes leur conférant des caractéristiques de type CSC (Tang 2012 ; Ruiz-Ontanon et al. 2013). Le processus de plasticité dans lequel les cellules cancéreuses hébergent la capacité dynamique de passer d'un état cellule non souche cancéreuse à un état cellule souche cancéreuse et vice versa peut être modulé par l'accumulation des altérations génétiques, par des modifications épigénétiques, en réponse à des signaux micro-environnementaux spécifiques et des interactions cellulaires se produisant dans la niche tumorale. Par exemple, une étude menée par Suvà et al. en 2014, a montré que les cellules GBM différenciées peuvent être entièrement reprogrammées en cellules souches tumorales par induction d'un ensemble central de facteurs de transcription neurodéveloppementaux (POU3F2, SOX2, SALL2 et OLIG2). De plus, le concept de plasticité des CSCs et de conversion bidirectionnelle entre les cellules souches et non souches peut aider à expliquer l'hétérogénéité tumorale observée dans les tumeurs solides.

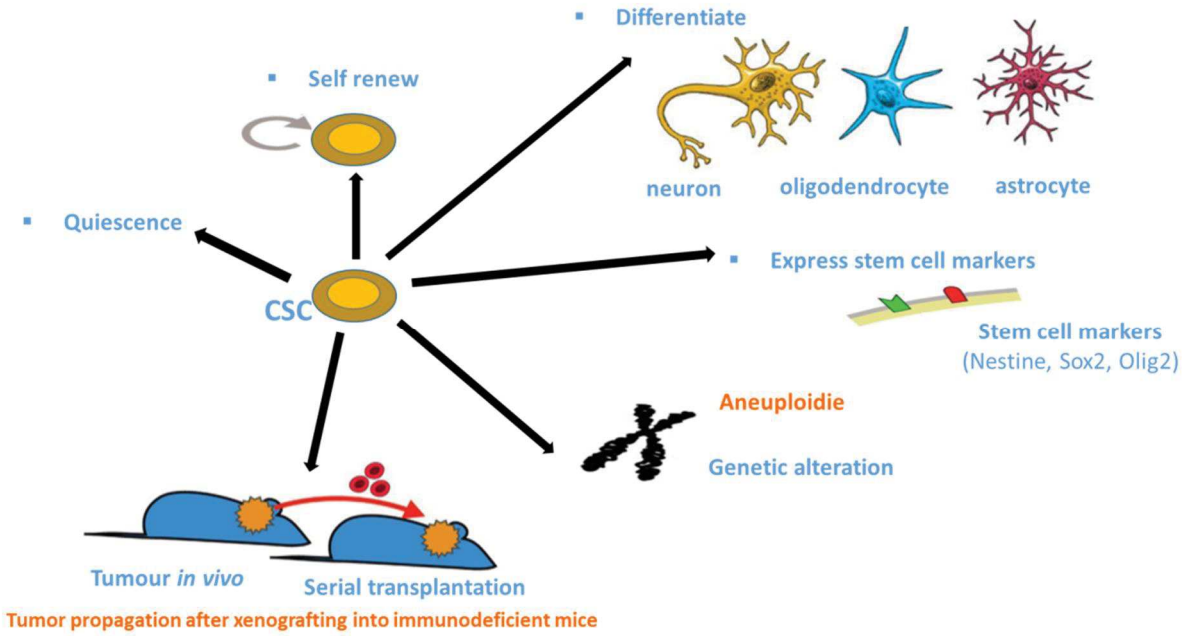


Figure 4. Les propriétés des cellules souches cancéreuses d'après Sutter et al. 2007.
Ces cellules ont la capacité de s'autorenouveler, d'entrer en quiescence, de se différencie en neurone, oligodendrocyte et astrocyte, présentent des marqueurs des cellules souches (Nestine, Sox2, Olig2) et sont tumorigènes, capables de générer une tumeur après une xénogreffe à des souris immunodéficientes.

3 Résistance des CSCs à la thérapie

Les cellules souches cancéreuses ont développé plusieurs mécanismes pour échapper aux traitements conventionnels. Celles-ci comprennent une signalisation pro-survie et anti-apoptotique accrue, une réponse plus efficace aux dommages à l'ADN et des mécanismes d'efflux de médicaments et des changements métaboliques conférant à ces cellules un avantage sélectif. Leur capacité à être maintenue *in vivo* dans les masses tumorales dans un état de croissance lente voire en quiescence préserve ces cellules de la chimiothérapie antiproliférative. Enfin, il a été démontré que les conditions hypoxiques et acides du microenvironnement tumoral augmentent les phénotypes agressifs de ces cellules.

La rechute de tumeurs après une thérapie peut être attribuée à la survie des cellules souches cancéreuses, en raison de leur résistance aux traitements conventionnels actuellement utilisés. Ces dernières années, un nouveau modèle a été proposé pour un traitement plus efficace du cancer. Il consiste en des stratégies thérapeutiques ciblant tous les types de cellules cancéreuses, y compris les CSCs (figure 5). Plusieurs approches visant à cibler les CSCs font actuellement l'objet de recherche.

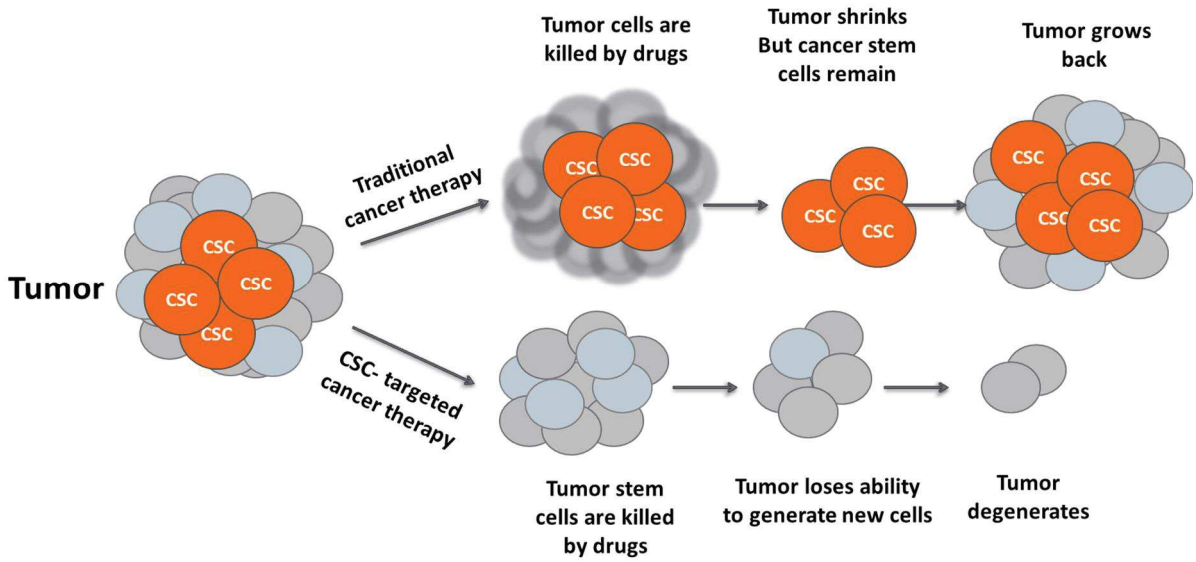


Figure 5. Nouveaux modèles pour le traitement du cancer, modifié d'après de Sousa E Melo et al. 2011.
Les approches thérapeutiques traditionnelles actuellement utilisées peuvent cibler les cellules tumorales différenciées mais pas les cellules souches cancéreuses, qui peuvent échapper aux traitements en raison de leurs propriétés de résistances thérapeutiques. Ces cellules persistent alors dans la masse tumorale et avec leurs capacités de s'autorenouveler, peuvent entraîner une rechute tumorale. Il a donc été proposé que, pour être efficaces, de nouveaux traitements devraient combiner le ciblage des CSCs et les approches thérapeutiques conventionnelles.

4 Cellules souches cancéreuses du Glioblastome (CSGs)

La première identification de la présence de CSCs dans les GBM a été rapportée en 2003 par Singh et al. (Singh et al. 2003 ; Singh et al. 2004). Les auteurs ont révélé l'existence d'une population de cellules CD133$^+$ (un antigen de surface encore appelé prominine 1) provenant de tumeurs cérébrales humaines adultes qui présente des propriétés de cellules souches *in vitro*, et ils ont montré qu'en injectant aussi peu que 100 cellules GBM CD133$^+$ dans des souris NOD/SCID (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency), il était possible de générer des tumeurs par transplantation en série. De plus, les tumeurs obtenues étaient phénotypiquement similaires à celles présentes chez les patients à partir desquels les cellules CD133 ont été isolées (Singh et al. 2003 ; Singh et al. 2004). Ces cellules ont également montré une multipotence *in vitro* car elles étaient capables de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes dans certaines conditions. Cette propriété a été maintenue même après une culture à long terme *in vitro* (Galli et al. 2004). Plusieurs groupes ont ensuite décrit l'isolement et la caractérisation des cellules souches cancéreuses du Glioblastome (CSGs) (Hemmati et al. 2003 ; Bao et al. 2006 ; Liu et al. 2006 ; Griffero et al. 2009 ; Bajetto et al. 2013).

La caractérisation phénotypique des CSGs était basée sur la reconnaissance de marqueurs cellules souches neurales CSNs distinctifs, tels que la nestine, protéine des filaments intermédiaires, les facteurs de transcription Sox2, Nanog et Oct-3/4, les répresseurs transcriptionnels poly-comb Bmi1 et Ezh2, la protéine de liaison à l'ARN musashi-1. Des composants de voies actives dans le développement du cerveau sont également exprimés dans les CSGs, y compris les protéines des voies de signalisation Notch et STAT3 (Wang et al. 2010a), Wnt (Jin et al. 2011), la protéine morphogénétique osseuse BMP (Piccirillo et al. 2006), TGF-β (Ikushima et al. 2009) ainsi que l'enzyme cytoplasmique ALDH1 (Molina et al. 2014 ; Kalkan 2015b). Initialement la glycoprotéine CD133 à cinq domaines transmembranaires (prominine-1), avait été présentée comme l'un des marqueurs les plus fiables pour identifier les CSGs (Beier et al. 2007). Cependant, bien que des rapports contradictoires aient été publiés par la suite et que CD133 ne marquait pas toutes les sous-populations du CSCs, ce marqueur est toujours considéré comme un élément clé des CSCs (Grosse-Gehling et al. 2013) agissant en tant que régulateur de la survie cellulaire induisant l'activation de la voie PI3K-Akt (Wei et al. 2013).

L'origine des CSGs n'est toujours pas claire et controversée. Il a été proposé que les CSCs dérivent de CSNs normaux après l'accumulation de mutations oncogènes et/ou à la suite d'événements induits par le microenvironnement (Hjelmeland et al. 2011). Plus récemment, il a été suggéré que des neurones ou des astrocytes différenciés puissent être dédifférenciés et transformés, acquérant ensuite des caractéristiques similaires à celles du CSC pour générer des GBMs histologiquement différents (Friedmann-Morvinski et al. 2012).

4.1 Conditions de culture et isolement des CSGs

Les critères utilisés pour identifier et maintenir les cultures de CSC diffèrent entre les différentes études, principalement en raison de l'absence de biomarqueurs absolus et uniformes et différentes méthodes d'isolement de CSC et d'enrichissement de culture *in vitro* ont été signalées, ce qui rend les comparaisons d'études difficiles. Bien que des cellules souches du GBM aient été isolées en tant que sous-population au sein de lignées cellulaires établies, l'isolement de sous-populations de cellules tumorales à partir d'explants post-chirurgicaux humains, cultivés sous forme de neurosphères non adhérentes dans un milieu sans sérum enrichi en facteurs de croissance (Folkins et al. 2009), est actuellement considéré comme la source la plus fiable de CSGs. Le passage à long terme de cellules dans des milieux contenant des pourcentages élevés de sérum modifié de manière irréversible à la fois le phénotype et le génotype des cellules par rapport à celles présentes dans la tumeur d'origine, favorisant la sélection de cellules mutées plus adaptées à la croissance *in vitro* (Lee et al. 2006 ; Wakimoto et al. 2012). De plus, les CSGs à passage précoce cultivés dans des conditions sans sérum récapitulent mieux les caractéristiques invasives *in vivo* de la tumeur parentale lorsqu'elle est cultivée sous forme de xénogreffes intracrâniennes, ce qui en fait un système de modèle plus approprié.

Les conditions de culture définies pour la propagation de CSNs (milieu sans sérum contenant EGF et bFGF) sont efficaces pour maintenir la croissance du CSG *in vitro*, permettant aux cellules de se développer sous forme de sphéroïdes (neurosphères) flottants qui retiennent le phénotype de cellule souche. Il convient de noter que la formation de neurosphères dans les expériences de dilution limitante est l'un des principaux outils utilisés pour évaluer l'auto-renouvellement i*n vitro* du CSC (Carra et al. 2013). Enfin, l'isolement de CSC doit encore être vérifié par une analyse *in vitro*/*in vivo* des propriétés fonctionnelles, telles que la différenciation sur plusieurs lignées et, surtout, la tumorigénicité chez les modèles animaux.

4.2 Résistance des CSGs aux thérapies

Au cours de la dernière décennie, la résistance des CSGs à la radiothérapie et à la chimiothérapie a été largement étudiée. Les mécanismes de résistance au TMZ, la norme de soins actuelle pour le GBM, ont été particulièrement étudiés.

Il a été démontré que les CSCs isolées de GBM expriment des niveaux plus élevés de MGMT, comme mentionné précédemment, MGMT est une enzyme de réparation de l'ADN capable d'éliminer les groupes méthyle ajoutés à l'ADN par des agents d'alkylation tels que TMZ (Molina et al. 2014). La résistance des CSGs au TMZ *via* la régulation de l'expression de MGMT est favorisée par les voies de signalisation JNK (c-Jun N-terminal kinase) et MEK-ERK-MDM2-TP53 (Sato et al. 2011 ; Okada et al. 2014). En plus de MGMT, la protéine de réparation de l'ADN ALKBH2 (AlkB homolog2) a été identifiée comme médiateur de la résistance au TMZ dans le GBM humain (Johannessen et al. 2013). En plus d'une réparation plus efficace de l'ADN, les CSCs du gliome ont également amélioré la capacité d'efflux d'agents chimiothérapeutiques grâce à la surexpression des transporteurs de cassette de liaison à l'ATP (ABC) tels que ABCG2 à leur surface cellulaire. Ce mécanisme de résistance était lié à la voie PTEN/PI3K/Akt (Bleau et al. 2009). Une autre étude sur les gliomes a montré que lorsque les xénogreffes étaient traitées par irradiation, une radiorésistance et une sélection au cours du temps des cellules exprimant CD133 à leur surface, un marqueur de CSC a été observé. Cette population de cellules était également capable de réparer très efficacement les dommages que les radiations causent à l'ADN (Bao et al. 2006).

De plus, l'état de quiescence des CSGs dans leur microenvironnement tumoral hypoxique/acide était lié, à une capacité tumorigène et une chimiorésistance améliorées (Patru et al. 2010 ; Campos et al. 2014 ; Ishii et al. 2016).

IV. Chimiokines et récepteurs dans GBM

1 Généralités sur les chimiokines et les récepteurs

1.1 Les chimiokines

Les chimiokines sont des petites protéines basiques pour la plupart de taille entre 6 et 14 kDa appartenant à la famille des cytokines présentant des propriétés chimioattractives. Les premières chimiokines ont d'abord été reconnues pour leur implication dans les processus inflammatoires, mobilisant les cellules du système immunitaire. Mais par la suite leur rôle dans de nombreux autres phénomènes physiologiques et pathologiques fut mis en évidence. Ainsi elles interviennent dans l'angiogénèse, l'organogénèse, le développement des organes lymphoides, le système immutaire, les processus inflammatoires, mais aussi pathologiques comme le développement tumoral où elles participent au contrôle de la croissance tumorale, des métastases et de l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes.
Au niveau des tumeurs, elles peuvent recruter des monocytes et des neutrophiles qui se différencient, respectivement, en macrophages associées aux tumeurs (TAMs : tumor associated macrophages) ou neutrophiles associés aux tumeurs (TAN : tumor associated neutrophils) avec des activités pro- ou anti-tumorales. Elles sont également impliquées dans l'angiogénèse requise pour la croissance tumorale et les métastases (Mollica Poeta et al. 2019). Dans de nombreuses tumeurs, on observe une dérégulation de leur expression ou de leur activité.

1.1.1 Nomenclature et classification des chimiokines

A l'heure actuelle, 48 chimiokines ont été identifiées chez l'homme (Bachelerie et al. 2014). Les chimiokines présentent une signature dans leur séquence qui a été utilisée pour les regrouper en quatre sous-familles en fonction du nombre de résidus cystéines situé dans la partie N-terminale de la protéine et de l'espacement entre ces cystéines (figure 6). Ainsi, dans la sous- famille des chimiokines CXC (ou α-chimiokines), les cystéines sont séparées par un acide aminé. Dans la sous famille la famille CC (ou β-chimiokines) les deux cystéines sont adjacentes. La sous-famille des C- chimiokines (ou γ-chimiokines) ne contient qu'une cystéine en N-terminal et dans la sous-famille CX3C (ou δ-chimiokines) les deux cystéines sont séparées par 3 acides aminés. Les chimiokines CXC, CC et CX3C contiennent au total quatre cystéines dans la structure, alors que la sous famille des C chimiokines n'en contient que deux. Des ponts disulfures s'établissent entre les différentes cystéines de la manière suivante (figure 6) :

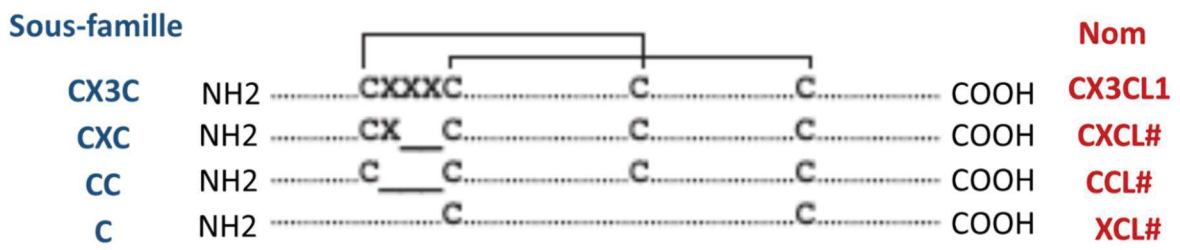


Figure 6. Motifs structuraux dans la structure primaire des chimiokines.
Le nombre de cystéines et le nombre d'acides aminés entre les cystéines dans la partie NH2-terminale permettent un regroupement des chmiokines en sous-familles. Pour les sous-familles CX3C, CXC et CC, des ponts disulfures sont établis entre les première et troisième cystéines et entre les deuxième et quatrième cystéines. Pour la famille C, un pont disulfure est établi entre les deux seules cystéines présentes dans la structure primaire (dont l'une se trouve dans la partie NH2 terminale). Les chimiokines sont désignées en prenant le nom du sous-groupe suivi de la lettre "L" (pour ligand) et d'un chiffre pour différencier les différentes chimiokines d'une même sous-famille. Chez l'homme, les sous-familles CX3X, CXC, CC et C contiennent respectivement 1 membre (la fractaline), 17 membres, 28 membres et 2 membres (les lymphotactines) (tableau 2). D'après Bachelerie et al. 2014.

Les chimiokines de la sous-famille CXC peuvent d'autre part être subdivisées en deux catégories suivant l'absence ou la présence d'un motif ELR (glutamate-leucine-argine) dans la partie NH2 terminale en amont de la première cystéine. On distingue ainsi les chimiokines ERL^- et les chimiokines ELR^+.

Enfin les chimikines sont classées sur la base de leur fonction en chimiokines inflammatoires, chimiokines homéostatiques ou chimiokines avec des fonctions duales (inflammatoires et homéostatiques). Les chimiokines inflammatoires furent les premières à être mises en évidence dans les années 1980-1990. Elles contrôlent le recrutement des leucocytes, notamment des monocytes, macrophages et des neutrophiles vers les sites d'inflammation. Les gènes codant ces chimiokines sont regroupés, chez l'homme, sous forme de clusters sur deux chromosomes : un cluster pour les chimiokines CXC localisé sur le chromosome 4 en q13.3 (17 gènes) et un second pour les chimiokines CC localisé sur le chromosme 17 en position q12 (18 gènes) (Bachelerie et al. 2014). Ces chimiokines n'ont en général pas une spécificité stricte pour un récépteur. Les chimiokines homéostatiques découvertes plus tard, dont les gènes sont situés en dehors des clusters précédents présentent une plus grande spécificité d'expression cellulaire et de reconnaissance de récepteurs. Elles jouent un rôle majeur dans le développement et l'organisation du système immunitaire ainsi que dans le trafic normal des leucocytes. Enfin certaines chimiokines peuvent être à la fois homéostatiques et inflammatoires (Zlotnik and Yoshie 2012). Les chimiokines inflammatoires de la sous-famille CXC impliquées dans la mobilisation des neutrophiles vers les sites inflammatoires sont ELR^+. Les chimiokines ERL^- agissent plus

spécifiquement sur les lymphocytes. Les principales caractéristiques des chimiokines sont résumées dans le tableau 2.

Chimiokine	Numéro d'accès humain (sauf indication contraire)	Type	Autres noms (Humain)	Symbole de gène (Humain)	Fonction
Sous-famille CXC (α chimiokine)					
CXCL1	P12850	I, ELR+	Gro-α : Growth related oncogene-α	*XCL1*	Trafic de neutrophiles
CXCL2	P10889	I, ELR+	Gro-β : Growth related oncogene-β	*CXCL2*	Trafic de neutrophiles
CXCL3	P19876	I, ELR+	Gro-γ : Growth related oncogene-γ	*CXCL3*	Trafic de neutrophiles
CXCL4	P02776	Pt, ELR-	PF4 : Platelet derived factor 4	*PF4*	Procoagulant
CXCL4L1	P10720	Pt, ELR-	PF4V1 : Platelet Factor 4 Variant 1	*PF4V1*	Procoagulant
CXCL5	P42830	I, ELR+	ENA-78 : Epithelial cell derived neutrophil activating factor-78	*CXCL5*	Trafic de neutrophiles
CXCL6	P80162	I, ELR+	GCP-2 : Granulocyte chemoattractant protein-2	*CXCL6*	Trafic de neutrophiles
CXCL7	P02775	Pt, I, ELR+	NAP-2 : Neutrophil activating protein-2	*PPBP*	Trafic de neutrophiles
CXCL8	P10145	I, ELR+	IL-8 : Interleukin-8	*IL-8*	Trafic de neutrophiles
CXCL9	P18340	I, ELR-	MIG : Monokine	*CXCL9*	Réponse immunitaire Th1
CXCL10	P02778	I, ELR-	IP-10 : Interferon inducible protein-10	*CXCL10*	Réponse immunitaire Th1
CXCL11	O14625	I, ELR-	I-TAC : Interferon inducible T cell a chemoattractant	*CXCL11*	Réponse immunitaire Th1
CXCL12	P48061	H, ELR-	SDF-1 : Stromal derived factor-1	*CXCL12*	Myélopoïèse; Lymphopoïèse B; HPC, homing neutrophile à la moelle
CXCL13	O43927	H, ELR-	BCA-1 : B cell activating chemokine	*CXCL13*	Trafic de lymphocytes B et T dans le tissu lymphoïde
CXCL14	O95715	H, ELR-	BRAK : Breast and kidney chemokine	*CXCL14*	Migration des macrophages
Cxcl15	NA (pour souris: Q9WVL7)	U, ELR-			Trafic de neutrophiles
CXCL16	Q9H2A7	I	SR-PSOX : Scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein	*CXCL16*	Trafic et survie de cellules NKT
CXCL17	Q6UXB2	U	DMC : Dendritic cell and monocyte chemokine-like protein	*CXCL17*	Chimiotaxie des cellules dendritiques (DC) et des monocytes
Sous-famille CC (β chemokine)					
CCL1	P22362	I	I-309	*CCL1*	Réponse immunitaire Th2

CCL2	P13500	I	MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1	*CCL2*	Immunité innée
CCL3	P10147	I	MIP-1α : Macrophage inflammatory protein-1-α	*CCL3*	Trafic de cellules T et de monocytes/macrophages
CCL3L1	P16619	I	LD78β	*CCL3L1*	Immunité innée
CCL3L3	P16619	I	LD78β	*CCL3L3*	Réponses immunitaires Th1 et Th2
CCL4	P13236	I	MIP-1β : Macrophage inflammatory protein-1-β	*CCL4*	Interaction T/DC
CCL4L1	Q8NHW4	I	AT744.2	*CCL4L1*	Suppression du VIH
CCL4L2	Q8NHW4	I		*CCL4L2*	
CCL5	P13501	I,Pt	RANTES : Regulated Activation Normal T cell Expressed and Secreted	*CCL5*	Immunité innée et adaptative
Ccl6	NA (in mouse P27784)				ND
CCL7	P80098	I	MCP-3 : Monocyte chemoattractant protein-3	*CCL7*	Réponse immunitaire Th2
CCL8	P80075	I	MCP-2 : Monocyte chemoattractant protein-2	*CCL8*	Réponse immunitaire Th2
Ccl9	NA (in mouse P51670)				ND
CCL10 (reserved)	NA				NA
CCL11	P51671	D	Eotaxin	*CCL11*	Réponse immunitaire Th2
Ccl12	NA (in mouse)	I			Trafic et dégranulation d'Eo, BA, MC
CCL13	Q99616	I	MCP-4 : Monocyte chemoattractant protein-4	*CCL13*	ND
CCL14	Q16627	P	HCC-1 : Haemofiltrate CC chemokine ou MIP-1d : Macrophage inflammatory protein-1-d	*CCL14*	ND
CCL15	Q16663	P	HCC-2 : Haemofiltrate CC chemokine 2 ou Lkn-1 : leukotactin 1	*CCL15*	ND
CCL16	O15467	U	HCC-4 : Haemofiltrate CC chemokine 4 ou LEC : liver expressed chemokine	*CCL16*	Facteur de maturation DC
CCL17	Q92583	D	TARC : Thymus and activation regulated chemokine	*CCL17*	Réponse immunitaire Th2
CCL18	P55774	H	PARC : Pulmonary and activation regulated chemokine	*CCL18*	Attraction des cellules T et B Hématopoïèse par DC
CCL19	Q99731	H	MIP-3β : Macrophage inflammatory protein-3-β ou ELC : Epstein Barr virus induced receptor ligand	*CCL19*	Homing des cellules T et DC au ganglion lymphatique

			chemokines		
CCL20	P78556	D	MIP-3α : Macrophage inflammatory protein-3-α ou LARC : liver and activation regulated chemokine	*CCL20*	Développement de GALT, homing des cellules B et DC à GALT, réponse immunitaire Th17, réponse humorale IgA dans l'intestin
CCL21	O00585	H	SLC : Secondary lymphoid tissue chemokine	*CCL21*	Homing des cellules T et DC au ganglion lymphatique
CCL22	O00626	D	MDC : Macrophage derived chemokine	*CCL22*	Réponse immunitaire Th2
CCL23	P55773	P	MPIF-1	*CCL23*	ND
CCL24	O00175	H	Eotaxin-2 ou MPIF-2 : Myeloid progenitor inhibitory factor-2	*CCL24*	Migration des Eo
CCL25	O15444	H	TECK : Thymus expressed chemokine	*CCL25*	Migration des thymocytes, Homing des cellules T mémoire vers l'intestin
CCL26	Q9Y258	I	Eotaxin 3	*CCL26*	Réponse immunitaire Th2
CCL27	Q9Y4X3	H	CTACK : cutaneous T-cell attracting chemokine ou ESkine : Embryonic stem cell chemokine	*CCL27*	Homing des lymphocytes T vers la peau
CCL28	Q9NRJ3	H	Mec : Mucosae-Associated Epithelial Chemokine	*CCL28*	Homing des lymphocytes T vers les surfaces muqueuses
Sous-famille C (γ chemiokine)					
XCL1 Lymphotactin	P47992	D	Lymphotactin ou SCM-1α : Single C motif-1 α	*XCL1*	Présentation croisée de l'Ag par CD8+ DCs
XCL2 Lymphotactin	Q9UBD3	D	SCM-1β : Single C motif-1 β ou Lymphotactin-β	*XCL2*	Présentation croisée de l'Ag par CD8+ DCs
Sous-famille CX3C (δ chemiokine)					
CX3CL1 Fractalkine	P78423	D	Fractakine/neurotactin	*CX3CL1*	Migration des cellules NK, monocytes et Th1

Tableau 2. Nomenclature, classification et principales fonctions des chimiokines humaines. Les chimiokines sont regroupées en 4 sous-familles CXCC, CC, C et CX3C, en fonction du nombre et de l'espacement des deux cystéines localisées à l'extrémité –NH2 terminale des protéines. Les chimiokines de la sous-famille CXC peuvent d'autres par être classées en ELR^- et ELR^+ en fonction de l'absence et de la présence du motif glutamate-leucine-arginine en amont de la première cystéine de la partie –NH2 terminale. I : inflammatoire, H : homeostatique, P ou Pt : chimiokines plasmatiques ou plaquettaires activées par clivage, U : propriété non connue (Unknown), NKT : natural killer T cell, NK : natural killer, DCs : dendritic cells, GALT : gut-associated lymphoid tissue, Eo : eosinophils, Ba : basophil, ND : not determined, NA : not applicable. D'après Bachelerie et al. 2014 ; Zlotnik and Yoshie 2012.

1.1.2 Structure des chimiokines

Les chimiokines sont codées par des gènes différents et leurs structures primaires présentant des variations. Les comparaisons de séquences d'acides aminés indiquent une identité de séquences entre 20 % et 90 % (Miller and Mayo 2017). Cependant, malgré les différences entre les séquences, les protéines présentent des repliements très similaires constitués de trois feuillets β antiparallèles (β1, β2 et β3) sur lesquels vient se replier une hélice α située dans la partie –COOH terminale (figure 7). Cette structure canonique est retouvée dans toutes les chimiokines, y compris dans les deux chimiokines de la sous-famille C qui ne présentent qu'un pont disulfure établi entre les deux deux cystéines présentes dans la structure (Tuinstra et al. 2008).

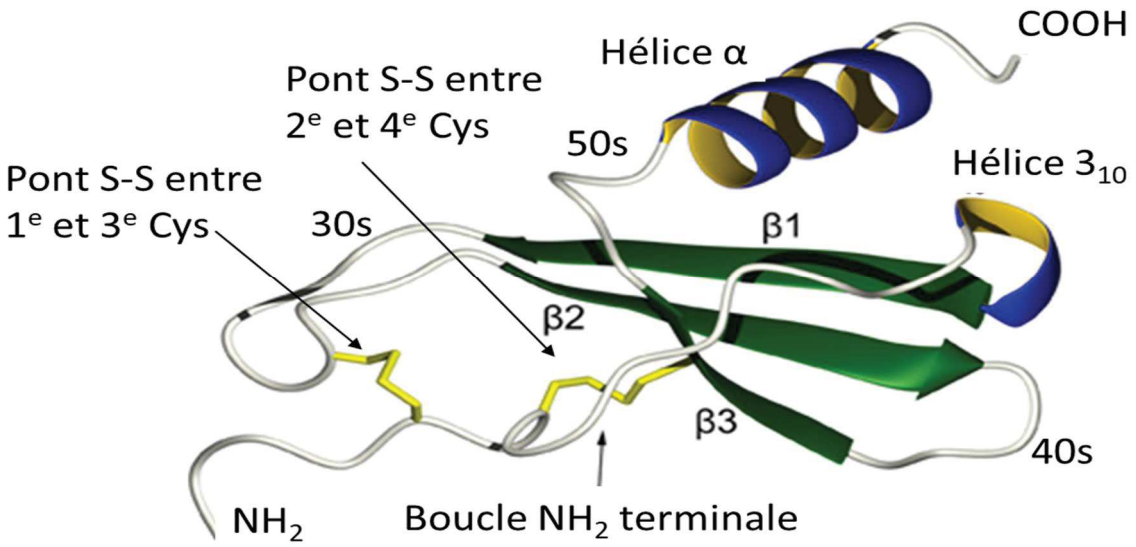


Figure 7. Structure des chimiokines .
Les différentes chimiokines adoptent une structure tertaire formée de trois feuillets β antiparallèles (β1, β2 et β3) et d'une hélice α dans la partie –COOH terminale. Une hélice 3_{10} se situe à l'entrée du premier feuillet β, après la boucle NH2 terminale. Trois boucles désignées par 30s, 40s et 50s relient, respectivement, le feuillet β1 au feuillet β2, le feuillet β2 au feuillet β3 et le feuillet β3 à l'hélice α en C-terminal. L'extrémité –NH2 terminale est flexible. Pour les chimiokines des sous familles CC, CXC et CX3C, des ponts disulfures (S-S), présentés en jaune sur la figure, sont établis entre, les première et troisème cystéines et les seconde et quatrième cystéines rencontrées dans la séquence en commençant à l'extrémité –NH2 terminale. D'après Miller and Mayo 2017.

Les chimiokines peuvent s'associer sous forme de dimères, tetramères, voire des oligomères de taille plus importante. Alors que les structures des monomères sont très similaires, la structure des assemblages oligomériques est très variée suivant la sous-famille de chimiokine considérée. Les différentes formes oligomériques peuvent co-exister dans un équilibre complexe dépendant des conditions de l'environnement (pH, concentration en

sels, présence de ligands comme les glycosaminoglycanes,..) (Kufavera et al. 2015). A côté des homo-dimères/homo-oligomères, l'association de chimiokines différentes avec formation notamment d'hétérodimères de type CC/CC ou CC/CXC a été observée *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs études suggèrent également que la signalisation cellulaire induite par ces associations protéiques et donc la fonction sous-tendue peuvent être différentes de celles liées aux formes monomériques (pour revue voir Miller and Mayo 2017).

1.1.3 Les récepteurs de chimiokines

Les chimiokines interagissent avec des récepteurs qui sont essentiellement de deux types : des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) formés de sept domaines transmembranaires et appartenant à la classe A (rhodopsin-like) et des récepteurs aux chimiokines atypiques (ACKRs), égalemement constitués de domaines transmembranaires (six ou sept) mais non couplés aux protéines G. La liste des récepteurs est donnée dans le tableau 3.

Récepteurs de chimiokine couplés aux protéines G humaines		
Nom	**Numéro d'accès**	**Fonction**
CXCR1	P25024	Trafic de neutrophiles
CXCR2	P25025	Lymphopoïèse des cellules B, sortie et trafic de neutrophiles de la moelle
CXCR3	P49682	Immunité adaptative de type 1
CXCR4	P61073	Hématopoïèse, organopoïèse, immunité adaptative
CXCR5	P32302	Trafic de lymphocytes B et T dans le tissu lymphoïde
CXCR6	O00574	Fonction des cellules lymphoïdes innées, immunité adaptative
CCR1	P32246	Immunité innée, immunité adaptative
CCR2	P41597	Trafic de monocytes, immunité adaptative de type 1
CCR3	P51677	Immunité adaptative de type 2, distribution et trafic d'éosinophiles
CCR4	P51679	Homing des cellules T mémoire résidents vers la peau, thymopoïèse, réponse immunitaire Th2
CCR5	P51681	Immunité adaptative de type 1
CCR6	P51684	Trafic de cellules dendritiques immatures, réponse immunitaire adaptative Th17, développement de GALT (gut-associated lymphoid tissue)
CCR7	P32248	Trafic de lymphocytes B, T et cellule dendritique myéloïde du tissu lymphoïde vers la zone des lymphocytes T, sortie des lymphocytes T des tissus
CCR8	P51685	Thymopoïèse, surveillance immunitaire de la peau, immunité adaptative de type 2
CCR9	P51686	Thymopoïèse; homing des cellules T à l'intestin, développement et fonction de GALT (gut-associated lymphoid tissue)
CCR10	P46092	Immunité humorale au niveau des muqueuses, surveillance immunitaire de la peau
XCR1	P46094	Présentation croisée de l'Ag par CD8+ et les cellules dendritiques
CX3CR1	P49238	Patrouille de monocytes dans l'immunité innée, migration de cellules microgliales et de cellules NK, immunité adaptative de type 1
Récepteurs de chimiokines atypiques (ACKR)		

ACKR1	Q16570	Transcytose des chimiokines, capture des chimiokines
ACKR2	O00590	Capture des chimiokines
ACKR3	P25106	Développement des valvules cardiaques, façonnent le gradient de chimiokine pour CXCR4
ACKR4	Q9NPB9	Capture des chimiokines
CCRL2 (ACKR5)	O00421	Non défini (ND)
PITPNM (ACKR6)	AAI28584.1	Métastase du cancer du sein

Tableau 3. Récepteurs aux chimiokines humains et principales fonctions.
Les chimiokines se lient à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) ou non couplés aux protéines G dénommés ACKR (Atypical chemokine receptors). D'après Bachelerie et al. 2014.

Leur nomenclature fait référence à la sous-famille de chimiokines se liant au recepteur. Ainsi les récepteurs aux chimiokines appartenant aux groupes des RGPGs peuvent être subdivisés en quatre sous-groupes : les récépteurs CXCR comptant chez l'homme 6 membres, les récepteurs CCR comptant 10 membres, les récepteurs XCR et le récepteur CX3CR contenant chacun un membre (XCR1 et CX3CR1, respectivement). La comparaison du nombre de récépteurs CXCR, CCR et XCR aux nombre de chimiokines de sous-familles CXC et CC (17, 28 et 2 resctivement), révèle l'absence d'une spécificité stricte entre les deux protagonistes. Ainsi certains récépteurs peuvent interagir avec plusieurs chimiokines différentes appartenant à la même sous-famille et inversement une chimiokine donnée peut se lier à des récepteurs différents (figure 8). Pour les récepteus interagissant avec différents chimiokines, l'affinité peut être différente ou non suivant la chimiokine. CXCR1 lie CXCL8 avec une affinité élevée et CXCL6 avec une faible affinité. D'un autre côté CXCR2 lie les sept chimiokines CXCL1/2/3/5/6/7/8 avec une forte affinité (Rajagopalan et al. 2006 ; Baggiolini et al. 1997 ; Gijsbers et al. 2004).

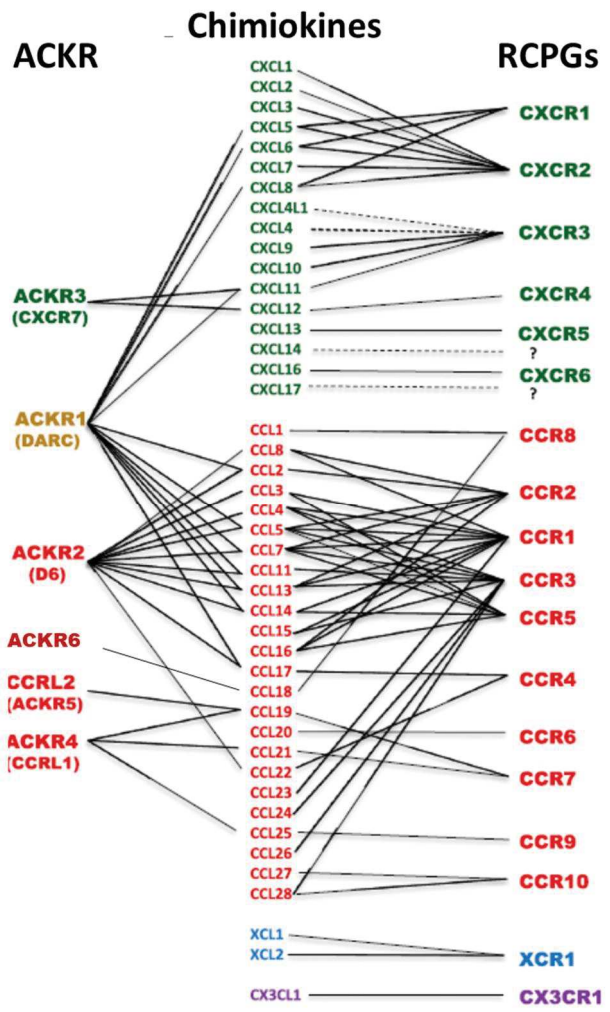


Figure 8. Chimiokines et interaction avec leurs récepteurs.
Les chimiokines peuvent interagir avec des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) ou non couplés aux protéines G (ACKR = Atypical Chemokine Receptor). D'après Bachelerie et al. 2014.

Sur l'ensemble des 18 récepteurs aux chimiokines du groupe RCPGs, seuls sept semblent interagir chacun avec une seule chimiokine et induire une signalisation en aval (tableau 4).

Récepteur	Chimiokine
CXCR4	CXCL12 (H)
CXCR5	CXCL13 (H)
CXCR6	CXCL16 (I)
CCR6	CCL20 (D)

CCR8	CCL1 (I)
CCR9	CCL25 (H)
CX3CR1	CXCCL1

Tableau 4. Récepteurs RCPGs de chimiokines avec une reconnaissance stricte vis-à-vis d'une chimiokine ligand.
H = homéostatique, I = inflammatoire, D = duale. D'après Bachelerie et al. 2014 et Zlotnik and Yoshie 2012).

D'autres récepteurs aux chimiokines non couplés aux protéines G ont été mis en évidence. Ces récepteurs initialement appelés "récepteurs leurres, pièges, ou intercepteurs" ont été renommés ACKR pour Atypical Chemokine Receptor (Bachelerie et al. 2014). Six ACKR sont actuellement connus (tableau 3). Certains de ces récepteurs lient plusieurs chimiokines, alors que ACKR5 et ACKR6 n'ont chacun qu'un ligand connu. Leur structure peut être proche de celle d'un RCPG à sept domaines transmembraires pour ACKR3, d'autre comme ACKR6 ne présente que 6 domaines transmembranaires. Ces récepteurs ont été retrouvés dans de nombreux types cellulaires : leucocytes, lymphocytes, cellules de la moelle osseuse, cellules dendritiques, stromales, neuronales, et dans des tissus comme le poumon et les intestins (pour revue voir Bachelerie et al. 2014).

Les récepteurs aux chimiokines se trouvent sous forme de monomères et dans certains cas peuvent former des oligomères, homo- ou hétéro-dimères (Thelen et al. 2010). Ainsi, les récepteurs CCR2, CCR5, CXCR4, ACKR3, CXCR2, CXCR1 et DARC (Duffy antigen/receptor for chemokines) forment des homodimères et pourraient aussi former des hétéro-dimères (Salanga et al. 2009). La liaison de CXCL12 à CXCR4 déclenche souvent l'homo- mais parfois également l'hétérodimérisation avec ACKR3, en fonction du niveau de co-expression des récepteurs (Levoye et al. 2009).

1.1.4 Liaisons des chimiokines aux glycosaminoglycanes (GAGs)

En dehors de leur fixation à des récepteurs RCPG ou ACKR, les chiomiokines se lient également aux glycosaminoglycanes (GAGs) constitués de longues chaines glucidiques acides (héparine/héparanes sulfates, chondroitines sulfates, kératanes sulfates et acide hyaluronique) liées de manière covalente ou non à des protéiques membranaires pour former des protéoglycanes ancrés dans la membrane cellulaire ou réparties dans la matrice extracellulaire (figure 9). Les GAGs varient considérablement dans leur composition et dans leur longueur qui peut aller de un à plusieurs dizaines de milliers d'unités disaccharidiques. Les processus affectés par les interactions chimiokine-GAG sont cités dans le tableau 5. L'importance de l'interaction des chimiokines avec les GAGs a été démontrée *in vivo* dans des animaux présentant des mutations au niveau des chimiokines empêchant leur

intercation avec les GAGs, tout en maintenant l'interaction avec les récepteurs. Cette interaction est indispensable à l'immobilisation des chimiokines et permet la création de gradients de chimiokines nécessaires à la migration par haptotaxie des cellules présentant des récepteurs aux chimiokines (Proudfoot et al. 2003 ; Rot 1993 ; Haessler et al. 2011 ; Weber et al. 2013). L'interaction avec les GAGs semble d'autre part favoriser la stabilité des chimiokine, la transcytose, ainsi que l'oligomérisation des chimiokines (et réciproquement) (Hoogewerf et al. 1997 ; Lau et al. 2004 ; Kuschert et al. 1999). Cette dernière induit une modulation de l'interaction des chimiokines avec leurs récepteurs et en corollaire de la signalisation cellulaire (Kuschert et al. 1999). Des peptides et des spiegelmers inhibant l'interaction des chimiokines avec les GAGs ont été proposés comme molécules thérapeutiques potentielles (pour revue voir Thompson et al. 2017 ; Kufavera et al. 2015 ; Crijns et al. 2020).

Cependant les modèles structuraux permettant de visualiser ces interactions restent encore limités à l'heure actuelle.

Chimiokine	GAG	Processus concerné
CXCL1	Héparine, HS	Stabilité de l'homodimère CXCL1, formation d'un gradient de chimiokine pour le trafic cellulaire,
		migration des neutrophiles dans le poumon
	HS	Liaison à CXCR2 et migration des neutrophiles *in vivo*
	KS	Formation de gradient dans la réponse inflammatoire de l'œil
CXCL2	Héparine	Formation de complexes GAG/CXCL2/CXCR2
		Stabilité de l'homodimère CXCL2
		Migration des neutrophiles dans le poumon
	HS	Migration des neutrophiles *in vivo* en réponse à CXCL2
CXCL4	Héparine, HS, CS	Liaison à haute affinité
	GAGs cellulaire	Prévention de la dégradation
CXCL5	Héparine	Formation d'hétérodimères *in vivo*
CXCL6	HS	Liaison à haute affinité
CXCL7	Héparine	Formation d'hétérodimères *in vivo*
CXCL8	Héparine, DS, CS, HA	Liaison à haute affinité
	HS	Formation induite par CXCL8 d'espèces réactives de l'oxygène et chimiotaxie *in vitro* des neutrophiles
		Inhibition de la libération d'élastase
		Liaison à haute affinité
		Activité neutrophile *in vivo*, inhibition de la libération d'élastase des neutrophiles
	GAGs endothélial	Migration de neutrophiles *in vivo*, transcytose
		Oligomérisation

CXCL9	Héparine, CS, HS	Protection contre l'activité CD26/DPPIV
	HS	Recrutement de cellules plasmacytoïdes
	GAGs endothélial	Recrutement et migration transendothéliale des cellules T
CXCL10	Héparine, HS	Liaison à haute affinité
		Oligomérisation
		Recrutement de cellules plasmacytoïdes
		Effet anti-prolifératif sur les cellules endothéliales
		Effet anti-fibrotique dans les poumons
		Effet antiviral contre le virus de la dengue
	GAGs endothélial	Recrutement et migration transendothéliale des cellules T
CXCL11	Héparine	Migration cellulaire in vivo
		Liaison à haute affinité
	HS	Liaison à haute affinité
		Recrutement de cellules plasmacytoïdes
	GAGs endothélial	Recrutement et migration transendothéliale des cellules T
CXCL12	Héparine, HS	Liaison à haute affinité
		Oligomérisation
		Protection contre l'activité CD26/DPPIV
		Activation des lymphocytes T dans la synoviale de la polyarthrite rhumatoïde
		Accumulation de leucocytes intrapéritonéaux et angiogenèse
		Activité anti-VIH
	Héparine, HA, CS, DS	Liaison à haute affinité
CCL2	Héparine, HS	Liaison à haute affinité
		Oligomérisation
		Hétérodimérisation
		Recrutement cellulaire *in vivo*
	Héparine, HS, HA, CS, GAGs cellulaire	Liaison à haute affinité
CCL3	Héparine, HS, DS, CS	Liaison et oligomérisation à haute affinité
CCL4	Héparine, HS, DS, CS	Liaison et oligomérisation à haute affinité
CCL5	Héparine, HS	Liaison à haute affinité
		Oligomérisation
		Fonction biologique *in vivo*

		Adhésion ferme des leucocytes aux cellules endothéliales
		Migration transendothéliale des macrophages *in vitro*
		Apoptose dépendante de CCL5 dans les cellules T
CCL7	Héparine, HS	Liaison à haute affinité
		Recrutement de leucocytes *in vivo*
		Hétérodimérisation
CCL8	Héparine	Oligomérisation
CCL13	Héparine	Liaison à haute affinité
		Hétérodimérisation

Tableau 5. Aperçu des processus affectés par les interactions chimiokine-GAG.
GAG = glycosaminoglycane, HS = sulfate d'héparane, KS = sulfate de kératane, CS = sulfate de chondroïtine, DS = sulfate de dermatane, HA = acide hyaluronique, DPPIV = dipeptidyl peptidase IV, VIH = virus de l'immunodéficience humaine. D'après Crijns et al. 2020.

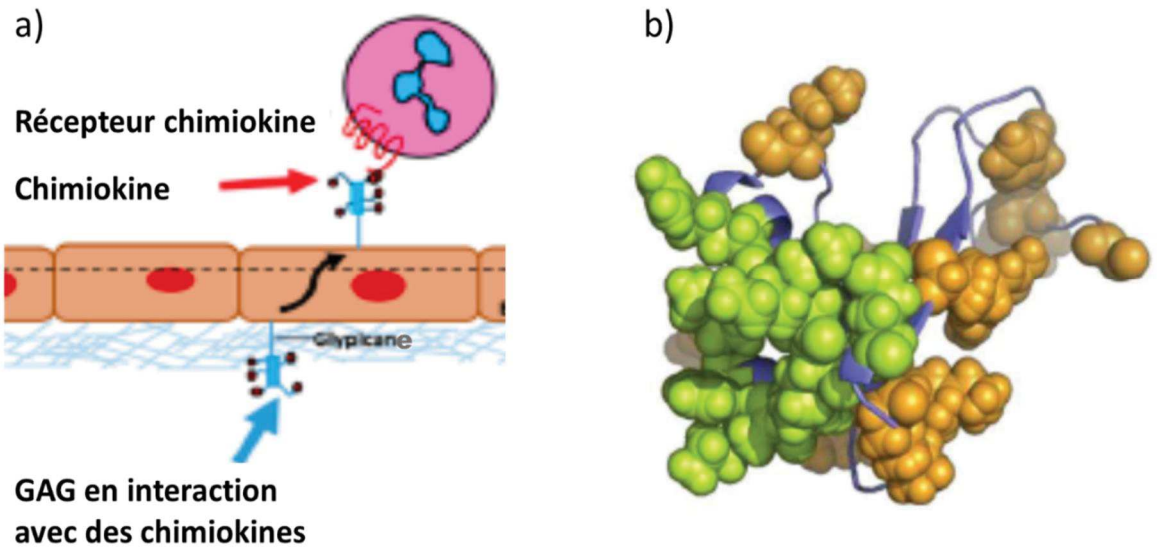


Figure 9. Modèle d'interaction entre chimiokine, RCPG et glycosaminoglycanes (GAG).
Le modèle prend l'exemple de la chimiokine CXCL8. a) La chimiokine interagit avec des GAG situés à la surface de la membrane de cellules endothéliales créant un gradient de concentration permettant le recrutement de leucocytes et leur transmigration de la circulation sanguine vers les tissus. En noir : la chimiokine, en bleu : un protéoglycane (glypicane), en rouge : un récepteur aux chimiokines de type RCPG à la surface d'un leucocyte. La flèche indique la transcytose de chimiokines à travers l'endothelium vers la lumière des vaisseaux. b) Structure 3D de CXCL8 humaine. En vert les acides aminés basiques interagissant avec les GAG. En orange, d'autres acides aminés basiques. D'après Thompson et al. 2017 ; Crijns et al. 2020.

1.1.5 Interaction chimiokines – récepteurs et signalisation cellulaire en aval.

La signalisation *via* les chimiokines est complexe du fait de la promiscuité de certaines interactions (interaction entre une chimiokine et plusieurs récépteurs ou entre plusieurs chimiokines et un même récepteur), de la laison de la chimiokine à des GAGs, des leurs modifications post-traductionnelles (Thompson et al. 2017) et de l'existence potentielle de multiples états d'oligomérisation du ligand et du récepteur pouvant conduire à des signalisations diverses. Cependant malgré l'apparente redondance du réseau chimiokine/récepteur, le système est contrôlé de manière spatiale et temporelle pour permettre un fonctionnement harmonieux de l'ensemble.

La liaison des chimiokines à leurs récepteurs du type RCPGs et l'activation de la signalisation en aval ont fait l'objet de nombreuses études. Un modèle en deux étapes avec deux sites indépendants a été proposé dans les années 1990 pour décrire la reconnaissance ligand/récepteur. Dans ce modèle, la partie amino terminale extracellulaire du récepteur interagit dans un premier temps avec le cœur globulaire de la chimiokine au niveau de la boucle –NH2 terminale (site 1), s'ensuit une interaction de la partie amino-terminale flexible de la chimiokine avec le faisceau d'hélices transmembranaires du récepteur (site 2) (figure 10). L'interaction au niveau du site 1 guiderait l'affinité et la spécificité, alors que la liaison au niveau du site 2 serait responsable de l'activation du récepteur et induirait la signalisation cellulaire (Monteclaro and Charo 1996 ; Monteclaro and Charo 1997 ; Crump 1997).

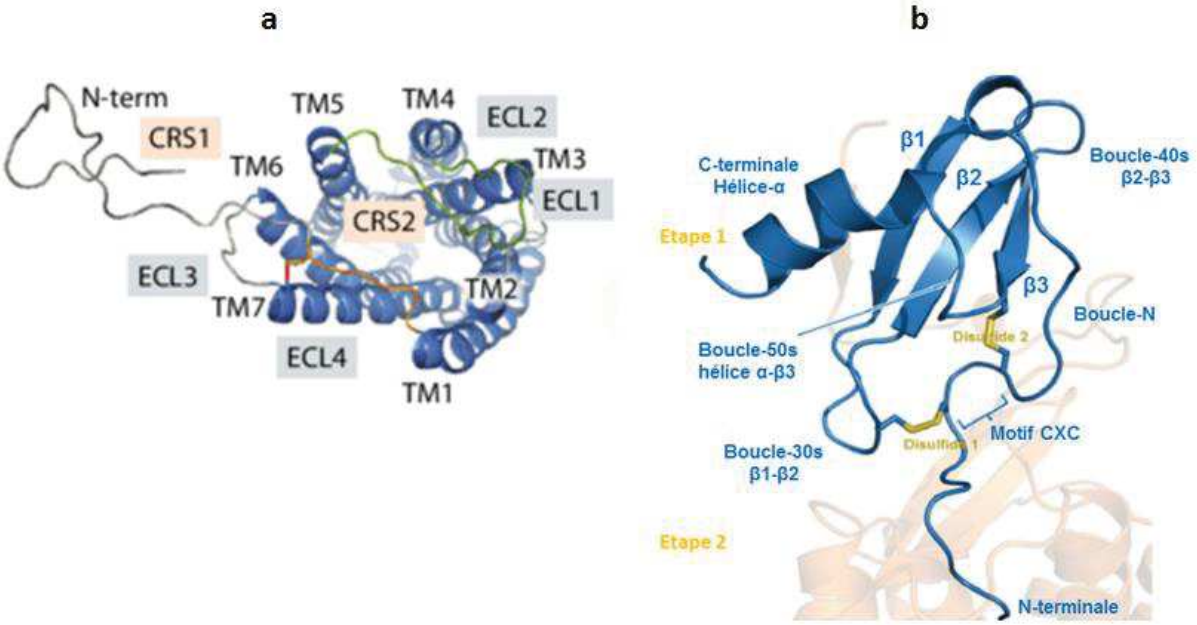


Figure 10. Récepteurs couplés aux protéines G et interaction avec une chimiokine.
a) Structure d'un RCPG à 7 domaines transmembranaires (7 TM). Les récepteurs sont des protéines de 320 à 380 acides aminés. Ils présentent dans leur structure sept hélices α transmembranaires (TM1-TM7), reliées par trois boucles du côté externe de la cellule (ECL1,

ECL2 et ECL3) et trois boucles du côté intracellulaire (ICL1, ICL2 et ICL3). La résolution des structures 3D des récepteurs CXCR1, CXCR4 et CCR5 a révélé une quatrième boucle extracellulaire ECL4 reliant l'extrémité –NH2 terminale du récepteur au septième domaine transmembranaire et maintenu par un pont disulfure. L'extrémité –NH2 terminale est extracellulaire et l'extrémité –COOH terminale est intracellulaire. Cette extrémité –COOH terminale adopte dans les formes non tronquées une structure en hélice α. Elle contient également le site d'attachement pour une ancre lipidique. b) Les domaines structuraux impliqués dans l'interaction chimiokine/récepteur dans le modèle en deux étapes et deux sites. Dans une première étape la partie –NH2 terminale du récepteur reconnait le cœur de la chimiokine, dans une fente située au niveau de la boucle N-terminale et le feuillet β3 de la chimiokine (site 1 d'interaction). Dans une seconde étape, l'extrémité flexible –NH2 terminale de la chimiokine se positionne au niveau de résidus dans les hélices transmembranaires du récepteur (site d'interaction 2). Selon les couples chimiokine/récepteur, cette extrémité de la chimiokine s'enfonce plus ou moins profondément dans la cavité du récepteur. CRS1 = site 1 de reconnaissance des chimiokines, CRS2 = site 2 de reconnaissance des chimiokines, ECL = boucle extracellulaire, ICL = boucle intracellulaire. D'après Kleist et al. 2016 ; Szpakowska et al. 2014.

Ce modèle d'interaction à deux sites a été conforté par différents résultats expérimentaux utilisant des récepteurs chimères ou des chimiokines mutées (Monteclaro and Charo 1996 ; Monteclaro and Charo 1997 ; Crump 1997). Cependant des résultats plus récents vont à l'encontre de l'indépendance structurale et fonctionnelle des sites 1 et 2. De même, les sites 1 et 2 ne sont pas toujours aussi nettement définis, d'autres points d'interaction peuvent exister et des interactions non site 1 et non site 2 ont été proposées (site 1.5) (Qin et al. 2015). Les boucles extracellulaires du récepteur et notamment la boucle E2, mais aussi E3 et E4 semblent également jouer un rôle dans l'interaction permettant le positionnement correct de la chimiokine et le transfert de l'information vers l'intérieur de la cellule. Les nouveaux modèles intègrent une interaction multi-sites, dynamique, avec une interdépendance entre la (les) chimiokine(s) et le (les) récepteur(s), l'interaction modifiant la structure de chacun des protagonistes (pour revue voir Kleist et al. 2016).

Les signalisations induites par l'interaction chimiokine/récepteur sont variées et classées en signalisation protéine G dépendante et signalisation β-arrestine dépendante, bien que d'autres voies puissent exister.

1.1.5.1 Signalisation protéine G dépendante

Dans le schéma classique, la liaison d'une chimiokine à son RCPG induit une activation d'une protéine G hétérotrimérique couplée au récepteur et conduit à une série de signaux intracellulaires. Un motif DRY, présent dans la deuxième boucle intracellulaire du récepteur est important dans cette signalisation. Les protéines G sont des GTP-ases composées de trois sous-unités (α, β, γ). Sous forme inactive la sous-unité α est liée GDP. Après activation, le GDP est échangé pour du GTP. La protéine G trimérique se décompose alors en deux sous-unités : Gα liée au GTP et le dimère G-βγ. Ces sous unités libres sont ensuite capables d'interagir avec des différentes molécules effectrices ancrées dans ou situées à proximité de la membrane cellulaire. Ainsi, des enzymes modifiant les

phospholipides et notamment les phospholipases C β2 et β3 (PLC) et la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) peuvent être activées. PLC hydrolyse le phosphatidyl inositol 4-5 diphosphate (PIP2) en diacylglycerol (DAG) et inositol 1,4,5 tri-phosphate (IP3). DAG active la protéine kinase C (PKC) qui catalysent des phosphorylation de protéines telles que les MAPKs (Naor 2009) et IP3 permet l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique, après fixation sur les récépteurs présents au niveau des réservoirs calciques intracellulaires. La kinase PI3K génèrent des inositides 3-phosphate qui servent de point d'ancrage pour le recrutement de protéines présentant des domaines homologues de la pleckstrine (PH), telles que la protéine kinase B (PKB = AKT) (Thelen 2001 ; Macoska 2011 ; Offermanns 2003). Ces premiers évènements intracellulaires semblent communs à la plupart des récepteurs aux chimiokines couplés aux protéines G. Par contre les étapes suivantes varient grandement et dépendent de nombreux facteurs (contexte et au type de cellule) qui peuvent moduler l'efficacité de l'interaction et par conséquent générer des flux de signalisation avec des composantes spatiales et temporelles différentes. La densité de récepteurs à la surface d'une cellule, leur modifications post traductionnelles, la formation d'homodimères ou d'hétérodimères, l'état d'oligomérisation de la ou des chimiokines sont des facteurs pouvant moduler la signalisation cellulaire. De plus les RCPGs ont des mobilité réduite au niveau membranaire et des associations préférentielles de RCPGs et de protéines G à certains endroits de la membrane ont été rapportés (Kusumi et al. 2010 ; Sungkaworn et al. 2017). La signalisation peut ainsi dépendre de l'assemblage macromoléculaire présent à un endroit donné et impliquant le récepteur, la protéine G et l'ensemble des protagonistes d'une voie de signalisation. La signalisation induite par l'activation du récepteur se termine lorsque la partie –COOH terminale du récepteur est phosphorylée par des sérine – thréonine kinases GRKs (GPCR kinases) ce qui induit la désensibilisation du récepteur. La phosphorylation permet la fixation de l'arrestine qui recrute la β-2 adaptine et la clathrine ce qui amène le récepteur et la chimiokine vers les puits à clathrine et conduit à leur internalisation. Après transfert vers les endosomes, le récepteur peut être soit recyclé, soit l'ensemble chimiokine et récepteur est amené vers les lysosomes pour être dégradé.

1.1.5.2 Signalisation β-arrestine dépendante

L'arrestine fixée à la partie –COOH terminale du récepteur peut également servir de point d'ancrage à la fixation et à l'activation de protéines kinases : tyrosine kinases de la famille Src (conduisant à l'activation de la voie des MAPKs), AKT, PI3K (Rajagopal et al. 2010 ; Luo et al. 2017 ; Smith et al. 2017 ; Ziarek et al. 2017). Cette signalisation nommée arrestine-dépendante médie différents aspects de la migration cellulaire comme la polymérisation des filaments d'actine, l'adhésion, la protrusion membranaire, mais est aussi impliquée dans la survie, la prolifération et la différentiation cellulaire.

1.1.5.3 Autres voies d'activation

En dehors de des activations dépendantes des protéines G ou de l'arrestine, d'autres voies sont possibles. Ainsi l'interaction entre CXCL12 et son récepteur CXCR4 sous forme dimérique peut conduire à l'activation de la voie JAK/STAT (Janus kinases/Signal transducer and activator of transcription) (Soriano et al. 2003). Les kinases JAK1 et JAK2 phosphorylent des résidus tyrosine du récepteur, ce qui conduit au recrutement et à la dimérisation de STAT et à l'activation de la voie de signalisation associée avec mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire. Cette interaction semble contrôlée par la sous-unité Gαi, suggérant un couplage entre la signalisation liée aux protéines G et les autres voies de signalisation.

1.1.5.4 Rôle des récepteurs atypiques ACKR dans la modulation de la signalisation induite par les chimiokines.

La signalisation pléiotrope induite par les chimiokines doit être régulée de manière très fine aussi bien au niveau spatial que temporel afin d'assurer une spécificité de réponse cellulaire et tissulaire et maintenir l'homéostasie et l'intégrité des organes et de l'organisme. Plusieurs mécanismes régulateurs ont été décrits, comme la signalisation biaisée (qui correspond à la capacité d'un récepteur ou d'un ligand à engager des voies de signalisation différentes, avec des efficacités variables selon le ligand ou le récépteur utilisé), la modulation allostérique de l'interaction, la dimérisation (homo ou hétéro) du récepteur, l'internalisation du récepteur après interaction avec l'arrestine, la séquestration du ligand par les GAGs à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire, l'oligomérisation des chimiokines et leur maturation protéolytique (Bonecchi et al. 2009 ; Zweemer et al. 2014 ; Mahabaleshwar et al. 2012 ; Crijns et al. 2020 ; Proudfoot et al. 2017 ; Proost et al. 2017) pour revue voir Stone et al. 2017.

Une régulation supplémentaire est apportée par les récepteurs atypiques ACKR. Ces récepteurs ont des structures analogues aux RCPGs, sont capables de lier des chimiokines sans susciter les signalisations canoniques via les protéines G vues pécédemment pour les RCPGs. Cette inaptitude à signaler *via* les protéines G semble corrélée à l'absence dans la plupart des ces récepteurs du motif canonique DRYLAIV présent dans la deuxième boucle intra cellulaire I2 du récepteur. Par contre les récepteurs ACKRs gardent la propriété de liaison à la β arrestine, ce qui permet l'internalisation du couple chimiokine/récepteur, le recyclage du récepteur vers la membrane et la dégradation lysosomale de la chimiokine (Boldajipour et al. 2008 ; Mahabaleshwar et al. 2012). En séquestrant des chimiokines, les ACKRs peuvent ainsi moduler leur gradient et contrôler ainsi la mobilité cellulaire. La famille comporte quatre ACKRs majeurs (ACKR1 à ACKR4) et deux récepteurs potentiels (ACKR5 et ACKR6) dont les fonctions sont en cours d'investigation. Les récepteurs ACKR1 – ACKR4 présentent une promiscuité dans la liaison des chimiokines (figure 8). Le récepteur ACKR3 est le plus étudié parmi ces récepteurs, il est exprimé dans les cellules hématopoiétiques, les neurones, les cellules mésenchymateuses, les cellules endothéliales et les cellules

cancéreuses. Le récepteurs n'a que deux ligands CXCL11 et CXCL12 (figure 8). ACKR3 peut former un hétérodimère avec CXCR4. Il constitue un leurre pour la chimiokine CXCL12 et semble jouer un rôle prépondérant dans l'organogénèse ainsi que le développement et la progression tumorale (Levoye et al. 2009).

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à la chimiokine CXCL12. Elle est l'une des rares chimiokines à interagir avec un seul récepteur RCPG, à savoir le récepteur CXCR4 et avec un seul ACKR en l'occurrence le récepteur ACKR3. Dans la suite de cette introduction, nous allons nous focaliser sur les propriétés et la fonction de cette chimiokine et de ses récepteurs dans la pathologie cancéreuse et notament dans le glioblastome.

2 La chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et ACKR3 (CXCR7)

2.1 CXCL12, isoformes et données cristallographiques

La protéine CXCL12 ou SDF1 « stromal cell-derived factor-1 » a été identifiée et isolée à partir des cellules stromales de la moelle osseuse (Tashiro et al. 1993). Cette protéine est classée dans la famille des chimiokines CXC. Elle présente la structure tridimensionnelle caractéristique des chimiokines (figure 11). Le gène humain de CXCL12 est localisé sur le chromosome 10q (Shirozu et al. 1995). Cette chimiokine existe sous forme soluble mais elle peut aussi se lier aux glycosaminoglycannes présents à la surface des cellules. Elle joue un rôle dans l'adhésion et dans la transmigration des leukocytes (Janowski 2009 ; Bryant et al. 2012 ; Daubeuf et al. 2013).

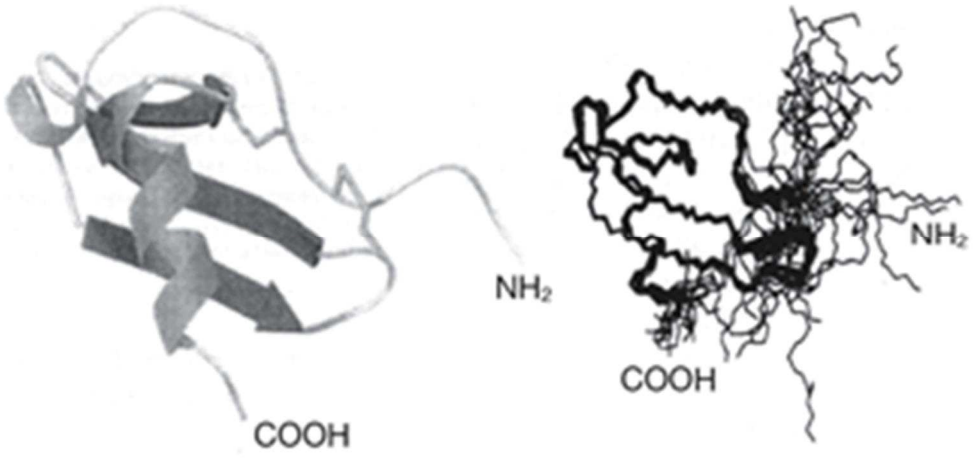


Figure 11. Structure tridimensionnelle de la chimiokine CXCL12 (SDF-1).
D'après Burteau et al. 2007.

Six isoformes du CXCL12 ont été identifiées chez l'homme : CXCL12α, CXCL12β, CXCL12γ, CXCL12δ, CXCL12ε et CXCL12φ. Les deux principales isoformes CXCL12α et CXCL12β, proviennent d'un seul gène par épissage alternatif (Nagasawa et al. 1996). CXCL12α code une protéine de 89 acides aminés AA alors que CXCL12 β code une protéine de 93 AA, dont les 89 premiers AA sont identiques à ceux de CXCL12α. Les 4 nouvelles isoformes de CXCL12 humain CXCL12γ, CXCL12δ, CXCL12ε et CXCL12φ ont été identifiées par (Yu et al. 2006). Ces différentes isoformes partagent toutes les trois premiers exons, mais l'exon 4 dans chaque cas est dérivé de différentes régions du locus du gène CXCL12 humain sur le chromosome 10q11 (figure 12).

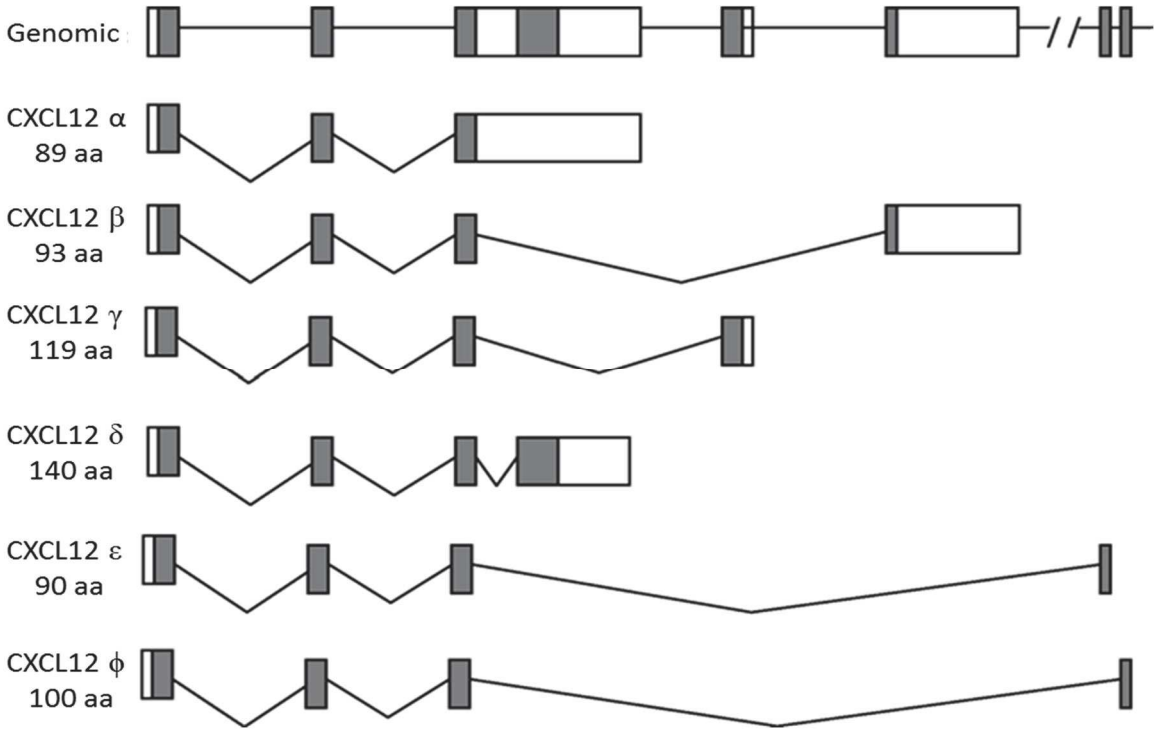


Figure 12. Structure génomique du gène *CXCL12* humain.

Les cases indiquent des exons avec une case pleine représentant la région de codage. Les lignes indiquent les introns. Les ARNm des cinq variants d'épissage ont été alignés. D'après Yu et al. 2006.

L'ADNc du CXCL12γ humain a été isolé de l'ARNm du cerveau fœtal et compte 543 paires de bases. Les trois premiers exons de CXCL12γ sont identiques à 100 % à celles de CXCL12α et CXCL12β. Le quatrième exon est situé à 3200 pb en aval du troisième exon sur le locus du gène CXCL12 et se situe entre le troisième exon et le quatrième exon de CXCL12β. Il possède une séquence signal de polyadénylation et un segment poly-A. La séquence peptidique code pour 119 AA. Les 89 premiers AA sont identiques à ceux du CXCL12α et CXCL12β, rajoutant 30 AA supplémentaire à l'extrémité C-terminaux.

L'ADNc du CXCL12δ humain a été isolé de l'ARNm du coeur humain et mesure 1052 paires de bases. La séquence AA du CXCL12δ prédit un peptide de 140 AA. Les 89 premiers AA sont identiques à ceux du CXCL12α et CXCL12β. Les 51 AA supplémentaires du C-terminal sont uniques.

L'ADNc du CXCL12ε humain a été isolé de l'ARNm du cerveau fœtal humain et mesure 628 paires de bases. L'ADNc du CXCL12φ humain a été isolé de l'ARNm du cœur du fœtus et mesure 621 paires de bases. Les trois premiers exons de CXCL12ε et CXCL12φ sont identiques à 100 % à ceux des isoformes CXCL12α et CXCL12β. Les ARNm de CXCL12ε et CXCL12φ ont une organisation génomique très similaire, le quatrième exon situé à environ 81 kilobases en aval du troisième exon. La séquence en acides aminés (AA) de CXCL12ε prédit un peptide de 90 AA, alors que celle de CXCL12φ est de 100 AA.

Ces différentes isoformes présentent une distribution tissulaire différente et semblent induire la même réponse cellulaire mais dans des conditions physiologiques ou pathologiques différents (Janowski 2009).

La séquence en acides aminés de CXCL12 est remarquablement conservée entre les espèces avec 95 % d'homologie entre la souris et l'humain (Shirozu et al. 1995 ; Tashiro et al. 1993). Cette conservation à travers l'évolution suggère un rôle fondamental de CXCL12 dans l'homéostasie et le développement (Shirozu et al. 1995).

2.2 Sites de production CXCL12

La chimiokines CXCL12 est exprimé de façon constitutive dans le foie, les poumons, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse (Luker and Luker 2006).

La production de CXCL12 chez l'adulte humain a été détectée dans les cellules stromales, endothéliales, épithéliales et dendritiques de plusieurs tissus comme le foie, la glande surrénale, le poumon, la moelle osseuse, et dans les cellules gliales, les astrocytes et certains types de neurones dans le système nerveux central (Banisadr et al. 2003 ; Karin 2010). Chez le fœtus l'expression de CXCL12 a été détectée dans les cellules épithéliales du foie fœtal et dans les cellules mésothéliales des cavités cœlomiques (Lewellis and Knaut 2012).

Pour les isoformes CXCL12α/β, l'ARNm est exprimé dans de nombreux tissus notamment les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, les ovaires, l'intestin, le foie (Shirozu et al. 1995). Dans les tissus fœtaux humains, CXCL12α est exprimé de manière ubiquiste mais l'expression de CXCL12β est plus limitée, l'expression la plus élevée pouvant être détectée dans la rate fœtale. L'expression de CXCL12β semble être liée au système vasculaire. Des études chez les souris ont montré que les cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux expriment spécifiquement CXCL12β et que cette isoforme est

surexprimée suite à une ischémie cérébrale focale (Stumm et al. 2002). De plus, une étude de la répartition de l'ARNm CXCL12β humain a indiqué leur présence dans les organes hautement vascularisés comme le foie, la rate, la moelle osseuse et les reins et leur absence dans le cerveau (Yu et al. 2006).

Le variant CXCL12γ a été principalement détecté dans le cœur humain et de la souris (Pillarisetti and Gupta 2001 ; Yu et al. 2006), avec une faible expression pulmonaire basale.

Les ARNm des isoformes CXCL12δ, CXCL12ε et CXCL12φ peuvent être détectés dans plusieurs tissus adultes et fœtaux humains, notamment le foie, les reins, le pancréas et l'intestin, avec un taux plus élevé dans le pancréas. L'expression de CXCL12δ dans les tissus humains fœtaux est assez omniprésente, l'expression la plus élevée étant détectée dans le foie fœtal. L'expression de CXCL12ε et CXCL12φ est faiblement détectée dans le rein humain foetal.

2.3 Activité de la chimiokine CXCL12

La chimiokine CXCL12 se lie à deux récepteurs : le récepteur CXCR4 et le récepteur ACKR3 ou (CXCR7) (Balabanian et al. 2005 ; Oberlin et al. 1996 ; Burns et al. 2006).

CXCL12 est impliquée dans des activités homéostatiques telles que le développement hématopoïétique, nerveux, cardiaque ou encore vasculaire (Bignon et al. 2011). CXCL12 peut être exprimé en condition inflammatoire ou sous l'effet de différents facteurs de stress, tels que l'utilisation d'agents induisant des dommages à l'ADN (irradiation, chimiothérapies cytotoxiques à base de cyclophosphamide ou de 5-Fluoro-uracile) (Ponomaryov et al. 2000). CXCL12 peut être induit également en cas d'hypoxie sous l'effet du facteur HIF-1α (Hypoxia Inductible Factor-1α) qui possède 2 sites de liaisons au niveau du promoteur du gène *CXCL12* (Ceradini et al. 2004 ; Davis et al. 2005).

Au niveau hématopoïétique, CXCL12 participe à la rétention et la migration des cellules souches hématopoïétiques dans les différentes niches de la moelle osseuse (Ratajczak et al. 2012 ; Rettig et al. 2012). La chimiokine participe aussi à la myélopoïèse, la lymphopoïèse B ou la domiciliation des polynucléaires neutrophiles sénescents au sein de la moelle osseuse (Bachelerie et al. 2014).

Il a été montré *in vitro*, que CXCL12 est un puissant inhibiteur de l'entrée du VIH dans les lymphocytes T $CD4^+$ par liaison et internalisation de son récepteur CXCR4 (Bleul et al. 1996 ; Oberlin et al. 1996).

Les effets de CXCL12 peuvent varier en fonction du type cellulaire et du récepteur considérés. Par exemple, il a été montré *in vitro,* que l'interaction de CXCL12 avec ACKR3 contrôle la migration des mélanocytes matures, tandis que l'interaction de CXCL12 avec CXCR4 contrôle la migration des mélanoblastes (Lee et al. 2013b ; Belmadani et al. 2009).

Les rôles importants de CXCL12 dans l'embryogenèse et le développement ont été mis en évidence chez les souris après invalidation de ce gène. Les souris invalidées pour le gène codant CXCL12 présentent des anomalies du système vasculaire et gastro-intestinal et des malformations du tissu cérébelleux (Nagasawa et al. 1996 ; Ma et al. 1998 ; Tachibana et al. 1998 ; Zou et al. 1998). Ces souris présentent aussi des anomalies dans l'hématopoïèse caractérisées par une diminution sévère de la lymphopoïèse B et de la myélopoïèse dans le foie fœtal et la moelle osseuse, ce qui se induit la mort de ces souris.

2.4 Les deux récepteurs de la chimiokine CXCL12

2.4.1 CXCR4

CXCR4 est un récepteur membranaire appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Cette famille de récepteurs constitue le plus important groupe de cibles pharmacologiques. CXCR4 est un récepteur de 352 acides aminés (Wu et al. 2010) et présente une masse moléculaire de 40 kDa. Il été identifié en 1996 comme un co-facteur essentiel permettant l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) dans les lymphocytes T $CD4^+$ (Deng et al. 1996). Lorsque la chimiokine CXCL12 a été identifiée comme un ligand du récepteur CXCR4, ce dernier a été reclassé parmi les récepteurs de chimiokines (Bleul et al. 1997 ; Oberlin et al. 1996).

A l'heure actuelle on ne connait que deux ligands qui peuvent interagir avec le récepteur CXCR4, la chimiokine CXCL12 et le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (macrophage migration inhibitory factor (MIF)).

CXCR4 présente aussi autre particularité, il dispose d'un très vaste patron d'expressions tissulaires, contrairement à la plupart des autres récepteurs de chimiokines.

Des études sur des modèles murins ont montré que la suppression du gène de CXCR4 mène à la mort périnatale des souriceaux par suite de multiples défauts d'organogenèse au niveau cérébral, cardiaque, vasculaire et immunitaire (Murphy et al. 2000).

2.4.2 Expression du récepteur CXCR4

Ontogénétiquement, ce récepteur est exprimé très tôt durant le développement embryonnaire, il exerce un rôle dans la migration de précurseurs pendant l'embryogenèse.

Durant l'évolution CXCR4 est exprimé dans un large pannel de cellules incluant les cellules du système immunitaire et du système nerveux central. Il peut médier la migration des leucocytes et des progéniteurs hématopoïétiques en réponse à CXCL12 dans de nombreux processus physiologiques (Balkwill 2004).

Le récepteur CXCR4 est largement exprimé au sein des leucocytes dans le sang périphérique incluant les monocytes, les neutrophiles, les lymphocytes B et T, les macrophages et les cellules dentritiques et par les progéniteurs de la moelle osseuse. Une expression différentielle de CXCR4 dans les cellules $CD34^+$ peut être impliquée dans le maintien des cellules progénitrices dans la moelle osseuse et la régulation du trafic des cellules souches (Sun et al. 2010).

CXCR4 se retrouve non seulement sur tous les types leucocytaires (plaquettes incluses) mais également il est exprimé dans le poumon, le cœur et le cerveau, notamment par les cellules endothéliales du système vasculaire, par les cellules épithéliales, et dans les neurones du système périphérique ou central, dans la microglie et les astrocytes.

De plus, une grande quantité de cellules qui exprime le récepteur CXCR4 a été détectée dans les muqueuses génitales et digestives, ainsi que dans les glandes salivaires et le placenta. Bien que CXCR4 soit exprimé dans un grand nombre de tissus, son expression est basse ou absente dans les tissus sains incluant le sein et les ovaires.

L'expression de CXCR4 a été détectée dans plus de 23 cancers humains incluant les cancers du sein, de l'ovaire, le mélanome et le cancer de la prostate (Balkwill 2004) où il est impliqué dans la migration et la survie des cellules cancéreuses (Furusato et al. 2010 ; Hattermann and Mentlein 2013). CXCR4 est surexprimé dans les cellules malignes (Ottaiano et al. 2006). L'expression de l'ARN messager de CXCR4 est régulée par HIF-1 (Zagzag et al. 2006).

2.4.2.1 Voies de signalisation intracellulaire du couple CXCR4/CXCL12

Lors de l'interaction, la région N-terminale et la dernière boucle extracellulaire du récepteur constituent des sites de fixation pour CXCL12, permettant l'activation de diverses voies de signalisation, en fonction du type cellulaire considéré (Doranz et al. 1999). L'intercation du ligand CXCL12 avec son récepteur induit un changement de conformation de ce dernier, ce qui favorise l'échange GDP/GTP des protéines G hétérotrimériques et la dissociation en sous-unités α et βγ, qui, à leur tour, activent de multiples voies transductionnelles (figure 13).

La sous unité Gαi inhibe la formation de l'AMPc par modulation de l'activité de l'adénylate cyclase (Dwinell et al. 2004). La baisse de l'AMPc, peut à son tour affecter la régulation homéostatique du transport des électrolytes par les canaux ioniques, mais peut aussi affecter l'activation de la PKA (protéine kinase A) (Takahashi et al. 2002). En condition basale, la PKA dans le cytoplasme, est associée au facteur de transcription NF-κB (nuclear factor-κB) et AKIP1 (A kinase interacting protein 1), et son domaine catalytique est masqué par IκB (King et al. 2011). Une augmentation d'AMPc entraine la dissociation de la PKA, qui par la suite induit la phosphorilation de la proteine P65 du complexe NF-κB, puis la

translocation de NF-κB jusqu'au noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles. L'inhibition de l'adénylate cyclase permet alors la régulation de l'activité de NF-κB. De plus, La sous unité Gαi est impliquée dans l'activation Ras de la cascade ERK1/2 MAPK, conduisant à des changements dans l'expression des gènes et la progression du cycle cellulaire.

L'autre sous unité G-βγ est capable d'activer la PLC-β (phospholipase C-β) et la PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase), conduisant à la régulation des processus tels que la transcription des gènes, la migration cellulaire et l'adhérence cellulaire (Offermanns 2003 ; Roland et al. 2003).

L'activation de PLC-β, hydrolyse le PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) qui induit la génération de diacylglycérol (DAG) et d'inositol 1,4,5 trisphosphate (IP3) qui contrôle la libération de Ca^{2+} intracellulaire du réticulum endoplasmique et l'activation de la protéine kinase C. En effet, l'IP3 peut se lier à un récepteur Ins3PR (inositol-3-phosphate receptor) présent sur un canal calcique, et cette liaison IP3/InsP3R déclenche l'ouverture du canal Ca^{2+} et la libération de Ca^{2+} dans le cytoplasme et conduit à l'activation de protéines kinases telles que la PKC (protein kinase-C) et les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Fernandis et al. 2003). De plus, la libération de calcium intracellulaire en réponse à l'activation du récepteur CXCR4 par CXCL12 peut être utilisée pour le criblage d'agents pharmacologiques dans le but d'identifier des inhibiteurs de l'interaction CXCR4/CXCL12 (Hachet-Haas et al. 2008).

Lorsque la PI3K est activée, elle entraine la phosphorylation d'effecteurs tels que la FAK (Focal adhesion kinase), la Pyk-2 (proline-rich tyrosine kinase 2), la paxilline, la NCK (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1), l'adaptateur protéique (Crk), et favorise ensuite le chimiotactisme. L'activation de PI3K peut également activer la kinase AKT ou "protéine kinase B" conduisant à la survie et à la prolifération cellulaire. L'activation d'AKT conduit à la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BAD (Bcl-2-associated death) et la dissocie du complexe Bcl-2/Bcl-X, perdant ainsi sa fonction pro-apoptotique (Suzuki et al. 2001). AKT peut aussi activer la voie NF-κB, impliquée dans la transcription de nombreux gènes.

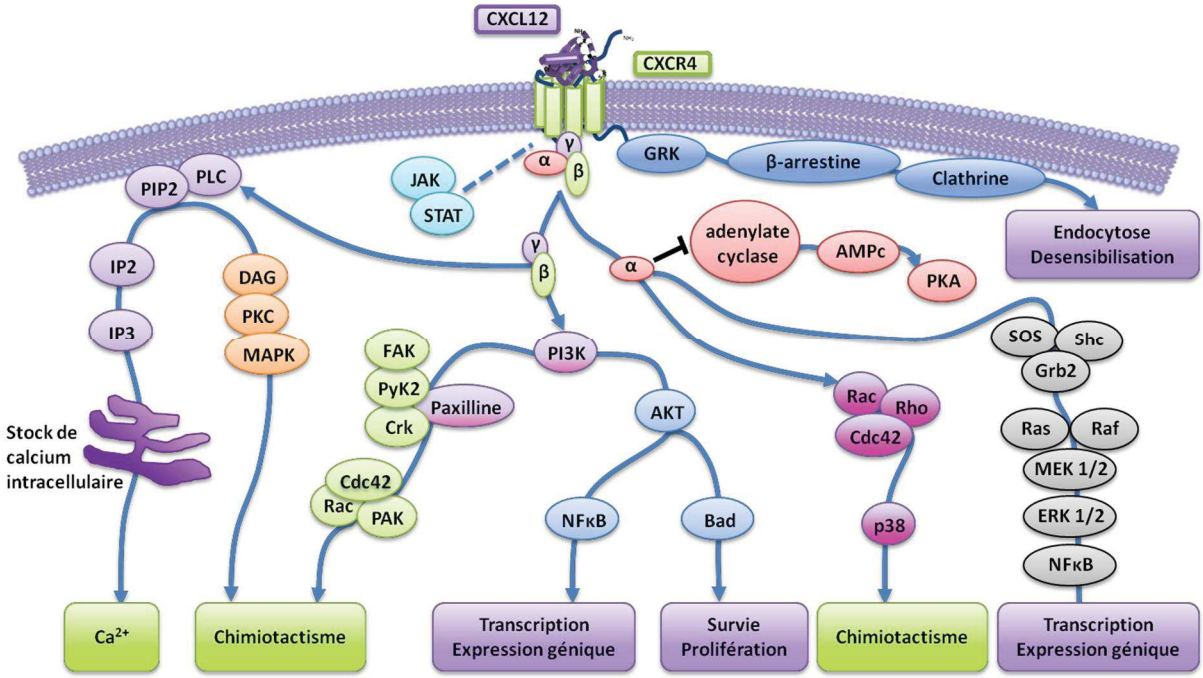


Figure 13. Principales voies de signalisation de l'axe CXCR4/CXCL12.
(D'après Teicher and Fricker 2010). La stimulation de CXCR4 par la chimiokine CXCL12 conduit à l'activation de différentes voies de signalisation, via l'activation des protéines G, qui activent les voies PI3 Kinase/Akt, phospholipases C/IP3 et Ras-Raf/MAP-Kinase et via les β-arrestines. Ces différentes voies peuvent entraîner la migration, le chimiotactisme, la survie, la prolifération cellulaire et la régulation de la transcription des gènes.

Indépendamment de la protéine G, l'axe CXCL12/CXCR4 peut signaliser via les β-arrestines. La chimiokine CXCL12 peut provoquer la désensibilisation et le découplage du récepteur CXCR4 de la protéine G par la phosphorylation dépendante de la GPCR kinase (GRK) et l'interaction ultérieur du CXCR4 avec la β-arrestine qui intervient dans l'internalisation du récepteur (Cheng et al. 2000 ; Busillo et al. 2010 ; Lagane et al. 2008). Les interactions entre CXCR4 et β-arrestine favorisent l'activation des médiateurs intracellulaires en aval, y compris les MAPK (p38, ERK1/2) et la chimiotaxie dépendante de CXCL12 (Sun et al. 2002).

2.4.3 ACKR3 (CXCR7)

Depuis 1989, le récepteur CXCR7 été connu sous le nom de RDC1 « Receptor Dog ADNc ». Puis, plus récemment ce récepteur est nommé ACKR3. Durant plusieurs années ce récepteur est resté orphelin, jusqu'à la découverte en 2005 de son premier ligand la chimiokine CXCL12 (Balabanian et al. 2005). Cette chimiokine possède une affinité pour ACKR3 10 fois supérieure que pour CXCR4 (Naumann et al. 2010). Puis, il a été montré un autre ligand pour ACKR3 c'est la chimiokine CXCL11/ITAC (interferon-inducible T cell αchemoattractant). ACKR3/CXCL11 se lie avec une forte affinité. ACKR3 appartient à la classe

des « récepteurs de chimiokines atypiques » ou « atypical chemokine receptor ». Il possède une structure à 7 domaines transmembranaires comme tous les récepteurs des chimiokines (Zlotnik and Yoshie 2000), mais ne semble pas signaliser *via* les protéines Gαi. ACKR3 joue un rôle dans la capture des chimiokines environnantes (récepteurs leurres, « decoy » ou « scavenger »). Ce récepteur est très conservé chez les mammifères.

ACKR3 est exprimé par les cellules leucocytaires telles que les lymphocytes B et T, les monocytes et les neutrophiles (Balabanian et al. 2005 ; Sánchez-Martín et al. 2013). Dans les lymphocytes B son expression est corrélée à la capacité de ces cellules à se différencier en plasmocyte, ce qui suggère que ACKR3 est un marqueur des cellules B mémoires compétentes pour devenir des cellules sécrétrices d'anticorps (Sierro et al. 2007). ACKR3 est également exprimé dans le mésenchyme et la microvascularisation de la valve cardiaque et du septum ventriculaire. Ce récepteur est en outre exprimé dans les tissus neuronaux (Thelen and Thelen 2008). Dans le cancer, ACKR3 est exprimé dans plusieurs types des cellules tumorales tels que le cancer du cerveau, du sein et du poumon.

ACKR3 est impliqué dans le développement embryonnaire (Sierro et al. 2007), la migration cellulaire directionnelle (Dambly-Chaudière et al. 2007 ; Boldajipour et al. 2008) et les fonctions immunitaires (Nibbs and Graham 2013). En coopération, CXCR4 et CXCR7 régulent la localisation des cellules progénitrices et la migration des tissus et des interneurones (wang et al. 2011).

Comme pour les gènes *CXCL12* et *CXCR4*, deux études ont montré que les souris invalidées pour le gène ACKR3 développent des anomalies du système cardio-vasculaire ou des malformations des valves cardiaques (Sierro et al. 2007 ; Gerrits et al. 2008), ce qui induit une létalité de 70 % des souris dans la première semaine après la naissance. Cependant, les souris qui n'expriment pas le gène CXCL11, ne présentent pas de phénotype particulier (Sierro et al. 2007).

2.4.3.1 Signalisation ACKR3

L'un des aspects uniques de ACKR3 (ou CXCR7) est qu'il ne signale pas par une voie médiée par la protéine G, mais plutôt par la voie de la β-arrestine (Rajagopal et al. 2010; Decaillot et al. 2011). ACKR3 ne provoque pas la mobilisation GPCR typique du calcium mais la liaison de CXCL12 (ou CXCL11) au récepteur ACKR3 stabilise l'association avec la β-arrestine et permet l'activation des cascades de signalisation menant à l'activation des MAP Kinases, en particulier ERK1/2, sans interagir avec les protéines G hétérotrimériques (Lipfert et al. 2013).

D'autre part, ACKR3 peut former des hétérodimères avec le récepteur CXCR4 (figure 14) et, ainsi, affaiblir la signalisation des protéines G médiées par CXCR4 (Levoye et al. 2009). L'hétérodimère CXCR4– ACKR3, peut également diminuer la signalisation calcique CXCR4 par

réarrangement du complexe protéique CXCR4/G (Levoye et al. 2009). De plus, ACKR3 peut ainsi moduler les diverses fonctions du récepteur CXCR4, il a été proposé que ce récepteur permet de piéger la chimiokine CXCL12 (son rôle de récepteur leurre («decoy»)), affectant ainsi le gradient CXCL12 et modulant la signalisation CXCR4 (Singh et al. 2013).

De plus, l'inhibition de CXCR4 conduit à une augmentation des taux de ACKR3 (Singh et al. 2013), par contre l'inhibition de ACKR3 n'affecte pas les niveaux de CXCR4, mais ACKR3 peut encore moduler la signalisation CXCR4 par dimérisation même lorsque ACKR3 est inhibé (Levoye et al. 2009). Dans l'ensemble, les deux protéines affectent la survie et la prolifération des cellules ainsi que la chimiotaxie. En plus de former des hétérodimères avec CXCR4, ACKR3 peut former des homodimères (Luker et al. 2009).

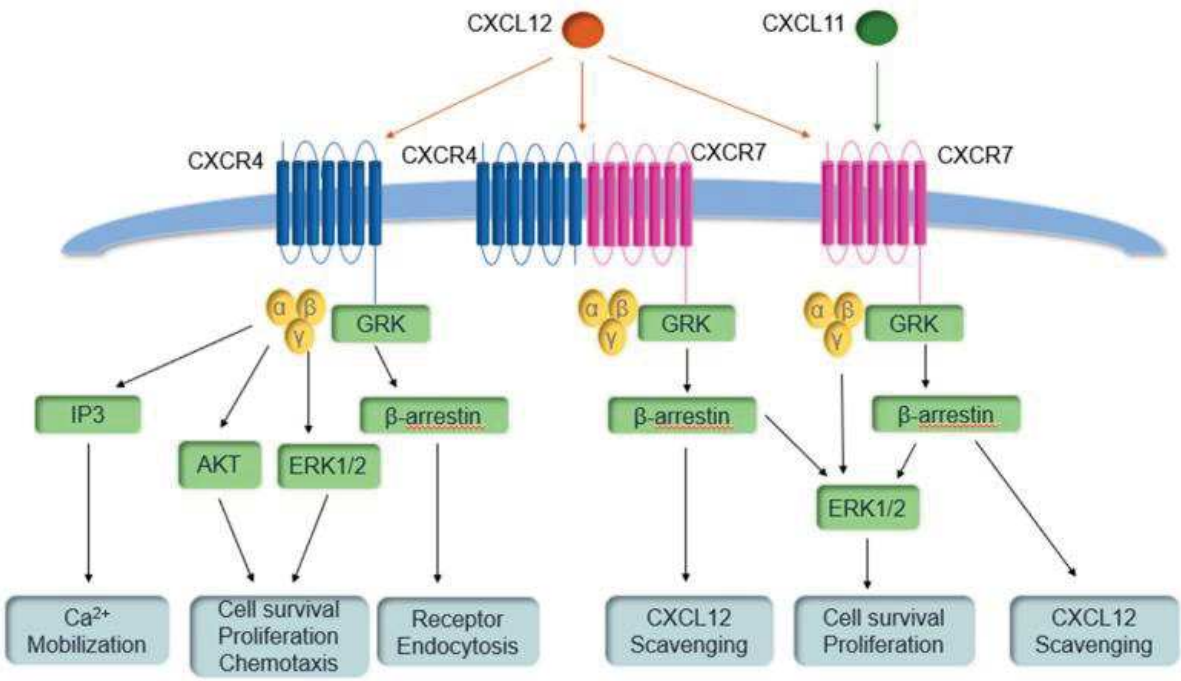


Figure 14. Voies de transduction intracellulaires liées à l'activation de ACKR3 (ou CXCR7) et CXCR4 affectant les principales voies de signalisation liées à la survie, à la prolifération et à la migration des cellules, d'après Lounsbury 2020.

CXCL12 se lie à CXCR4 et ACKR3, qui peuvent former des homodimères ou des hétérodimères. L'interaction CXCL12–CXCR4 déclenche la signalisation GPCR via les voies PI3K/Akt, PLC/IP3 et ERK1/2, et la mobilisation du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique via l'inhibition de la production d'AMPc médiée par l'adényl cyclase, régulant ainsi la survie, la prolifération et la chimiotaxie des cellules. La voie β-arrestine peut être activée via GRK pour internaliser CXCR4. Lorsque CXCL12 se lie à ACKR3, l'activation de la β-arrestine peut conduire à l'élimination de CXCL12. L'hétérodimérisation CXCR4–ACKR3 induit un changement conformationnel des protéines G du récepteur CXCR4 et bloque la signalisation.

2.5 Pathologies associées à CXCL12, CXCR4, ACKR3 (CXCR7)

CXCR4 est impliqué dans différentes situations pathologiques : certaines maladies auto-immunes : le lupus érythémateux disséminé (Wang et al. 2010c), la polyarthrite rhumatoïde (Chung et al. 2010 ; Bryant et al. 2012), certains déficits immunitaires rares (la Lymphopénie T CD4+ Idiopathique (LCI)) (Luo and Li 2008) et le syndrome WHIM (warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis) (Balabanian et al. 2008 et 2012 ; Beaussant et al. 2012 ; Liu et al. 2012a).

Les récepteurs CXCR4 et ACKR3 sont des corécepteurs d'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4+ (Kuritzkes 2009).

Le couple CXCL12/CXCR4 joue un rôle dans diverses pathologies inflammatoires comme l'allergie (Gonzalo et al. 2000 ; Lukacs et al. 2002 ; Hachet-Haas et al. 2008), et les maladies inflammatoires de l'intestin (Werner et al. 2013), ainsi que dans l'hypertension artérielle pulmonaire (Young et al. 2009 ; Montani et al. 2011 ; Gambaryan et al. 2011 ; Yu and Hales 2011 ; Costello et al. 2012).

2.6 Propriétés oncogéniques du trio CXCL12/CXCR4-ACKR3

Plusieurs études ont montré que la chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et ACKR3 sont impliqués dans plus d'une vingtaine de cancers tels que le cancer du pancréas, du sein, des poumons, de l'ovaire et de la prostate, (Sun et al. 2005 ; Sun et al. 2010) et jouent un rôle très important dans la prolifération des cellules tumorales, les métastases, et l'angiogenèse (Hattermann and Mentlein 2013 ; Sun et al. 2010 ; Domanska et al. 2013).

2.6.1 Expression de CXCR4 dans les tumeurs

CXCR4 est impliqué dans plus de 23 cancers, tels que les cancers du rein, des poumons, du sein, de la prostate, des ovaires (Biajoux et al. 2012 ; Balabanian et al. 2005 ; Kanbe et al. 2002 ; Chatterjee et al. 2014). Il s'agit du récepteur de chimiokine le plus fréquemment retrouvé sur les cellules cancéreuses humaines et murines (Balkwill 2004).

La surexpression de CXCR4 a été trouvée dans une grande variété de cancers humains, notamment les cancers de l'ovaire (Hall and Korach 2003), de la prostate (Taichman et al. 2002 ; Darash-Yahana et al. 2004), de l'œsophage (Kaifi et al. 2005), du cerveau et de nombreux autres (Balkwill 2004 ; Cojoc et al. 2013).

Un certain nombre d'études suggèrent qu'une forte expression de CXCR4 est également associée à un mauvais pronostic dans les cancers, notamment le mélanome (Scala et al. 2005), le carcinome à cellules rénales (Wang et al. 2012 ; Gassenmaier et al.

2013) et gastrique (He et al. 2013), le côlon (Zhang et al. 2012), le pancréas (Wehler et al. 2006 ; Maréchal and Van Laethem 2013) et cancers de la prostate (Akashi et al. 2008). Ce mauvais pronostic associé à des niveaux élevés d'expression de CXCR4 et de SDF-1 peut refléter une augmentation du nombre de cellules souches cancéreuses (cancer stem cells « CSCs »).

L'expression excessive de CXCR4 peut survenir lorsque le facteur suppresseur de tumeur von Hippel-Lindauest est perdu dans le cancer, cette perte entraîne une augmentation excessive de l'activité du facteur HIF-1α inductible par l'hypoxie, avec pour conséquence une augmentation des taux de CXCR4 et de CXCL12, qui pourraient être à l'origine de la stimulation autocrine de la croissance et du degré élevé de vascularisation de ces tumeurs (Zagzag et al. 2005).

Dans les tumeurs l'action du CXCL12 sur le récepteur CXCR4 participe à attirer activement les cellules stromales, y compris les fibroblastes, les cellules inflammatoires et les cellules vasculaires (Olumi et al. 1999 ; Orimo et al. 2005). Les fibroblastes jouent un rôle important dans la cancérogenèse, à la fois par le remodelage des tissus et par la sécrétion de facteurs de croissance paracrines.

Ces cellules stromales favorisent la croissance tumorale par divers mécanismes, notamment l'angiogenèse, la suppression immunitaire et la sécrétion de facteurs de croissance, dont CXCL12 et TGFβ (Orimo et al. 2005). Par exemple, contrairement aux fibroblastes mammaires normaux, les fibroblastes associés au cancer humain sécrètent CXCL12 et favorisent la croissance tumorale et l'angiogenèse par l'activation de CXCR4 (Orimo et al. 2005).

2.6.1.1 Dans le Glioblastome (GBM)

L'expression de CXCR4 dans la tumeur de GBM est corrélée à l'état de progression, à la résistance au traitement et à la rechute de la maladie (Trautmann et al. 2014). Des taux élevés de CXCR4 sont associés à un mauvais pronostic chez les patients GBM (Bian et al. 2008 ; Komatani et al. 2009) et à un phénotype plus diffus et infiltrant (Stevenson et al. 2008).

Dans une analyse de lignées cellulaires de GBM dérivées de patients, les cellules $CD133^+$ ont montré un niveau d'expression de CXCR4 300 fois plus élevé que celui des cellules $CD133^-$, ainsi que des taux élevés d'autres marqueurs souches tels que CD44 et Nestin (Liu et al. 2006). Ces cellules $CD133^+$ et $CXCR4^+$ étaient également plus résistantes au témozolomide, au carboplatine, à l'étoposide et au paclitaxel par rapport aux cellules CD133.

Dans le GBM, des taux élevés de CXCR4 sont observés dans les cellules tumorales du bord d'attaque (pseudopallisading) du cerveau et les microvaisseaux proliférants associés (Komatani 2009 ; Zagzag 2006 ; Zagzag 2008 ; Rempel 2000), ce qui concorde avec un rôle

dans la migration et la propagation ainsi que dans la pluripotence. Ces zones sont probablement hypoxiques en raison du nombre excessif de cellules et peut-être du système vasculaire défectueux, ce qui entraîne une augmentation de HIF-1α, CXCR4, CXCL12 et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Cette expression élevée de CXCL12 est fortement impliquée dans la propagation et la croissance des tumeurs GBM, ainsi que dans l'attraction des progéniteurs endothéliaux et autres progéniteurs vasculaires (Komatani et al. 2009).

Les cellules de GBM ont tendance à migrer le long des vaisseaux sanguins et des structures de substance blanche, qui expriment toutes les deux des taux élevés de CXCL12. Il a été montré que la migration induite par CXCL12 se produit avec le facteur de croissance épithélial (EGF) et/ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Sciaccaluga et al. 2013 ; Sciaccaluga et al. 2010). Les cellules de GBM en migration présentent une propension réduite à l'apoptose et à la prolifération (Joy et al. 2003 ; Mariani et al. 2001), et présentent une régulation positive de CXCR4 (Ehtesham et al. 2006) et de p-Akt. Cette infiltration du tissu cérébral contribue probablement à la récurrence de la maladie, et il a été montré que les tumeurs récurrentes présentent un taux élevé d'expression de CXCR4 par rapport aux GBM primaires (Tabouret al. 2014).

2.6.1.2 Dans les cellules souches cancéreuses (CSCs)

L'expression de CXCR4 et de CXCL12 a été démontrée dans une grande variété de CSC isolées à partir de lignées cellulaires tumorales et de tumeurs dérivées du patient (Würth et al. 2014 ; Maréchal and Van Laethem 2013 ; Barone et al. 2014), y compris les glioblastomes (Salmaggi et al. 2006 ; Gatti et al. 2013).

CXCR4 est présent dans les cellules souche cancéreuses du glioblastome (CSGs) et constitue un marqueur de surface de ces cellules. La stimulation de ces récepteurs induit la prolifération des cellules souches tumorales mais pas des cellules cancéreuses différenciées qui n'expriment pas CXCR4 (Ehtesham et al. 2009). Il a été également montré que les CSGs qui expriment CXCR4, présentent une capacité de s'autorenouveler, une cancérogénicité et une résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie contrairement aux cellules qui n'expriment pas CXCR4 (Zheng et al. 2012).

CXCR4 a un effet essentiel pour le maintien de l'aspect souche dans le GBM et de nombreux autres CSCs (Würth et al. 2014). *In vitro*, il a été montré que les antagonistes de CXCR4 ont pour effet de perturber le maintien, la migration et le renouvellement des cellules souches cancéreuses, réduisant ainsi la capacité de la tumeur à se régénérer après le traitement et entraînant éventuellement une défaillance de la tumeur par l'absence de renouvellement cellulaire.

2.6.2 Expression de CXCL12 dans les tumeurs

Comme indiqué précédemment, CXCL12 est une chimiokine homéostatique, qui contrôle le trafic et l'adhésion des cellules hématopoïétiques, dans la surveillance immunitaire et le développement, s'exprimant de manière constitutive dans différents organes (par exemple, moelle osseuse, cœur, foie, poumon, ganglions lymphatiques, foie, cerveau, rein, hypophyse, etc.). Cependant, la production de CXCL12 a également été corrélée avec des processus pathologiques, tels que l'inflammation, l'insuffisance cardiaque, les lésions cellulaires après irradiation d'organe ou pendant la chimiothérapie et lors de maladies auto-immunes.

Dans le cancer, l'expression de la chimiokine CXCL12 est élevée dans différents types de tumeur ou encore au niveau de sites métastatiques préférentiels comme le cerveau, la moelle osseuse, le foie et les poumons (Janowski 2009 ; Yu et al. 2006 ; Ho et al. 2012). Au sein des tumeurs, la sécrétion de CXCL12 est particulièrement pertinente dans les environnements hypoxiques et pro-angiogéniques, attirant ainsi les cellules exprimant CXCR4 vers le site hypoxique (Ceradini et al. 2004 ; Kucia et al. 2005). CXCL12 module ainsi la prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse et les métastases, agissant en tant que facteur de croissance autocrine/paracrine (Barbero et al. 2003 ; Barbieri et al. 2008 ; Pattarozzi et al. 2008), représentant une cible prometteuse pour le traitement du néoplasie. Dans le microenvironnement tumoral, la sécrétion de CXCL12 par les cellules stromales participe à l'attraction des cellules tumorigènes sur-exprimant CXCR4, contribuant à la progression tumorale et au développement éventuel de métastases.

2.6.3 Expression de ACKR3 dans le cancer

Le récepteur ACKR3 est exprimé dans un grand nombre de cancers tels que le cancer cervical, du sein, du poumon, du pancréas, de la prostate, etc. (Freitas et al. 2014). Des études récentes ont rapporté que ACKR3 participe à la tumorigenèse et à la progression tumorale. De nouvelles preuves suggèrent que ce récepteur est largement exprimé dans divers tissus tumoraux et a pour fonction d'activer les cellules endothéliales (Tripathi et al. 2009 ; Martinez et al. 2000) favorisant la prolifération, la migration, l'invasion et les métastases des cellules cancéreuses (Levoye et al. 2009 ; Zabel et al. 2009 ; Miao et al. 2007 ; Long et al. 2016 ; Guo et al. 2016 ; D'Alterio et al. 2016). Comme par exemple, dans le cancer de la vessie, une expression élevée de ACKR3 a été associée à la prolifération, à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses, entraînant une progression rapide de la tumeur (Nazari et al. 2017).

De plus, la surexpression de ACKR3 est souvent retrouvée dans les tissus cancéreux en comparaison avec les tissus sains homologues. Par exemple, au niveau des astrocytomes ou des glioblastomes qui présentent une surexpression génique de ACKR3, il a été observé une détection plus forte et plus large de la protéine ACKR3 par rapport à celle retrouvée

dans le tissu cérébral normal (Hattermann et al. 2010). Par ailleurs, ACKR3 est exprimé de façon élevée au niveau des vaisseaux associés aux tumeurs tandis que son expression est modérée par les cellules endothéliales des vaisseaux normaux (Miao et al. 2007). Globalement, la surexpression de ACKR3 est corrélée aux principaux processus tumoraux, mais les effets du récepteur sont variables en fonction du type de tumeur (tableau 6).

Cancers	Effets cliniques et biologiques
Cavité buccale	Carcinogénèse
Cerveau	Prolifération, modulation de la migration cellulaire, inhibition de l'apoptose, progression des gliomes. Vascularisation, prolifération des méningiome
Cervical	Croissance de tumeurs agressives, formation de métastases, survie faible
Colorectal	Prolifération, métastases, taille de la tumeur
Foie	Angiogenèse, invasion et métastases, croissance tumorale
Leucémies	Trafic et adhésion cellulaire
Lymphome gastrique du MALT	Associé à des manifestations nodulaires et des stades avancés de lymphomes
Neuroblastome	Migration, métastases
Pancréas	Prolifération
Poumon	Croissance, métastases
Prostate	Prolifération, croissance tumorale, augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques : IL-8/CXCL8, VEGF
Rein	Angiogenèse, métastases
Rhabdomyosarcome	Chimiotaxie
Sein	Développement tumoral, Croissance/survie, prolifération, métastases (poumons, cerveau)
Vessie	Expression de facteurs pro-angiogéniques : IL-8/CXCL8, VEGF, survie, prolifération, migration

Tableau 6. Impact de ACKR3 dans différents cancers.
Modifié d'après Freitas et al. 2014.

2.6.4 Axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans la régulation de cellules souches cancéreuses du GBM (CSGs)

La GBM est en particulier l'histotype de la tumeur qui correspond plus précisément aux critères du cellule souche cancéreuse (CSC), en termes d'hétérogénéité et d'organisation hiérarchique des cellules, d'identification des caractéristiques des cellules souches dans les sous-populations de cellules tumorales et, surtout, en ce qui concerne les réponses pharmacologiques. De plus, selon les preuves génotypiques et phénotypiques d'une reproduction *in vitro* des caractéristiques tumorales *in vivo* des cultures enrichies en CSC, par rapport aux lignées cellulaires établies (Lee et al. 2006), des études récentes ont abordé le rôle de la CXCL12 et ses récepteurs dans cette sous-population de cellules GBM (figure 15). Le concept de CSCs et leur identification dans plusieurs tumeurs mettent en évidence de nouveaux rôles possibles pour l'axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 en biologie tumorale.

L'axe CXCL12/CXCR4 a été signalé comme étant le principal régulateur des caractéristiques biologiques du CSG: autorenouvellement, prolifération, migration, angiogenèse et chimiorésistance. Une surexpression de CXCR4 a été observée dans les CSGs,

ce qui a accru la prolifération en réponse à la CXCL12 exogène (Ehtesham et al. 2009). Cependant, cette chimiokine est également libérée par les CSCs, suggérant un mécanisme de signalisation autocrine/paracrine (Salmaggi et al. 2006 ; Gatti et al. 2013).

In vitro, la prolifération des CSGs a été induite par traitement avec CXCL12 exogène (Liu et al. 2013b) ou par l'activation du récepteur induite par CXCL12 sécrétée par les CSCs de manière autocrine (Uemae et al. 2014). Cet effet a été principalement médié par CXCR4, puisqu'il a été inversé en présence de l'antagoniste CXCR4 « l'AMD3100 » (Schulte et al. 2011 ; Gatti et al. 2013). Par ailleurs, il a été observé que les effets autocrines de CXCL12 favorisent la survie de CSGs plus que la prolifération: Le blocage de CXCR4 par l'AMD3100 réduit la survie de CSCs proportionnellement à la quantité de CXCL12 libérée spontanément (Gatti et al. 2013). La capacité de l'AMD3100 à diminuer la formation de colonies induite à la fois par CXCL12 exogène et CXCL12 sécrétée par des cellules de GBM CD133 positives confirme davantage l'effet de stimulation de la croissance autocrine de cette chimiokine dans ce sous-ensemble de cellules GBM (Ping et al. 2011).

Le rôle de l'axe CXCL12/CXCR4 dans les CSGs a été confirmé par des études *in vivo*. En particulier, le knock-down du récepteur CXCR4 en utilisant l'RNAi ou l'inhibition de la fonction de CXCR4 par l'AMD3100 dans les CSCs, altère la prolifération *in vivo*, réduisant efficacement la croissance tumorale dans deux modèles de xénogreffes différents (Ping et al. 2011; Lee et al. 2013a); de même, le knock-down par shRNA CXCL12 dans les CSCs a inhibé la croissance tumorale *in vivo* (Uemae et al. 2014).

Le rôle de l'axe CXCL12/ACKR3 dans la biologie de CSG n'a été étudié que récemment et, même si un établissement définitif de son rôle n'a pas été fourni, des preuves solides soutiennent son implication dans le maintien du CSGs et la tumorigénicité. L'inhibition pharmacologique du ACKR3 après l'irradiation a provoqué une régression tumorale, une diminution de la récidive tumorale et une survie sensiblement prolongée dans un modèle de GBM chez les rongeurs, interférant probablement avec les CSCs (Walters et al. 2014). L'analyse des cultures enrichies en CSCs a déterminé un pourcentage accru de cellules exprimant CXCR4 et ACKR3 suggérant que les deux récepteurs pourraient réguler le phénotype souche. Les sous-populations de cellules $CXCR4^+$, $ACKR3^+$ et $(CXCR4/ACKR3)^+$ présentes dans les cultures cellulaires sont toutes tumorigènes (Lee et al. 2013a ; Liu et al. 2013b). À l'inverse, d'autres études ont indiqué que les CSGs n'expriment pas ACKR3 ou elles expriment à un faible niveau de ACKR3 (Hattermann et al. 2010 ; Gatti et al. 2013). De plus, lors de la différenciation de CSGs, les niveaux de CXCR4 diminuent tandis que ACKR3 augmente, ce qui suggère un rôle dominant pour ACKR3 dans les cellules GBM différenciées (Hattermann et al. 2010).

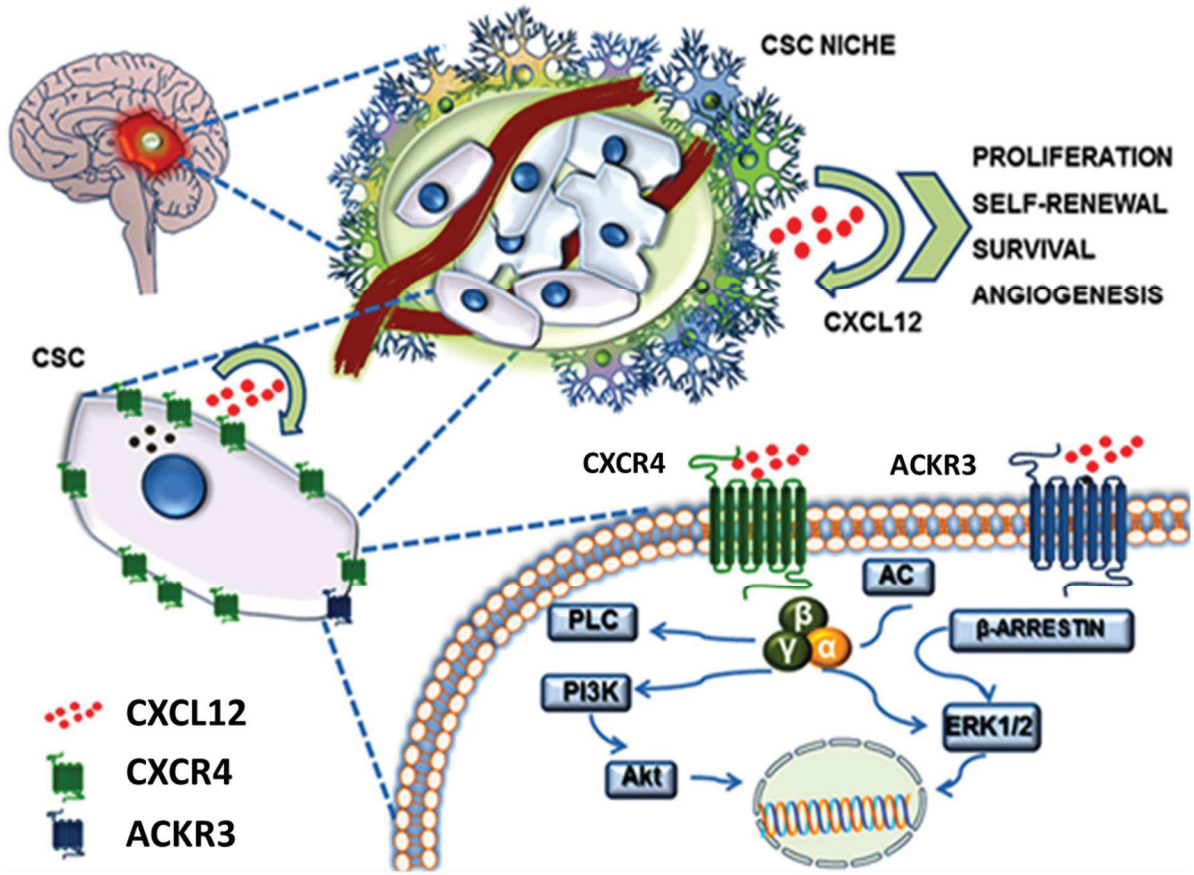


Figure 15. Système CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans la niche CSGs (d'après le revue Würth et al. 2014).
La niche de CSC du GBM est un microenvironnement discret dans la masse tumorale. Il est composé d'une population de cellules hétérogènes qui comprend généralement des vaisseaux sanguins, des cellules tumorales, des CSCs, des composants de la matrice extracellulaire et un gradient de facteurs solubles. La sécrétion de CXCL12 par les cellules endothéliales, les cellules tumorales et les CSCs génère une action autocrine et paracrine qui contribue à l'auto-renouvellement, à la survie et à la migration des CSCs eux-mêmes, déclenchant la signalisation intracellulaire des Akt et MAP-kinase(s).

2.6.4.1 Autorenouvellement

L'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle important dans le maintien de l'autorenouvellement de CSCs. Des tests, *in vitro*, ont été effectués pour évaluer l'autorenouvellement par des essais de formation de sphères et de clonogénicité sur deux modèles différents de CSGs (Gatti et al. 2013 ; Lee et al. 2013a) montrant que le CXCL12 exogène favorise la formation de sphères, et que le blocage pharmacologique du CXCR4 par AMD3100 (Gatti et al. 2013) ou son blocage par silencing (Lee et al. 2013a) a supprimé la capacité de CSCs à former des sphères après plusieurs des passages *in vitro*.

De plus, le rôle de CXCL12 dans l'autorenouvellement de CSCs a également été confirmé par la perturbation de la signalisation de CXCR4 qui réduit l'expression des gènes

associés à l'activité d'autorenouvellement (Oct4 et Nanog) (Lee et al. 2013a). De même, l'inhibition de ACKR3 par CCX771 affecte puissamment l'autorenouvellement du CSC (Walters et al. 2014). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le maintien de l'aspect souche de la sous-population CSC représente une fonction pertinente liée à l'activité CXCL12.

2.6.4.2 Angiogenèse

Il a été démontré que les CSCs contribuent à la formation de microvascularisation en se différenciant en cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*, et que les xénogreffes de souris GBM contiennent des cellules endothéliales d'origine humaine (Ricci-Vitiani et al. 2010 ; Wang et al. 2010b ; Soda et al. 2011). Des études plus récentes ont montré que des péricytes vasculaires localisés près des cellules endothéliales ont été suggérés comme les cellules dérivées de tumeurs réelles dans les néovaisseaux et, par le traçage de la lignée *in vivo*, les CSGs ont été proposés comme étant la source de péricytes plutôt que de cellules endothéliales (Cheng et al. 2013). L'axe CXCL12/CXCR4, au moins en partie, contribue à la formation de péricytes GBM induisant une migration des CSCs exprimant CXCR4 vers la niche périvasculaire, où les cellules endothéliales sécrètent CXCL12 et TGF-β entraîne la différenciation en péricytes matures (Cheng et al. 2013). De plus, CXCL12 stimule la sécrétion de VEGF dans les CSCs $CD133^+$ exprimant CXCR4 à partir d'échantillons chirurgicaux de GBM et de lignées cellulaires humaines, favorisant l'angiogenèse tumorale via la signalisation PI3K/AKT (Ping et al. 2011). Des résultats différents ont été rapportés en utilisant des cellules souches de GBM murines, dans lesquelles une différenciation de type endothélial était associée à l'expression de CXCL12 mais le blocage de CXCL12/CXCR4 n'affectait ni la formation de tubes *in vitro* ni l'angiogenèse *in vivo*. Ainsi, l'autocrine/paracrine de CXCL12 régule la prolifération des cellules souches murines de GBM mais probablement pas l'angiogenèse (Uemae et al. 2014).

2.6.4.3 Migration

Des études *in vitro*, ont montré que la chimiokine CXCL12 a stimulé la migration des CSCs d'une manière dépendante de la dose et la co-administration d'AMD3100 a inhibé les réponses chimiotactiques maximales. À l'inverse, le même traitement a entraîné des effets mineurs sur les lignées cellulaires de gliomes et uniquement en présence de concentrations extrêmement élevées d'AMD3100 a provoqué une inhibition statistiquement significative de la migration (Schulte et al. 2011). Cependant, dans des expériences de migration cellulaire *in vitro*, les cultures individuelles de CSCs ont montré des réponses hétérogènes à CXCL12. En particulier, CXCL12 a induit une migration cellulaire sensible à AMD3100 uniquement dans un sous-ensemble de cultures CSCs testées (Liu et al. 2013b).

2.7 Les antagonistes de CXCR4, CXCL12 et ACKR3

2.7.1 Antagoniste de CXCR4

La découverte de CXCR4 en tant que corécepteur du VIH tropique des cellules T a conduit au développement initial d'antagonistes CXCR4 tels que T140 (Masuda et al. 1992), AMD3100 (De Clercq et al. 1992) et ALX- 4C (Doranz et al. 1997). Par la suite, l'identification de fonctions non liées au VIH a stimulé de nouvelles applications des inhibiteurs de CXCR4 telles que la mobilisation des cellules souches, l'inflammation et les traitements contre le cancer.

Les antagonistes de CXCR4 peuvent être classés en: i) antagonistes non peptidiques (AMD3100, AMD11070, MSX-122, GSK812397); ii) peptides modifiés (T140 et ses analogues, BKT140, POL6326, FC131); iii) des analogues de peptides CXCL12 (CTCE-9908 et CTCE-0214); ou iv) des anticorps ciblant CXCR4 (MDX-1338/BMS 93656, ALX-0651).

2.7.1.1 Antagonistes non peptidiques

Les cyclames sont les premiers antagonistes non peptidiques à avoir été développés pour cibler le récepteur CXCR4 et l'AMD3100 (Plerixafor) est à l'heure actuelle la seule molécule ciblant CXCR4 approuvée par la Food and Drug Administration (FDA). Initialement, développés pour traiter les patients atteints de VIH, le design de cyclames a débuté après l'identification de polyoxometallates présentant des propriétés anti-VIH (De Clercq 2003). Les cyclames sont des mimiques des polyoxometallates enrichis en azote qui ciblent essentiellement les résidus chargés négativement à la surface du récepteur CXCR4. Les propriétés pharmacodynamiques de 3 dérivés de cyclames, montrent que l'AMD11070 et l'AMD3465 présentent des affinités nettement supérieures à leur équivalent bicyclame AMD3100. La liaison de l'AMD3100 ou de ses dérivés à CXCR4 conduit à une inhibition de la relâche calcique induite par CXCL12 de manière spécifique.

Des essais cliniques chez des patients atteints de VIH traités avec l'AMD3100 se sont montrés largement concluants dans l'inhibition de la réplication du VIH-1. Cependant, l'utilisation de l'AMD3100 dans un contexte anti-VIH n'a pas abouti à cause de sa toxicité cardiaque mais il est utilisé comme mobilisateur de cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique pour leur collecte en vue d'une autogreffe chez les patients atteints de lymphome ou de myélome multiple (MM). De plus, le blocage de CXCR4 par l'AMD3100 diminue la croissance tumorale dans des modèles de GBM précliniques. Il a été montré que le dérivé AMD3465, inhibe la formation de tumeurs mammaires et réduit les métastases pulmonaires et hépatiques (Ling et al. 2013) agissant à la fois sur les cellules tumorales et immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral. L'efficacité antiangiogénique de l'AMD3100 a été signalée en 2013 par Ali et al. La molécule entraîne une réduction

marquée de la croissance tumorale et du caractère invasif chez les rats avec des greffes orthotopiques GBM xénotransplantés (Ali et al. 2013).

MSX-122, une petite molécule identifiée comme un antagoniste partiel CXCR4 « antagoniste biaisé » montre une activité anti-métastatique *in vivo* (Liang et al. 2012). Le MSX-122 inhibe également le développement du processus fibrotique chez la souris, après une lésion pulmonaire radio-induite (Shu et al. 2013).

2.7.1.2 Antagonistes peptidiques

Plusieurs autres antagonistes de CXCR4 ont été développés comme agents antirétroviraux contre l'infection du VIH de type 1 dont le peptide T140 et son analogue le TC14012 (Fujii et al. 2003 ; Murakami et al. 1997). Ces peptides cycliques comportent un pont disulfure reliant deux résidus cystéines entre eux et sont formés d'environ 14 acides aminés.

Parmi plusieurs antagonistes ciblant le récepteur CXCR4, le T140 a été observé pour avoir le plus haut degré d'activité anti-VIH et s'est revélé être l'antagoniste le plus puissant contre l'entrée du VIH de type 1 (Tamamura et al. 2001). Ainsi, son analogue TC14012 présente une forte activité antirétrovirale et une faible cytotoxicité (Tamamura et al. 2001).

Dans des études précliniques, l'antagoniste peptidique T140 et ses analogues TC14012, TZ14001 et TN14003, ont montré, la capacité de prévenir la croissance tumorale et les métastases dans des modèles animaux de carcinome du sein, de la tête et du cou (Liang et al. 2004 ; Yoon et al. 2007). Dans les cellules cancéreuses du poumon à petites cellules, le TN14003 perturbe les interactions CXCR4/CXCL12 et bloque l'adhésion cellulaire et la chimiorésistance.

Les antagonistes BKT140, TG-0054 et POL6326 sont actuellement en évaluation clinique en tant que mobilisateurs de cellules souches pour le myélome multiple (MM), les leucémies et les lymphomes. L'innocuité et l'efficacité du BKT140 pour la mobilisation des cellules $CD34^+$ humaines chez les patients atteints de MM ont été signalées (Peled et al. 2014).

2.7.1.3 Analogues de peptides CXCL12

Le CTCE-9908, un peptide modifié CXCL12, est le seul analogue antagoniste CXCR4 approuvé par la FDA pour les tumeurs solides, et spécifiquement pour le traitement du sarcome ostéogénique. Le CTCE-9908 inhibe la croissance des cellules tumorales du sein humain dans les xénogreffes de souris, altérant la boucle CXCR4-VEGF et abaissant les niveaux de VEGF tumoral (Hassan et al. 2011) et affecte la métastase du cancer du sein, de la prostate et de l'œsophage dans les modèles murins (Wong and Korz 2008 ; Richert et al. 2009).

2.7.1.4 Anticorps ciblant CXCR4

Des études précliniques et cliniques ont montré que le développement d'anticorps dirigés contre les récepteurs des chimiokines peut être une piste thérapeutique prometteuse. Les approches pharmacologiques utilisant des anticorps exploitent un double mécanisme: direct, par inhibition fonctionnelle sélective du récepteur cible et, indirectement, par potentialisation de la réponse immunitaire de l'hôte par le recrutement de monocytes/macrophages cytotoxiques (c.-à-d. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) ou en se liant aux facteurs du complément (c.-à-d. toxicité dépendante du complément).

La majorité des anticorps qui ont passé les essais cliniques ciblent les récepteurs de chimiokines plutôt que les ligands. Ce développement a été stimulé par l'identification de la structure cristalline des récepteurs, en particulier concernant le domaine extracellulaire N-terminal, la région la plus accessible pour la liaison des anticorps. L'anticorps monoclonal (AcMo), MDX-1338/BMS-93656, ciblant le récepteur CXCR4 entièrement humain, est capable d'empêcher la liaison de CXCL12, entraînant par conséquence une inhibition de l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et la chimiotaxie induite par CXCL12.

. L'anticorps « 30D8 », un anticorps humanisé contre CXCL12 inhibe la croissance tumorale et les métastases et améliore l'arthrite dans des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* (Zhong et al. 2013).

Une nouvelle classe de produits thérapeutiques dérivés d'anticorps, basée sur un fragment d'anticorps à chaîne lourde (VHH) à domaine unique, nommé nanobodies ou nanocorps, affiche une stabilité élevée, une faible toxicité et une capacité de liaison à l'antigène. Le premier nanocorps ciblant CXCR4 (Jahnichen et al. 2010), a montré une affinité 100 fois plus élevée que l'AMD3100. *In vitro*, les nanocorps CXCR4 inhibent complètement l'entrée des souches VIH-1 tropiques CXCR4 et dans les modèles animaux, l'injection intraveineuse mobilise les cellules souches, agissant de manière similaire à l'AMD3100 (Jahnichen et al. 2010). Actuellement, un nanocorps inhibiteur de CXCR4, ALX-0651, est en essai de phase I (https://clinicaltrials.gov: NCT01374503).

2.7.2 Antagonistes ACKR3

Comme pour le récepteur CXCR4, le récepteur ACKR3 représente une cible viable pour les médicaments anticancéreux et antimétastatiques. Le Dr. Schall et son équipe de recherche s'intéressent notamment à l'axe CXCL12/ACKR3 puisqu'il est impliqué dans plusieurs pathologies du cerveau telles que le glioblastome multiforme. Cette équipe a donc développé des petites molécules synthétiques inhibitrices ciblant spécifiquement le récepteur de chimiokine ACKR3 (Burns et al. 2006 ; Zabel et al. 2009). Ces molécules synthétiques sont fabriquées par la compagnie Chemocentryx. CCX771 et ses analogues tels que CCX754 et CCX733 ont été vite considérés comme des antagonistes du récepteur ACKR3

étant donné qu'ils inhibent la liaison de CXCL12 à ACKR3. Cependant, en 2009, deux équipes de recherche observent que le CCX771 est plutôt un agoniste sur ACKR3 puisqu'il stimule le recrutement de β-arrestine dans ACKR3 dans un modèle de leucémie lymphoblastique (Luker et al. 2009 ; Zabel et al. 2009). De plus, ces molécules ont été montrées pour leur efficacité à réduire la taille des tumeurs de multiples cancers comme par exemple le lymphome humain de type B (Burns et al. 2006 ; Zabel et al. 2009). Au niveau des astrocytes, il a été montré, que c'est plutôt ACKR3 et non CXCR4 qui est, à lui seul, responsable de la signalisation de CXCL12 et que la stimulation avec la molécule CCX754 a pour effet d'inhiber les effets de CXCL12 sur ACKR3 (Odemis et al. 2010).

Les antagonistes de ACKR3 devraient agir principalement en réduisant l'extravasation des cellules tumorales et donc les métastases, et en bloquant l'angiogenèse tumorale, comme le démontre le ligand synthétique CCX771, qui est nettement plus puissant pour inhiber la migration transendothéliale que l'AMD3100.

De plus, l'exposition des cellules cancéreuses $(CXCR4/ACKR3)^+$ à CXCL12 améliore considérablement la migration des cellules de lymphome de Burkitt humain à travers une monocouche de cellules endothéliales HUVEC humaines comme modèle *in vitro* de migration transendothéliale (Zabel et al. 2011) suggérant l'efficacité potentielle des antagonistes ACKR3 dans le blocage de la propagation métastatique médiée par CXCL12 de cellules tumorales $(CXCR4/ACKR3)^+$, *in vivo*.

La molécule CCX662 a été développée pour le traitement du cancer du cerveau chez l'humain. Notamment, Walter et al. ont montré que cette molécule nouvellement développée pour cibler ACKR3 a pour effet de diminuer la taille des tumeurs et d'empêcher le caractère récurrent de la tumeur associée au GBM suite à la radiothérapie, et cela en interférant avec les cellules souches cancéreuses (Walters et al. 2014).

Il a été rapporté que l'AMD3100 et le peptidomimétique TC14012, antagonistes de CXCR4, agiraient également comme agonistes partiels du ACKR3 (Kalatskaya et al. 2009 ; Gravel et al. 2010).

2.7.3 Inhibiteurs CXCL12

Des molécules capables de cibler et de bloquer le ligand CXCL12 lui-même, ont été proposées. Elles pourraient représenter une approche pharmacologique améliorée par rapport aux antagonistes des récépteurs qui manquent parfois de spécificité ou présentent des activités d'agonistes partiels.

2.7.3.1 NOX-A12

NOX-A12, est un oligoribonucléotide, capable de se lier avec une haute affinité à la chimiokine CXCL12 et de la neutraliser (Liang et al. 2007). La molécule est développée par Noxxon Pharma, société de biotechnologie développant principalement des traitements

contre le cancer en ciblant le microenvironnement tumoral. NOX-A12 est conçu pour combattre les tumeurs solides en modulant le microenvironnement tumoral de deux manières distinctes : 1) Rompre la protection tumorale en permettant aux cellules immunitaires actives, telles que les lymphocytes T, de pénétrer dans la tumeur dans le but de libérer tout le potentiel des approches immuno-oncologiques avec des molécules telles que les inhibiteurs de point de contrôle immunitaires (Fearon 2014) ; 2) Inhiber la réparation tumorale en empêchant l'attraction des « cellules de réparation » vers les tumeurs, inhibant ainsi la reprise de la croissance tumorale suite à une radiothérapie.

Un essai clinique avec NOX-A12 dans la leucémie et la MM, montre une activité antinéoplasique et une mobilisation des cellules souches à partir de la moelle osseuse. De plus, NOX-A12 a montré une grande efficacité pour mobiliser les cellules CLL (chronic lymphoid leukemia) et empêcher leur recirculation dans les organes lymphatiques protecteurs. L'abrogation de la signalisation CXCL12/CXCR4 en combinaison avec la chimiothérapie peut fournir une approche intéressante pour le traitement de la CLL. Il convient de noter aussi, que le NOX-A12 s'est révélé efficace pour inhiber ou retarder les récidives après irradiation dans un modèle de GBM *in vivo* (Liu et al. 2014).

NOXXON a récemment publié (2019), des résultats cliniques chez des patients atteints d'un cancer colorectal ou pancréatique métastatique stable aux microsatellites, avec un système immunitaire altéré et une charge tumorale élevée, traités par « NOX-A12 » en association avec l'inhibiteur de point de contrôle PD-1 pembrolizumab. Ce traitement a montré une induction de la réponse immunitaire, une maladie stable chez 25 % des patients, et un temps de traitement prolongé par rapport au traitement antérieur pour 35 % des patients. La survie médiane sans progression était de 1,87 mois, la survie globale était de 48 % à 6 mois et de 33 % à 12 mois. Cette étude souligne également le rôle de CXCL12 dans la résistance à l'immunothérapie. CXCL12 est abondamment présent dans les lésions tumorales. Le degré de neutralisation de CXCL12 dans le tissu tumoral est en corrélation avec une réponse immunitaire Th1 et une stabilisation de la maladie. NOXXON a lancé une autre étude du NOX-A12 en association avec la radiothérapie dans le cancer du cerveau (glioblastome/gliome). NOX-A12 a reçu le statut de médicament orphelin pour le traitement du glioblastome aux États-Unis et du gliome en Europe.

2.7.3.2 Les chalcones

Les chalcones sont des subtances naturelles issues de plantes. Certains chalcones ont été isolés d'*Angelica keiskei* KOIDZUMI (nom commun japonais "Ashitaba"), une plante herbacée vivace rustique qui pousse principalement le long de la côte pacifique du Japon et a été utilisée traditionnellement au Japon comme diurétique, laxatif, analeptique et galactagogue. Il a été montré que les chalcones isolés d'*Angelica Keiskei* inhibent la vasoconstriction induite par la phényléphrine *in vivo* (Matsuura et al. 2001) et régulent l'activation du facteur nucléaire (NF-kB) (Sugii et al. 2005). De plus, certaines chalcones

isolées auraient une activité anti-tumorale et anti-métastatique (Kimura et al. 2004 ; Kimura and Baba 2003). Les effets anti-métastatiques ont été montrés dans le carcinome de Lewis du poumon chez la souris (Kimura 2005) et dans le cancer de la prostate. Certaines équipes ont montré un effet potentiel antiparasitaire de chalcones contre la malaria (Li et al. 1995), et antiinfectieux contre la tuberculose (Lin et al. 2002). Finalement, d'autres équipes ont signalé l'intérêt des chalcones dans l'inhibition de l'inflammation notamment dans l'asthme allergique (Anuradha et al. 2006 ; Hachet-Haas et al. 2008), ils ont montré que les chalcones sont capables de se lier à CXCL12 avec une haute affinité pour empêcher sa liaison aux récepteurs, induire ensuite l'inhibition des réponses inflammatoires des éosinophiles (Hachet-Haas et al. 2008).

Quatre-vingt molécules inhibant l'interaction CXCR4-CXCL12 ont été identifiées après un screening de 3200 molécules de la chimiothèque du laboratoire de chimie de l'Université de Strasbourg (Hachet-Haas et al. 2008). Ces molécules sont capables, d'inhiber de 30 % la liaison de CXCR4 avec CXCL12 à une concentration de 10 µM. Parmi ces molécules, 7 sont actives à une concentration de 1 µM et sont considérés comme des inhibiteurs potentiels de liaison de CXCL12.

La chalone 4 est la molécule la plus intéressante. Cette molécule inhibe la liaison de CXCL12 à ses récepteurs CXCR4 et ACKR3 avec une forte affinité et bloque les réponses cellulaires (élévation de Ca^{2+}, baisse d'AMPc) et le chimiotactisme des cellules exprimant CXCR4. La chalcone 4 neutralise la chimiokine par interaction directe avec celle-ci et l'empêche d'interagir avec ses récepteurs cibles.

Etant donné que cette molécule agit sur le ligand CXCL12 et non pas sur les récepteurs CXCR4 et ACKR3, son mécanisme d'action présente donc une analogie à celui des anticorps neutralisants, d'où le terme «neutraligand » utilisé pour décrire l'activité de la molécule. Ce neutraligand présente un fort potentiel car il neutralise la liaison de CXCL12 à CXCR4 et ACKR3, et n'affecte pas la capacité d'activation des récepteurs, ni leurs signalisations intracellulaires en réponse à leurs autres ligands (ubiquitine et CXCL11 respectivement). Ainsi, l'utilisation d'un neutraligand de CXCL12 dans le traitement des cancers pourrait présenter une alternative intéressante aux autres antagonistes compétitifs tels que l'AMD3100, l'ALX40-4C et le T22/T140 et présenter moins d'effets secondaires.

Il existe également des analogues de la molécule chalcone 4 tels que la SRN927 qui présente une activité neutraligand similaire à la chalcone 4.

Objectifs de la thèse

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale maligne la plus courante et la plus agressive chez l'adulte. Il est très hétérogène et présente une vascularisation étendue. Les options de traitement au moment du diagnostic sont multimodales et comprennent la résection chirurgicale, la radiothérapie fractionnée et la chimiothérapie au témozolomide. Cependant, ces tumeurs sont très infiltrantes, menant quasi inévitablement à une rechute après résection et radiothérapie d'un volume cérébral restreint. L'identification au sein de la masse tumorale du GBM de cellules souches cancéreuses (CSCs) pluripotentes, autoréplicatives et présentant des propriétés tumorogènes est probablement la cause de cette récurrence tumorale. En outre, le microenvironnement tumoral complexe et dynamique du GBM contribue à la croissance, la prolifération et l'invasion de la tumeur. Parmi les nombreux facteurs potentiellement impliqués dans la croissance et l'invasion tumoral, les chimiokines et leurs récepteurs et notamment CXCL12 et CXCR4, le duo le plus étudié, jouent un rôle crucial. L'objectif de notre étude est de mieux comprendre le rôle de l'axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans la physiopathologie des cellules initiatrices de glioblastome (CI-GBM). Nous avons plus précisément essayer de mettre en évidence le rôle de la chimiokine CXCL12 produite de manière endogène dans l'autorenouvellement et la survie de CI-GBM en utilisant une approche pharmacologique avec des molécules à activité neutraligand de CXCL12 d'un part et les outils d'interruption génique d'autre part. Les molécules à activité neutraligand se fixent sur la chimiokine et inhibent son interaction avec ses récepteurs.

Matériels et Méthodes

I. Caractéristiques des cellules utilisées dans notre étude

Les CI-GBM TG1 ont été isolées des tumeurs glioneuronales malignes (TGNM) correspondant aux gliomes de grade III et IV selon la classification de l'OMS, par l'équipe du Dr Hervé Chneiweiss (INSERM U894, Paris) (Patru et al. 2010). Brièvement, des fractions de tissu tumoral prélevées sur des patients ont été dissociées et les cellules cultivées dans un milieu sans sérum en présence des facteurs de croissance EGF et FGF2. Dans ces conditions des sphères apparaissent entre 15 et 60 jours. Ces sphères ont été dissociées, les cellules amplifiées et caractérisées pour leurs propriétés de cellules initiatrices de tumeurs (CI-GBM). Les cellules TG1_C1 (initialement dénommée OB1) correspondent à un clone dérivé des cellules TG1. Elles ont les signatures génétiques de ces dernières, mais présentent cependant des caractéristiques légèrement différentes comme l'expression de la protéine du cycle cellulaire p21 dans les cellules en quiescence (Zeniou et al. 2015), leur plus grande sensibilité au bisacodyl (une molécule précédemment étudiée au laboratoire ; Thèse Marie Fève, 2012, Université Strasbourg). Les cellules CI-GBM TG1 et TG1_C1 expriment des marqueurs de cellules souches, sont capables de se différencier en cellules exprimant les marqueurs neuronaux ou de cellules gliales et d'initier des tumeurs lors d'injections intra-cérébrales à des souris immuno-déprimées (200 à 1000 cellules greffées dans le cerveau de souris NOD/SCID sont capables de générer une tumeur). Elles expriment les caractéristiques des cellules de GBM de type mésenchymateux et sont résistantes au témozolomide, médicament de référence dans le traitement des glioblastomes (60 % de survie cellulaire à 1000 µM de témozolomide *in vitro*, la molécule étant utilisée à une concentration de 60 µM dans les thérapies) (Patru et al. 2010 ; Thirant et al. 2011 ; Zeniou et al. 2015 ; Dong et al. 2017).

La caractérisation génétique de cellules TG1 a été effectuée en réalisant un caryotype en Multi-FISH (multiple fluorescence *in situ* hybridization) par Patru et al. 2010. Les résultats ont montré un profil féminin avec une haplotriploïdie avec des gains des chromosomes 1q, 5, 7, 9q, 12 et 14 et des pertes des chromosomes 9p et 18q. Une analyse complémentaire a été effectuée au laboratoire par Marie Féve (Thèse Université de Strasbourg, Juin 2012) pour étudier la variation génomique des TG1 au cours des passages en culture en utilisant la technique de puce Affymetrix Genome Wide SNP_6. Ces études ont montré des variations génétiques au cours des passages. Par exemple, une augmentation du nombre de copies des chromosomes 5, 9q et 19 peut être observée, et les chromosomes 2 et 3p et une partie du 3q qui étaient initialement amplifiés, reviennent à un nombre normal (deux copies) au cours de la culture de ces cellules. Le profil protéomique des cellules TG1 ne semble pas varier en

culture entre la semaine 40 et 160. Pour pallier l'instabilité génétique et éviter les conséquences sur la reproductibilté des résultats nous avons choisi de réaliser nos tests sur des cellules à des passages récents qui ne dépassent pas 20.

Les cellules CI-GBM TG1 et TG1_C1 (expriment au niveau des ARNm et des protéines) des marqueurs de cellules souches et de cellules neurales à la fois (tableau 7).

Données	Patru et al. 2010	Galan-Moya et al. 2011	Silvestre et al. 2011	Zeniou et al. 2015
Marqueurs	**Protéique :** Nestine +, GFAP +, Olig2 +, NCAM +, CXCR4 +, CD90 +, VLA2 +, CD15, CD34 + CD31 -, VE-cdh -, CD45 -, CD3 -, CD11b -, CD14 -, CD19 -, CD33 -, CD36 -, CD38 -, c-kit -, Flt3 -, CD44 -, CD93 -, CD133 + ↘	**Protéique :** Sox2, Nestin, PTEN	**Protéique :** Telomérase +	
	ARNm : POU5F1, Nanog +++ TERT ++ CD133 +			**ARNm :** GBX2, Nanog, TERT + PAX6, SOX2, GFAP + SEMA3A + NES, OLIG2 +++ PODXL ++++

Tableau 7. Caractéristiques moléculaires des cellules TG1.
Les marqueurs protéiques et ARNm exprimés au niveau des cellules TG1. Abréviations : GFAP : glial fibrillary acid protein ; Olig2 : facteur de transcription de type 2 des oligodendrocytes ; NCAM : molécule d'adhésion des cellules neurales ; CXCR4 : récepteur à motif C-X-C de type 4 ; CDxx : « cluster » de différenciation xx ; VLA2 : very late activation 2 ; VE-cdh : cadhérine de l'endothélium vasculaire ; Flt3 : tyrosine kinase 3 semblable à FMS ; TERT : télomérase ; Sox2 : (sex determining region Y)-box 2 ; PTEN : phosphase-tensine homologue ; GBX2 : protéine homéobox 2 spécifique de la gastrulation et du cerveau ; PAX6 : paired box gene 6 ; SEMA3A : sémaphorine classe3A ; NES : nestine ; PODXL : podocaxyline-like.

D'autres cellules souches cancéreuses de glioblastome (BTIC 53, BTIC 25M, U3021) ont été également utilisées dans notre projet.

Les cellules BTSCs (brain tumor stem cells) ou BTICs (brain tumor initiating cells) ont été isolées de tumeurs de GBM de patients adultes (âgés de > 16 ans) au cours de leur procédure opératoire. Ces cellules ont été évaluées dans le service de neuropathologie au Foothills Medical Center, Université de Calgary/région sanitaire de Calgary, conformément aux directives de l'Organisation mondiale de la santé (Louis et al. 2007). Pour la culture cellulaire, les cellules BTICs, comme d'autres cellules souches cancéreuses, se développent dans un milieu de culture sans sérum avec ou sans les facteurs de croissance EGF et FGF, et forment des neurosphères (figure 16). Les sphères tumorales ont été caractérisées pour leurs capacités à se différencier pendant 7 jours dans du milieu SFM (serum-free culture

medium) avec 1 % de sérum bovin fœtal. Les cellules BTICs GBM sont capables de générer de tumeurs intracrâniennes chez les souris NOD-SCID.

Les U3021 ont été isolées à l'université d'Uppsala, Suède et appartenant au sous type neural/proneural dans la classification des GBM de (Verhaak et al. 2010 ; Xie et al. 2015). Dans le milieu NS34 (sans sérum mais avec les facteurs de croissance EGF et FGF), ces cellules ne forment pas des sphères, mais émettent les prolongements cellulaires (figure 16).

II. Culture des CI-GBM

Les CI-GBM sont cultivées dans un milieu de culture défini NS34 (annexe IV, protocole n° 2, tableau 14) , en absence de sérum et en présence de facteurs de croissance cellulaires (bFGF et EGF). Les protocoles expérimentaux pour la culture des cellules, leur comptage, leur congélation, décongélation sont donnés en annexe IV, protocole n°1, 3, 4.

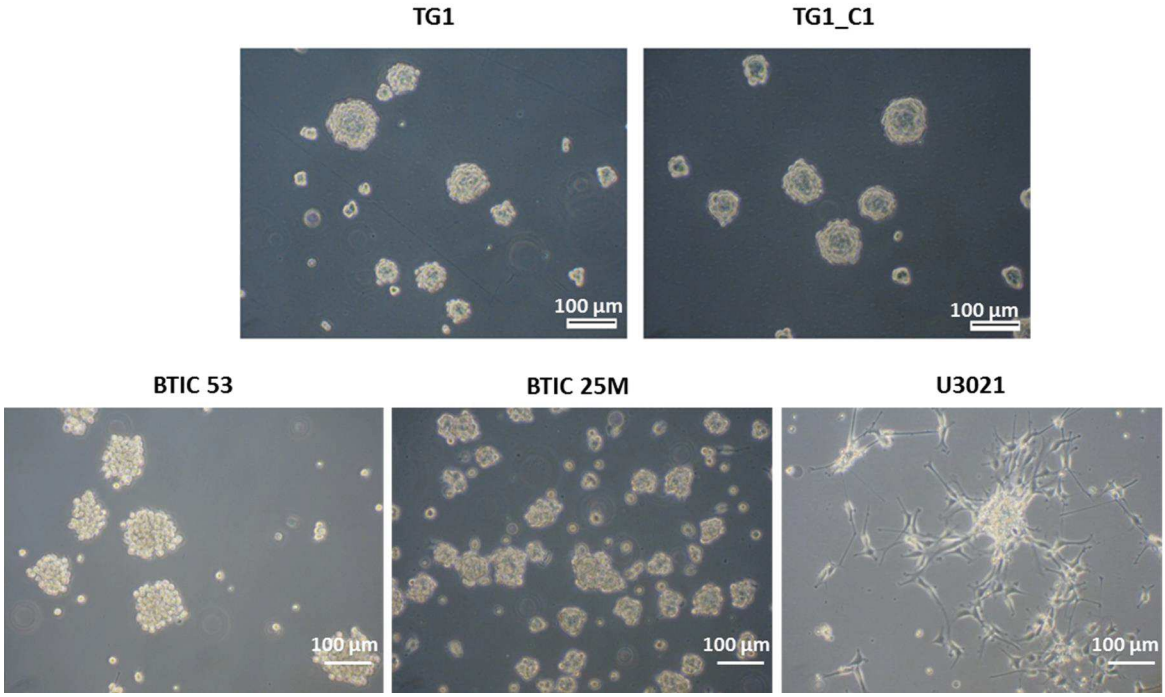


Figure 16. Cellules de CI-GBM en culture.
Les cellules TG1, TG1_C1, BTIC 53, BTIC 25M, U3021 utilisées dans l'étude ont été cultivées dans du milieu sans sérum en présence de facteurs de croissance EGF et FGF selon les protocoles 1 et 2 décrit en annexe IV.

Lorsque les sphères sont maintenues en culture durant 6 à 8 semaines, elles forment des tumorosphères qui atteignent une taille de plusieurs centaines de microns et qui présentent les caractéristiques retrouvées dans les tumeurs de GBM *in vivo* (cœur

nécrotique, hypoxique et acide avec des cellules présentant un phénotype prolifératif à la périphérie) (Dong et al. 2017).

III. Test de clonalité

La clonalité est la capacité d'une cellule souche isolée à reformer une sphère après mise en culture *in vitro*. Les cellules TG1 et TG1_C1 en culture dans du milieu NS34, sans sérum et en présence d'EGF et de FGF2 sont dissociées, puis comptées comme indiqué dans le protocole n°1, annexe IV avec le bleu de trypan. Les cellules sont ensuite ensemencées à une densité 1 cellule/puits dans 200 µL de milieu NS34 frais dans une plaque à 96 puits (655090 Greiner). Chaque semaine, 50 µL de milieu NS34 frais est ajouté dans chaque puits. Après 3 semaines de culture à 37 °C, la formation des sphères dans chaque puits est déterminée afin d'évaluer le développement des tumorosphères clonales. Ce test peut être utilisé pour tester l'effet de composés chimiques sur l'aptitude des cellules à reformer des sphères. Les molécules à tester sont alors ajoutées à des concentrations données lors de l'ensemencement des cellules à 1 cellule/puits.

IV. Extraction, purification et quantification de l'ARN total

L'extraction des ARN totaux a été réalisé en utilisant le TRI – Reagent (réf. TR-118-200 Euromedex) contenant du phénol et du thiocyanate de guanidine et en suivant le protocole décrit par le fournisseur. L'ARN est extrait des cellules, isolé, puis précipité avec de l'isopropanol. Le culot d'ARN séché est repris dans de l'eau traité au DEPC (réf. AM9920 Ambion®). Le protocole d'extraction des ARN totaux est donné dans le protocole n° 5, annexe IV.

Pour l'amélioration de la qualité des ARN, une étape de purification a été effectuée avec le kit QIAGEN (RNeasy® Mini Kit, Cat : 74104) en respectant les instructions données par le fabriquant.

La quantification et le contrôle de la qualité des ARN sont effectués par l'appareil NanoDrop ND-1000 (Labtech™). La pureté des ARN est déterminée par le ratio d'absorbance 260/280 (qui doit être très proche de 2,0) et par le ratio d'absorbance 260/230 (qui doit être dans la gamme de 1,8 - 2,2).

V. Rétrotranscription et PCR Quantitative (RT-qPCR)

1 Rétrotranscription

La transcription inverse des ARN en ADN complémentaires (ADNc) a été effectué à l'aide du protocole « High capacity cDNA Archive Kit® » d'Applied Biosystems™. 1 µg d'ARN purifié est dilué dans de l'eau traitée au DEPC pour un volume final de 10 µL, auxquels sont ajoutés 10 µL du mélange des réactifs (tableau 8) comme indiqué par le fabriquant. Le mélange réactionnel (20 µL) est ensuite déposé dans le thermocycleur avec le programme 10 minutes à 25 °C, puis 2 h à 37 °C. Les ADNc obtenus sont ensuite conservés à -20 °C.

Réactifs	Volume en µL
10x RT BUFFER	2
25x dNTP mix (100 mM)	0,8
10x RT Random primers	2
Multiscribe R transcriptase	1
Rnase Inhibitor	1
DEPCC-Treated H2O	3,2
Total par réaction	10

Tableau 8. Mélange des réactifs du kit « High capacity cDNA Archive Kit® » d'Applied Biosystems™.

2 PCR quantitative

Les PCR quantitatives ont été réalisées en utilisant des essais TaqMan®. Chaque essai TaqMan® contient les amorces et une sonde spécifiques du gène à amplifier. Ces sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur FAM (reporter), et à leur extrémité 3' par un désactivateur de fluorescence non fluorescent NFQ (Non fluorescent Quencher) qui inhibe l'émission de fluorescence du reporter FAM lorsqu'ils sont à proximité.

Dans une plaque 96 puits de PCR « MicroAmp® Optical 96-Well Reaction » (Applied Biosystems™), 15 µL du mélange réactionnel (tableau 9) ont été déposés dans un puits avec 5 µL d'ADNc (soit 50 ng d'ADNc) pour réaliser une réaction de PCR quantitative (les ADNc utilisés étant obtenus lors de la réaction de rétrotranscription, nous considérons que 1 µg

d'ARN donne 1µg d'ADNc). La plaque est ensuite scellée avec un film adhésif « Optical Adhesive Covers » (Applied Biosystems™) avant d'être placée dans le thermocycleur ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems™).

Le programme de PCR utilisé dans le thermocycleur consiste en une incubation de 10 minutes à 95 °C pour l'activation de l'ADN polymérase et la dénaturation de l'ADNc, puis 40 cycles de 15 secondes à 95 °C et 1 minute à 60 °C. A la fin de chaque amplification, la fluorescence de chaque puits de réaction est mesurée par le thermocycleur. Le cycle seuil Ct est déterminé pour chaque expérience.

Mélange réactionnel	1 essai (µL)
Master mix 2X (Applied Biosystem™)	10
TaqMan® Pre-developed assay reagent (Applied Biosystem™)	1
DEPC-Treated H2O	4
Volume réactionnel	15

Tableau 9. Mélange de réactifs déposé par puits pour une réaction de PCR quantitative.

VI. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN génomique à partir des cellules souches (5 x 10^6 cellules maximum) a été effectuée à l'aide du kit DNeasy® Blood &Tissue (cat : 69504 (QIAGEN), en respectant les étapes du protocole fourni par le fabriquant. Le contrôle de la qualité de l'ADN ainsi que la mesure de sa concentration sont effectués à l'aide du NanoDrop ND-1000 (Labtech™). Les rapports A260/A280 et A260/A230 sont mesurés.

VII. Détection de CXCL12 par ELISA

La présence de la chimiokine CXCL12 dans le surnageant de culture des cellules CI-GBM est mesurée par ELISA. Le surnageant de CI-GBM est prélevé à différents temps de culture des cellules dans le milieu NS34 à 37 °C, 5 % de CO_2 et 95 % d'humidité. La chimiokine CXCL12 est détectée en utilisant le kit DuoSet Elisa Development System (Mouse CXCL12/SDF1), réf. DY460, de R&D systems. Dans une plaque 96 puits (réf. Plaques NUNC Maxisorp 442404 de Themo Scientific), l'anticorps primaire (anticorps de capture) est déposé et incubé toute la nuit à température ambiante (TA), la plaque est couverte par un film transparent (réf. Greiner 676001). Une aspiration de la solution de chaque puits et un lavage des puits sont effectués avant de bloquer la plaque par la solution PBS, BSA 1 %

pendant 1 h minimum à TA sous agitation (cette étape de lavage des puits est indispensable entre chaque étape du protocole). 100 µL des échantillons à tester sont ensuite ajoutés dans les puits. Après 2 h à TA, l'anticorps secondaire marqué à la biotine (anticorps de détection) est ajouté dans les puits et la plaque est laissée sous agitation durant 2 h à TA. La streptavidine conjuguée à l'HPR (horse radish peroxydase) est ensuite ajoutée. Enfin une solution contenant le substrat (tétraméthylbenzidine/H_2O_2) est ajoutée et laissée pendant 20 minutes à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution stop constiuée de 2N H_2SO_4. Une mesure de l'absorbance à 450 nm est effectuée à l'aide de l'appareil ENVISION.

VIII. Test de la viabilité cellulaire

L'effet des molécules sur la prolifération et la survie des CI-GBM a été déterminé par la mesure du taux d'ATP cellulaire (CellTiter-Glo ATP luminescent assay, réf. G7570, Promega), que l'on relie au nombre de cellules métaboliquement actives. Le principe de ce test est basé sur la réaction indiquée dans la figure 17.

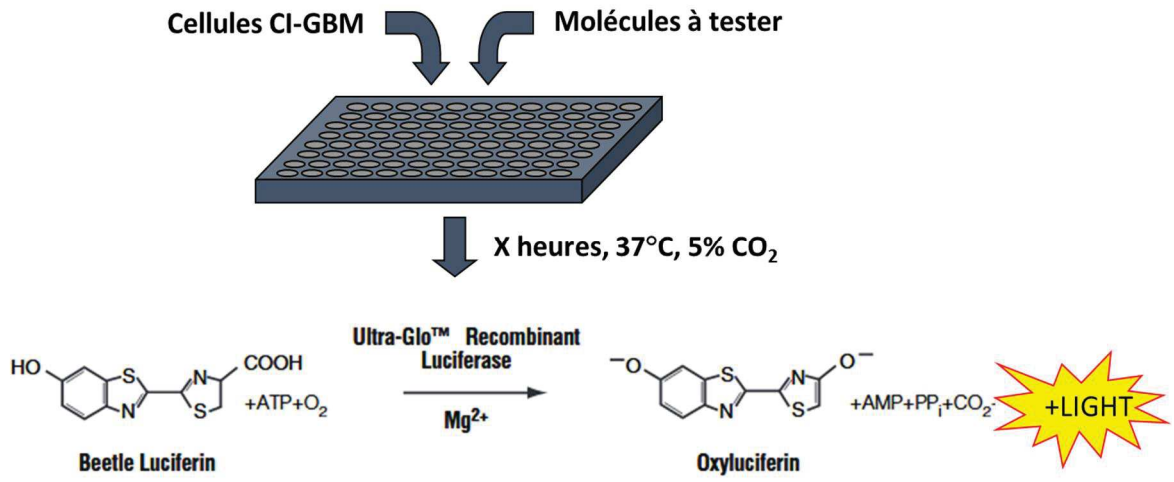


Figure 17. Test de viabilité cellulaire basé sur la mesure de l'ATP à l'aide du CellTiter-Glo de Promega.

Les cellules CI-GBM sont ensemencées à différentes concentrations dans des plaques Greiner 96 puits (réf. 655090) noires à fond transparent, puis les molécules à tester ont été rajoutées à différentes concentrations en présence de DMSO (concentration finale 0,1 %). Les cellules sont incubées (3 à 9 jours) à 37 °C, à 5 % de CO_2 et 95 % d'humidité. Le milieu de culture NS34 est renouvelé tous les 3 jours. A la fin du temps d'incubation choisi, l'ATP contenu dans les puits est mesuré en utilisant le système CellTiter-Glo de Promega qui contient la luciférine (Beetle Luciferin), une solution contenant l'enzyme (Ultra-GloTM Recombinant luciferase), du magnésium et du détergeant qui va lyser les cellules induisant la libération de l'ATP qui va être utilisé dans la réaction. La réaction enzymatique produit l'oxyluciferine, de l'AMP, du pyrophosphate (PPi), du CO_2 et de la lumière. Cette lumière émise lors de la réaction, proportionnelle à la quantité d'ATP, est mesurée par le lecteur de plaque Envision.

IX. Interruption du gène *CXCL12*

L'interruption du gène *CXCL12* sur les deux allèles pour réaliser un knockout complet (KO-CXCL12) est effectuée en utilisant la technologie CRISPR/Cas9. Deux technologies ont été testées.

1 Système CRISPR/Cas9 commercial de la société Santa Cruz

Le principe de ce système repose sur l'utilisation de deux plasmides : 1) le plasmide CRISPR/Cas9 knockout (KO), ref. SDF-1 CRISPR/Cas9 KO Plasmid (h), sc-400268 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, codant les ARN guides (gRNA) et l'endonuclése Cas9 , ainsi que la GFP; 2) le plasmide Homology Directed Repair (HDR), ref. SDF-1 HDR Plasmid (h), sc-400268-HDR SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY codant la protéine fluorescente rouge (RFP) et le gène de résistance à la puromycine flanqués des bras d'homologie permettant un processus de recombinaison homologue après coupure du gène cible. L'utilisation du premier plasmide seul permet d'envisager un KO du gène suite à un mécanisme de réparation NHEJ (non homologous end joining). En utilisant les deux plasmides, il est possible de sélectionner les cellules présentant un KO induit par coupure de l'ADN suivie d'une réparation par recombinaison homologue (HDR, *ie* homology driven repair). Ces cellules présentent une fluorecence rouge et une résistance à la puromycine.

La transfection des CI-GBM est effectuée par le système de transfection 4D Nucleofector de LONZA. Les cellules sont transfectées soit avec les deux plasmides de la Société Santa Cruz (CRISPR/Cas9 et HDR), soit avec plasmide contrôle GFP de LONZA, soit avec une solution sans plasmide. Pour chaque condition, 250K de cellules CI-GBM en prolifération sont utilisées. Dans notre cas nous avons 3 conditions, donc 750K de cellules en culture sont prélevées, centrifugées 5 minutes à 1100 rpm, remises en suspension dans 1 mL de milieu de culture et bien dissociées mécaniquement. Après une deuxième centrifugation le culot cellulaire est récupéré dans 60 µL de la solution de nucléofection composée de 82 % de la solution P3 Primary Cell 4D-Nucleofectort™ et 18 % de supplément (kit 4D-Nucleofector™ X de LONZA, réf. V4XP-3032). 20 µL de cellules dans la solution de nucleofection P3 sont déposés dans un puits d'une barrette 16 puits fournie avec le kit (16-well Nucleocuvette™ strip). Pour une transfection avec un plus grand nombre de cellules (entre 1 à 3,5 x 10^6 cellules), 100 µL de la solution P3 sont déposés dans une nucleocuvette « single Nucleocuvette™ vessels »).

Les plasmides sont ensuite ajoutés dans les puits de la barrette selon la condition choisie : 2 µg de plasmide CRISPR/Cas9 et 2 µg de plasmide HDR ; 1 µg de plasmide GFP LONZA (contrôle positif); puits contenant seulement 20 µL de cellules dans la solution de

nucleofection sans ajout de plasmide (contrôle négatif sans plasmide). La barrette est ensuite passée dans l'appareil de transfection 4D Nucleofector de LONZA.

Après transfection, les cellules CI-GBM sont récupérées avec 1,5 mL de milieu NS34 fraichement préparé, puis transférées dans une plaque Greiner 6 puits spéciale pour les cellules en suspension (réf. 657185). La plaque est mise dans un appareil Incucyte à 37 °C, 5 % de CO_2, afin de suivre les cellules GFP^+ vertes (gène *GFP* présent sur le vecteur CRISPR/Cas9) en prenant des photos toutes les 4h dans 16 zones de chaque puits. L'expression de la GFP à partir du plasmide CRISPR/Cas9 est transitoire et témoigne de la présence du plasmide dans la cellule et en principe de l'expression des ARNg et de l'enzyme Cas9. Après 3 jours de culture, la sélection des cellules est effectuée avec la puromycine à 3 µg/mL. Après la sélection, les cellules présentant une fluorescence rouge sont analysées pour la production d'ARNm codant la chimiokine CXCL12 ou la protéine elle-même par RT-QPCR ou ELISA, respectivement.

2 Système CRISPR/Cas9 non commercial

Le système CRISPR/Cas9 non commercial a été mis à disposition par l'équipe du Dr Bernardo Reina San Martin, IGBMC (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire), Illkirch. Il utilise une Cas9 High Fidelity permettant une réduction de l'effet "off target".

Le plasmide pX-851 utilisé code deux ARN guides (gRNA) ciblant une séquence du gène *CXCL12*, une Cas9 High Fidelity et la protéine GFP. L'interruption du gène choisi sera due au mécanisme de réparation NHEJ (Non-Homologous End Joining) de l'ADN faisant suite à la cassure double brin induite par l'endonucléase Cas9. La séquence des ARN guides est indiquée dans le tableau 10.

Cible	Région	séquence gRNA	PAM	Brin	OFF/ON score
hCXCL12	5' E1	GCTGACGGAGAGTGAAAGTG	CGG	-	63/73
hCXCL12	3' E1	TGCGCCGCCCGACACAGTGG	GGG	+	85/62

Tableau 10. Séquences des ARN guides ciblant le gène CXCL12.
L'ARNg ciblant le côté 5' de la coupure s'aligne sur le brin antisens (-) et celui ciblant le côté 3' s'aligne sur le brin sens (+). PAM : Protospacer adjacent motif. OFF/ON score : Off target score et On target score correspondent à des scores calculés pour chaque séquence de protospacer à partir des algorithmes de Doench et al. 2016 ; Hsu et al. 2013. Les scores prennent des valeurs comprises entre 1 et 100 et la séquence est d'autant meilleure que le score est élevé. Le "Off target score" est inversement proportionnel à la probabilité de l'endonucléase de se lier à des séquences hors cible. Le "On target score" correspond à l'efficacité de clivage de l'endonucléase.

La méthode de transfection est similaire à celle décrite dans le paragraphe précédent avec les plasmides commerciaux de la Société Santa Cruz, en utilisant selon les conditions 2 µg du plasmide Cas9 ou 1 µg de plasmide GFP LONZA pour le contrôle positif, et sans plasmide pour le contrôle négatif. Après transfection les cellules sont récupérées, déposées dans une plaque Greiner 6 puits et mises dans un appareil Incucyte permettant de suivre la croissance des cellules et la fluorescence verte des cellules transfectées. Après 48 heures de culture à 37 °C et 5 % de CO_2 dans l'incucyte, les cellules sont récupérées et un tri des cellules vertes est effectué par cytométrie en flux.

2.1 Tri des cellules transfectées

Le tri des cellules vertes transfectées par le plasmide pX-851 est effectué dans le service de cytométrie en flux à l'IGBMC (Illkirch).

48h après la transfection, les cellules de chaque puits sont récupérées dans un tube eppendorf de 2 mL et centrifugées 5 minutes à 4000 rpm (Minispin Eppendorf). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans du PBS contenant pénicilline/streptomycine à une concentration 10 U/mL (C_i Pen/Strep = 10000 U/mL) préalablement filtrée avec un filtre stérile 0,22 µm Merck Millipore. 1 mL de la solution PBS/antibiotiques sont utilisés pour 1 million de cellules.

Après une bonne dissociation du culot, les cellules sont filtrées à l'aide d'un filtre stérile 40 µm au-dessus d'un tube FACS stérile.

Dans un premier temps, le contrôle négatif (cellules transfectées sans plasmide) est passé au cytomètre pour sélectionner une population cellulaire en évitant les cellules mortes et les agrégats, puis une sous population contenant les cellules uniques (single cells). Dans un second temps, le contrôle positif (cellules transfectées avec le plamide codant la GFP) est analysé pour sélectionner la population cellulaire à fluorescence verte. Finalement chaque échantillon contenant les cellules transfectées par le plasmide pX-851 est analysé. Les cellules présentant une fluorescence verte sont recueillies individuellement dans des plaques à 96 puits (655090 Greiner), contenant dans chaque puits 100 mL du milieu NS34 fraichement préparé. Après le tri, 100 µL de milieu NS34 suppémentaire sont ajoutés à chaque puits.

Les plaques sont placées dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO_2 pendant 5 à 6 semaines. Le nombre de plaques obtenu à la fin de chaque tri est quatre ou plus, en fonction du pourcentage de transfection. Les différents clones obtenus seront caractérisés par PCR, ELISA et séquençage afin d'identifier les clones présentant une interruption génique sur les deux allèles du gène *CXCL12*.

2.2 Caractérisation des clones

2.2.1 Par PCR

Une PCR a été effectuée pour identifier l'interruption génique CXCL12 des clones transfectés avec le plasmide pX-85. Cette PCR permet de vérifier si l'interruption génique a eu lieu sur les deux allèles ciblés, ou sur un allèle, ou sur aucun allèle. L'ADN génomique cellulaire est extrait en utilisant le kit DNeasy® Blood &Tissue, cat : 69504 (QIAGEN), en respectant les étapes du protocole fourni par le fabriquant. Le contrôle de la qualité de l'ADN est effectué à l'aide du NanoDrop ND-1000 (Labtech™). Les rapports A260/A280 et A260/A230 sont mesurés. Des réactions de PCR ont été réalisées pour vérifier l'interruption génique du gène *CXCL12* en utilisant différentes combinaisons de couples d'amorces sens et antisens entourant les sites de coupure. Le mélange réactionnel pour la PCR ainsi que le programme des cycles utilisés sont indiqués dans le tableau 11.

a)

Component	Volume or final concentration
H_2O	qsp 50 µL
5x Phusion HF Buffer	10 µL
dNTPs (10 mM)	200 µM each
Primer Fwd	0.5 µM
Primer Rev	0.5 µM
Template DNA	50-250 ng per 50 µL reaction volume
DMSO, optional	3 %
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µL)	0.02 U/µL

b)

Cycle step	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	98 °C	30 s	1
Denaturation	98 °C	10 s	30
Annealing	60 à 70 °C	20 s	
Extension	72 °C	30 s	
Final Extension	72 °C	5 min	1
	4 °C	Hold	

Tableau 11. Conditions de PCR pour l'analyse des clones de CI-GBM après interruption des gènes CXCL12.
a) Mélange réactionnel utilisé pour la PCR. La concentration finale recommandée pour le primer est de 0,5 µM, mais elle peut être modifiée dans une gamme de 0,2 à 1,0 µM si nécessaire. Le DMSO est recommandé pour les amplicons riches en GC, mais non pour les amplicons avec un très faible pourcentage en GC ou les amplicons de taille > 20 Kb. b) Le programme de PCR appliqué correspond à celui pour l'ADN polymérase "Phusion Hot Start II High-Fidelity" de Thermo Fisher Scientific.

2.2.2 Par ELISA

Suivant le protocole cité dans le paragraphe : VII détection de CXCL12 par ELISA.

2.2.3 Par séquençage

Après la migration des produits PCR sur un gel d'agarose, les bandes d'ADN ont été découpées avec précision. L'extraction et la purification des fragments d'ADN des gels d'agarose ont été effectuées avec le kit NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel™ en respectant les étapes du protocole fourni par le fabriquant. Les séquençages des fragments d'ADN ont été effectués dans le service GATC de la société Eurofins Genomics.

X. Analyse de l'entrée des molécules chimiques dans les CI-GBMs

La pénétration intracellulaire des molécules chimiques a été mesurée par une méthode adaptée de celle décrite pour évaluer l'entrée de composés dans les bactéries ou dans *Chlamydomonas* (Richter et al. 2017). Les cellules CI-GBM (50 000 à 10^6 cellules) sont incubées avec la molécule à tester pendant 1 heure. La solution est ensuite déposée délicatement sur un coussin d'huile de silicone (200 µL) constitué de AR20 : AR200 dans une proportion 4 : 1.

Dans un tube eppendorf (1 mL), les cellules CI-GBM en prolifération sont incubées à une densité 1 million de cellules, avec les molécules à tester (chalcone 4 ou la chalcone 1 ou la LIT-927) à 50 µM, dans un volume final 200 µL du milieu NS34, pendant une heure à température ambiante. Après l'incubation, les cellules traitées sont déposées délicatement, goutte à goutte dans un tube Eppendorf contenant 160 µL d'huile de silicone AR20 (Sigma-Aldrich ref. 10836) et 40 µL d'huile de silicone oil AR200 (Sigma-Aldrich ref. 85419). Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 5000 rpm (minispin Eppendorf). Au cours de cette centrifugation, les cellules, en traversant les deux couches d'huile silicone, sont débarrassées des molécules adsorbées à leur surface et n'ayant pas pénétré dans le milieu intracellulaire. Le surnageant est éliminé. Un volume de 100 µL d'acétonitrile est ajouté au culot cellulaire. Les tubes sont agités à l'aide d'un vortex pendant 3 minutes, puis placés dans un bain à ultrasons pendant 1 minute. Les débris cellulaires sont sédimentés par

centrifugation (10000 g, 2 minutes à 22 °C) et les surnageants sont transférés dans des tubes pour être analysés par LC-MS/MS en utilisant une UHPLC couplée à un triple quadripôle Shimadzu LC-MS 8030. Pour chaque expérience, un tube contrôle sans cellules contenant uniquement la molécule à tester est inclus. Les molécules testées en solution à 1 µM dans un mélange acétonitrile/eau sont utilisées comme référence lors de l'analyse HPLC/LC-MS/MS. L'analyse LC-MS/MS a été effectuée sur la plate-forme TechMed^{ILL} à Illkirch par Patrick Gizzi et Sarah Benmalek.

Résultats

I. Etude de l'expression des ARNm des gènes *CXCL12, CXCR4* et *ACKR3* (*CXCR7*) dans les cellules CI-GBMs

Dans un premier temps, une analyse de la transcription des gènes *CXCL12*, *CXCR4* et *ACKR3 (ou CXCR7)* a été effectuée dans différents types de cellules CI_GBM, à savoir :

- les cellules TG1 et TG1_C1 (aussi dénommées OB1) isolées dans le laboratoire du Dr H. Chneiweiss, Université Pierre et Marie Curie, Paris (Patru et al. 2010 ; Zeniou et al. 2015 ; Dong et al. 2017). Comme les cellules TG1, les cellules TG1_C1 sont des cellules de type "mésenchymateux".
- les cellules BTIC 25M et BTIC 53 isolées à l'Université de Calgary, Canada dans le laboratoire du Dr S. Weiss (Cusulin et al. 2015). Ce sont également des cellules de type mésenchymateux. En culture dans du milieu NS34 sans sérum, les cellules BTIC 53 forment des neurosphères. Les cellules BTIC 53 ont, en culture, des caractéristiques proches de celles des TG1. Les cellules BTIC 25M forment des neurosphères de taille plus petite que les cellules TG1 (figure 16).
- les cellules U3021 isolées à l'université d'Uppsala, Suède. Ces cellules avaient été classées dans le type "neural" (Xie et al. 2015). En culture, dans le milieu NS34, la vitesse de croissance est plus lente que celles des cellules TG1. Elles n'ont pas tendance à former des sphères, mais émettent des prolongements cellulaires (figure 16).

Une PCR quantitative après transcription inverse (RT-QPCR) a été réalisée sur les ARN totaux isolées des types cellulaires indiqués ci-dessus. Les résultats d'expression des gènes *CXCL12* et des deux récepteurs *CXCR4* et *ACKR3*, normalisés par rapport au gène de ménage *RPLP0* (Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0), sont présentés en valeurs relatives dans la figure 18. Le cycle seuil (Ct) indiquant la limite de la détection a été fixé par à 31,5. L'expression des gènes a donc été calculée selon la formule : Expression relative = $2^{-(31,5-\Delta Ct)}$ où ΔCt représente la normalisation des cycles seuils pour *CXCL12*, *CXCR4* et *ACKR3* par rapport au contrôle *RPLP0*. Les valeurs brutes de Ct sont données dans l'annexe III, tableau 13.

Selon les types cellulaires l'expression des trois gènes testés est différente. Les cellules CI-GBM TG1 et TG1_C1 expriment fortement l'ARNm codant le récepteur CXCR4 par

rapport aux autres cellules CI-GBM dans lesquelles CXCR4 n'est que faiblement (BTIC 53 et U3021) voire très faiblement exprimé (BTIC 25M) (figure 18a). Le gène *ACKR3* est très exprimé dans les cellules U3021, mais il est faiblement exprimé, dans les cellules BTIC 53 et BTIC 25M, très faiblement dans les cellules TG1 et il n'y a pas d'expression dans les cellules TG1_C1 (figure 18b). Finalement, l'expression de l'ARNm codant la chimiokine CXCL12 est élevée dans les cellules TG1 et environ 3 fois plus faible dans les cellules TG1_C1 par rapport aux cellules TG1. Dans les cellules BTIC 53, BTIC 25M et U3021 la chimiokine CXCL12 est très faiblement exprimée, proche de la limite de détection fixée (figure 18c).

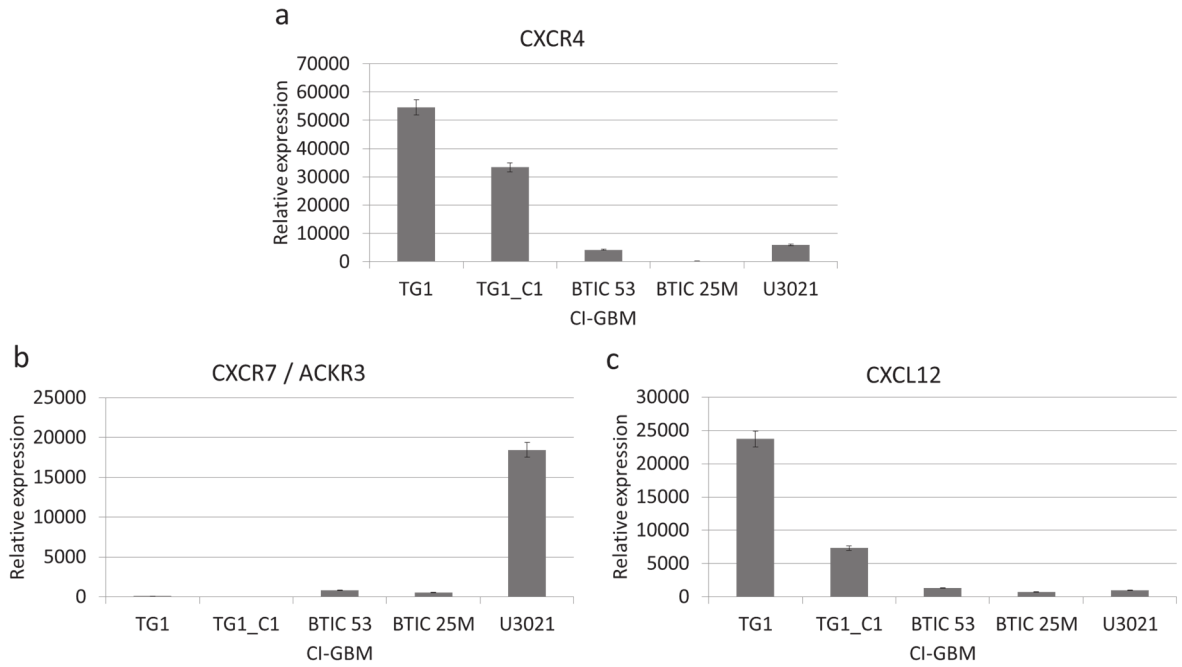


Figure 18. Expression de l'ARNm codant les protéines CXCR4, CXCR7/ACKR3 et CXCL12 dans différents types cellulaires.
Les graphiques a, b et c représentent l'expression relative des gènes *CXCR4, CXCR7/ACKR3 et CXCL12,* respectivement, dans les cinq types de CI-GBM testés. Chaque type cellulaire a été testé en triplicats. Les cellules testées sont en prolifération (deux jours de culture). Les cellules TG1 et TG1_C1 sont au passage 16 et les cellules BTIC 53, BTIC 25M et U3021 sont au passage 10. La QPCR a été réalisée avec la technologie TaqManTM Gene Expression Assay d'Applied Biosystems. TG1, TG1_C1, BTIC 53, BTIC 25M et U3021, cellules initiatrices de tumeur issues d'une tumeur glioneuronale maligne.

II. Identification de l'expression de la protéine CXCL12 par les cinq types des CI-GBMs

Dans un premier temps, nous avons mesuré par ELISA la présence de la protéine CXCL12 dans le milieu de culture des cellules TG1 en fonction du temps. L'étude a été effectué sur 11 jours. Quatre prélèvements ont été réalisés à J3, J6, J9 et J11.

Les résultats montrent une augmentation de la quantité de la protéine CXCL12 secrétée par les cellules TG1 dans le milieu de culture en fonction du temps (figure 19). A J3, la protéine n'est pas significativement détectable < 500 pg/mL. A partir de J6, CXCL12 est bien détectable avec une concentration de 2000 pg/mL à J6 et à 2500 pg/mL à J9. A J11, la concentration est similaire à celle mesurée à J9 probablement à cause de l'acidification du milieu de culture qui induit la quiecence des cellules et une légère mortalité cellulaire. L'augmentation de la concentration en CXCL12 dans le milieu extracellulaire observée entre J3 et J9 est vraisemblablement liée à l'augmentation du nombre de cellules en culture et suivrait la courbe de croissance cellulaire, mais ceci n'a pas été vérifié.

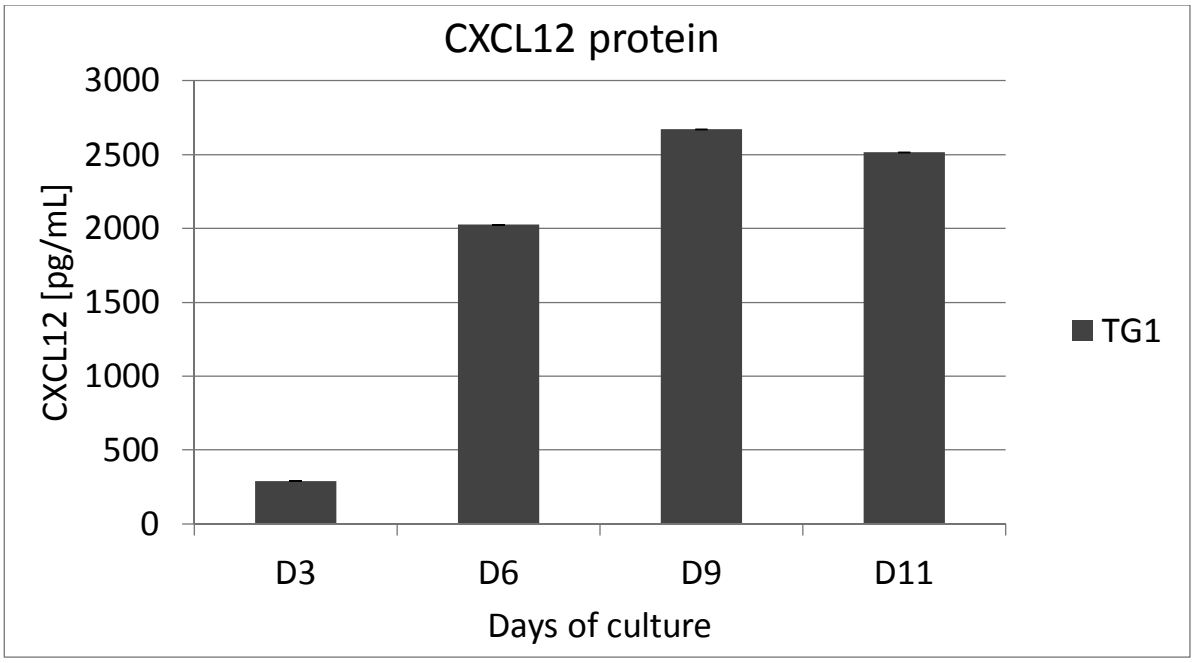


Figure 19. Production de CXCL12 dans le milieu de culture des cellules TG1 en fonction du temps.
La concentration de CXCL12 a été mesurée par Elisa comme indiqué dans Matériels et Méthodes. Environ 2 millions de cellules ont été ensemencées dans chaque plaque. Les cellules sont maintenues en culture, sans changement du milieu.

Après ces résultats, nous avons fixé le jour 7 pour effectuer les prélèvements de surnageant, afin de mesurer par ELISA la quantité de CXCL12 sécrétée par les cellules CI-GBM utilisées dans notre étude. Les cinq types cellulaires CI-GBM (TG1, TG1_C1, BTIC 53, BTIC 25M et U3021), sont placés en culture à 37 °C pendant 7 jours sans changement du milieu de culture. Les cellules TG1 et TG1_C1 expriment fortement la protéine CXCL12 avec une concentration dans le milieu extracellulaire de 2800 pg/mL et 1500 pg/mL respectivement (figure 20). Les cellules BTIC 53 expriment également la protéine CXCL12,

mais plus faiblement avec une concentration extracellulaire de 500 pg/mL. Une absence d'expression de cette protéine est observée dans les deux types cellulaires BTIC 25M et U3021.

Les résultats de la sécrétion de la protéine CXCL12 par les cinq types des cellules initiatrices de glioblastome semblent corrélés avec l'expression de l'ARNm codé par le gène *CXCL12* qui est élevée dans les cellules TG1 et TG1_C1 (avec TG1 > TG1_C1) et plus faible dans les cellules BTIC 53, voire très faible dans BTIC 25M et U3021.

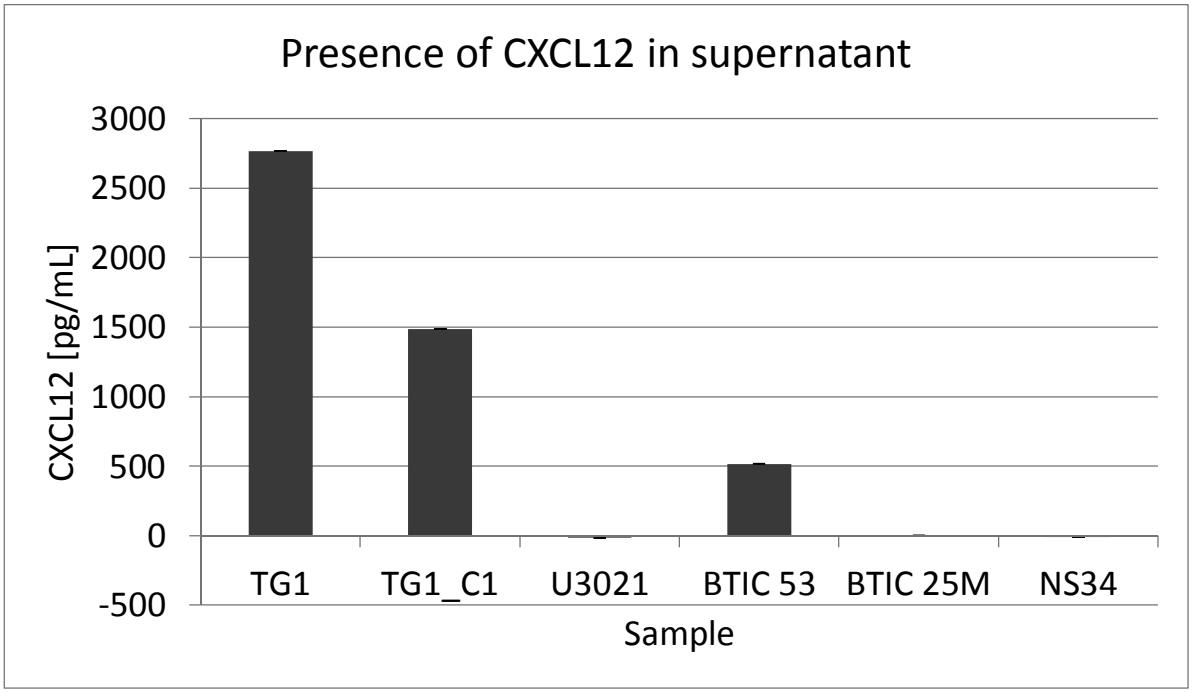


Figure 20. Expression de la protéine CXCL12 par les cinq types des cellules CI-GBM utilisés. Le graphique représente l'expression de la chimiokine CXCL12 dans les différents types des cellules souches cancéreuses de glioblastome. La détection de cette protéine a été effectuée par ELISA à partir des milieux de culture des cellules mise en culture pendant 7 jours à 37 °C. Les cellules ont été ensemencées à 2 x 10^6 cellules/puits. Le milieu NS34 est utilisé comme contrôle négatif.

III. Rôle de la chimiokine CXCL12 et de son récepteur CXCR4 dans la prolifération des CI-GBM. Approche pharmacologique.

La chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et ACKR3, constituent une voie de signalisation dont l'importance est reconnue dans le développement des GBMs. Elle intervient dans le fonctionnement des cellules cancéreuses, la communication avec leur environnement et joue un rôle dans la néovascularisation, la mobilité cellulaire, la transition

épithélio-mésenchymateuse (EMT), l'invasion des tissus et la résistance aux agents thérapeutiques. La multitude de fonctions cellulaires gouvernées par cette voie fait de ces protagonistes des cibles thérapeutiques attractives, soit pour le développement de nouveaux traitements, soit pour sensibiliser les cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques existants.

Différentes molécules capables de bloquer cette voie ont été développées. Il s'agit de petites molécules, de peptides, d'anticorps interagissant avec les récepteurs ou avec la chimiokine. Comme indiqué dans l'introduction, certains composés sont testés en clinique, notamment l'AMD3100 (plerixafor) molécule anti-CXCR4, NOX-A12 (un aptamère de CXCL12).

Au laboratoire (UMR 7200 et UMR 7242), des molécules chalcones à activité neutraligands vis à vis de CXCL12 ont été développées et testées sur des modèles inflammatoires. Nous avons choisi de les utiliser comme outils pharmacologiques pour étudier le rôle de la chimiokine CXCL12 produite de manière endogène dans la prolifération et la survie des CI-GBM et leur capacité à former des tumorosphères clonales.

1 Les Molécules

Ont été testées (figure 21) :

a) **Les molécules chalcones** (chalcone 4, chalcone 1 et LIT-927) qui ont été mises en évidence par des membres des UMR 7200 et 7242 et testées dans des modèles de pathologies inflammatoires.

- Les deux molécules chalcones (chalcone 4 et LIT-927) synthétisées au laboratoire, sont connues pour leur effet neutraligand de CXCL12. Ces molécules se lient à CXCL12 et inhibent la signalisation induite par la chimiokine en bloquant son interaction avec les récepteurs CXCR4 et CXCR7/ACKR3 (Hachet-Haas et al. 2008 ; Daubeuf et al. 2013 ; Regenass et al. 2018)
- La chalcone 1, également synthétisée au laboratoire ne présente pas d'effet neutraligand de CXCL12 (Hachet-Haas et al. 2008).

b) **La molécule AMD3100** commerciale qui est un antagoniste du récepteur CXCR4.

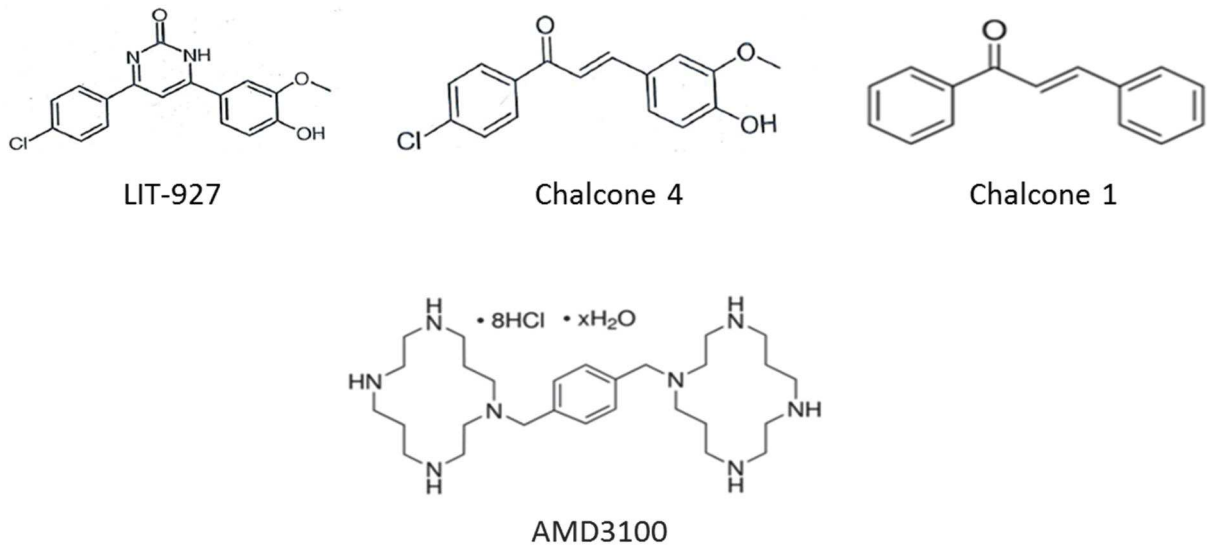


Figure 21. Les différentes molécules utilisées pour bloquer la signalisation CXCL12/CXCR4/ACKR3.
La molécule chalcone 4 est un neutraligand de CXCL12 et empêche sa liaison aux récepteurs CXCR4 et ACKR3. La molécule LIT-927 est un analogue de la molécule chalone 4 mais présente une solubilité supérieure. La molécule chalcone 1 ne présente pas d'effet neutraligand. Pour les chalcones, le cycle du côté du carbonyl est le cycle A, l'autre étant le cyle B. Dans la molécule LIT-927, une rigidification a été introduite au niveau de l'oxopropényl central *via* une pyrimidinone. La molécule AMD3100 un antagoniste du récepteur CXCR4.

2 Effet des chalcones 1, 4, LIT-927 et de l'AMD3100 sur la formation des tumorosphères clonales

Les cellules CI-GBM et notamment les cellules TG1 ont la capacité de générer des tumorosphères clonales à partir d'une cellule en culture. Nous avons testé l'effet des différentes molécules chalcones et de l'AMD3100 sur cette propriété.

Après dissociation des cellules TG1 et ensemencement à une cellule par puits, la formation des tumorosphères clonales a été testée en absence (0 µM) et en présence de chalcone 4, 1, LIT-927 aux concentrations de 0,1 µM, 1 µM et 5 µM et d'AMD3100 aux concentrations de 1 et 10 µM, pendant trois semaines à 37 °C (figure 22).

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'AMD3100 à une concentration de 10 µM inhibe fortement le développement des sphères clonales (au jour 21, diamètre 92 µm en présence de 10 µM d'AMD3100 contre 258 µm pour les sphères contrôles, soit des sphères de volume 3 fois plus petits), suggérant un rôle du récepteur CXCR4 et de la chimiokine dans cette propriété des CI-GBM TG1. La chalcone 4 et la chalcone 1 à 5 µM inhibent totalement la formation des sphères, alors que la chalcone LIT-927 à 5 µM ne présente aucun effet sur la formation et le développement des sphères. Les trois molécules chalcones ont une activité différentielle sur formation de sphères. Cependant compte tenu des propriétés des trois

chalcones (neutraligand de CXCL12 pour chalcone 4 et LIT-927 et non-neutraligand de chalcone 1) et des effets similaires de chalcone 4 et LIT-927 dans des modèles d'inflammation et de mobilié cellulaire, les résultats ne semblent pas en accord avec une activité des molécules chalcone 4 et chalcone 1 *via* une activité neutraligand de CXCL12.

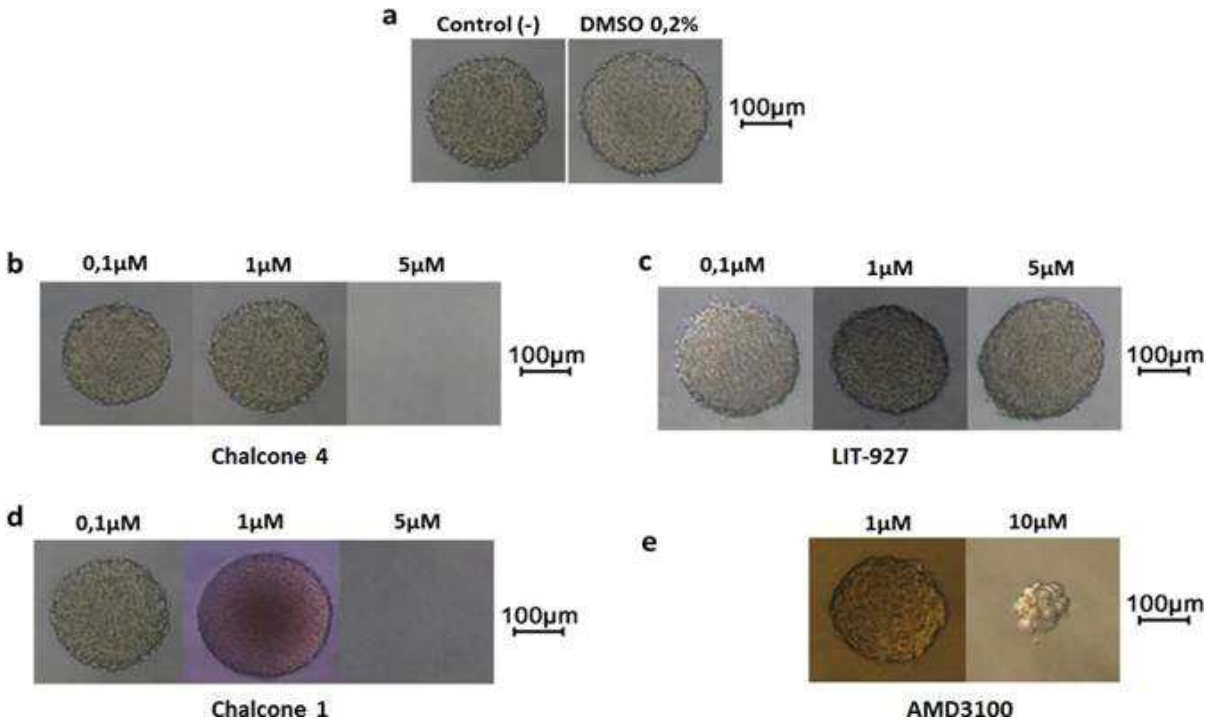


Figure 22. Effet des molécules chalcones et de l'AMD3100 sur le développement d'une tumorosphère clonale de CI-GBM TG1.

Les cellules TG1 sont ensemencées dans des plaques 96 puits à raison d'une cellule/puits en moyenne (dilution limite) dans 200 µL de milieu NS34 sans sérum, en présence de FGF et d'EGF a) en absence de composé (contrôle DMSO 0,2 %); en présence de différentes concentrations de b) chalcone 4 (dans 0,2 % de DMSO final); c) chalcone LIT-927; d) chalcone 1; e) AMD3100. Le milieu est renouvelé une fois par semaine. Les photos correspondent à des sphères à 3 semaines.

3 Effet des chalcones 1, 4, LIT-927 et de l'AMD3100 sur la prolifération de cellules CI-GBM TG1

Dans les expériences précédentes, nous avons pu montrer que les molécules chalcone 4 et chalcone 1 à 5 µM inhibaient totalement la formation des tumorosphères clonales de cellules TG1, alors que la molécule LIT-927 ne présentait aucun effet inhibiteur. Cette propriété de formation de tumorosphères à partir d'une seule cellule au départ est une caractéristique peu commune des cellules, mais retrouvée dans certaines cellules cancéreuses. Afin de savoir si l'effet des molécules testées s'exercait uniquement sur cette propriété, nous avons testé les molécules chalcones et l'AMD3100 sur la croissance des CI-

GBM en culture, en fonction du nombre de cellules ensemencées et en fonction de la concentration des composés.

L'effet des molécules chalcones à 5 µM a été testé sur la prolifération des CI-GBM TG1 ensemencées à différentes concentrations entre 100 et 9600 cellules par puits dans un volume de 100 µL. Le suivi de la viabilité cellulaire a été effectué tous les 3 jours sur une durée totale de 9 jours par mesure du taux d'ATP cellulaire (CellTiter Glo ATP luminescent assay, Promega) (annexe IA) et le test d'exclusion du bleu trypan.

En absence de molécules chalcones le taux d'ATP cellulaire augmente en fonction des jours en culture (figure 23). Cette augmentation est liée à la multiplication cellulaire, mise en évidence par mesure au bleu trypan. Le temps de doublement calculé à partir de ces données est de ~2 jours (1,85 $\pm$ 0.36 pour 600 cellules ensemencées à 2,3 $\pm$ 0.44 jours pour 9600 cellules ensemencées), comparable à celui trouvé par un test au bleu trypan.

Les chalcones ont des effets différents sur le taux d'ATP. De plus, cet effet dépend du nombre de cellules ensemencées. Les chalcones 4 et 1 à une concentration de 5 µM inhibent la croissance cellulaire, alors que la chalcone LIT-927 est sans effet notoire (figure 23). Pour la chalcone 4 à 5 µM, l'inhibition est totale (100 %) lorsque la densité cellulaire est inférieure à 4800 cellules/puits. Au-delà de cette densité cellulaire, l'effet de la chalcone 4 à 5 µM n'est plus observée.

Pour des temps d'exposition à la chalcone 4 allant jusqu'à 9 jours, l'effet observé pour les densités cellulaires inférieures à 4800 cellules/puits semble être de nature cytostatique. En effet le test d'exclusion au bleu trypan n'indique pas de mortalité cellulaire et le taux d'ATP dans les cellules reste stable. Des durées d'incubation supérieures à 10 jours conduisent à la mort cellulaire.

La chalcone 1 montre un effet similaire à la chalcone 4 et inhibe la prolifération des cellules TG1 de manière dépendante de la quantité cellulaire (figure 23). Cependant son effet est moins marqué que celui de la chalcone 4. La chalcone LIT-927, n'inhibe ni la prolifération, ni la survie des cellules CI-GBMs.

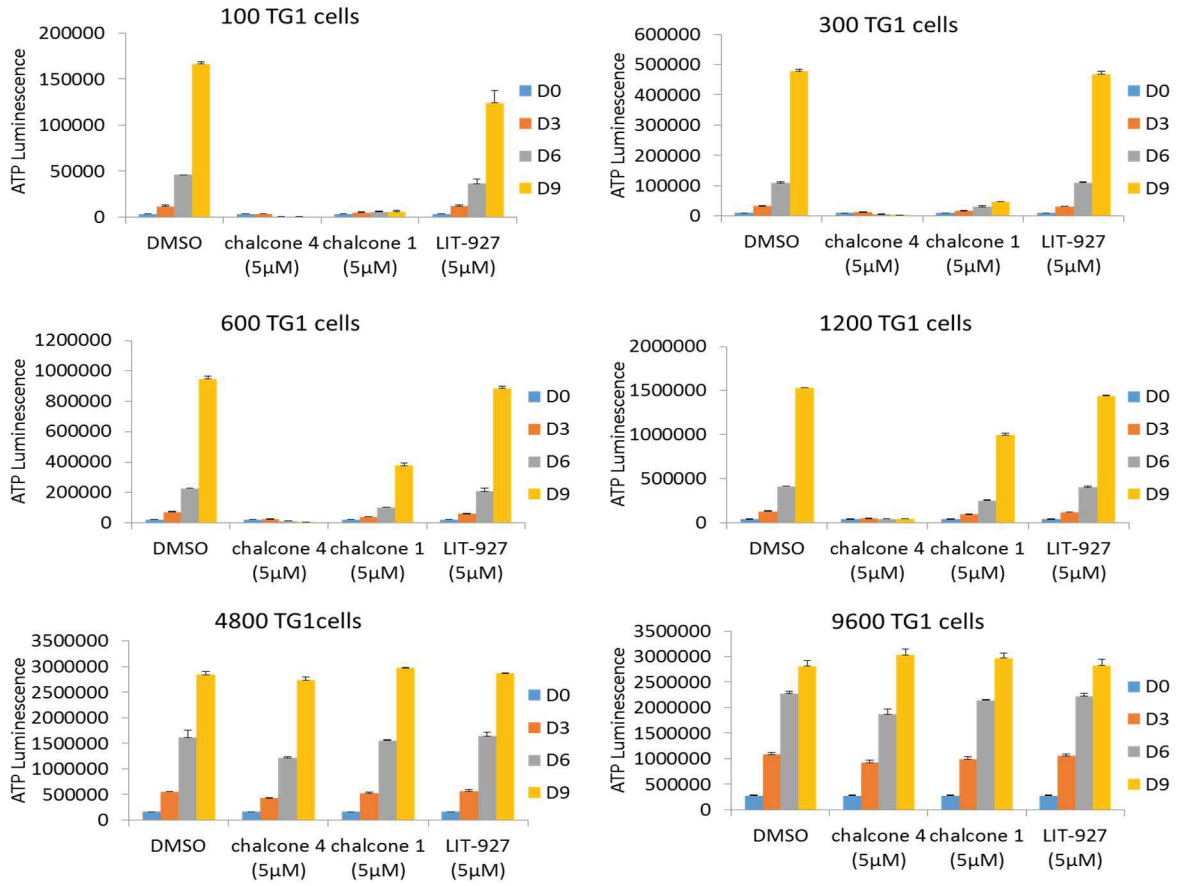


Figure 23. Effet des molécules chalcones sur la croissance des cellules TG1.
Les cellules en prolifération ont été ensemencées à différentes densités de 100 à 9600 cellules par puits dans une plaque Greiner 96 puits (réf. 6550990), en absence ou en présence de molécules chalcones à une concentration de 5 µM, en présence de 0,1 % de DMSO (concentration finale) dans tous les puits. Chaque condition est testée en triplicat. La croissance cellulaire a été évaluée par la mesure du taux d'ATP à l'aide du système CellTiter-Glo ATP luminescent assay, comme indiqué dans la section "Matériels et Méthodes". Les taux d'ATP ont été mesurés à 3 jours (D3), 6 jours (D6) ou 9 jours (D9) et un changement du milieu NS34 avec et sans les molécules est effectué dans les plaques des prochaines lectures (changement de milieu tous les 3 jours en respectant les conditions expérimentales).

La molécule contrôle AMD3100, antagoniste des récepteurs CXCR4, a été testée à 3 concentrations (5 µM, 10 µM, 20 µM) sur 600 cellules TG1. La viabilité cellulaire est suivie sur 13 jours. Les résultats montrent un effet inhibiteur de l'AMD3100 sur la croissance des cellules CI-GBM TG1. Cependant cet effet n'est pas immédiat et n'est observé qu'à partir du 10e jour. Des inhibitions de 20 % et de 50 % sont observées après 10 et 13 jours de culture des cellules en présence de 5 à 20 µM d'AMD3100 (figure 24). Dans une étude similaire sur différentes CI-GBM, Gatti et collaborateurs ont observé un délai de 2 à 7 jours pour l'apparition de l'effet inhibiteur de l'AMD3100 (Gatti et al. 2013). Dans leur étude, ce délai était corrélé à la quantité de chimiokine sécretée par les cellules, le délai étant d'autant plus long que les quantités de chimiokines produites par les cellules étaient élevées. Les cellules TG1 semblent sécréter une quantité de chimiokines plus élevée. Cependant les conditions

expériementales ne sont pas les mêmes et il est difficile de comparer les résulats quantitativement.

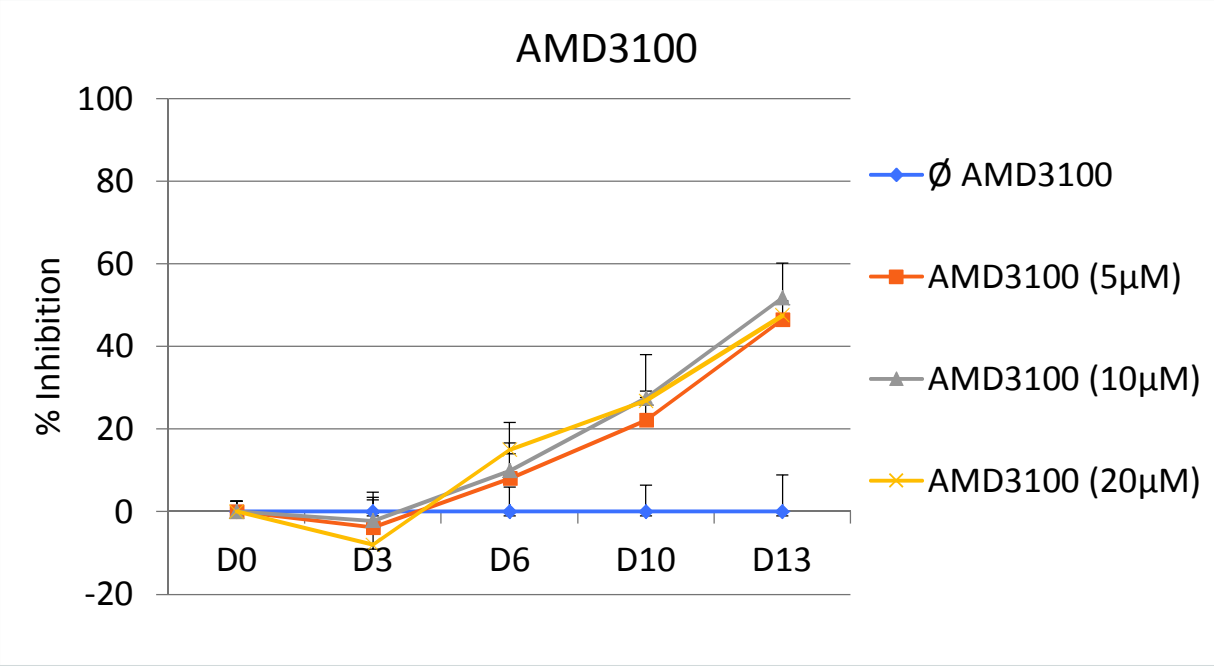


Figure 24. Effet de la molécule AMD3100 sur la prolifération des cellules TG1.
L'effet de l'AMD3100 sur le taux d'ATP cellulaire a été testé sur 600 cellules TG1 par puits à 3 concentrations 5 µM, 10 µM, 20 µM sur 13 jours. Les cellules sont cultivées dans du milieu NS34 sans sérum et en présence de d'EGF et de FGF, avec un changement du milieu de culture tous les 3 jours, comme indiqué dans la section Matériels et Méthodes. Le taux d'ATP a été mesuré à l'aide du test CellTiter-Glo 2.0 Assay en absence et en présence d'AMD3100. Les courbes représentent les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'AMD3100 (0 à 20 µM) et en fonction des jours de culture (3 jours (D3), 6 jours (D6), 9 jours (D9) ou 13 jours (D13)).

Des courbes dose-réponse ont été établies pour les molécules chalcones (4, 1 et LIT-927) et l'AMD3100. L'effet des molécules a été mesuré après 3 jours pour un ensemencement de 600 cellules par puits (figure 25). Dans les conditions expérimentales utilisées, les molécules chalcones 4 et 1 inhibent totalement l'autorenouvellement des cellules TG1 avec une EC_{50} de l'ordre de 5 µM. La chalcone LIT-927 ne présente un effet inhibiteur qu'à forte concentration (50 % d'inhibition à 50 µM) et l'AMD3100 ne présente aucun effet après 3 jours d'incubation, même à des concentrations de 50 µM.

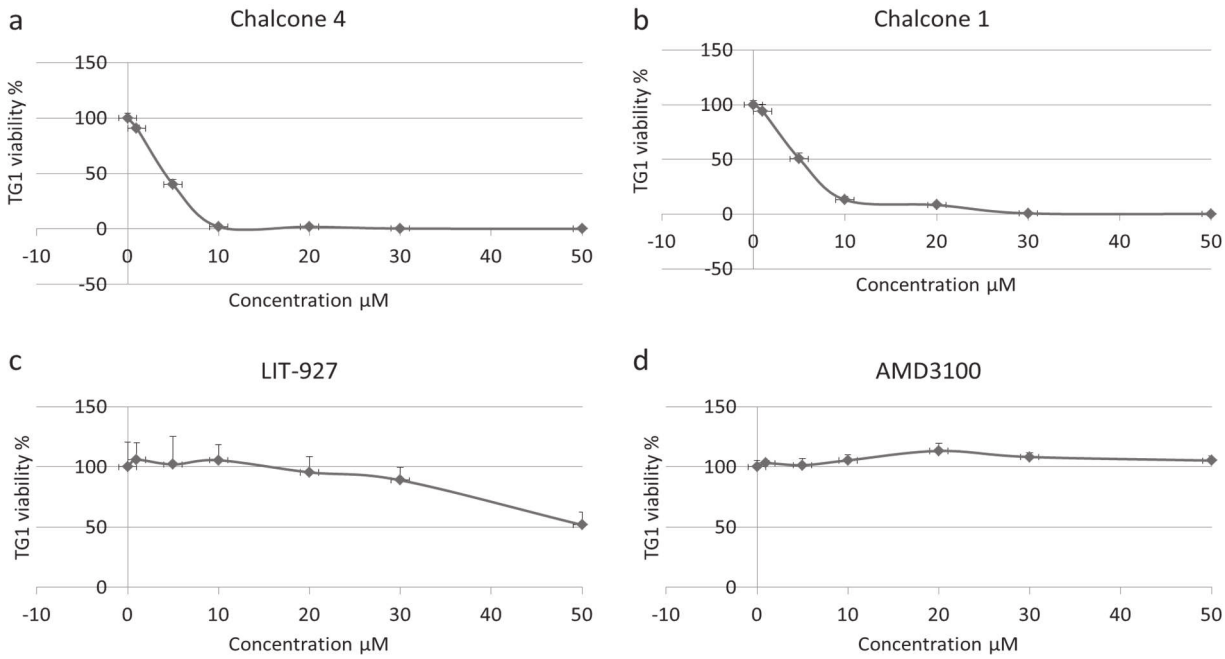


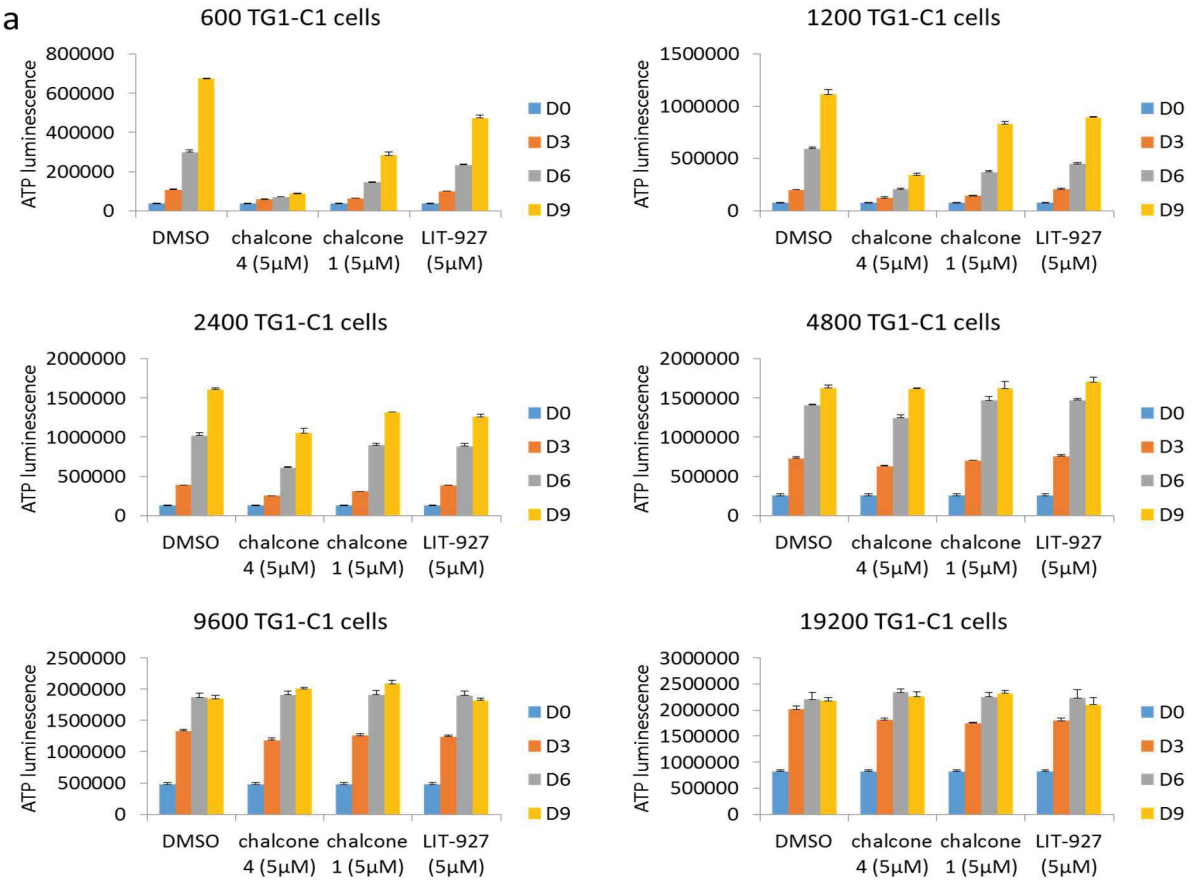
Figure 25. Courbes doses-réponses des molécules chalcones 4, 1, LIT-927 et de l'AMD3100 sur les CI-GBM TG1.

Les molécules chalcones 4, 1, LIT-927 et AMD3100 ont été testées aux concentrations de 0 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM sur les cellules TG1 incubées pendant 3 jours à 37 °C dans du milieu NS34 en présence d'EGF et de FGF. En ordonnée, le pourcentage de viabilité correspond au rapport du taux d'ATP mesuré en présence du composé à une concentration donnée par rapport au taux d'ATP en absence de composé. Le taux d'ATP est mesuré dans chaque puits à l'aide du test Cell Titer-Glo® de Promega.

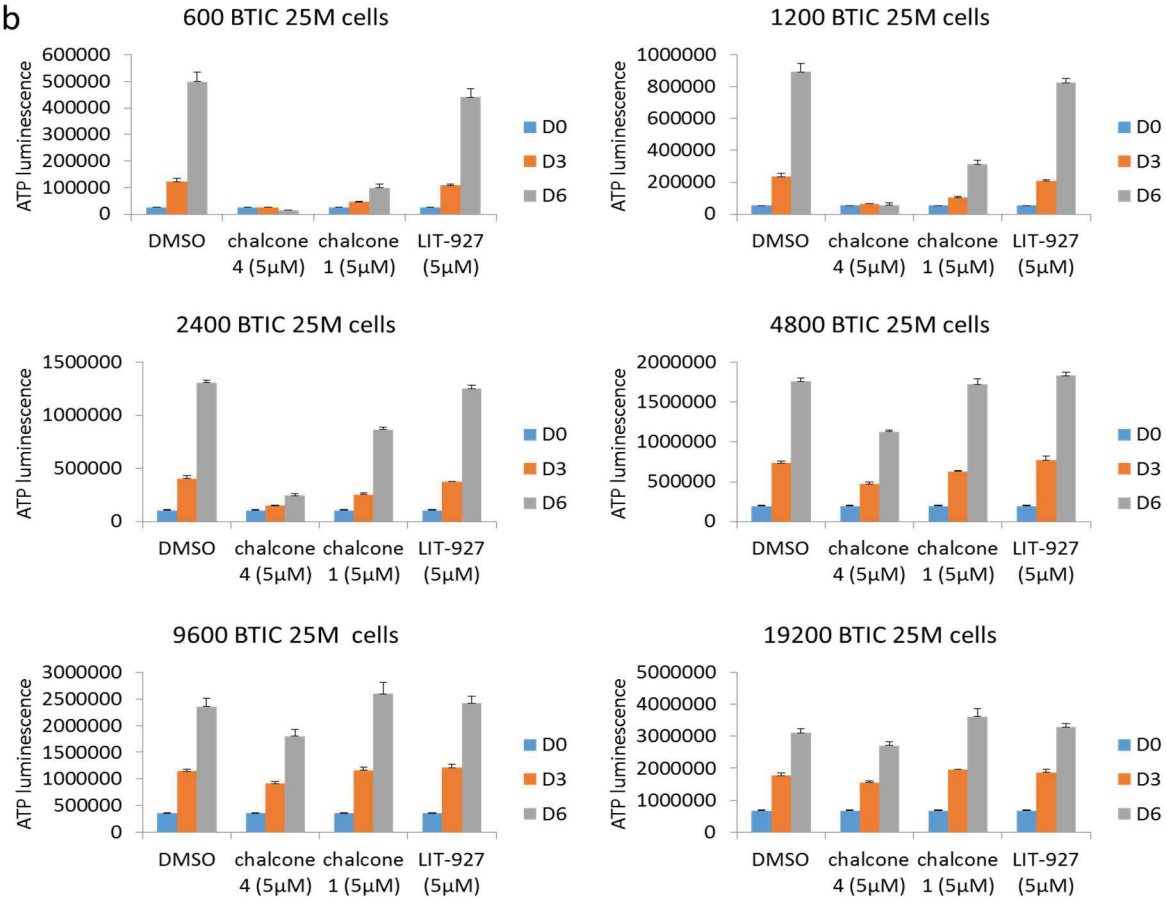
4 Effet des molécules chalcone 4, 1, LIT-927 sur des CI-GBM autres que les cellules TG1

Compte tenu de l'hétérogénéité des CI-GBM, il est important de tester les molécules chalcones utilisées dans notre étude sur d'autres CI-GBM. Les trois molécules chalcones ont été testées à 5 µM sur les CI-GBM TG1_C1, BTIC 25M, BTIC 53, U3021 à une densité cellulaire de 600 à 19200 cellules par puits (voir annexes IB, IC, ID et IE).

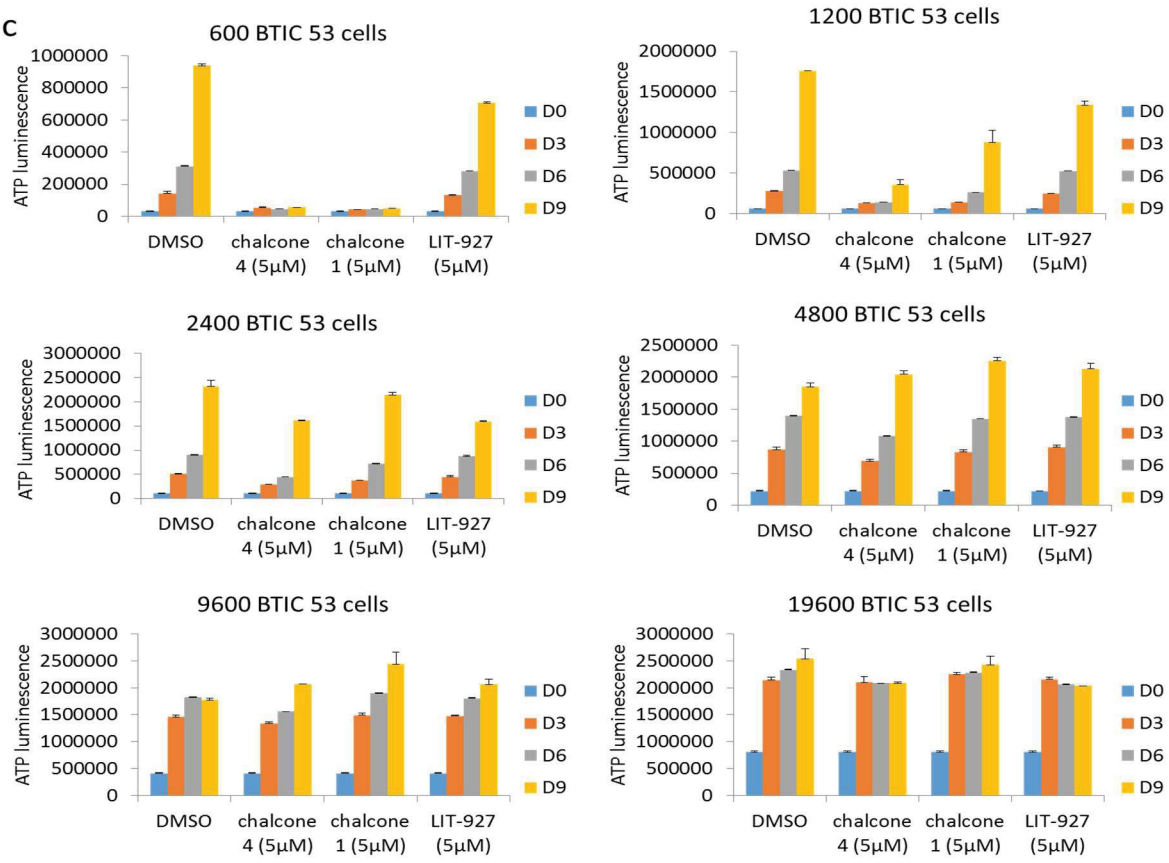
a


600 TG1-C1 cells
1200 TG1-C1 cells
2400 TG1-C1 cells
4800 TG1-C1 cells
9600 TG1-C1 cells
19200 TG1-C1 cells
ATP luminescence
DMSO
chalcone 4 (5µM)
chalcone 1 (5µM)
LIT-927 (5µM)
D0
D3
D6
D9

b


600 BTIC 25M cells
1200 BTIC 25M cells
2400 BTIC 25M cells
4800 BTIC 25M cells
9600 BTIC 25M cells
19200 BTIC 25M cells
ATP luminescence
DMSO
chalcone 4 (5μM)
chalcone 1 (5μM)
LIT-927 (5μM)
D0
D3
D6

C


600 BTIC 53 cells
1200 BTIC 53 cells
2400 BTIC 53 cells
4800 BTIC 53 cells
9600 BTIC 53 cells
19600 BTIC 53 cells
ATP luminescence
DMSO
chalcone 4 (5µM)
chalcone 1 (5µM)
LIT-927 (5µM)
D0
D3
D6
D9

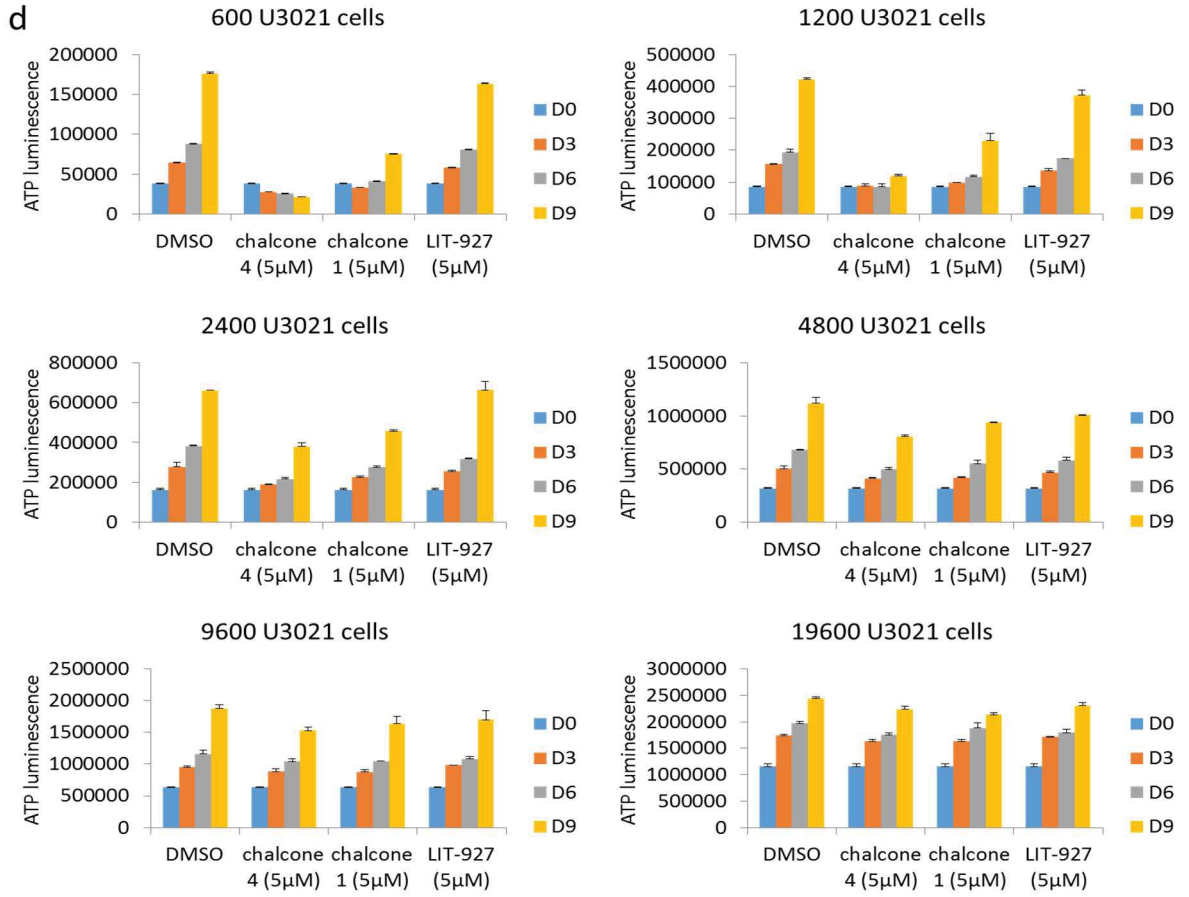


Figure 26. Effet des molécules chalcones sur la prolifération de cellules de CI-GBM autres que TG1.

Les molécules ont été testées sur a) les cellules TG1_C1, b) les cellules BTIC 25M, c) les cellules BTIC 53, d) les cellules U3021. Les cellules ont été ensemencées à différentes densités de 600 à 19200 cellules par puits dans une plaque Greiner 96 puits (réf. 6550990), en absence ou en présence des molécules chalcones à une concentration de 5 µM, en présence de 0,1 % de DMSO (concentration finale) dans tous les puits. Chaque condition est testée en triplicat. La croissance cellulaire a été évaluée par la mesure du taux d'ATP à l'aide du système CellTiter-Glo ATP luminescent assay, à 3 jours (D3), 6 jours (D6) ou 9 jours (D9). Le milieu NS34 avec et sans les molécules est remplacé tous les 3 jours.

L'effet des composés chalcones sur la prolifération et l'autorenouvellement des cellules TG1_C1, BTIC 53, BTIC 25M et U3021 est similaire à celui observé pour les cellules TG1 (figure 26). On observe un effet inhibiteur sur la croissance des cellules pour les deux molécules chalcones 4 et 1 à 5 µM lorsque la densité cellulaire est inférieure 4800 cellules par puits. Au-delà de cette densité cellulaire, l'effet n'est plus observée. Comme pour les cellules TG1, la molécule LIT-927 ne présente pas d'effet significatif sur la prolifération des différentes cellules à la concentration utilisée.

Ainsi, lorsque le nombre de cellules en culture est faible, l'activité différentielle des chalcones observée précédemment sur la formation des tumorosphères clonales est retrouvée avec, comme précédemment, une non-corrélation entre les propriétés neutraligands des chalcones et leur activité sur la division cellulaire, suggérant que les chimiokines agissaient sur les cellules par un mécanisme différent de l'effet neutraligand.

IV. Effet de la chimiokine CXCL12 exogène sur la prolifération des cellules TG1 en absence et en présence des molécules chalcones et de l'AMD3100

Les cellules TG1 produisent la chimiokine CXCL12 de manière endogène. Nous avons souhaité savoir si les cellules sont sensibles à l'ajout dans le milieu de culture de CXCL12 exogène. Dans ce but des cellules TG1 ont été mises en culture à 37 °C en absence ou en présence de 5 nM, 50 nM et 500 nM de protéine CXCL12 exogène humaine (h-SDF-1α, réf. CN-11, ALMAC; fiche descriptive en annexe II). La croissance cellulaire évaluée par mesure du taux d'ATP est effectuée sur une période de 9 jours (figure 27). Après 3 jours de culture (J3), la protéine CXCL12 rajoutée à 5 nM, 50 nM et 500 nM augmente la croissance cellulaire de 0 %, (8 ± 4) % et (15 ± 5) %, respectivement, par rapport aux cellules cultivées sans ajout de CXCL12 exogène. À J6, la stimulation de la prolifération, pour les trois concentrations testées est de (21 ± 4,5) %, (31 ± 3) % et (35 ± 5,7) %, respectivement et à J9 elle est de (3 ± 0,3) %; (15 ± 1) % et (11 ± 1,2) %. Les cellules restent donc sensibles à la chimiokine aux fortes concentrations, bien que la stimulation de la croissance soit modeste. Nous avons ensuite testé l'effet des chalcones 1, 4 et LIT-927 et de l'AMD3100 sur cette stimulation de croissance induite par la chimiokine rajoutée. Dans ce but, des cellules TG1 auxquelles la chimiokine CXCL12 a été ajoutée de manière exogéne ont été cultivées en absence et en présence (5 µM) de molécules chalcones 1, 4, LIT-927 et de l'AMD3100. L'effet sur la prolifération de cellules a été mesuré tous les trois jours sur une période de 9 jours. La figure 27 indique que la chalcone 4 à 5 µM bloque totalement la croissance des cellules TG1, que celles-ci soient en absence ou en présence de fortes concentrations (500 nM) de chimiokine exogène. En effet le taux d'ATP mesuré pour les cellules incubées avec la chalcone 4 et la protéine CXCL12 est similaire à celui des cellules en culture avec la chalcone 4 seule indiquant que l'effet cytostatique de la chalcone 4 ne peut être levé par l'addition de la chimiokine. Dans nos conditions expérimentales, la chalcone 1, à 5 µM, inhibe partiellement la croissance des cellules TG1 (diminution de 35 - 40 % par rapport au contrôle DMSO). Lorsque l'on compare les données en présence de CXCL12 et de chalcone 1 à celles en présence de CXCL12 seule, on constate que l'effet inhibiteur est maintenu en présence de la

chimiokine exogène, quelle que soit la concentration de cette dernière (~25 - 30 % en présence de 50 nM et 20 % en présence de 500 nM) (figure 27) et que l'effet stimulant de CXCL12 sur la croissance des cellules TG1 est maintenu, du moins partiellement, en présence de chalcone 1. La chimiokine LIT-927 qui n'a pas d'effet sur la croissance des cellules, ne semble pas non plus interférer avec avec la stimulation induite par CXCL12 suggérant de plus une absence d'effet neutraligand. En absence de chimiokine exogène, l'AMD3100, antagoniste du récepteur CXCR4, exerce un léger effet inhibiteur sur la croissance des cellules (20 % par rapport au contrôle) à partir de 9 jours d'incubation (figure 27). De plus, la molécule bloque l'effet stimulant sur la croissance cellulaire de la chimiokine CXCL12 ajoutée de manière exogène dans toutes les conditions expérimentales utilisées. Cette expérience conforte les conclusions de l'expérience précédente, à savoir que les molécules chalcones 1 et 4 ont un effet cytostatique qui ne passe vraisemblablement pas par une fixation sur la chimiokine et une absence d'effet neutraligand de LIT-927. Pour confirmer cette hypothèse, mais aussi pour progresser dans l'étude du rôle de la chimiokine CXCL12 produite de manière endogène, dans l'autorenouvellement et la prolifération des CI-GBM, nous avons procédé à des expériences d'interruption génique (knockout ou KO) du gène codant CXCL12.

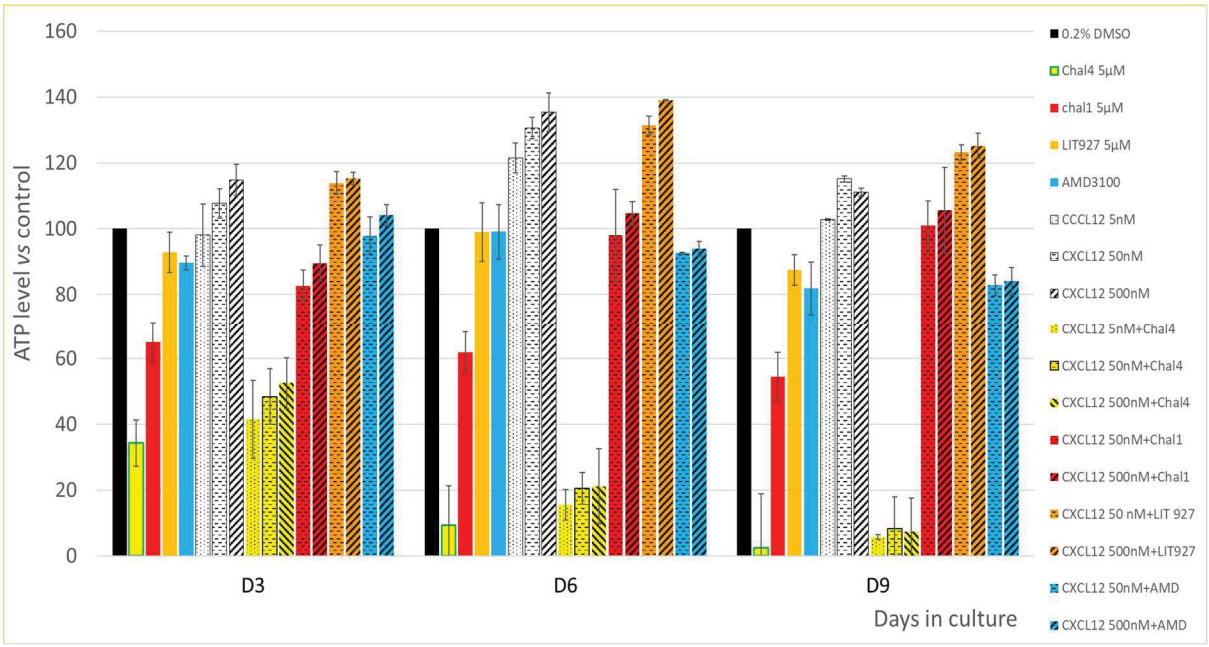


Figure 27. Effet de la chimiokine CXCL12 exogène sur la croissance des cellules TG1 en absence et en présence molécules chalcones 1, 4, LIT-927 et l'AMD3100.

Les cellules TG1 (600 cellules par puits) sont cultivées dans le milieu NS34 dans une plaque Greiner 96 puits (réf. 6550990) en absence (barre en couleurs sans motifs) ou présence (barres avec motifs) de chimokine CXCL12 humaine aux concentrations de 5 nM (pointillés noirs), 50 nM (tirets noirs) et 500 nM (hachuré noir) et en absence ou présence de 5 µM de chalcone (jaune), en absence ou présence de 5 µM de chalcone 1 (rouge), en absence ou présence de 5 µM de LIT-927 (orange) et en absence ou présence de 5 µM d'AMD3100 (turquoise). Les molécules à 5 µM sont incubées pendant une heure à température ambiante avec la protéine CXCL12 à 5, 50 ou 500 nM pour la chalcone 4 et à 50 nM ou 500 nM pour chalcone 1, LIT-927 et AMD3100, avant ajout du mélange aux cellules TG1. Pour les

puits sans CXCL12 et sans molécules (contrôles), les cellules sont cultivées en présence de DMSO 0,1 % (barres noires). Le taux d'ATP cellulaire est mesuré à l'aide du test Cell Titer-Glo® de Promega. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours, en respectant les conditions expérimentales dans les puits.

V. Rôle de la chimiokine CXCL12 dans la prolifération des CI-GBM. Approche génétique par interruption du gène codant la chimiokine CXCL12 dans les cellules CI-GBM TG1

Pour comprendre le rôle de la chimiokine CXCL12 produite de manière endogène, dans l'autorenouvellement et la prolifération des CI-GBM, nous avons procédé à des expériences d'interruption génique (knockout ou KO) du gène codant CXCL12 sur les deux allèles en utilisant la technologie CRISPR/Cas9. Dans les cellules humaines, le gène *CXCL12* est localisé sur le chromosome 10. Le caryotype des cellules TG1 ne montrent pas de polysomie de ce chromosome (Patru et al. 2010).

Deux systèmes ont été utilisés pour réaliser l'interruption génique : un système commercialisé par la société Santa Cruz et un système développé à l'institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch.

1 Interruption du gène *CXCL12* des cellules TG1 avec la méthode CRISPR/Cas9 commerciale de la société Santa Cruz

Ce système utilise deux plasmides : un plasmide contenant les ARN guides (gRNA) et la protéine Cas9 et un deuxième permettant, après coupure du gène cible par l'endonucléase Cas9, l'insertion de la protéine fluorescente rouge (RFP) et du gène de résistance à la puromycine par un mécanisme de réparation guidée par l'homologie (HDR pour homology driven repair) (figure 28). Avec ce système, les cellules recherchées présentent une fluorescence rouge et sont résistantes à la puromycine.

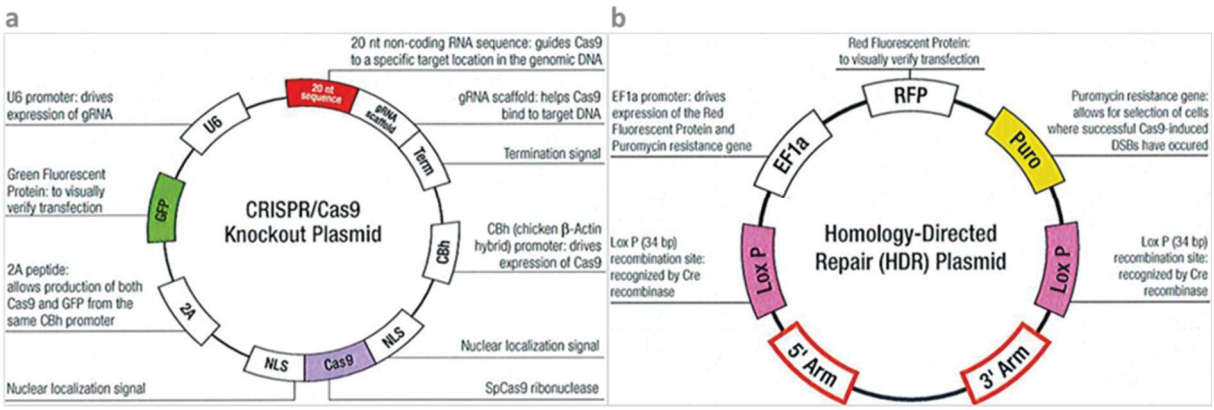


Figure 28. Les deux plasmides Cas9 et HDR de la société Santa Cruz.
a) Plasmide Cas9 (SDF-1 CRISPR/Cas9 KO Plasmid) permettant de réaliser une coupure du gène *CXCL12*; b) Plasmide HDR (SDF-1 HDR Plasmid) permettant de remplacer le gène coupé par la cassette RFP/Puro (protéine à fluorescence rouge/gène de résistance à la puromycine).

Des cellules TG1 ont été transfectées avec les deux plasmides, puis sélectionnées en présence de puromycine selon le chronogramme ci-dessous (figure 29). La fluorescence rouge des cellules a été suivie sur une période de 5 à 8 semaines. Les cellules sont cultivées dans du milieu NS34 sans sérum, conditions dans lesquelles les cellules TG1 se divisent en formant des tumorosphères.

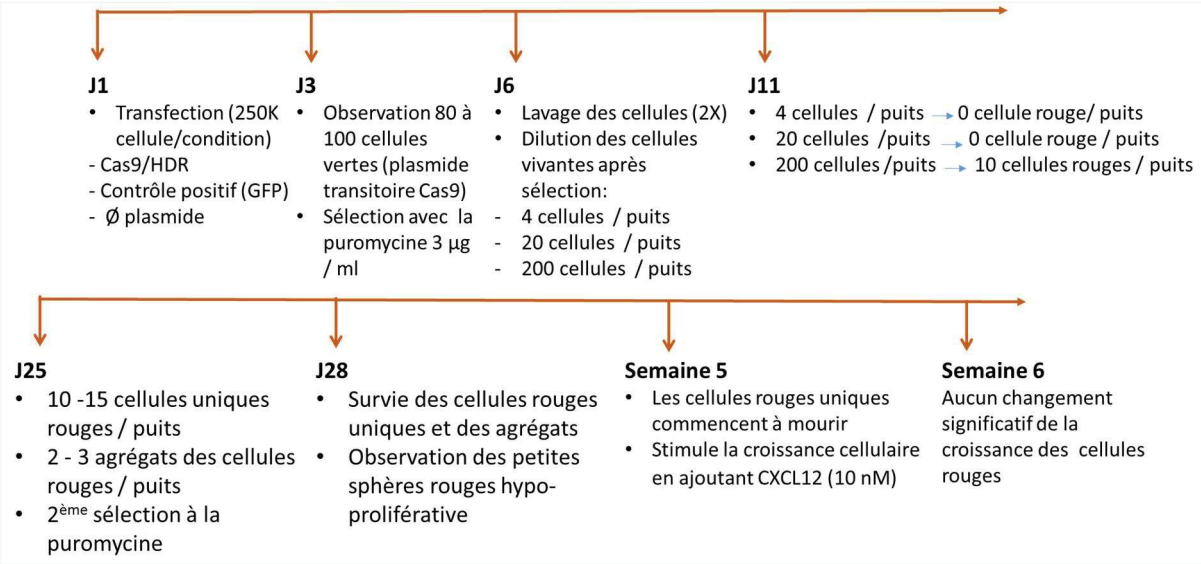


Figure 29. Schéma représentant des différentes étapes de la transfection des cellules TG1 par les deux plasmides Cas9 et HDR de la société Santa Cruz.

Trois phénotypes de cellules TG1 présentant une fluorescence rouge et une résistance à la puromycine ont été mis en évidence (figure 30) :

1) Des cellules TG1 transfectées qui prolifèrent en formant des petites sphères. La figure 30a montre l'évolution de la croissance de ces cellules par rapport aux cellules TG1 non transfectées avec les deux plasmides. On constate que la taille des sphères obtenues avec les cellules transfectées est plus petite que la taille des sphères témoins durant 8 semaines de culture à 37 °C.

2) Des cellules qui restent sous forme de cellules uniques (sans division cellulaire pendant toute la période d'observation) ou qui forment des petits agrégats cellulaires et qui finissent par disparaitre au bout de 5 semaines (figure 30b).

3) Des cellules TG1 transfectées qui forment des sphères dont la taille et la vitesse de croissance sont similaires à celles formées par les cellules témoins non transfectées avec les deux plasmides (figure 30c). Ces cellules seront dénommées "normo-proliférative".

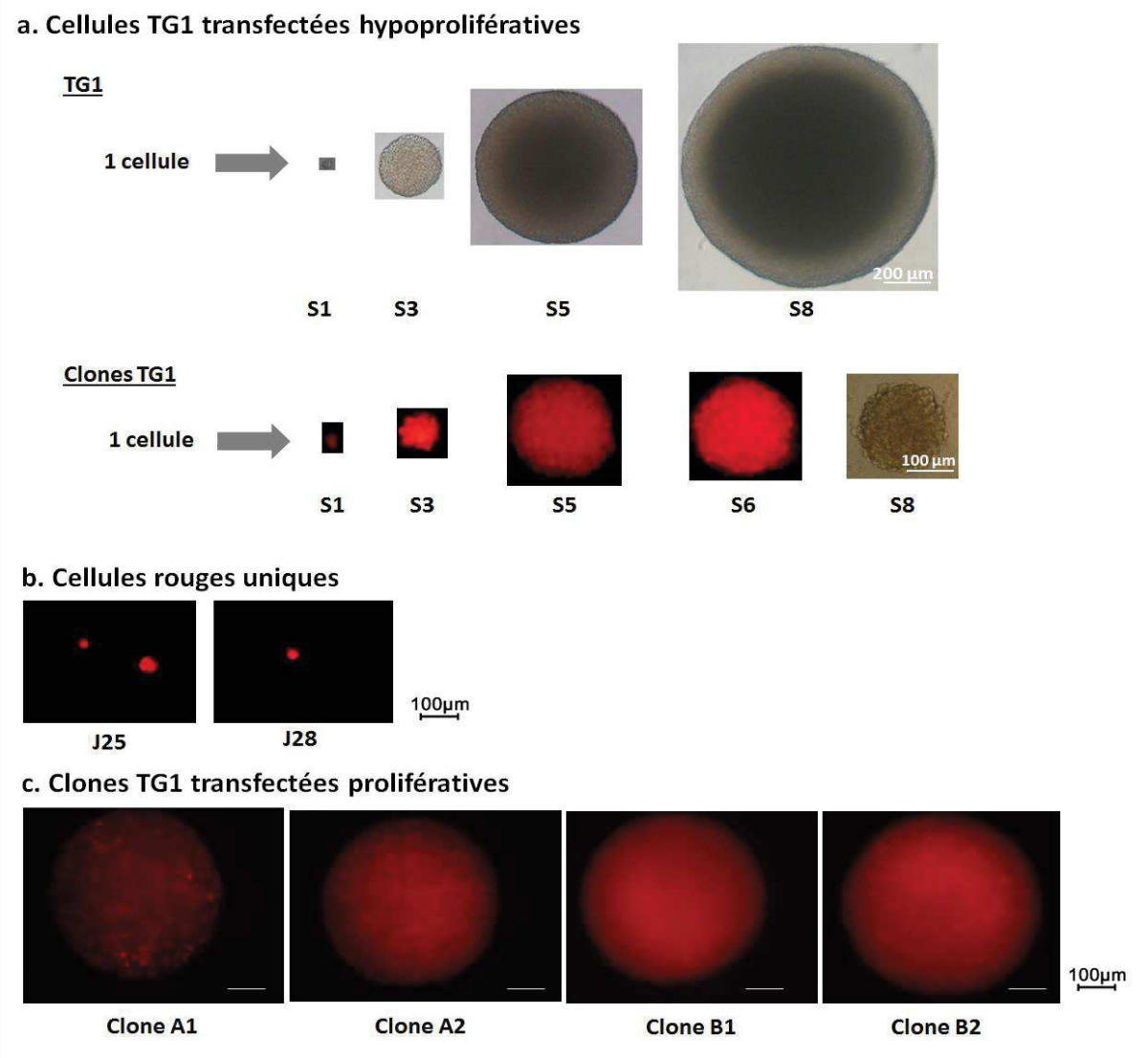


Figure 30. Suivi des cellules transfectées avec les plasmides du système commercial Santa Cruz ciblant le gène *CXCL12*.
La transfection a été réalisée selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes. Les cellules ont été sélectionnées avec de la puromycine 72h après la transfection avec les deux plasmides. Les cellules sont en culture dans du milieu NS34 et la fluorescence rouge émise la protéine RFP est observée en fonction du temps. L'évolution des cellules témoins non transfectées (et non fluorecentes) est présentée en parallèle. Trois types d'évolution sont observés. a) Cellules TG1 transfectées hypoprolifératives formant des sphères (rouges) de taille inférieure à celles obtenues à partir des cellules non transfectées (sphères grises). La croissance des cellules a été suivie pendant 8 semaines. La croissance des sphères à partir des cellules transfectées a été comparée à celle de cellules non transfectées (partie supérieure du schéma) b) Cellules TG1 transfectées présentant un phénotype non proliferatif et restant sous forme de cellules uniques. Au bout de 5 semaines, les cellules et les agrégats finissent par disparaitre. c) Cellules transfectées (rouges) formant en 5 semaines des sphères de taille similaire à celle des sphères formées par les cellules témoins non transfectées par les deux plasmides (sphères grises).

Pour aller plus avant dans l'interprétation des résultats et notamment pouvoir relier le degré de prolifération des cellules transfectées à l'invalidation du gène *CXCL12*, une analyse de l'ADN génomique des cellules est nécessaire. Cette analyse par PCR ou séquençage permet de définir le statut des cellules par rapport à l'interruption génique. En effet différentes situations sont possibles :

- Les deux allèles du gène *CXCL12* ont été invalidés (invalidation bi-allélique) et la séquence codant la protéine RFP a été insérée au niveau d'au moins un des deux allèles par HDR, l'autre allèle pouvant éventuellement avoir été réparé par NHEJ
- Un seul allèle du gène *CXCL12* a été invalidé et la séquence codant la protéine RFP a été insérée au niveau du gène par HDR
- Aucun des deux allèles du gène *CXCL12* n'a été invalidé et une recombinaison ectopique avec insertion de la séquence codant la protéine RFP en dehors du gène *CXCL12* a eu lieu.
- Enfin on ne peut exclure des coupures de l'endonucléase Cas9 en dehors de la cible associées à une recombinaison ectopique de la séquence codant la protéine RFP.

Remarque : Dans les deux premiers cas la fluorescence rouge observée n'est pas nécessairement liée à l'insertion de la séquence codant la protéine RFP au niveau du gène *CXCL12*. En effet, la coupure du gène *CXCL12* par l'endonucléase Cas9 n'est pas nécessairement suivie d'une réparation de type HDR, mais peut se faire par NHEJ (qui est un mécanisme plus favorable). Cependant comme les cellules présentent une fluorescence rouge, dans cette éventualité, la séquence codant la protéine RFP se serait insérée dans une région hors cible par un phénomène de recombinaison ectopique.

La Société Santa Cruz n'a pas fourni les outils permettant de faire une analyse simple au niveau génomique. De plus, dans le cas des cellules non prolifératives ou hypo- prolifératives la quantité de matériel était insuffisante pour réaliser les caractérisations dans de bonnes conditions.

Pour les cellules présentant une fluorescence rouge et dont la croissance était similaire à celles des cellules non transfectées (figure 30c) une mesure de l'expression de la chimiokine CXCL12 a été réalisée en quantifiant l'ARNm, ainsi que la production de protéine dans le surnageant du milieu de culture. La figure 31 montre que dans ces cellules, l'ARNm et la protéine CXCL12 sont exprimés de manière similaire à celle des cellules TG1 non transfectées suggérant que dans ces cellules l'interruption du gène *CXCL12* n'a pas eu lieu et que la fluorescence rouge (et la résistance à la puromycine) observée est le résultat d'une insertion hors cible de la séquence codant la protéine RFP, insertion qui n'affecte pas la croissance cellulaire.

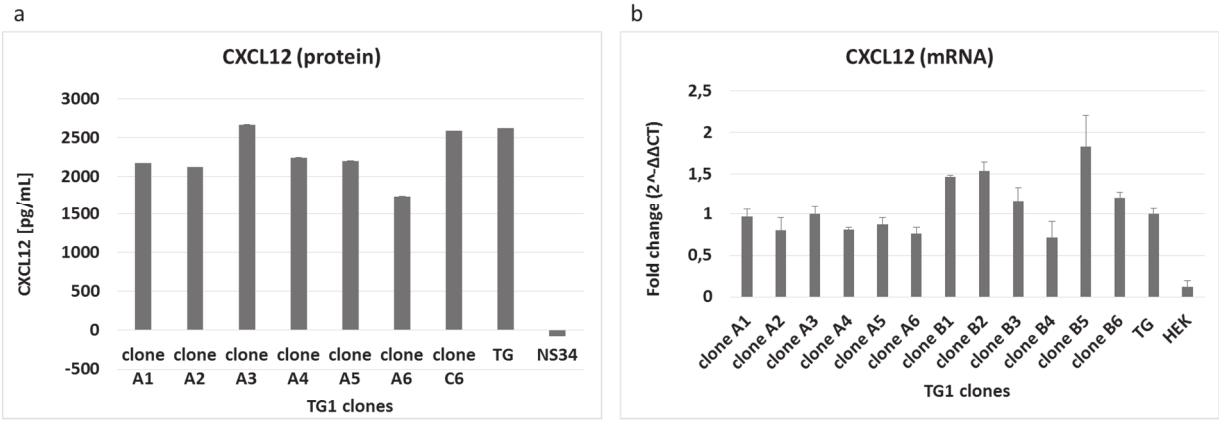


Figure 31. Expression de CXCL12 dans les cellules TG1 transfectées par le système CRISPR/Cas9 commercial et présentant un phénotype normo-proliferatif.
Les cellules normo-prolifératives présentant une fluorescence rouge (voir figure 30c) sont testées : (a) pour l'expression de la protéine CXCL12 par ELISA dans le surnageant des cellules après 7 jours en culture, (b) pour la présence de l'ARNm codant CXCL12 par RT-PCR. Les cellules poussent sous forme de tumorosphères clonales. Différentes tumorosphères (correspondant à différents clones) ont été testées. TG correspond aux cellules TG1 non transfectées (contrôle positif), HEK à des cellules HEK 293 qui n'exprime pas CXCL12, NS34 au millieu de culture seul (contrôle négatif). Pour la quantification de l'ARNm, le gène *RPLP0* est pris comme housekeeping gene et le niveau d'expression de CXCL12 dans les cellules transfectées est rapporté à celui dans les cellules non transfectées après normalisation par rapport à l'expression de RPLP0 pris comme gène de ménage et exprimé par la grandeur $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Concernant les cellules non prolifératives et hypo-prolifératives nous ne savons pas si elles correspondent à une interruption du gène *CXCL12*, respectivement, bi-allélique et mono-allélique. Il aurait fallu développer les technologies de travail sur cellule unique, mais nous avons préféré refaire les expériences d'interruption génique en utilisant un autre

système CRISPR/Cas9, non propriétaire, nous permettant de choisir les séquences d'ARNg et d'avoir une connaissance des sites de coupures. D'autre part l'insertion du gène *RFP* dans les cellules transfectées, bien que potentiellement intéressante en raison de la fluorescence des cellules transfectées, ne facilite pas l'analyse de l'ADN des cellules et pourrait être source de problèmes par la suite puisque nos résultats suggèrent une possibilté d'insertion hors cible de la séquence, ce qui induit une rupture de la relation phénotype/génotype.

2 Interruption du gène *CXCL12* des cellules TG1 par une méthode CRISPR/Cas9 non commerciale

2.1 Obtention de clones après transfection avec le plasmide pX-851 codant la Cas9 "high fidelity" (HF) et les ARNg.

Les résultats obtenus avec la technologie CRISPR/Cas9 de la société Santa Cruz (reproductibles sur plusieurs expériences), ne nous ont pas permis de déterminer le rôle de la chimiokine CXCL12 dans la croissance et la survie des CI-GBM. L'impossibilité de génotyper les cellules a rendu l'interprétation des résultats impossibles.

Nous avons donc utilisé un deuxième système CRISPR/Cas9 mis à disposition par l'équipe du Dr B. Reina San Martin, (IGBMC, Illkirch). Les principales différences par rapport au système commercial de Santa Cruz sont les suivantes :

- Possibilité de choisir la séquence des ARNg et donc connaissance des sites de coupure par la Cas9, ce qui facilite ultérieurement le génotypage par PCR
- Utilisation d'une Cas9 "high fidelity" qui diminue fortement la probabilité d'une interruption génique hors cible et évite les effets "off-target"
- Utilisation d'un seul plasmide pour la transfection. Ce plasmide code les ARNg, la Cas9 haute-fidélité et la protéine EGFP. Pas d'utilisation de plasmide codant la protéine RFP. Un mécanisme de réparation par NHEJ conduisant à des indels sera à l'origine de l'interruption génique.
- Tri et clonage des cellules transfectées grâce à la fluorescence verte de la protéine GFP exprimée de manière transitoire à partir du plasmide portant les ARNg et l'endonucléase Cas9.

Le plasmide pX-851 utilisé pour l'interruption du gène *CXCL12* dans les CI-GBM TG1 est présenté dans la figure 32. Il code deux ARNg dont les séquences sont données dans le tableau 10. Ces ARNg ciblent le début du gène *CXCL12* et induisent une coupure par la Cas9 au niveau du 5'UTR et dans le premier intron.

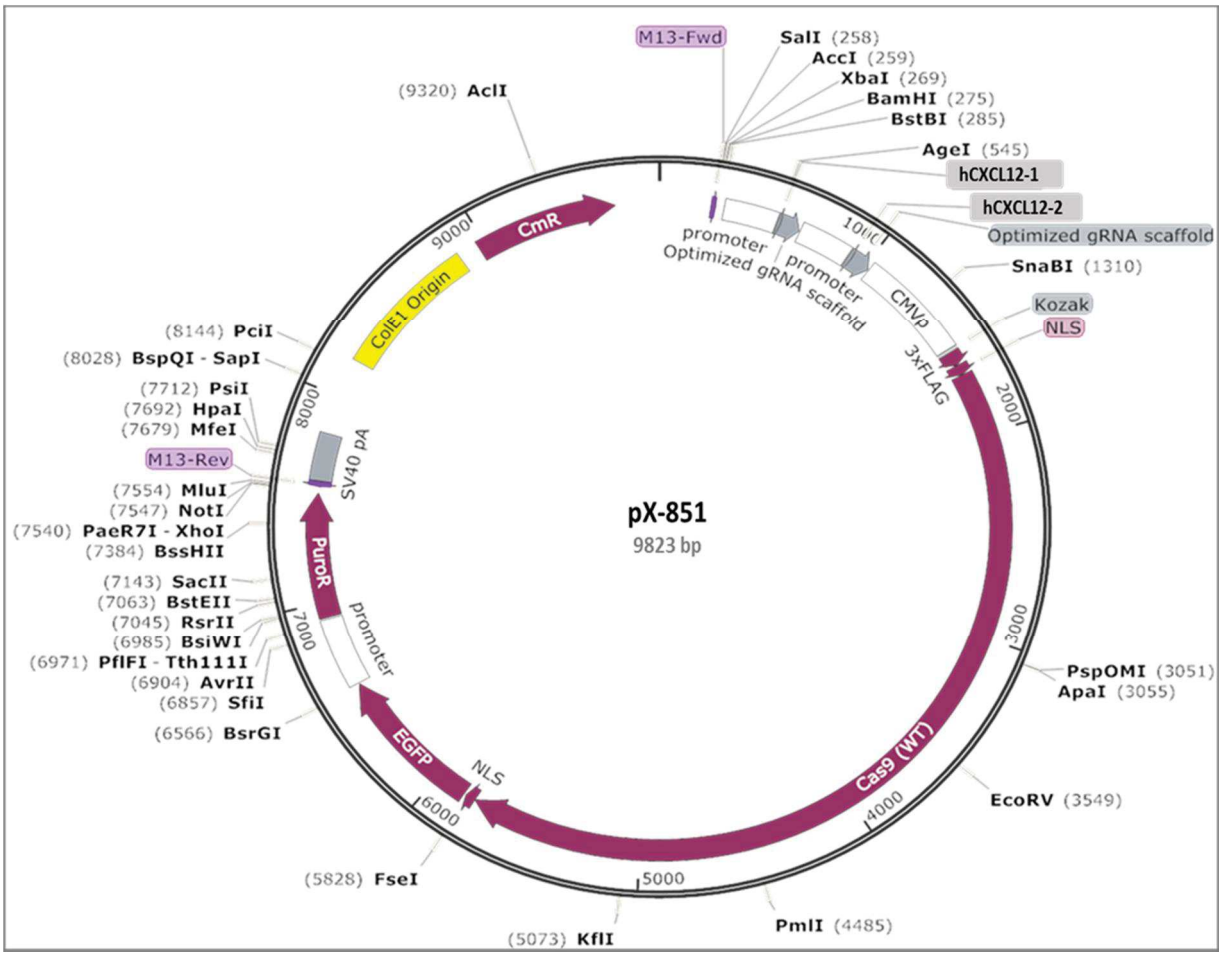


Figure 32. Plasmide pX-851 utilisé pour l'interruption génique du gène CXCL12 dans les cellules TG1.

Le plasmide code les ARN guides (gRNA) ciblant le gène CXCL12, une Cas9 HiFi sous contrôle d'un promoteur pCMV, la protéine à fluorescence verte mutée EGFP (enhanced GFP) avec une séquence de localisation nucléaire (NLS). La séquence des ARNg est donnée dans le tableau 10. Le plasmide ne présente pas d'origine de réplication eucaryote. Conception et construction du plasmide réalisé par le Dr B. Reina San Martin, IGBMC, Illkirch.

Quarante-huit heures après la transfection avec le plasmide pX-851, un plasmide transitoire, sans origine de réplication eucaryote, les cellules TG1 ont été triées par FACS et les cellules présentant une fluorescence verte ont été réparties dans des plaques 96 puits à raison de 1 cellule par puits. La croissance des cellules a été déterminée en suivant la formation de tumorosphères clonales dans les puits. 63 clones ont été obtenus à partir des 3 plaques 96 puits ensemencées (288 puits au total). Des clichés d'un échantillon de ces clones, 23 jours après l'ensemencement dans les plaques, sont présentés dans la figure 33. On observe que la croissance des clones n'est pas uniforme. En effet, la taille des tumorosphères correspondant aux clones C10, C34, C35 et C36 est inférieure à celle des clones C9, C16, C22 et C20.

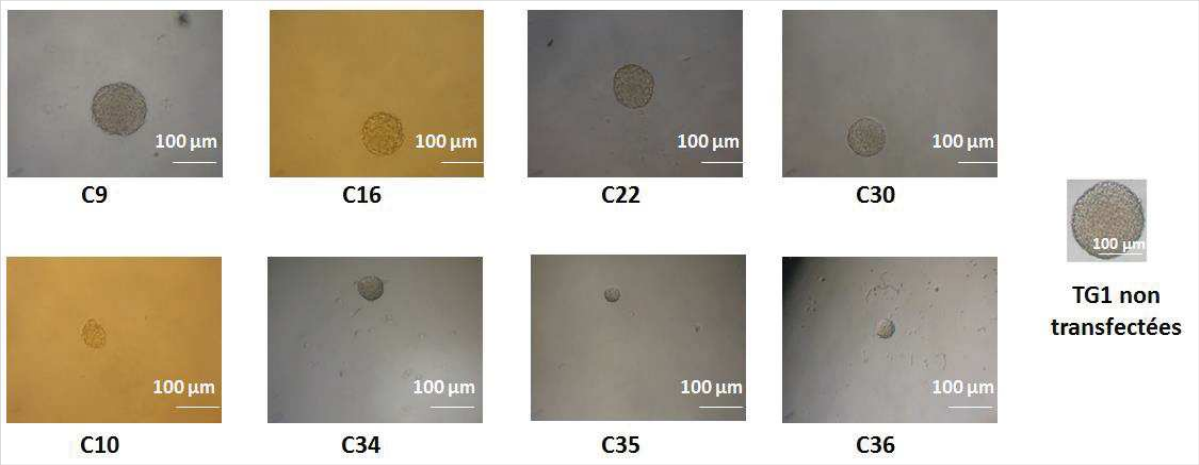


Figure 33.Tumorosphères clonales obtenues après transfection des cellules TG1 avec le plasmide pX-851.

Au jour 3 après la transfection des cellules TG1, les cellules sont triées par FACS et ensemencées individuellement dans des plaques 96 puits. Trois plaques (soit 288 puits) ont été ensemencées. Des tumorosphères clonales se sont développées dans 63 puits. La figure présente un échantillon de 8 clones sur les 63 clones. Les photos des sphères sont prises après 23 jours en culture dans du milieu NS34 à 37 °C. Echelle : 100 µm.

2.1.1 Caractérisation des tumorosphères clonales obtenues après transfection des cellules TG1 avec le plasmide pX-851 et identification des clones présentant une interruption du gène *CXCL12*.

Un certain nombre de clones ont été testés afin de définir leur statut par rapport l'interruption du gène *CXCL12*. Ces clones ont été analysés en utilisant trois méthodes :

- la PCR réalisée sur l'ADN génomique extrait des cellules
- la méthode ELISA pour mesurer la production de la protéine CXCL12
- Le séquençage de la région d'ADN ciblée par la Cas9 HiFi et les ARNg.

2.1.1.1 Analyse par PCR des clones obtenus après transfection des cellules TG1 avec le plasmide pX-851

Pour tester l'interruption du gène *CXCL12* dans les cellules transfectées, des réactions de PCR ont été réalisées avec des amorces s'hybridant de part et d'autres des régions cibles des ARNg et de la Cas9 HiFi. Des couples d'amorces établis à partir de 3 amorces sens (CXCL12 Fwd 1_3) et de 3 amorces antisens (CXCL12 Rev 1_3) ont été testés, à différentes températures d'hybridation, sur les cellules TG1 non transfectées afin de déterminer les conditions conduisant à un produit de PCR à la taille attendue. La séquence des amorces, la taille des amplimères attendus avec l'ADN sauvage en fonction du couple d'amorces et la

localisation théorique des sites d'hybridation des amorces sur l'ADN génomique sont données dans le tableau 12 et la figure 34.

Screening Primers CXCL12	Sequence (5'-3')		
CXCL12-Fwd1	CCGCCCGGGACTAACTTGTTTGCTTTTCATTGG		
CXCL12-Fwd2	CTCGGGAGCACAGAGGGAGCGGAGGAG		
CXCL12-Fwd3	CCCCGCCTGGCTCTCCCCTCTAAAG		
CXCL12-Rev1	CTCGCTCTGCAGCCAGCTTGAGGTCAGG		
CXCL12-Rev2	CGCCTTCCCGCGCCAGTCCCGAACG		
CXCL12-Rev3	GCGCAGCAGGACCTCGGAGCCCATTC		
Germline	CXCL12-Rev1	CXCL12-Rev2	CXCL12-Rev3
CXCL12-Fwd1	829 bp	892 bp	1004 bp
CXCL12-Fwd2	574 bp	637 bp	749 bp
CXCL12-Fwd3	438 bp	501 bp	613 Bp

Tableau 12. Séquences des amorces de PCR testées et taille théorique des amplimères.
Les amorces sens (Fwd) et antisens (Rev) ont été utilisées pour tester l'interruption du gène *CXCL12* dans les clones de cellules TG1 transfectées avec le plasmide pX-851. La taille des amplimères indiquée dans le tableau correspond à celle attendue pour chaque couple d'amorces en utilisant l'ADN des cellules TG1 non modifiées comme matrice.

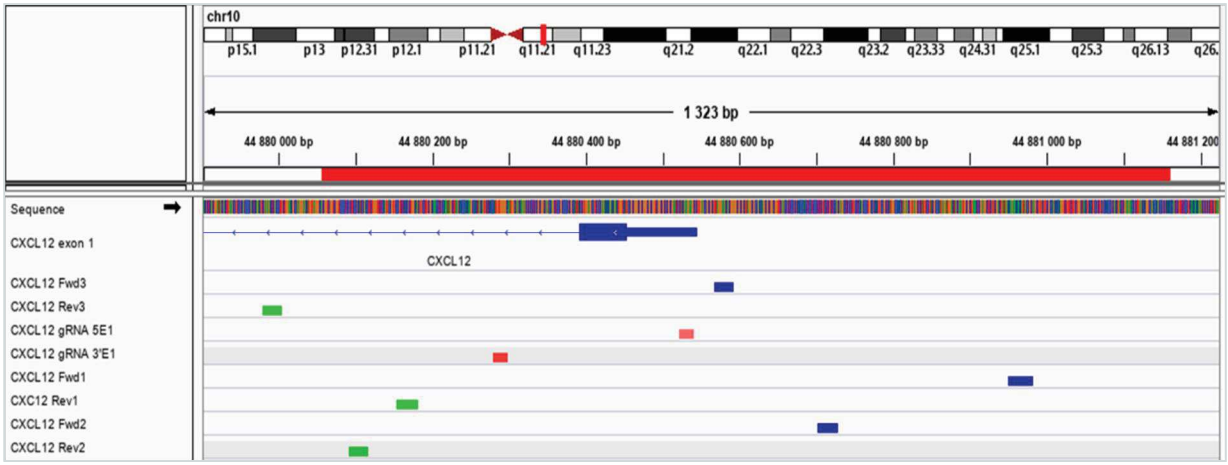


Figure 34. Alignement sur l'ADN génomique humain des ARNg et des amorces de PCR utilisées pour tester l'interruption génique dans les clones de cellules TG1 transfectées.
Le haut de la figure indique la position du gène *CXCL12* sur le chromosome 10. Un agrandissement sur un segment de 1323 pb comprenant le premier exon et le début du premier intron de *CXCL12* est ensuite présenté. En dessous, les rectangles de couleurs indiquent : en rouge les régions d'alignement des ARNg, en bleu les différentes amorces sens (Fwd) et en vert les différentes amorces antisens (Rev) testées (cf tableau 12).

Lors du test des amorces à des températures d'hybridation entre 60 °C et 70 °C sur l'ADN génomique de cellules TG1 contrôles non transfectées, le couple d'amorces CXCL12-Fwd3/CXCL12-Rev3 a donné les meilleurs résultats (bande nette, à la taille attendue de 600 pb). Ce couple d'amorces a ensuite été choisi pour tester les différents clones de cellules TG1 transfectées avec le plasmide pX-851.

Après coupure de l'ADN sur les deux brins, la cellule engage généralement un processus de réparation par NHEJ qui donne lieu à des insertions/délétions (Indels). Ces Indels peuvent en principe être mis en évidence par PCR. En effet la taille de l'amplimère obtenu avec des amorces situées de part et d'autre des sites de coupures diffère théoriquement selon que la matrice soit de l'ADN sauvage ou muté, bien que l'on ne puisse pas prédire la taille des Indels générés par la réparation NHEJ (de quelques nucléotides à une centaine de nucléotides). De plus, cette taille peut varier pour chacun des allèles.

Si les deux allèles ont été modifiés, on peut s'attendre, sur un gel d'électrophorèse, à la disparition de la bande de PCR correspondant à l'amplimère "sauvage" et l'apparition d'une ou de deux bandes correspondant aux amplimères "mutés". Si un seul allèle a été muté, la bande correspondante à l'amplimère sauvage est maintenue et une deuxième bande apparait, les deux bandes présentant en principe des intensités équivalentes.

L'ADN a été extrait de 33 clones sur les 63 obtenus après transfection des cellules TG1 avec le plasmide pX-851. Les résultats des PCR réalisés sur ces ADN avec le couple d'amorces CXCL12-Fwd3/CXCL12-Rev3 sont présentés dans la figure 35. On remarque que tous les clones testés présentent une bande de PCR intense (bande 1) migrant au même niveau (~600 pb) que le contrôle positif C+ (ADN des cellules TG1 non transfectées avec le plasmide). Certains clones (C1, C4, C5, C7, C10, C19) présentent une bande supplémentaire de taille inférieure (bande 2). Cependant ces bandes sont moins intenses que la bande majoritaire à 600 pb. D'autres bandes d'intensité plus faible sont aussi visibles, y compris dans le contrôle C+ "sauvage"

La présence dans tous les clones de la bande de PCR migrant comme celui de l'ADN sauvage laisse penser qu'aucun des 33 clones ne présente une interruption génique sur les deux allèles du gène *CXCL12*. Cependant ce manque d'efficacité du système était surprenant au vu de l'expérience acquise au laboratoire de l'IGBMC. D'autre part, dans l'hypothèse d'une interruption mono-allélique dans certains clones, l'intensité des bandes observées n'était pas en adéquation avec ce qui était attendu, c.à.d. deux bandes d'intensité similaires. Etant donné que nous travaillons sur des cellules cancéreuses, il était également envisageable que les cellules TG1 présentant plus de deux copies du gène CXCL12. Cependant, ces cellules ne présentaient pas de polysomie pour le chromosome 10.

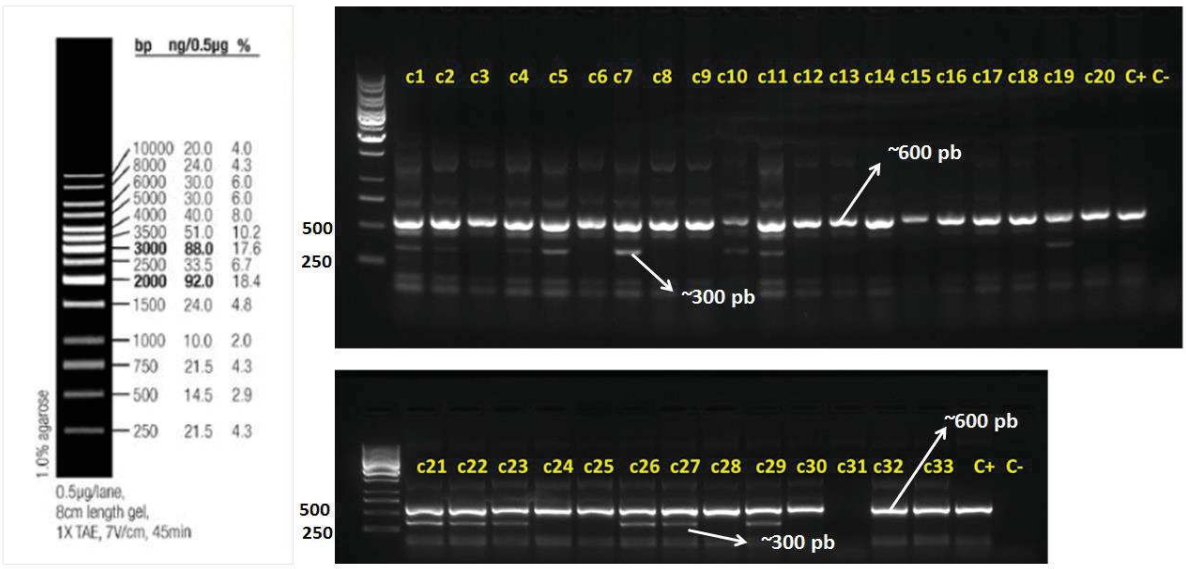


Figure 35. Génotypage des clones issus de cellules TG1 transfectées avec le plasmide pX-851.

La PCR a été réalisée sur l'ADN génomique extrait de 33 clones issus de cellules transfectées en utilisant le couple d'amorces CXCL12-Fwd3/CXCL12-Rev3 (voir tableau 12 pour les séquences) et une température d'hybridation de 60 °C. C1 à C33 désignent les différents clones; C+ : le contrôle positif (TG1 non transfectées); C- : contrôle négatif (eau). La bande la plus intense migre à ~600 pb. Une deuxième bande migrant à ~300 pb est présente dans certains clones. La migration a été faite sur un gel d'agarose à 1,2 %. A gauche sur la figure, le marqueur de taille GeneRuler 1 Kb de la Société Thermo Scientific™.

Pour aller plus avant dans l'analyse des clones, nous avons examiné la production de la protéine CXCL12.

2.1.1.2 Expression de la protéine CXCL12 dans les clones de cellules TG1 transfectées avec le plasmide pX-851

Un test ELISA a été réalisé pour mettre en évidence la protéine CXCL12 dans le surnageant de culture des différents clones C1 à C36 obtenus après transfection des cellules TG1. Les résultats sont présentés dans la figure 36. Le clone C9 exprime la protéine le plus fortement (1350 pg/mL ± 0,0091). D'autres clones l'expriment plus modérément (100 – 500 pg/mL ± 0,0021 – 0,0056) ou très faiblement (4 – 40 pg/mL ± 0,0007 – 0,0028). Enfin dans 15 clones (C2, C4, C10, C11, C12, C13, C15, C21, C24, C25, C26, C29, C33, C35 et C36) la chimiokine CXCL12 n'a pas été détectée dans le surnageant. Tous ces clones présentaient cependant une bande de PCR migrant comme celle de l'ADN sauvage lors du génotypage (figure 35). A ce stade la seule méthode pouvant clarifier la situation est le séquençage.

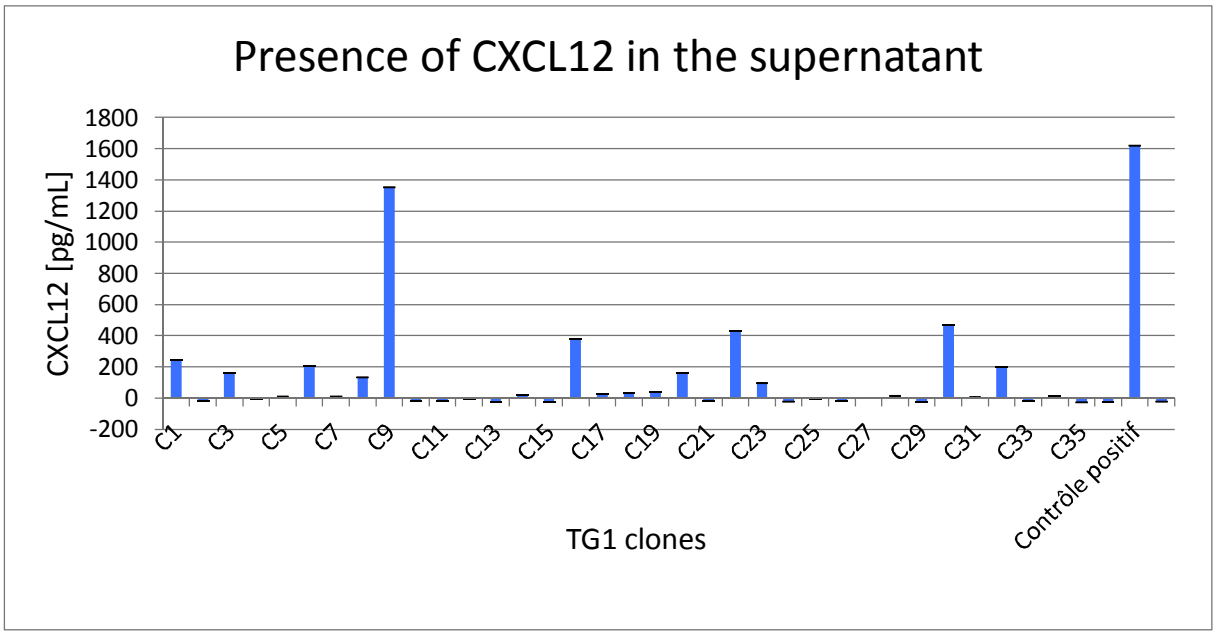


Figure 36. Mise en évidence de l'expression de la protéine CXCL12 dans le surnageant de cultures des différents clones de cellules TG1 transfectées.
Pour chacun de clones C1 à C36, la détection de la protéine dans le surnageant a été effectué par ELISA (DuoSet ELISA DEVELOPMENT SYSTEM, R&D systems) après 7 jours de culture pour environ 500K cellules TG1 transfectées. Pour le témoin positif, le test a été réalisé à partir du surnageant de 500K de cellules TG1 non transfectées (WT). Contrôle négatif : milieu NS34 frais.

2.1.1.3 Séquençage de clones de cellules TG1 transfectées avec le plasmide pX-851

Des réactions de séquençage ont été réalisées sur les produits de PCR de clones de cellules TG1 transfectées n'exprimant pas la protéine CXCL12 et présentant lors du génotypage par PCR soit uniquement la bande sauvage « Clones : C9, C12, C24 », soit deux bandes (l'une migrant comme celle de l'ADN sauvage et l'autre de taille inférieure) « Clones : C2, C4, C13, C16, C25, C33 ». Les bandes issues de réactions de PCR avec les amorces CXCL12-Fwd3/CXCL12-Rev3 à une température d'hybridation de 60 °C ont été découpées des gels d'agarose, extraites puis séquencées par le service GATC de la société Eurofins Genomics. La lecture et l'analyse des séquences ont été effectuées avec les deux logiciels : SnapGene Viewer version 4.2.5 et Intergrative Genomics Viewer (IGV) version 2.5.2. Pour les cellules TG1 non transfectées, l'analyse de la séquence de la bande "sauvage" migrant à ~600 pb (taille théorique attendue 613 pb, voir tableau 12) a montré une double séquence, l'une correspondant à celle du gène *CXCL12* et une seconde parasite correspondant à un produit d'amplification non spécifique voir annexe V.

De nouvelles conditions de PCR ont été testées pour augmenter la spécificité de la réaction et éliminer la bande parasite. Différentes températures d'hybridation des amorces CXCL12-Fwd3/CXCL12-Rev3 ont été testées à 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C et 67 °C et la température d'hybridation de 65 °C fut choisie pour l'analyse de l'ADN génomique des cellules TG1 non transfectées avec le plasmide et de celui des clones C15, C35 et C36. La figure 37 montre les

produits de PCR obtenus dans ces conditions. Pour chacun des clones C35 et C36, les deux bandes d'ADN majeures ont été découpées et séquencées (C35a et C35b pour le clone C35 et C36a et C36b pour le clone C36).

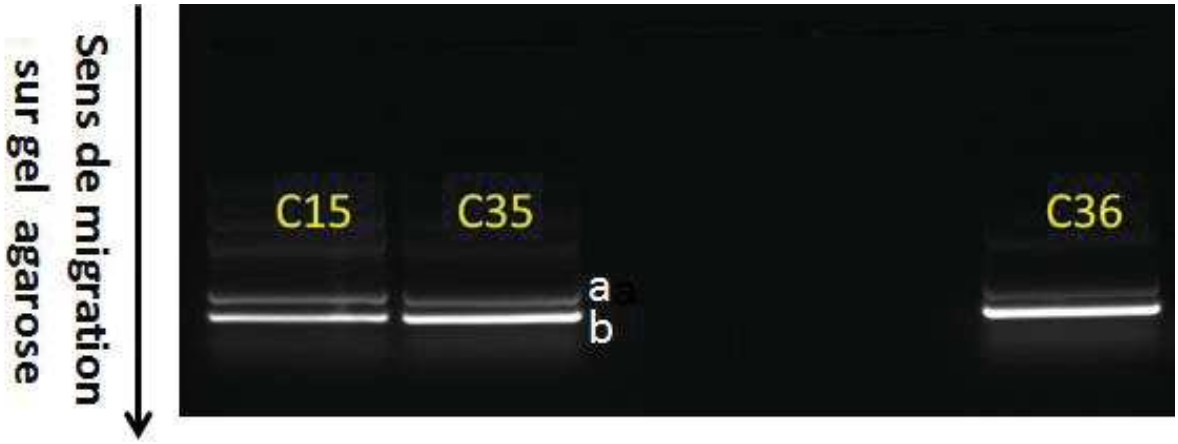


Figure 37. Génotypage par PCR du gène CXCL12 des clones C15, C35 et C36 de cellules TG1 transfectées avec le plasmide pX-851.
La PCR a été réalisée avec les amorces CXCL12-Fwd3 et CXCL12-Rev3 (Tableau 12 pour les séquences) à une température d'hybridation 65 °C. La migration a été faite sur un gel d'agarose à 1,2 %. La taille de la double bande d'ADN obtenu par PCR des clones C15, C35 et C36 est aux alentours de 300 pb.

Les séquences (annexe VI et figure 38) ont été alignées sur la séquence du génome humain (figure 38). Les séquences des deux fragments de PCR s'alignent sur la région 5' du gène *CXCL12*. Sur cet alignement, on constate une délétion, dans la séquence de toutes les bandes de PCR au niveau des régions ciblées par la Cas9 HiFi, d'environ 250 pb qui correspond à la distance entre les deux sites de coupure de l'enzyme. Pour les deux bandes C35b et C36b la taille exacte des indels a pu être déterminée. Pour la bande C35b il s'agit d'une délétion de 255 pb. Pour la bande C36b, il s'agit d'une délétion de 258 pb avec une insertion de 3pb.

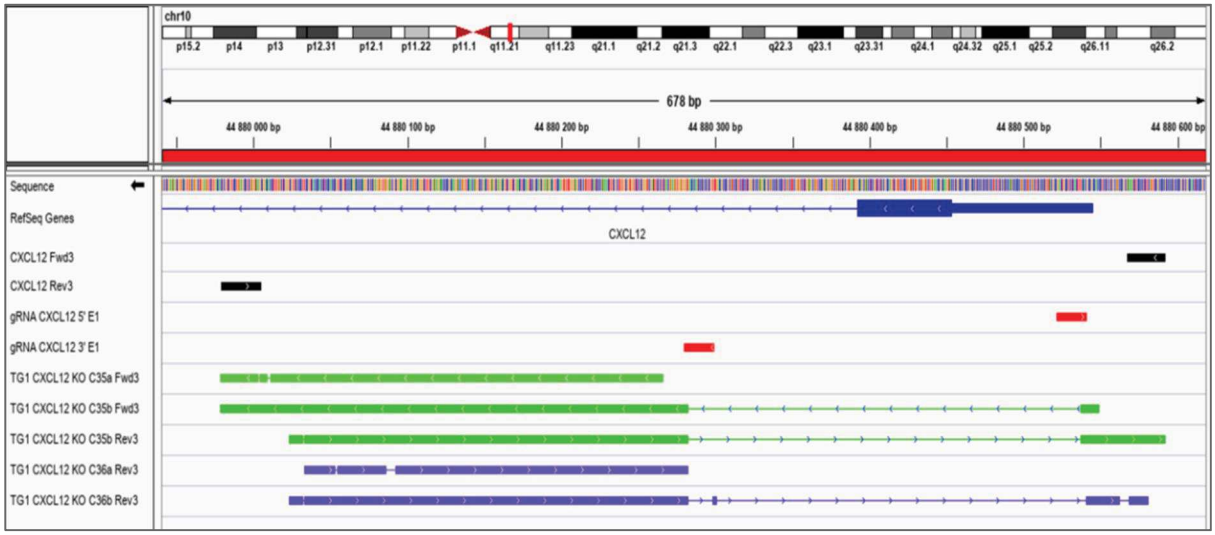


Figure 38. Analyse des résultats du séquençage des clones 35 et 36 obtenus après transfection de cellules TG1 avec le plasmide pX-851.

Les bandes de PCR correspondant aux clones 35 et 36 (figure 37) ont été découpées et extraites du gel d'agarose, puis séquencées par le service GATC (société Eurofins Genomics). Pour chaque clone, les deux fragments de PCR présents sur le gel de la figure 37 ont été séquencés en utilisant les amorces de PCR CXCL12-Fwd3 et CXCL12-Rev3. La ligne 'RefSeq gene' présente le premier exon et le début du premier intron de CXCL12. Les lignes "CXCL12-Fwd3" et "CXCL12-Rev3" présentent l'alignement des amorces de PCR sur la séquence de *CXCL12*. Les lignes "gRNA CXCL12 5'E1 et gRNA CXCL12 3'E1" présentent l'alignement des ARNg. (TG1 CXCL12 KO-C35a)/Fwd3, C35b/Fwd3 et C35b/Rev3 présentent l'alignement des séquences des bandes a et b du clone 35 pour un séquençage réalisé avec les amorces CXCL12-Fwd3 et CXCL12-Rev3. (TG1 CXCL12 KO-C36a)/Rev3 et C36b/Rev3 correspondent à l'alignement des séquences des deux bandes du clone 36 pour un séquençage avec l'amorce CXCL12-Rev3. L'alignement des séquences est visualisé avec le logiciel Intergrative Genomics Viewer (IGV) version 2.5.2.

D'après les résultats du séquençage, on peut considérer que les deux bandes de PCR (a et b) pour chacun des clones C35 et C36 représentent les deux allèles du gène *CXCL12* modifié par CRISPR/Cas9. Selon le clone et l'allèle, la position de la coupure par rapport au PAM (protospacer adjacent motif) peut varier de quelques nucléotides (3 à 6 nucléotdes) et la réparation par NHEJ peut être légèrement différente. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les deux clones C35 et C36 avec un phénotype hypoprolifératif par rapport aux cellules TG1 non transfectées (figure 33) présentent une interruption génique bi-allélique du gène *CXCL12*. Ces clones seront dénommés **TG1 CXCL12 KO.**

2.2 Croissance des cellules TG1 CXCL12 KO

2.2.1 Culture dans des conditions non clonales

Pour tester l'interruption génique de *CXCL12* sur la croissance, des cellules TG1 et TG1 CXCL12 KO ont été mises en culture dans des conditions non clonales et ensemencées à raison de 600 cellules jusqu'à 19200 cellules par puits puits et le taux d'ATP a été mesuré tous les 3 jours jusqu'au jour 9. Le temps de doublement a été déterminé à partir des courbes de croissance. Les cellules TG1 CXCL12 KO présentent des temps de doublement similaires à celui des cellules TG1 (entre 1,4 et 1,8 jours pour un ensemencement de 600 cellules/puits). Ce temps de doublement augmente légèrement avec le nombre de cellules ensemencées pour atteindre des valeurs de 2,5 à 2,8 jours, de manière similaire pour les cellules TG1 et TG1 CXCL12 KO. Ce ralentissement peut être lié au mode de croissance sous forme de neurosphères. En effet les neurosphères qui se forment sont issus de neurosphères qui se développent indépendamment les unes des autres par division cellulaire, mais aussi de la fusion de neurosphères ou de la coalescence de cellules ou petits amas cellulaires avec des sphères en suspension. Ces deux derniers phénomènes augmentent avec la densité cellulaire.

D'après la figure 39, les cellules CXCL12 KO du clone C36 semblent croitre legèrement plus rapidement que les cellules CXCL12 KO du clone C35 et les cellules TG1. Cependant il serait nécessaire de répéter l'expérience pour s'assurer que cette différence soit statistiquement significative.

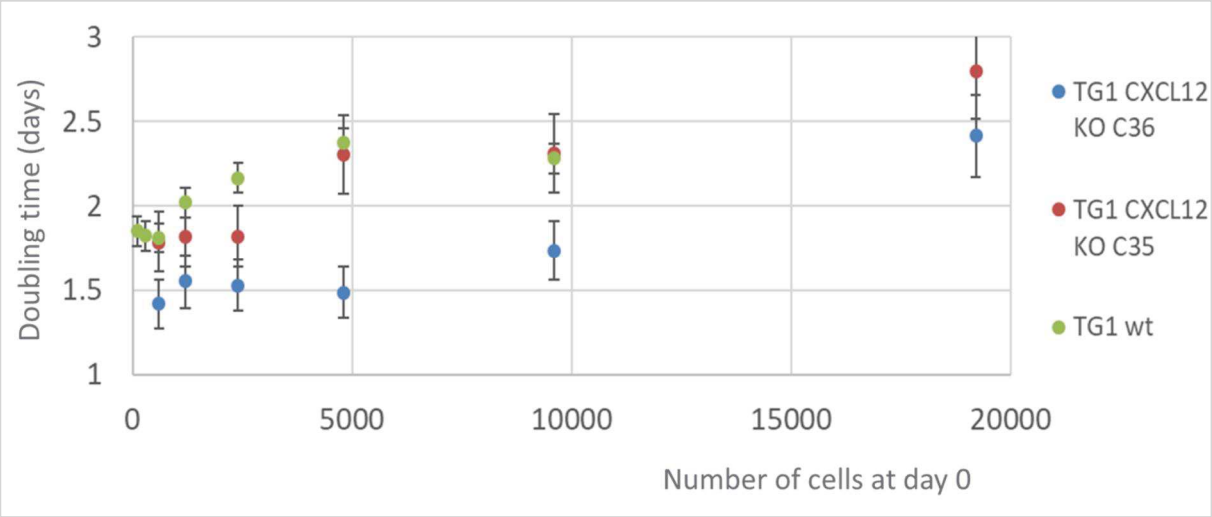


Figure 39. Temps de doublement des cellules TG1 CXCL12 KO par rapport aux cellules TG1 wt.

Les cellules ont été ensemencées à différentes densités (de 600 jusqu'à 20 000 cellules/puits) et les temps de doublement ont été mesurés à partir des courbes de croissance (sur 9 jours).

2.2.2 Formation des tumorosphères clonales

Les cellules TG1 CXCL12 KO clones C35 et C36 ont été ensemencées à raison d'une cellule par puits et la formation des tumorosphères a été observée sur une période de 3 semaines (figure 40). Au bout de 3 semaines, les sphères formées à partir de TG1 CXCL12 KO ont un diamètre de 31 à 36 µm contre 150 µm pour les sphères contrôles TG1, soit une diminution de taille d'un facteur 4 à 5, indiquant que bien que la chimiokine n'affecte pas le temps de doublement des cellules dans des conditions de culture non clonales, elle joue un rôle dans la croissance des tumorosphères. On peut émettre l'hypothèse que CXCL12 est un des facteurs sécretés par les cellules qui, directement ou indirectement, favorise la croissance des cellules isolées.

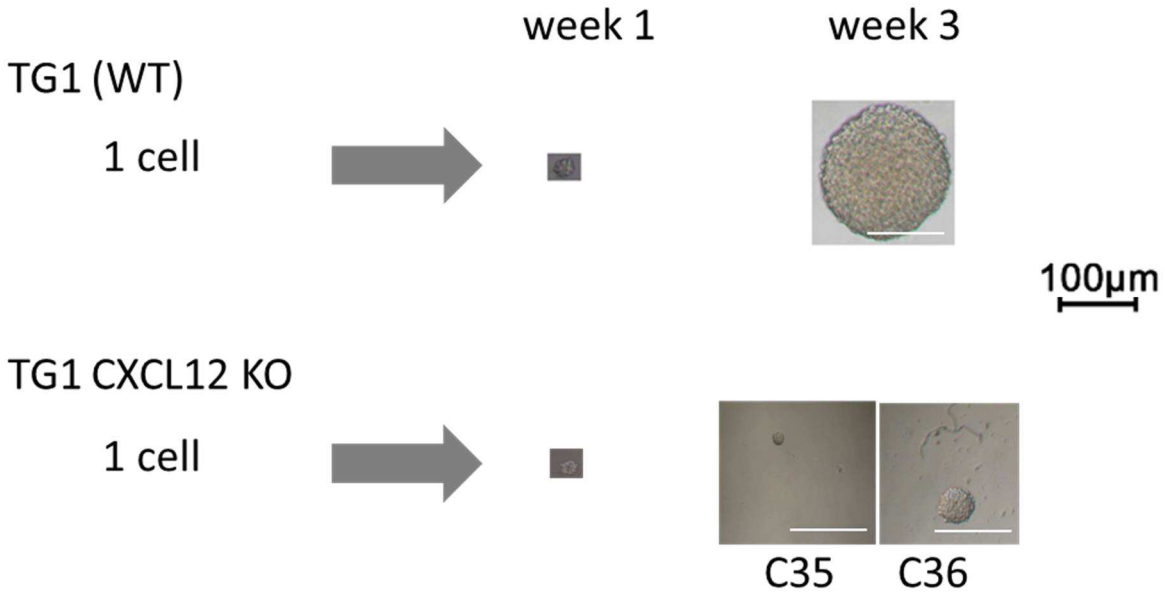


Figure 40. Tumorosphères des cellules TG1 et des clones C35 et C36 CXCL12 KO après trois semaines de culture.
Dans une plaque Greiner 96 puits les cellules ont été ensemencées à une densité d'une cellule/puits dans 200 µL de milieu NS34 sans sérum, en présence de FGF et d'E GF. Le milieu est renouvelé une fois par semaine. Les sphères sont présentées à 1 semaine et à 3 semaines.

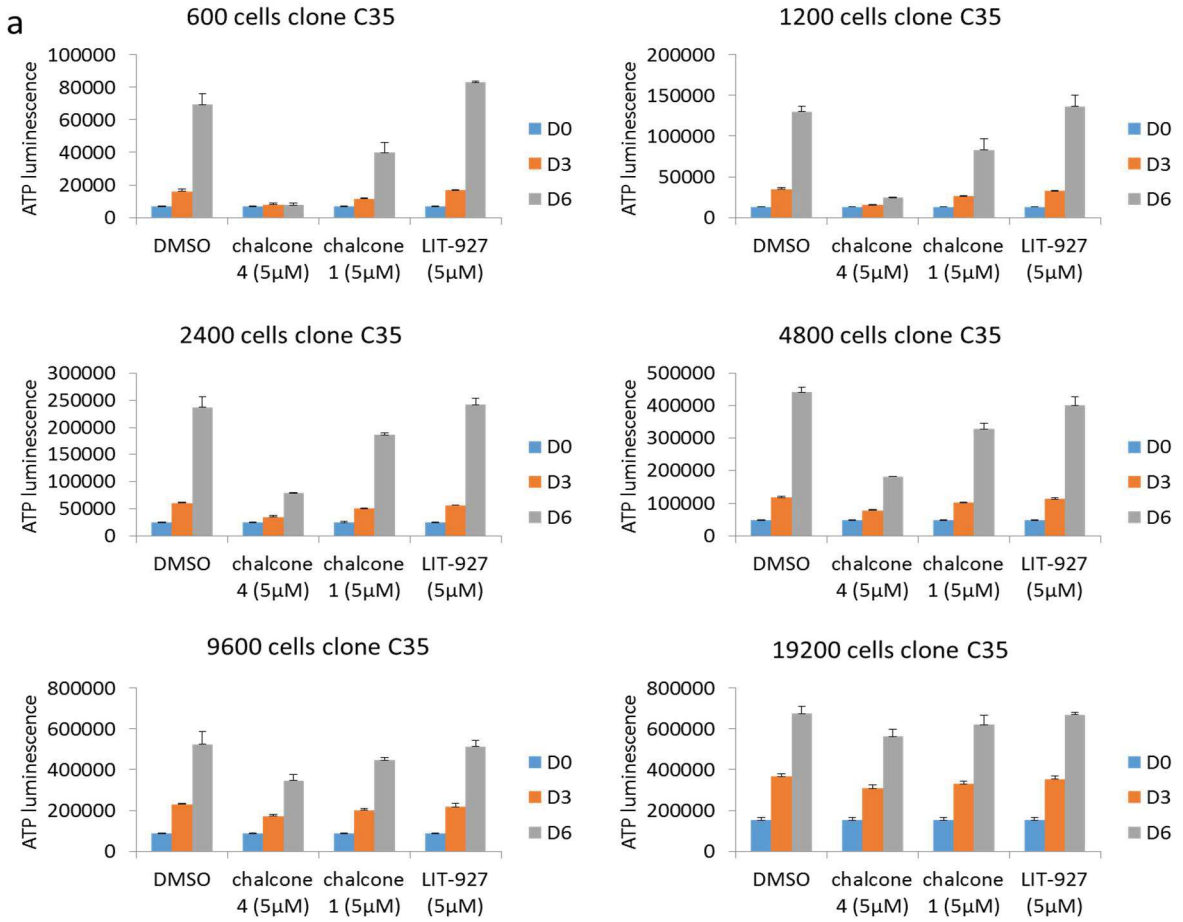
2.2.3 Effet des molécules chalcones sur la prolifération de cellules TG1 CXCL12 KO et la formation des sphères

Au début de ce travail nous avions utilisé les chalcones et notamment les chalcones 4 et LIT-927, neutraligands de la chimiokine CXCL12 comme outil pharmacologique pour tester le rôle de la chimiokine dans la croissance des cellules tumorales. L'obtention des cellules TG1 CXCL12 KO va nous permettre de tester si l'effet des différentes chalcones sur la prolifération cellulaire est dépendant de la chimiokine.

2.2.3.1 Effet des chalcones sur la prolifération des clones des cellules TG1 CXCL12 KO

Les molécules chalcones 1, 4 et LIT-927 ont été testées pour leur effet sur la prolifération des clones C35 et C36 de cellules TG1 CXCL12 KO par mesure du taux d'ATP cellulaire de manière analogue à ce qui a été réalisé pour les cellules TG1 (figure 23). Les molécules ont été rajoutées à une concentration de 5 µM aux cellules ensemencées à différentes concentrations et la viabilité des cellules a été mesurée.

Un effet inhibiteur marqué de la chalcone 4 sur la croissance des cellules est observée pour une faible quantité de cellules ensemencées (jusqu'à 9600 cellules). La chalcone 1 présente un effet inhibiteur moins marqué, alors que la LIT-927 n'a aucun effet (figure 41 voir aussi figure 45 dans annexe VII). Ce résultat est similaire à celui observé précédemment pour les cellules TG1 (WT) (figure 23).



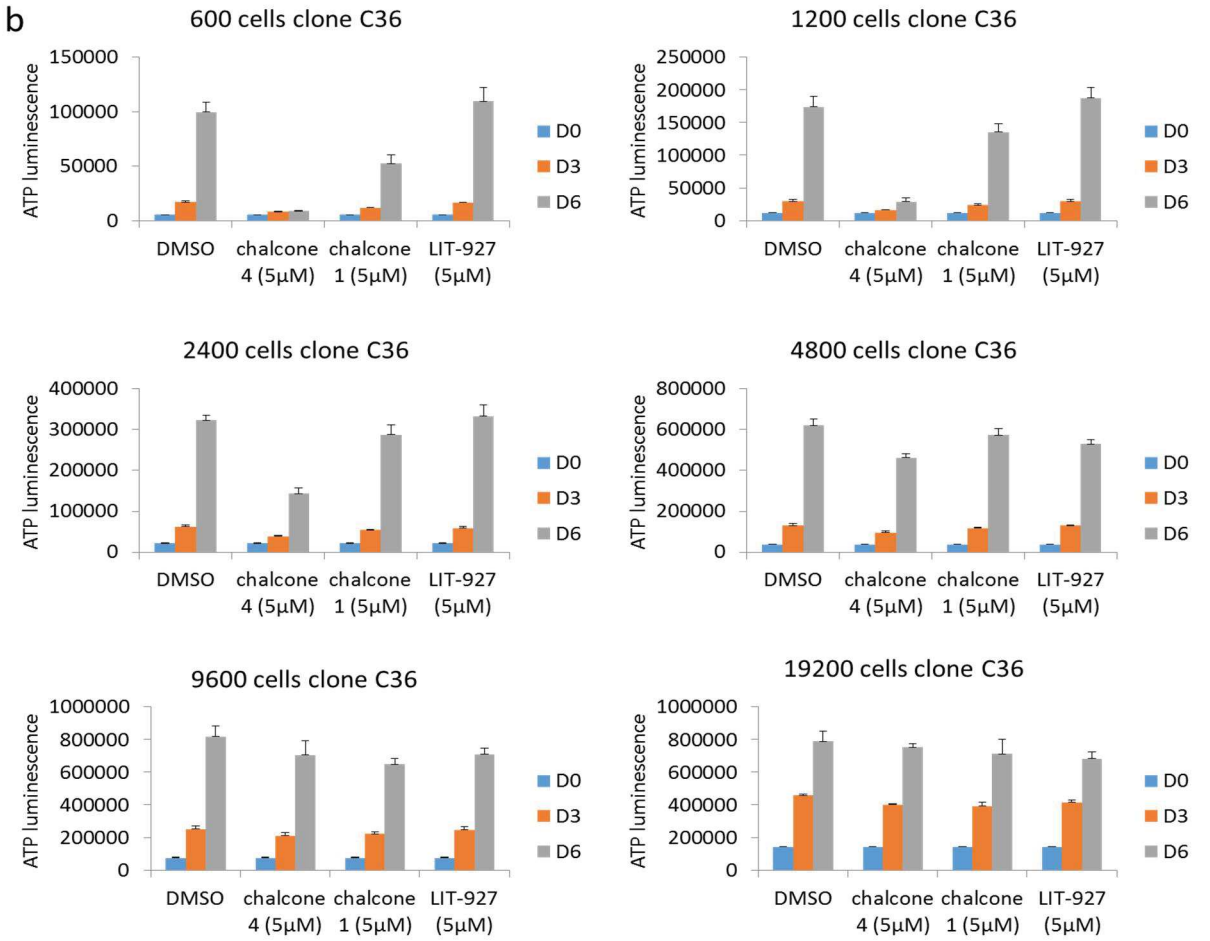


Figure 41. Effet des molécules chalcones sur la croissance des clones C35 (a) et C36 (b) de cellules TG1 CXCL12 KO.

Les cellules ont été ensemencées à différentes densités dans une plaque Greiner 96 puits. Les molécules chalcones ont été ajoutées à une concentration finale de 5 µM. Chaque puits contient une concentration de DMSO de 0,1 %. Aux différents temps Jour 0 (D0), Jour 3 (D3) et Jour 6 (D6) l'ATP cellulaire a été mesuré à l'aide du test CellTiter-Glo® 2.0 Assay qui conduit à une émission de luminescence. Tous les 3 jours le milieu de culture NS34 est renouvelé en conservant la concentration de chalcones à 5 µM et le DMSO à 0,1 %. Chaque condition est réalisée en triplicat.

2.2.3.2 Effet des chalcones 1, 4, LIT-927 sur la formation des tumorosphères clonales des lignées TG1 CXCL12 KO

Nous avons testé l'effet des différentes molécules chalcones sur la capacité des clones TG1 CXCL12 KO à générer des tumorosphères clonales à partir d'une cellule en culture.

Les cellules ont été dissociées et ensemencées à une cellule par puits, la formation des tumorosphères clonales a été testée en absence (0 µM) et en présence des chalcone 1, 4 et LIT-927 à une concentration de 5 µM, pendant trois semaines à 37 °C (figure 42). Les

expériences menées en absence de chalcones sur les cellules TG1 wt et les cellules TG1 CXCL12 KO montrent que l'interruption du gène *CXCL12* ralentit considérablement le développement des tumorosphères. Dans les conditions expérimentales utilisées, la chalcone 4 et la chalcone 1 à 5 µM agissent de manière similaire sur les cellules TG1 wt et TG1 CXCL12 KO (clones C35 et C36) en inhibant totalement la formation des sphères. La chalcone LIT-927 à 5 µM ne présente aucun effet sur la formation et le développement des sphères qu'elles soient issues de cellules TG1 wt ou KO pour *CXCL12*. Ces résultats suggérent que l'effet inhibiteur des chalcones 1 et 4 sur la prolifération cellulaire et la formation des tumorosphères est indépendante de la présence de la chimiokine CXCL12 endogène. En corrolaire, les activités neutraligands des chalcones 4 et LIT-927 ne s'exercent pas sur la chimiokine CXCL12 produite de manière endogène par les CI-GBM..

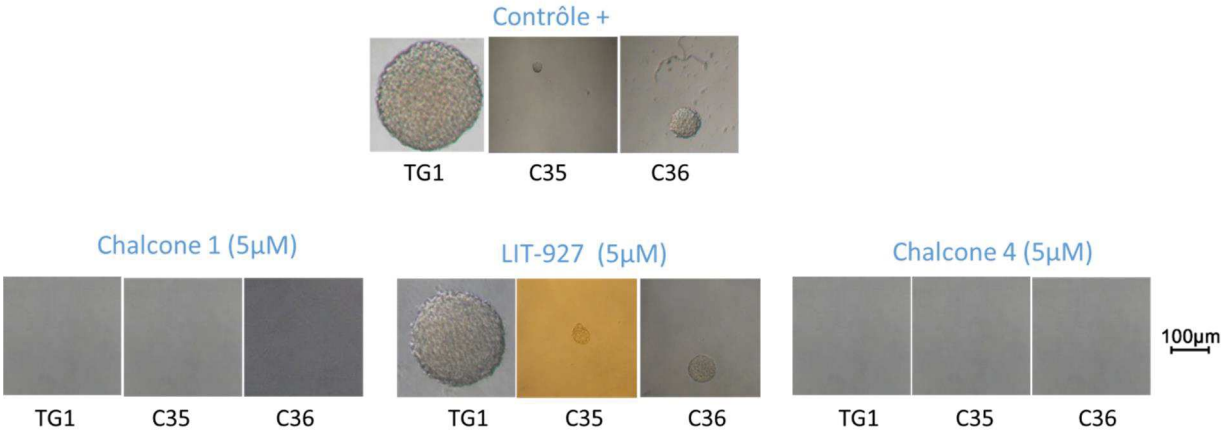


Figure 42. Effet des molécules chalcones sur le développement de tumorosphères clonales de cellules TG1 et TG1 CXCL12 KO.
Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à raison d'une cellule/puits en moyenne (dilution limite) dans 200 µL de milieu NS34 a) en absence de composé (contrôle DMSO 0,2 %); en présence de 0,2 % de DMSO et 5 µM de : b) chalcone 1 ; c) chalcone LIT-927 ; d) chalcone 4. Le milieu est renouvelé une fois par semaine. Les photos correspondent à des sphères à 3 semaines. C35 et C36 correspondent à deux clones de cellules TG1 CXCL12 KO.

VI. Etude de la perméabilté membranaire des cellules TG1 vis-à-vis des molécules chalcones.

Trois chalcones (chalcones 1, 4 et LIT-923) ont été testées dans cette étude. Ces molécules agissent de manière différentielle sur l'autorenouvellement des CI-GBM avec une activité inhibitrice des chalcones 1 et 4 (surtout marquée pour la chalcone 4) et une absence d'effet de LIT-927. L'effet différentiel entre ces molécules de structure proche et notamment

entre les deux chalcones décrites comme neutraligands de CXCL12, la chalcone 4 et l'analogue soluble (LIT-927), nous a conduit à émettre l'hypothèse que leur activité pourrait s'exercer au niveau intracellulaire et que la différence d'activité observée serait liée à une différence de passage de la membrane cellulaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les différences de concentration intracellulaire des chalcones après traitement des cellules CI-GBM TG1 avec les molécules à tester. Cette concentration est évaluée en utilisant un test basé sur la centrifugation de cellules, préalablement mises en contact avec les molécules, à travers une couche de milieu aqueux, puis d'huile de silicone (AR20 : AR200 dans un rapport 4 : 1), suivie d'une détéction des molécules dans le culot cellulaire par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométie de masse. Le schéma récapitulatif de l'expérience est donné dans la figure 43. Ce test est adapté de celui décrit par Richter et collaborateurs qui l'avait utilisé pour analyser l'activité antibiotique de nombreuses molécules en testant leur passage à travers les membranes bactériennes (Richter et al. 2017).

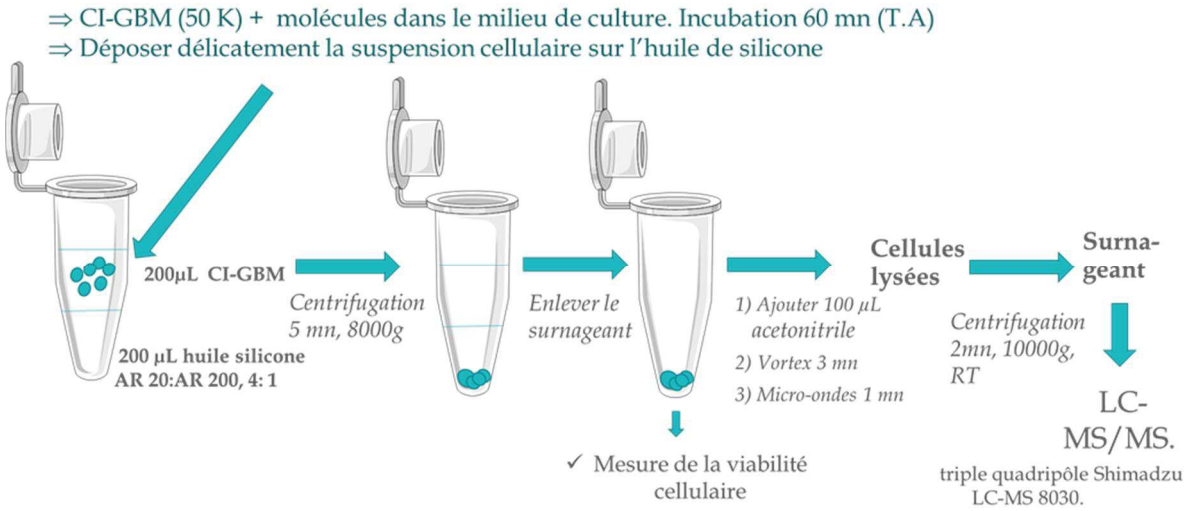


Figure 43. Schéma du protocole pour la détection des molécules traversant la membrane des cellules CI-GBM.
Les molécules ayant traversé la membrane cellulaire se retrouvent dans le culot cellulaire après centrifugation. Les molécules adsorbées à la surface des cellules sont éliminées par passage à travers les couche d'huile de silicone (AR20 : AR200). T.A. : température ambiante.

Dans un premier temps nous avons utilisé ce test avec des composés dont la perméabilité membranaire était connue, à savoir l'indo1 et la calcéine d'une part et leurs dérivés acétoxy-méthylés, l'indo1-AM et la calcéine-AM, d'autre part. Ces deux dernières sont connues pour traverser la membrane cellulaire et pénétrer dans le milieu intracellulaire, alors que les deux premières ne la traversent pas. Dans nos expériences, l'indo1 et la calcéine mis en contact de 50 000 cellules TG1 à une concentration de 1 µM ne sont jamais retrouvés dans les culots cellulaires, alors que, dans les mêmes conditions, les dérivés estérifés le sont, bien qu'en faible quantité.

Nous avons ensuite testé la perméabilité cellulaire des trois molécules chalcones à une concentration de 50 µM sur 0, 50K, 250K, 500K, 700K et 1 million cellules TG1. Les résultats des expériences réalisées avec la chalcone 1 n'étaient pas explotables et seuls les résultats obtenus avec les chalcones 4 et LIT-927 sont présentés dans la figure 44. La quantité de molécules retouvée dans les culots cellulaires est faible, mais elle augmente avec le nombre de cellules utilisé dans l'expérience. L'analyse des courbes ne montre pas de différences significatives entre la chalcone 4 et LIT-927 suggérant que la perméabilté cellulaire est similaire pour les deux molécules. Ainsi les différences d'activité entre les deux molécules sur la croissance des cellules TG1, ne semblent pas être liées à leur pénétration différentielle dans les cellules.

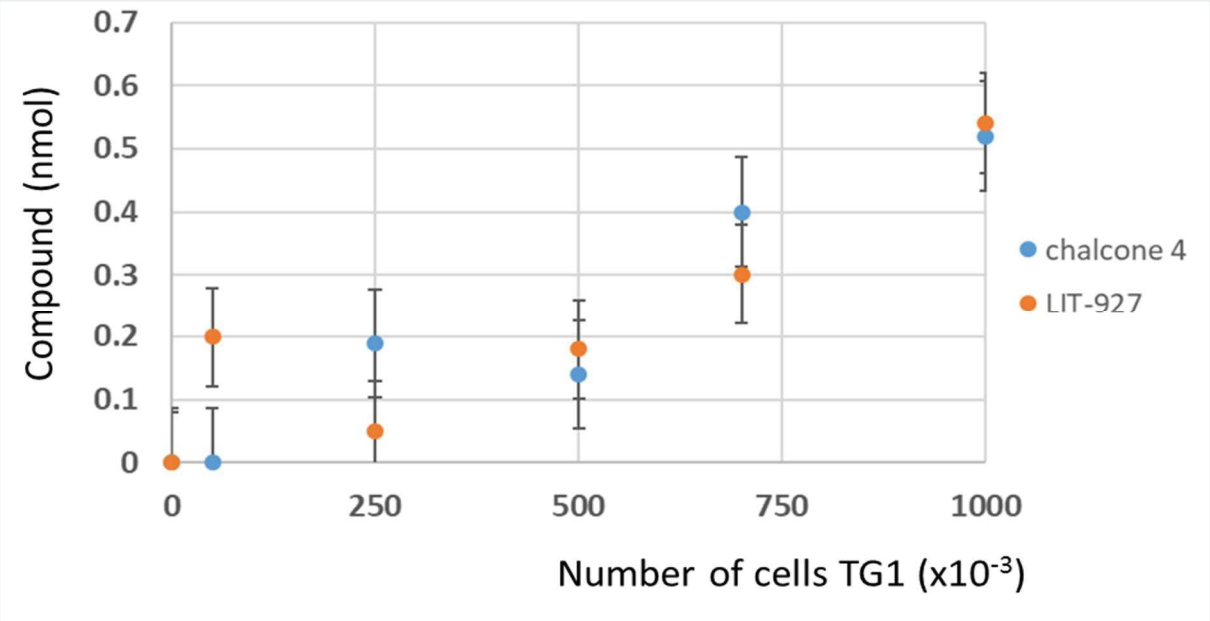


Figure 44. Détection intracellulaire de molécules chalcone 4 et LIT-927 par LC-MS/MS.
Les cellules TG1 en prolifération ont été incubées à température ambiante pendant 1 heure avec 50 µM de chalcone, puis traitées selon le protocole décrit dans la figure 43 ci-dessus. En ordonnée, la quantité de chalcone extraite du culot cellulaire. Pour chaque expérience, la quantité de composé retrouvé dans le culot cellulaire a été corrigée par rapport à l'échantillon sans cellule. Les expériences ont été réalisées en triplicat.

Discussion

La chimiokine homéostatique CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et ACKR3 interviennent dans divers processus physiologiques et pathologiques. Leur rôle a été mis en évidence dans de nombreux cancers, y compris les GBMs. De ce fait, cet axe est devenu une cible thérapeutique potentielle pour la découverte de nouvelles thérapies. Dans la recherche de molécules anticancéreuses, un intérêt tout particulier a été apporté ces dernières années à l'étude des cellules cancéreuses présentant des propriétés souches et d'autorenouvellement, ainsi que la capacité d'induire une tumeur récapitulant les caractéristiques de la tumeur d'origine après injection à des animaux immuno-déprimés. Ces cellules appelées, selon les auteurs, cellules souches cancéreuses, cellules progénitrices cancéreuses, ou cellules initiatrices de tumeurs représentent un faible pourcentage de la tumeur (< 2 %), mais sont responsables du développement tumoral, des récidives après traitement et des résistances aux chimio- et radio-thérapies (Reya et al. 2001 ; Visvader and Lindeman 2008).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'expression de CXCL12, CXCR4 et ACKR3 dans des cellules initiatrices de GBM (CI-GBM), à l'effet de molécules chalcones (dont deux connues pour leur effet neutraligand de CXCL12), et de l'AMD3100 sur la survie, la prolifération et l'aptitude des cellules à former des tumorosphères, ainsi qu'au rôle de la chimiokine CXCL12 produite de manière endogène sur ces fonctions.

Des CI-GBM de différentes origines ont été utilisées dans notre étude. Les cellules TG1 et TG1_C1, BTIC 25M, BTIC 53 et U3051 ont toutes été caractérisées dans les laboratoires dans lesquels elles ont été isolées (Patru et al. 2010 ; Cusulin et al. 2015 ; Xie et al. 2015). Elles expriment les marqueurs Sox2, Nestine, Nanog, ainsi que GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Les cellules TG1 et TG1_C1 sont majoritairement CD133 (prominine) négatives, alors que les cellules BTIC et U3081 sont CD133 positives. Beaucoup de laboratoires travaillant sur les CSCs utilisent la prominine comme critère de sélection des cellules souches. Néanmoins, l'expression de ce gène n'est pas indispensable pour qu'une cellule cancéreuse présente des propriétés initiatrices de tumeurs (Chen et al. 2010) et la présence ou l'absence de ce marqueur dans les tumeurs ne modifie pas la survie des patients (Kong et al. 2014). En utilisant la classification des GBM de Verhaak et al. 2010, les cellules TG1, TG1_C1 (communication personnelle suite à l'étude des transcriptomes dans le laboratoire de H. Chneiweiss), BTIC 25M et BTIC 53 (Cusulin et al. 2015), font partie des sous-types mésenchymateux, alors que les cellules U3021 ont été classées dans le sous-type neural (Xie et al 2015). En 2017, le sous-type neural a été supprimé dans la classification des GBM (Wang et al. 2017a) car ce sous type neural était retrouvé à la marge de la tumeur où des cellules neurales normales sont présentes (Gill et al. 2014 ; Sturm et al. 2012) et seuls les sous-types proneural, mésenchymateux et classique furent rapportés par la suite dans l'étude des GBM (pour une étude récente voir Couturier et al. 2020). Cependant, une seconde analyse récente en cellules uniques de 26 215 cellules cancéreuses émanant de tumeurs de GBM de 8 patients non traités, auxquels ont été ajoutés 384 cellules issues de bases de données publiques et utilisant les techniques de scRNAseq, sc-ATAC, la dynamique

de l'ARN (RNA velocity et exome-seq) montre que l'ensemble de l'hétérogénéité des GBM IDH1 non muté peut être décrit à partir des deux sous-types de cellules souches/progénitrices de GBM, en faisant varier leurs proportions respectives, ainsi que celles des cellules différenciées qui en dérivent et des cellules stromales et immunitaires (Wang et al. 2019). Les marqueurs donnés pour le sous-type mésenchyamateux sont CD44, GFA, CHI3LL et pour le sous-type proneural DLL3, PDGFRA et Olig2. Les cellules U3021 issues d'une banque de cellules souches de glioblastome (Human Glioblastoma Cell Culture (HGCC) resource) avaient été classées lors d'une première analyse de l'expression de 765 gènes dans le sous-type proneural. Lors d'une seconde analyse avec utilisation du bootstrapping statistique, elles ont été classées dans le type neural (sous-type sortant de l'analyse dans ~85 % des cas, les 15 % des cas correspondant à du sous-type pro-neural) (Xie et al. 2015). En culture dans le milieu NS34, ces cellules ne forment guère de neurosphères et émettent des prolongements (figure 16 du manuscrit). Compte tenu de ces caractéristiques et des connaissances acquises récemment, ces cellules dérivent probablement de cellules progénitrices cancéreuses du sous-type proneural.

Les cellules utilisées dans notre étude (trois lignées de CI-GBM dérivant du sous-type mésenchymateux et une lignée dérivant du sous type proneural), montrent une expression différente des ARNm codant la chimiokine CXCL12 et des récepteurs CXCR4 et ACKR3 (CXCR7). Les cellules TG1 et TG1_C1 surexpriment la chimiokine CXCL12 et le récepteur CXCR4, mais n'expriment pas ou très faiblement le récepteur ACKR3. Dans les cellules BTIC 53 et BTIC 25M l'ensemble des trois protagonistes est faiblement exprimé, à la limite de la détection pour BTIC 25M. Pour les cellules U3021, seul le récepteur ACKR3 est bien exprimé. Dans la littérature, CXCR4 apparait comme un récepteur dont l'expression est généralement augmentée dans les cellules présentant des propriétés souches. Nous l'avons également observé au laboratoire en comparant son expression dans les cellules cancéreuses TG1, TG1_C1 et U87, dans les astrocytes humains et dans des cellules souches neurales fœtales (f-NSC). Le récepteur est surexprimé d'un facteur > 5000 dans les cellules TG1, TG1_C1 et f-NSC par rapport au astrocytes et aux cellules U87 (Fève et al. 2014).

Dans divers cancers dont les GBM, CXCR4 est reconnu comme un marqueur oncogénique, favorisant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la vasculogénèse et les métastases. L'axe CXCR4/CXCL12 apparait particulièrement important dans les cellules souches cancéreuses/cellules initiatrices de tumeurs pour le maintien des propriétés souches, leur autorenouvellement et leur tumorogénicité (Ehtesham et al. 2009 ; Gatti et al. 2013 ; Jung et al. 2013 ; pour revue voir Würth et al. 2014 ; Richardson 2016 ; Fareh et al. 2017). Concernant l'autorenouvellement, Fareh et collaborateurs ont montré, en utilisant les cellules TG1, qu'une diminution de l'expression de CXCR4, *via* le cluster miR 302-367, inhibait l'autorenouvellement et la mobilité des CI-GBM par un mécanisme impliquant le réseau sonic hedghog (SHH)-Gli-Nanog (Fareh et al. 2012 ; Fareh et al. 2017). Pour le maintien des propriétés souches, une corrélation positive entre l'expression de CXCR4 et des marqueurs de cellules souches (LgR5, Nanog, Sox2) a été rapportée pour des cellules souches de cancer de l'œsophage (Wang et al. 2017b), ainsi que dans les GBM (Flüh et al. 2016). On peut cependant observer dans ces études que l'amplitude de la variation d'expression de CXCR4 est plus importante que celle des marqueurs de cellules souches. Ainsi des cellules avec des

propriétés souches peuvent présenter un différentiel d'expression de CXCR4 important de (32 – 40 fois). Concernant notre étude une analyse comparative de l'expression des marqueurs de cellules souches aurait été nécessaire pour discuter la possible utilisation de CXCR4 comme marqueur de l'état d'indifférenciation des cellules.

Le récepteur atypique ACKR3, qui lie CXCL12 avec une affinité plus forte que CXCR4 (Kd = 0,4 nM) et impliqué dans la régulation de la concentration de CXCL12 dans l'environnement tissulaire par un effet "scavenger" serait plutôt faiblement exprimé dans les cellules cancéreuses souches et un niveau d'expression plus élevé correspondrait à un état de différentiation plus avancée (Hattermann et al. 2010 ; Flüh et al. 2016). Généralement les deux récepteurs ne seraient pas exprimés sur les mêmes cellules, bien que des cellules $CXCR4^+$ et $ACKR3^+$ aient été trouvées. On peut supposer que les cellules U3021 de notre étude qui présentent le niveau d'expression de ACKR3 le plus élevé soient des cellules progénitrices plus différenciées que les cellules souches et les autres cellules de notre étude. Ceci est à mettre en relation avec la difficulté de ces cellules à former des neurosphères dans le milieu de culture NS34 et au phénotype des cellules en culture, où elles forment des prolongements semblables à ceux observés lors de la différentiation des cellules TG1 et TG1_C1 qui prend place lorsque ces cellules sont cultivées en présence de sérum de veau fœtal (Zeniou et al. 2015). Cependant les cellules U3021, injectées à des souris NOD/SCID, donnent des tumeurs macroscopiques présentant des caractéristiques similaires à la tumeur d'origine (Xie et al. 2015), un des critères essentiels pour les cellules initiatrices de tumeurs.

CXCL12 induit des effets pléiotropes dans les cellules et dans les tissus et agit par un effet autocrine et/ou paracrine. Dans les tissus, mais aussi dans les tumeurs, la chimiokine peut être produite par l'environnement et/ou par les cellules elles-mêmes.

Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur le rôle de la chimiokine produite de manière endogène dans l'autorenouvellement et la prolifération des cellules CI-GBM et plus précisément des cellules TG1 qui, parmi les cellules étudiées, l'exprime au taux le plus élevé. Les études présentées dans la littérature pour analyser ce rôle utilisent des modifications des conditions de culture dans lesquelles la sécrétion de CXCL12 est diminuée par exemple en absence de facteur de croissance (Gatti et al. 2013), ou testent l'effet de l'addition de CXCL12 rajouté dans le milieu, ou observent les effets sur la prolifération dans des conditions comme l'hypoxie qui induit une surexpression de CXCR4 et de CXCL12, ou encore en bloquant les récepteurs CXCR4 avec l'AMD3100 ou le récepteur ACKR3 avec CCX771 ou un anticorps (Uemae et al. 2014 ; pour revue Würth et al. 2014 ; Richardson 2016 ; Miyazaki et al. 2017; Groblewska et al. 2020).

Nous avons choisi de réaliser une interruption génique du gène *CXCL12* en utilisant la méthode CRISPR/Cas9 avec une Cas9 dite "high fidelity" (HF) et des ARN guides ciblant des régions 5' du gène *CXCL12* de manière à réaliser l'interruption pour l'ensemble des variants d'épissage (six variants possibles) qui ont en commun les trois premiers exons et diffèrent au niveau du quatrième. La Cas9 HF a été obtenue à partir de la spCas9 par des modifications d'acides aminés visant à diminuer l'interaction de l'endonucléase avec les sites "hors cible" (Kleinstiver et al. 2016). Ces changements ne modifient pas la spécificité de la Cas9. Le

système CRISPR/Cas9 commercial de Santa Cruz que nous avions utilisé dans un premier temps et qui utilisait une Cas9 non HF avait suggéré l'existence de modifications hors cible et l'insertion de la protéine à fluorescence rouge dans une (des régions) autre(s) que celles codant *CXCL12*. Avec le plasmide fourni par le laboratoire du Dr Reina San Martin à l'IGBMC (Illkirch), la probabilité de coupures hors cible est extrêmement faible. L'expérience d'interruption génique réalisée sur les cellules CI-GBM TG1 avec ce système HF nous a fourni des clones présentant une interruption bi-allélique du gène *CXCL12* mis en évidence par séquençage de la région ciblée par les ARN guides et ne sécrétant pas la chimiokine dans le milieu de culture. L'analyse de deux clones C35 et C36 a souligné un rôle marqué de CXCL12 dans la formation des tumorosphères clonales avec un net ralentissement de leur croissance (obtention de sphères quatre à cinq fois plus petites que les sphères contrôles après 3 semaines de culture) (figure 40). Ces résultats sont à rapprocher des expériences de formation de tumorosphères de cellules TG1 en présence d'AMD3100 (obtention de sphères 3 fois plus petites après 21 jours de culture comparées aux sphères contrôles). CXCL12 n'est donc pas indispensable à la formation des tumorosphères, mais favorise leur croissance. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans la formation des tumorosphères, les cellules situées à l'intérieur des sphères sont soumises à l'hypoxie, ce qui d'après la littérature induit une augmentation de l'expression de CXCL12 *via* HIF1α avec un signal de croissance cellulaire par activation de la voie des kinases PI3K/Akt, de l'expression de la cycline D1, de la protéine du rétinoblastome et l'activation des signaux anti-apoptotique *via* des molécules de la famille Bcl2 (Calinescu et al. 2017). L'absence de cette signalisation conduirait à la diminution de la croissance des sphères issues de cellules KO CXCL12. Ces signalisations n'ont pas été étudiées dans notre travail. De même, nous n'avons pas testé si les cellules TG1 CXCL12 KO pouvaient former de grandes tumorosphères de taille > 1mm, comme cela peut être observé avec les cellules TG1 au bout de 8 semaines (Dong et al. 2017) et si l'ajout de CXCL12 exogène pouvait stimuler la croissance des tumosphères. L'absence d'effet de l'interruption génique sur le temps de doublement des cellules lorsque celles-ci sont cultivées dans des conditions non clonales est plus difficile à expliquer, bien qu'il soit admis que le comportement d'une cellule isolée diffère de son comportement dans une population de cellules (Lin and Amir 2020). Un faible impact de CXCL12 sur la prolifération cellulaire avait aussi été observé lors de l'ajout de la protéine au milieu de culture de cellules TG1 wt qui n'avaient montré qu'une faible augmentation de la prolifération cellulaire (25 à 30 % pour des concentrations saturantes de 50 et 500 nM). Une observation similaire avait été faite par Gatti et al. (Gatti et al. 2013) suggérant que la fonction première de CXCL12, produite de manière endogène ou apportée de manière exogène n'est pas de stimuler la croissance des cellules. On peut supposer que le rôle majeur de CXCL12 réside dans les autres fonctions connues pour la chimiokine comme la régulation des migrations cellulaires (cellules endothéliales, cellules du système immunitaire, cellules stromales) afin de promouvoir l'angiogénèse, la vasculogénèse, l'invasion tissulaire, la modification du microenvironnement ainsi que dans l'adaptation aux situations de stress (hypoxie, chimiothérapie, radiothérapie) (pour revues voir Würth et al. 2014 ; Richardson 2016 ; Miyazaki et al. 2017 ; Groblewska et al. 2020). L'absence d'effet dans les conditions non clonales pourrait aussi être imputable aux conditions de culture utilisées, à savoir un milieu sans sérum (pour conserver l'état indifférencié), mais enrichi en facteurs de croissance, EGF, bFGF et insuline et en normoxie, qui permettent une croissance optimale des cellules.

Au début de notre étude, avec l'objectif de trouver de nouvelles molécules interférant avec l'axe CXCR4/CXCL12, nous nous étions intéressés aux chalcones et notamment aux deux chalcones 4 et LIT-927 dont les propriétés neutraligands de CXCL12 (K_D de 1,7 x 10^{-8} M; Hachet-Haas et al. 2008) avaient été montrées au laboratoire et les effets étudiés *in vivo* dans des modèles d'inflammation allergique des voies aériennes chez la souris où une diminution de l'infiltration d'éosinophiles ou de cellules dendritiques était observé après administration de chalcone 4 ou LIT-927 (Hachet-Haas et al. 2008 ; Galzi et al. 2010 ; Heck et al. 2017 ; Regenass et al. 2018) ou *in vitro* dans des cellules de cancer colorectal dont la migration était fortement inhibée en présence de chalcone 4 (Romain et al. 2014). La chalcone 1, sans effet neutraligand de CXCL12 (K_D de 5,5 x 10^{-6} M; Hachet-Haas et al. 2008) était utilisée comme molécule contrôle. L'utilisation des molécules chalcones pour étudier la formation des tumorosphères clonales conduit à des résultats surprenants. Certes, la chalcone 4 inhibait totalement la formation des sphères à une concentration de 5 µM, mais la chalcone 1, sans effet neutraligand était également active, alors que la chalcone LIT-927 neutraligand comme la chalcone 4, n'avait aucun effet. De plus l'effet inhibiteur des chalcones 1 et 4 était plus marqué que celui de l'AMD3100, qui même à 10 µM n'induisait qu'un ralentissent de la croissance des sphères. Cela suggérait que l'activité de la molécule chalcone 4 était indépendante de son effet neutraligand et que les deux chalcones 4 et 1 agissaient *via* une autre cible. Ceci est corroboré par le fait que les deux molécules sont actives aux mêmes concentrations (activité à 5 µM, pas d'activité à 1 µM), alors que les affinités pour CXCL12 diffèrent d'un facteur 100. Les chalcones appartiennent à la classe des flavonoides. Les molécules naturelles ou synthétiques dérivent du chassis moléculaire 1,3-diaryl-2 propène-1-one qui dans notre étude correspond à la chalcone 1. Une grande variété de chalcones a été extraite de plantes ou synthétisée. Les molécules sont connues pour leurs activités antipaludiques et antibactériennes, mais en fonction des substituants, le spectre d'activités biologiques est plus large avec des propriétés anti-prolifératives, anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-angiogéniques (Zhuang et al. 2017 ; Mielcke et al. 2017). Leurs cibles moléculaires potentielles sont multiples. Elles agissent, entre autres, comme inhibiteurs de IκB, de la thioredoxine réductase (IC50 = 1.4 µM), de la cyclooxygénase, de la polymérisation des microtubules, de la voie Notch/Akt et de l'activité de récepteurs à tyrosines kinases comme EGFR. L'activité antiproliférative, proapoptotique ou synergique de molécules anticancéreuses de nombreuses chalcones, y compris des chalcones à structure simple comme le xanthumol- un dérivé prénylé (Walden et al. 2017) ou la cardamonine- un dérivé dihydroxylé et méthoxylé sur un des phényles (Hou et al. 2020 ; pour revue voir Nawaz et al. 2020) a été montrée. Pour la cardamonine, des cibles extracellulaires et intracellulaires induisant un blocage de la voie Wnt/β caténine, JAK/STAT, PI3K/Akt/mTor ou de l'apotose, ont été rapportées (Nawaz et al. 2020).

Dans notre étude, une activité antiproliférative et apoptotique des chalcones 1 et 4, indépendante de la signalisation *via* CXCR4/CXCL12 doit être envisagée. Il reste cependant à comprendre pourquoi cet effet dépend du nombre de cellules ensemencées, mais aussi pourquoi la chalcone LIT-927 avec les mêmes substituants que la chalcone 4, mais présentant un cycle pyrimidone n'a pas d'effet. LIT-927 est plus soluble que la chalcone 4 (36 µM *vs* 9 µM dans le tampon PBS à pH 7,4 et elle légèrement moins hydrophile (logP = 3,32 *vs*

3,63). Nous avons émis l'hypothèse que la(les) cible(s) des molécules chalcones 1 et 4 étai(en)t intracellulaire(s) et que la différence d'activité entre les molécules chalcones 4 et LIT-927 était due à une différence de pénétration intracellulaire. Des résultats préliminaires de mesure des quantités intracellulaires de chalcones 4 et LIT-927, en utilisant le test de centrifugation sur coussin de silicone, indiquent que les deux molécules traversent la membrane cellulaire, mais ne montrent pas de différence significative entre les deux molécules (les résultats avec la chalcone 1 n'étaient pas interprétables). La courbe présentée dans la figure 44 révèle la nécessité de travailler avec un nombre de cellules supérieur à 5 x 10^5 afin de sortir du bruit de fond lors des mesures par LC-MS/MS. Lors de nos premiers essais des quantités trop faibles de cellules avaient été utilisées. Si cette équivalence dans la pénétration intracellulaire se confirme, nous pourrons considérer que le noyau pyrimidinone central dans la chalcone LIT-927 bloque son interaction avec sa (ses) cible(s) et/ou les effets de celle-ci. La chalcone 4 a une réactivité d'accepteur de Michael au niveau de l'oxopropényl, alors que dans LIT-927 qui ne diffère de la chalcone 4 que par le remplacement de l'oxoprényl par une pyrimidinone cette réactivité n'existe plus (Regenass et al. 2018) Or les propriétés d'accepteur de Michael des chalcones seraient un de leur mécanisme d'action majeur pour l'interaction avec les cibles et l'activité qui en découle (Zhuang et al. 2017). Cette réactivité conduit à la formation de liaison covalente carbone/carbone ou carbone/soufre entre la chalcone et la cible qui présente des propriétés nucléophiles. L'inhibition des kinases IκB (IKKs, impliquées dans les réponses immunes et inflammatoires), de la thioredoxine réductase (TR, régulant la balance Redox), ou la dérégulation de la voie Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)-Nrf2-ARE (impliquée dans la protection vis-à-vis du stress oxydant) passerait par ce mécanisme. Le groupement oxopropényl de la chalcone 1 est également un accepteur de Michael, ce qui expliquerait son effet. Son effet moindre par rapport à la chalcone 4 pourrait être du à l'absence de substituants au niveau des noyaux phényles A et B.

Les différents types cellulaires testés (TG1, TG1_C1, BTIC et U3021) ont une sensibilité similaire aux molécules chalcones, suggérant que la(les) cible(s) est (sont) présente(s) dans ces cellules. Nous n'avons pas testé l'activité des molécules sur des cellules non cancéreuses, ou sans propriétés souches. Ceci permettrait d'évaluer la spécificité, même relative par rapport aux des cellules cancéreuses. Des expériences d'ADME-Tox et *in vivo* sur des souris ont été réalisées au laboratoire et aucune toxicité particulière des chalcones n'a été relevée, suggérant un effet discriminatif sur des cellules présentant une dérégulation dans le fonctionnement.

Conclusion et perspectives

La chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et ACKR3 ont des effets pléiotropes dans les cellules et les CI-GBM en particulier. Cependant les approches utilisées dans les études manquent parfois de spécificité pour établir leur rôle avec précision. Notre étude très focalisée sur le rôle de la chimiokine endogène dans la formation des tumorosphères clonales et la prolifération des CI-GBM a montré que la chimiokine n'était pas indispensable à la croissance des cellules, mais qu'elle la favorisait, notamment lorsque les cellules étaient à l'état de cellule unique ou en petit nombre. Une interruption du gène *CXCR4* codant le récepteur permettrait de corroborer les résultats obtenus. D'autres fonctions de la chimiokine CXCL12 et du récepteur CXCR4, notamment leurs rôles dans la survie des cellules dans des conditions de stress (stress oxydant, hypoxique, métabolique, présence d'agents chimio thérapeutiques), ou dans l'entrée des cellules en quiescence, ou dans leur différentiation, ainsi que les voies de signalisation en aval pourront être étudiées de manière plus fine en utilisant les cellules CI-GBM KO CXCL12 et KO CXCR4.

Concernant les chalcones, l'étude a mis en évidence leur effet cytostatique, par un mécanisme différent de celui considéré au départ, c'est-à-dire ne passant pas par un effet neutraligand de CXCL12. Les propriétés neutraligands de CXCL12 n'ont pas pu être mises en évidence dans notre système et nos conditions d'étude du système.

Cependant la caractérisation précise des cellules étudiées lors de la recherche de nouvelles thérapies reste un problème majeur. L'utilisation de quelques biomarqueurs est insuffisante pour définir l'objet étudié. Les nouvelles approches basées sur l'étude en cellules uniques obtenues à partir de tumeurs dissociées permettent d'avoir une vision plus globale d'une tumeur à partir des éléments étudiés individuellement (Couturier et al. 2020 ; Wang et al. 2019). Les études récentes de Wang et collaborateurs (Wang et al. 2019) suggèrent que l'ensemble des GBM contiennent des cellules souches de type mésenchymateux et proneural et des cellules plus ou moins différenciés qui en dérivent. De plus, l'ensemble des cellules souches de GBM se situerait sur un axe avec d'un côté le type mésenchymateux et de l'autre le type proneural. En accord avec ce modèle, les auteurs ont montré que la synergie des molécules antitumorales n'est observée qu'avec des molécules ciblant les deux types cellulaires. Ainsi l'étude de signatures transcriptomiques de cellules uniques issues des tumeurs permettrait de mieux appréhender l'hétérogénité tumorale et adapter la thérapie en fonction des voies de signalisation dérégulés. Cependant, compte tenu de la plasticité cellulaire, les cellules isolées conservent-elles les propriétés qu'elles avaient dans la tumeur d'origine ? Le protocole utilisé pour leur isolement influe-t-il sur leur phénotype ? Aussi, pour la recherche de nouvelles molécules ciblant une voie donnée, faut-il travailler sur des populations de cellules ou des cellules isolées, ou des systèmes 3D de type organoïdes vascularisés ? La description de systèmes aussi complexes que les tumeurs et la mise en place de nouvelles thérapies, notamment pour les GBM qui restent incurables, constituent un réel défi.

Bibliographie

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. Expert Opin Investig Drugs 2009; 18: 1061-83.

Akashi T, Koizumi K, Tsuneyama K, Saiki I, Takano Y, Fuse H. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. Cancer Sci 2008; 99: 539-42.

Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Iizuka M, Schneider S, Ogasawara K et al. Chalcones, coumarins, and flavanones from the exudate of Angelica keiskei and their chemopreventive effects. Cancer Lett 2003; 201: 133-7.

Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. Acta Neuropathol 2015; 129: 829-48.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 3983-8.

Ali MM, Kumar S, Shankar A, Varma NR, Iskander AS, Janic B, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitors and CXCR4 antagonist on tumor growth and angiogenesis in rat glioma model: MRI and protein analysis study. Transl Oncol 2013; 6: 660-9.

Amorim JP, Santos G, Vinagre J, Soares P. The role of ATRX in the alternative lengthening of Telomeres (ALT) phenotype. Genes (Basel) 2016; 7: E66.

Anuradha V, Srinivas PV, Rao RR, Manjulatha K, Purohit MG, Rao JM. Isolation and synthesis of analgesic and anti-inflammatory compounds from Ochna squarrosa L. Bioorg Med Chem 2006; 14: 6820-6.

Bachelerie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacol Rev 2014; 66: 1-79.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 1997; 15: 675-705.

Bajetto A, Porcile C, Pattarozzi A, Scotti L, Aceto A, Daga A, et al. Differential role of EGF and BFGF in human GBM-TIC proliferation: relationship to EGFR-tyrosine kinase inhibitor sensibility. J Biol Regul Homeost Agents 2013; 27: 143-54.

Balabanian K, Brotin E, Biajoux V, Bouchet-Delbos L, Lainey E, Fenneteau O, et al. Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. Blood 2012; 119: 5722-30.

Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. J Biol Chem 2005; 280: 35760-6.

Balabanian K, Levoye A, Klemm L, Lagane B, Hermine O, Harriague J, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. J Clin Invest 2008; 118: 1074-84.

Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. Semin Cancer Biol 2004; 14: 171-9.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 2001; 357: 539-45.

Banisadr G, Skrzydelski D, Kitabgi P, Rostène W, Parsadaniantz SM. Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. Eur J Neurosci 2003; 18: 1593-606.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 2006; 444: 756-60.

Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. Cancer Res 2003; 63: 1969-74.

Barbieri F, Bajetto A, Stumm R, Pattarozzi A, Porcile C, Zona G, et al. Overexpression of stromal cell-derived factor 1 and its receptor CXCR4 induces autocrine/paracrine cell proliferation in human pituitary adenomas. Clin Cancer Res 2008; 14: 5022-32.

Barone A, Sengupta R, Warrington NM, Smith E, Wen PY, Brekken RA, et al. Combined VEGF and CXCR4 antagonism targets the GBM stem cell population and synergistically improves survival in an intracranial mouse model of glioblastoma. Oncotarget 2014; 5: 9811-22.

Beaussant Cohen S, Fenneteau O, Plouvier E, Rohrlich PS, Daltroff G, Plantier I, et al. Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from the French Severe Chronic Neutropenia Registry. Orphanet J Rare Dis 2012; 7: 71.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. Cancer Res 2007; 67: 4010-5.

Belmadani A, Jung H, Ren D, Miller RJ. The chemokine SDF-1/CXCL12 regulates the migration of melanocyte progenitors in mouse hair follicles. Differentiation 2009; 77: 395-411.

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer 2003; 3: 401-10.

Biajoux V, Bignon A, Freitas C, Martinez V, Thelen M, Lima G, et al. Expression of CXCL12 receptors in B cells from Mexican Mestizos patients with systemic Lupus erythematosus. J Transl Med 2012; 10: 251.

Bian X, Xiao H, Yang S, Wang JM. Neurosurgery 2008; 63: e820.

Bignon A, Biajoux V, Bouchet-Delbos L, Emilie D, Lortholary O, Balabanian K. CXCR4, a therapeutic target in rare immunodeficiencies. Med Sci Paris 2011; 27: 391-7.

Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, et al. PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. Cell Stem Cell 2009; 4: 226-35.

Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature 1996; 382: 829-33.

Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 1925-30.

Bobola MS, Kolstoe DD, Blank A, Chamberlain MC, Silber JR. Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide. Front Oncol 2012; 2: 176.

Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. Cell 2008; 132: 463-73.

Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. Front Biosci 2009; 14: 540-51.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997; 3: 730-7.

Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. Cell 2013; 155: 462-77.

Brouland JP, Hottinger AF. [Revised WHO classification 2016 of gliomas : what's new ?]. Rev Med Suisse 2017; 13: 180509.

Bryant J, Ahern DJ, Brennan FM. CXCR4 and vascular cell adhesion molecule 1 are key chemokine/adhesion receptors in the migration of cytokine-activated T cells. Arthritis Rheum 2012; 64: 2137-46.

Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med 2006; 203: 2201-13.

Burteau C, Willems L, Kettmann R. Les chémokines et leurs récepteurs : rôle dans les infections virales et dans les pathologies cancéreuses. Biotechnol Agron Soc Environ 2007; 11: 141-50.

Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. J Biol Chem 2010; 285: 7805-17.

Calinescu AA, Yadav VN, Carballo E, Kadiyala P, Tran D, Zamler DB, et al. Survival and Proliferation of Neural Progenitor-Derived Glioblastomas Under Hypoxic Stress is Controlled by a CXCL12/CXCR4 Autocrine-Positive Feedback Mechanism. Clin Cancer Res 2017; 23: 1250-62.

Campos B, Gal Z, Baader A, Schneider T, Sliwinski C, Gassel K, et al. Aberrant self-renewal and quiescence contribute to the aggressiveness of glioblastoma. J Pathol 2014; 234: 23-33.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 2008; 455: 1061-8.

Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. Acta Neuropathol 2009; 118: 599-601.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 2011; 473: 298-307.

Carra E, Barbieri F, Marubbi D, Pattarozzi A, Favoni RE, Florio T, et al. Sorafenib selectively depletes human glioblastoma tumor-initiating cells from primary cultures. Cell Cycle 2013; 12: 491-500.

Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. Cell 2016; 164: 550-63.

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. Nat Med 2004; 10: 858-64.

Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA Jr, Asher AL, Bernstein M, et al. Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. JAMA 2005; 293: 557-64.

Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. Adv Cancer Res 2014; 124: 31-82.

Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature 2012; 488: 522-6.

Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. Cancer Cell 2010; 17: 362-75.

Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. Cell 2013; 153: 139-52.

Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu YL, Cen B, et al. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. J Biol Chem 2000; 275: 2479-85.

Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. J Cell Mol Med 2010; 14: 771-94.

Chung SH, Seki K, Choi BI, Kimura KB, Ito A, Fujikado N, et al. CXC chemokine receptor 4 expressed in T cells plays an important role in the development of collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2010; 12: R188.

Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovska A. Emerging targets in cancer management: Role of the CXCL12/CXCR4 axis. Onco Targ Ther 2013; 30: 1347-61.

Costello CM, McCullagh B, Howell K, Sands M, Belperio JA, Keane MP, et al. A role for the CXCL12 receptor, CXCR7, in the pathogenesis of human pulmonary vascular disease. Eur Respir J 2012; 39: 1415-24.

Couturier CP, Ayyadhury S, Le PU, Nadaf J, Monlong J, Riva G, et al. Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. Nat Commun 2020; 11: 3406.

Crijns H, Vanheule V, Proost P. Targeting Chemokine—Glycosaminoglycan Interactions to Inhibit Inflammation. Front Immunol 2020; 11: 483.

Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. EMBO J 1997; 16: 6996-7007.

Cusulin C, Chesnelong C, Bose P, Bilenky M, Kopciuk K, Chan JA, et al. Precursor States of Brain Tumor Initiating Cell Lines Are Predictive of Survival in Xenografts and Associated with Glioblastoma Subtypes. Stem Cell Reports 2015; 5: 1-9.

D'Alterio C, Nasti G, Polimeno M, Ottaiano A, Conson M, Circelli L, et al. CXCR4-CXCL12-CXCR7, TLR2-TLR4, and PD-1/PD-L1 in colorectal cancer liver metastases from neoadjuvant-treated patients. Oncoimmunology 2016; 5: 1254313.

Dambly-Chaudière C, Cubedo N, Ghysen A. Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: Antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. BMC Dev Biol 2007; 7: 23.

Dang L, Su SM. Isocitrate Dehydrogenase Mutation and (R)-2-Hydroxyglutarate: From Basic Discovery to Therapeutics Development. Annu Rev Biochem 2017; 86: 305-31.

Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. FASEB J 2004; 18: 1240-2.

Das B, Tsuchida R, Malkin D, Koren G, Baruchel S, Yeger H. Hypoxia Enhances Tumor Stemness by Increasing the Invasive and Tumorigenic Side Population Fraction. Stem Cells 2008; 26: 1818-30.

Daubeuf F, Hachet-Haas M, Gizzi P, Gasparik V, Bonnet D, Utard V, et al. An antedrug of the CXCL12 neutraligand blocks experimental allergic asthma without systemic effect in mice. J Biol Chem 2013; 288: 11865-76.

Davis DA, Singer KE, De La Luz Sierra M, Narazaki M, Yang F, Fales HM, et al. Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1alpha in the circulation. Blood 2005; 105: 4561-8.

De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Baba M, Schols D, Nakashima H, et al. Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 5286-90.

De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. Nat Rev Drug Discov 2003; 2: 581-7.

de Sousa E Melo F, Guessous I, Vermeulen L, Medema JP. [Cancer stem cells and future therapeutic implications]. Rev Med Suisse 2011; 7: 774-7.

Decaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. J Biol Chem 2011; 286: 32188-97.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature 1996; 381: 661-6.

Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nat Biotechnol 2016; 34: 184-91.

Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. Eur J Cancer 2013; 49: 219-30.

Dong J, Aulestia FJ, Assad Kahn S, Zeniou M, Dubois LG, El-Habr EA, et al. Bisacodyl and its cytotoxic activity on human glioblastoma stem-like cells. Implication of inositol 1,4,5-triphosphate receptor dependent calcium signaling. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 2017; 1864: 1018-27.

Doranz BJ, Grovit-Ferbas K, Sharron MP, Mao SH, Goetz MB, Daar ES, et al. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. J Exp Med 1997; 186: 1395-400.

Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, et al. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. J Virol 1999; 73: 2752-61.

Dwinell MB, Ogawa H, Barrett KE, Kagnoff MF. SDF-1/CXCL12 regulates cAMP production and ion transport in intestinal epithelial cells via CXCR4. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 286: G844-50.

Ehtesham M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. Cancer Lett 2009; 274: 305-12.

Ehtesham M, Winston JA, Kabos P, Thompson RC. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. Oncogene 2006; 25: 2801-6.

England B, Huang T, Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. Tumour Biol 2013; 34: 2063-74.

Erasimus H, Gobin M, Niclou S, Van Dyck E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. Mutat Res Mutat Res 2016; 769: 19-35.

Evans SM, Jenkins KW, Chen HI, Jenkins WT, Judy KD, Hwang WT, et al. The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study. Transl Oncol 2010; 3: 160-9.

Fareh M, Almairac F, Turchi L, Burel-Vandenbos F, Paquis P, Fontaine D, et al. Cell-based therapy using miR-302-367 expressing cells represses glioblastoma growth. Cell Death Dis 2017; 8: e2713.

Fareh M, Turchi L, Virolle V, Debruyne D, Almairac F, de-la-Forest Divonne S, et al. The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. Cell Death Differ 2012; 19: 232-44.

Fearon DT. The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. Cancer Immunol Res 2014; 2: 187-93.

Fernandis AZ, Cherla RP, Ganju RK. Differential regulation of CXCR4-mediated T-cell chemotaxis and mitogen-activated protein kinase activation by the membrane tyrosine phosphatase, CD45. J Biol Chem 2003; 278: 9536-43.

Fève M, Saliou JM, Zeniou M, Lennon S, Carapito C, Dong J, et al. Comparative expression study of the endo-G protein coupled receptor (GPCR) repertoire in human glioblastoma cancer stem-like cells, U87-MG cells and non malignant cells of neural origin unveils new potential therapeutic targets. PLoS One 2014; 9: e91519.

Fidoamore A, Cristiano L, Antonosante A, Angelo M, Di Giacomo E, Astarita C, et al. Glioblastoma Stem Cells Microenvironment: The Paracrine Roles of the Niche in Drug and Radioresistance. Stem Cells Int 2016; 2016: e6809105.

Florio T, Barbieri F. The status of the art of human malignant glioma management: the promising role of targeting tumor-initiating cells. Drug Discov Today 2012; 17: 1103-10.

Flüh C, Hattermann K, Mehdorn HM, Synowitz M, Held-Feindt J. Differential expression of CXCR4 and CXCR7 with various stem cell markers in paired human primary and recurrent glioblastomas. Int J Oncol 2016; 48: 1408-16.

Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, et al. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. Cancer Res 2009; 69: 7243-51.

Freitas C, Desnoyer A, Meuris F, Bachelerie F, Balabanian K, Machelon V. The relevance of the chemokine receptor ACKR3/CXCR7 on CXCL12-mediated effects in cancers with a focus on virus-related cancers. Cytokine Growth Factor Rev 2014; 25: 307-16.

Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, et al. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. Science 2012; 338: 1080-4.

Fujii N, Nakashima H, Tamamura H. The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV. Expert Opin Investig Drugs 2003; 12: 185-95.

Furnari FB, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. Nat Rev Cancer 2015; 15: 302-10.

Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. Pathol Int 2010; 60: 497-505.

Gabrusiewicz K, Liu D, Cortes-Santiago N, Hossain MB, Conrad CA, Aldape KD, et al. Anti-vascular endothelial growth factor therapy-induced glioma invasion is associated with accumulation of Tie2-expressing monocytes. Oncotarget 2014; 5: 2208-20.

Gadji M, Fortin D, Tsanaclis AM, Drouin R. Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas? Cancer Genet Cytogenet 2009; 194: 12-22.

Galan-Moya EM, Le Guelte A, Lima Fernandes E, Thirant C, Dwyer J, Bidere N, et al. Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. EMBO Rep 2011; 12: 470-6.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, Vitis SD, et al. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. Cancer Res 2004; 64: 7011-21.

Galzi JL, Hachet-Haas M, Bonnet D, Daubeuf F, Lecat S, Hibert M, et al. Neutralizing endogenous chemokines with small molecules. Principles and potential therapeutic applications. Pharmacol Ther 2010; 126: 39-55.

Gambaryan N, Perros F, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Mazmanian M, Renaud JF, et al. Targeting of c-kit+ haematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension. Eur Respir J 2011; 37: 1392-9.

Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. J Clin Neurosci 2009; 16: 748-54.

Gao K, Li G, Qu Y, Wang M, Cui B, Ji M, et al. TERT promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas. Oncotarget 2016; 7: 8712-25.

Gassenmaier M, Chen D, Buchner A, Henkel L, Schiemann M, Mack B, et al. CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. Stem Cells 2013; 31: 1467-76.

Gatti M, Pattarozzi A, Bajetto A, Würth R, Daga A, Fiaschi P, et al. Inhibition of CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting self-renewal activity. Toxicology 2013; 314: 209-20.

Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, et al. Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. Genesis 2008; 46: 235-45.

Gijsbers K, van Assche G, Joossens S, Struyf S, Proost P, Rutgeerts P, et al. CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: Down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue. Eur J Immunol 2004; 34: 1992-2000.

Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Volgelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. N Engl J Med 2014; 370: 699-708.

Gill BJ, Pisapia DJ, Malone HR, Goldstein H, Lei L, Sonabend A, et al. MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111: 12550-5.

Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. J Immunol 2000; 165: 499-508.

Gravel S, Malouf C, Boulais PE, Berchiche YA, Oishi S, Fujii N, et al. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. J Biol Chem 2010; 285: 37939-43.

Griffero F, Daga A, Marubbi D, Capra MC, Melotti A, Pattarozzi A, et al. Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. J Biol Chem 2009; 284: 7138-48.

Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Mroczko B. The Role of Selected Chemokines and Their Receptors in the Development of Gliomas. Int J Mol Sci 2020; 21: 3704.

Grosse-Gehling P, Fargeas CA, Dittfeld C, Garbe Y, Alison MR, Corbeil D, et al. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. J Pathol 2013; 229: 355-78.

Guo JC, Li J, Zhou L, Yang JY, Zhang ZG, Liang ZY, et al. CXCL12-CXCR7 axis contributes to the invasive phenotype of pancreatic cancer. Oncotarget 2016; 7: 62006-18.

Hachet-Haas M, Balabanian K, Rohmer F, Pons F, Franchet C, Lecat S, et al. Small neutralizing molecules to inhibit actions of the chemokine CXCL12. J Biol Chem 2008; 283: 23189-99.

Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, Arampatzi P, Papamatheakis J, Kretsovali A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. World J Stem Cells 2015; 7: 1150-84.

Haessler U, Pisano M, Wu M, Swartz MA. Dendritic cell chemotaxis in 3D under defined chemokine gradients reveals differential response to ligands CCL21 and CCL19. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108: 5614-9.

Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. Mol Endocrinol 2003; 17: 792-803.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Cancer Cell 2012; 21: 309-22.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.

Harris AL. Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. Nat Rev Cancer 2002; 2: 38-47.

Hassan S, Buchanan M, Jahan K, Aguilar-Mahecha A, Gaboury L, Muller WJ, et al. CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model. Int J Cancer 2011; 129: 225-32.

Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, et al. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. Cancer Res 2010; 70: 3299-308.

Hattermann K, Mentlein R. An infernal trio: the chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in tumor biology. Ann Anat 2013; 195: 103-10.

He H, Wang C, Shen Z, Fang Y, Wang X, Chen W, et al. Upregulated expression of C-X-C chemokine receptor 4 is an independent prognostic predictor for patients with gastric cancer. PLoS One 2013; 8: e71864.

Heck S, Daubeuf F, Le DD, Sester M, Bonnet D, Bals R, et al. Decreased Migration of Dendritic Cells into the Jugular-Nodose Ganglia by the CXCL12 Neutraligand Chalcone 4 in Ovalbumin-Sensitized Asthmatic Mice. Neuroimmunomodulation 2017; 24: 331-40.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. N Engl J Med 2005; 352: 997-1003.

Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 15178-83.

Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD, et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. Cell Death Differ 2011; 18: 829-40.

Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF 1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. Cardiol Res Pract 2012; 2012: 143209.

Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, et al. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. Biochemistry 1997; 36: 13570-8.

Hottinger AF, Stupp R, Homicsko K. Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme. Chin J Cancer 2014; 33: 32-9.

Hou G, Yuan X, Li Y, Hou G, Liu X. Cardamonin, a natural chalcone, reduces 5-fluorouracil resistance of gastric cancer cells through targeting Wnt/β-catenin signal pathway. Invest New Drugs 2020; 38: 329-39.

Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol 2013 Sep; 31: 827-32.

Huang H, Held-Feindt J, Buhl R, Mehdorn HM, Mentlein R. Expression of VEGF and its receptors in different brain tumors. Neurol Res 2005; 27: 371-7.

Huang Z, Wu T, Liu AY, Ouyang G. Differentiation and transdifferentiation potentials of cancer stem cells. Oncotarget 2015; 6: 39550-63.

Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma- initiating cells through Sry-related HMG-box factors. Cell Stem Cell 2009; 5: 504-14.

Ishii A, Kimura T, Sadahiro H, Kawano H, Takubo K, Suzuki M, et al. Histological Characterization of the Tumorigenic “Peri-Necrotic Niche” Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. PLoS ONE 2016; 11: e0147366.

Islam F, Qiao B, Smith RA, Gopalan V, Lam AK-Y. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. Exp Mol Pathol 2015; 98: 184-91.

Jahnichen S, Blanchetot C, Maussang D, Gonzalez-Pajuelo M, Chow KY, Bosch L, et al. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 20565-70.

Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. Cell Adh Migr 2009; 3: 243-9.

Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. Cancer Res 2006; 66: 9852-61.

Jiang H, Cui Y, Wang J, Lin S. Impact of epidemiological characteristics of supratentorial gliomas in adults brought about by the 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system. Oncotarget 2017; 8: 20354-61.

Jin X, Jeon HY, Joo KM, Kim JK, Jin J, Kim SH, et al. Frizzled 4 regulates stemness and invasiveness of migrating glioma cells established by serial intracranial transplantation. Cancer Res 2011; 71: 3066-75.

Johannessen TC, Prestegarden L, Grudic A, Hegi ME, Tysnes BB, Bjerkvig R. The DNA repair protein ALKBH2 mediates temozolomide resistance in human glioblastoma cells. Neuro Oncol 2013; 15: 269-78.

Joy AM, Beaudry CE, Tran NL, Ponce FA, Holz DR, Demuth T, et al. Migrating glioma cells activate the PI3-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis. J Cell Sci 2003; 116: 4409-17.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer 2009; 9: 239-52.

Jung MJ, Rho JK, Kim YM, Jung JE, Jin YB, Ko YG, et al. Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. Oncogene 2013; 32: 209-21.

Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P, et al. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1840-7.

Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. Mol Pharmacol 2009; 75: 1240-7.

Kalkan R, Atli Eİ, Özdemir M, Çiftçi E, Aydin HE, Artan S, et al. IDH1 mutations is prognostic marker for primary glioblastoma multiforme but MGMT hypermethylation is not prognostic for primary glioblastoma multiforme. Gene 2015a; 554: 81-6.

Kalkan R. Glioblastoma Stem Cells as a New Therapeutic Target for Glioblastoma. Clin Med Insights Oncol 2015b; 9: 95-103.

Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. Arthritis Rheum 2002; 46: 130-7.

Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease. J Leukoc Biol 2010; 88: 463-73.

Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. Acta Neuropathol 2012; 124: 439-47.

Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110: 6021-6.

Kimura Y, Baba K. Antitumor and antimetastatic activities of Angelica keiskei roots, part 1: Isolation of an active substance, xanthoangelol. Int J Cancer 2003; 106: 429-37.

Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic activities of 4- hydroxyderricin isolated from Angelica keiskei roots. Planta Med 2004; 70: 211-19.

Kimura Y. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. In Vivo 2005; 19: 37-60.

King CC, Sastri M, Chang P, Pennypacker J, Taylor SS. The rate of NF-κB nuclear translocation is regulated by PKA and A kinase interacting protein 1. PLoS One 2011; 6: e18713

Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, et al. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. Cancer Res 2004; 64: 3288-95.

Klarenbeek A, Maussang D, Blanchetot C, Saunders M, van der Woning S, Smit M, et al. Targeting chemokines and chemokine receptors with antibodies. Drug Discov Today Technol 2012; 9: e227-314.

Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature 2016; 529: 490-5.

Kleist AB, Getschman AE, Ziarek JJ, Nevins AM, Gauthier PA, Chevigné A, et al. New paradigms in chemokine receptor signal transduction: Moving beyond the two-site model. Biochem Pharmacol 2016; 114: 53-68.

Komatani H, Sugita Y, Arakawa F, Ohshima K, Shigemori M. Expression of CXCL12 on pseudopalisading cells and proliferating microvessels in glioblastomas: an accelerated growth factor in glioblastomas. Int J Oncol 2009; 34: 665-72.

Kong BH, Moon JH, Huh YM, Shim JK, Lee JH, Kim EH, et al. Prognostic value of glioma cancer stem cell isolation in survival of primary glioblastoma patients. Stem Cells Int 2014; 2014: 838950.

Köstler WJ, Yarden Y. Chapter 61 - The Epidermal Growth Factor Receptor Family A2 - Bradshaw, Ralph A. In: Dennis EA, editor. Handbook of Cell Signaling (Second Edition). San Diego: Academic Press 2010; pp. 435-41.

Kucia M, Reca R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. Stem Cells 2005; 23: 879-94.

Kufavera I, Salanga CL, Handel TM. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. Immunol Cell Biol 2015; 93: 372-83.

Kuritzkes DR. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr Opin HIV AIDS 2009; 4: 82-7.

Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, et al. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. Biochemistry 1999; 38: 12959-68.

Kusumi A, Shirai YM, Koyama-Honda I, Suzuki KG, Fujiwara TK. Hierarchical organization of the plasma membrane: investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy. FEBS Lett 2010; 584: 1814-23.

Lagane B, Chow KY, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, et al. CXCR4 dimerization and betaarrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. Blood 2008; 112: 34-44.

Laks DR, Visnyei K, Kornblum HI. Brain tumor stem cells as therapeutic targets in models of glioma. Yonsei Med J 2010; 51: 633-40.

Lau EK, Paavola CD, Johnson Z, Gaudry JP, Geretti E, Borlat F, et al. Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. J Biol Chem 2004; 279: 22294-305.

Lee CC, Lai JH, Hueng DY, Ma HI, Chung Y, Sun YY, et al. Disrupting the CXCL12/CXCR4 axis disturbs the characteristics of glioblastoma stem-like cells of rat RG2 glioblastoma. Cancer Cell Int 2013a; 13: 85.

Lee E, Han J, Kim K, Choi H, Cho EG, Lee TR. CXCR7 mediates SDF1-induced melanocyte migration. Pigment Cell Melanoma Res 2013b; 26: 58-66.

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. Cancer Cell 2006; 9: 391-403.

Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. Blood 2009; 113: 6085-93.

Lewellis SW, Knaut H. Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations. Semin Cell Dev Biol 2012; 23: 333-40.

Li L, Bhatia R. Stem Cell Quiescence. Clin Cancer Res 2011; 17: 4936-41.

Li R, Kenyon GL, Cohen FE, Chen X, Gong B, Dominguez JN, et al. In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives. J Med Chem 1995; 38: 5031-7.

Liang Z, Wu H, Reddy S, Zhu A, Wang S, Blevins D, et al. Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA. Biochem Biophys Res Commun 2007; 363: 542-6.

Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, et al. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. Cancer Res 2004; 64: 4302-8.

Liang Z, Zhan W, Zhu A, Yoon Y, Lin S, Sasaki M, et al. Development of a unique small molecule modulator of CXCR4. PLoS ONE 2012; 7: e34038.

Lin E, Rosenthal MA, Le BH, Eastman P. Neuro-oncology and palliative care : A challenging interface. Neuro Oncol 2012; 14: iv3-7.

Lin J, Amir A. From single-cell variability to population growth. Phys Rev E 2020; 101: 012401.

Lin YM, Zhou Y, Flavin MT, Zhou LM, Nie W, Chen FC. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. Bioorg Med Chem 2002; 10: 2795-802.

Ling X, Spaeth E, Chen Y, Shi Y, Zhang W, Schober W, et al. The CXCR4 antagonist AMD3465 regulates oncogenic signaling and invasiveness in vitro and prevents breast cancer growth and metastasis in vivo. PLoS ONE 2013; 8: e58426.

Lipfert J, Ödemis V, Engele J. Grk2 is an essential regulator of CXCR7 signalling in astrocytes. Am J Respir Crit Care Med 2013; 184: 116-23.

Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. Chin J Cancer 2013a; 32: 483-7.

Liu C, Pham K, Luo D, Reynolds BA, Hothi P, Foltz G, et al. Expression and functional heterogeneity of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in primary patient-derived glioblastoma cells. PLoS ONE 2013b; 8: e59750.

Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. Mol Cancer 2006; 5: 67.

Liu H, Lv L, Yang K. Chemotherapy targeting cancer stem cells. Am J Cancer Res 2015; 5: 880-93.

Liu J, Zhang X, Yan X, Sun M, Fan Y, Huang Y. Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. Oncol Lett 2019; 17: 95-102.

Liu Q, Chen H, Ojode T, Gao X, Anaya-O'Brien S, Turner NA, et al. WHIM syndrome caused by a single amino acid substitution in the carboxy-tail of chemokine receptor CXCR4. Blood 2012a; 120: 181-9.

Liu SC, Alomran R, Chernikova SB, Lartey F, Stafford J, Jang TC, et al. Blockade of SDF-1 after irradiation inhibits tumor recurrences of autochthonous brain tumors in rats. Neuro Oncol 2014; 16: 21-8.

Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. Acta Neuropathol 2012b; 124: 615-25.

Long P, Sun F, Ma Y, Huang Y. Inhibition of CXCR4 and CXCR7 for reduction of cell proliferation and invasion in human endometrial cancer. Tumour Biol 2016; 37: 7473-80.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol 2007; 114: 97-109.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol 2016; 131: 803-20.

Lounsbury N. Advances in CXCR7 Modulators. Pharmaceuticals (Basel) 2020; 13: 33.

Lukacs NW, Berlin A, Schols D, Skerlj RT, Bridger GJ. AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. Am J Pathol 2002; 160: 1353-60.

Luker KE, Gupta M, Luker GD. Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation. FASEB J 2009; 23: 823-34.

Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. Cancer Lett 2006; 238: 30-41.

Luo J, Busillo JM, Stumm R, Benovic JL. G Protein-Coupled Receptor Kinase 3 and Protein Kinase C Phosphorylate the Distal C-Terminal Tail of the Chemokine Receptor CXCR4 and Mediate Recruitment of β-Arrestin. Mol Pharmacol 2017; 91: 554-66.

Luo L, Li T. Idiopathic CD4 lymphocytopenia and opportunistic infection an update. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; 54: 283-9.

Ma B, Zhu Z, Homer RJ, Gerard C, Strieter R, Elias JA. The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. J Immunol 2004; 172: 1872-81.

Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 9448-53.

Macoska JA. Chemokines and BPH/LUTS. Differentiation 2011; 82: 253-60.

Mahabaleshwar H, Tarbashevich K, Nowak M, Brand M, Raz E. β-arrestin control of late endosomal sorting facilitates decoy receptor function and chemokine gradient formation. Development 2012; 139: 2897-902.

Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older

than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 2012; 13: 916-26.

Mao H, LeBrun DG, Yang J, Zhu VF, Li M. Deregulated Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. Cancer Invest 2012; 30: 48-56.

Maréchal R, Van Laethem JL. Towards a tailored therapy in pancreatic cancer. Acta Gastroenterol Belg 2013; 76: 49-56.

Mariani L, Beaudry C, McDonough WS, Hoelzinger DB, Demuth T, Ross KR, et al. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: A cDNA microarray analysis. J Neurooncol 2001; 53: 161-76.

Martinez A, Kapas S, Miller MJ, Ward Y, Cuttitta F. Coexpression of receptors for adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin in pancreatic beta-cells. Endocrinology 2000; 141: 406-11.

Masuda M, Nakashima H, Ueda T, Naba H, Ikoma R, Otaka A, et al. A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12,Lys7]-polyphemusin II). Biochem Biophys Res Commun 1992; 189: 845-50.

Matsuura M, Kimura Y, Nakata K, Baba K, Okuda H. Artery Relaxation by Chalcones Isolated from the Roots of Angelica keiskei. Planta Med 2001; 67: 230-5.

Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 15735-40.

Mielcke TR, Muradás TC, Filippi-Chiela EC, Amaral MEA, Kist LW, Bogo MR, et al. Mechanisms underlying the antiproliferative effects of a series of quinoxaline-derived chalcones. Sci Rep 2017; 7: 15850.

Miller MC, Mayo KH. Chemokines from a Structural Perspective. Int J Mol Sci 2017; 18: 2088.

Mirimanoff R, Mason W, Van den Bent M, Kortmann R, Taphoorn M, Brandes A, et al. Is long-term survival in glioblastoma possible? Updated results of the EORTC/NCIC phase III randomized trial on radiotherapy (RT) and concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) versus RT alone. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007; 69: S2.

Miyazaki T, Uemae Y, Ishikawa E. CXCL12/CXCR4 signaling in glioma stem cells—prospects for therapeutic intervention. Transl Cancer Res 2017; 6(Suppl 2): S434-S437.

Mizukoshi E, Kaneko S. Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy. Int J Mol Sci 2019; 20: 1823.

Molina ES, Pillat MM, Moura-Neto V, Lah TT, Ulrich H. Glioblastoma stem- like cells: approaches for isolation and characterization. J Cancer Stem Cell Res 2014; 2: e1007.

Mollica Poeta V, Massara M, Capucetti A, Bonecchi R. Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. Front Immunol 2019; 10: 379.

Montani D, Perros F, Gambaryan N, Girerd B, Dorfmuller P, Price LC, et al. C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. Cell Mol Neurobiol 2011; 33: 111-8.

Monteclaro FS, Charo IF. The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. Receptor activation by a pseudo-tethered ligand. J Biol Chem 1997; 272: 23186-90.

Monteclaro FS, Charo IF. The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. J Biol Chem 1996; 271: 19084-92.

Moura B, Migliorini D, Bourhis J, Daniel R, Levivier M, Hottinger AF. [Multidisciplinar approach to the management of gliomas]. Rev Med Suisse 2016; 12: 821-5.

Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tamamura H, et al. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. J Exp Med 1997; 186: 1389-93.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev 2000; 52: 145-76.

Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. Mol Cell Proteomics 2012; 11: M111.014647.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature 1996; 382: 635-8.

Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, et al. Aberrant Signaling Pathways in Glioma. Cancers 2011; 3: 3242-78.

Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. Lab Investig J Tech Methods Pathol 2001; 81: 77-82.

Naor Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. Front Neuroendocrinol 2009; 30: 10-29.

Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. PLoS ONE 2010; 5: e9175.

Nawaz J, Rasul A, Shah MA, Hussain G, Riaz A, Sarfraz I, et al. Cardamonin: A new player to fight cancer via multiple cancer signaling pathways. Life Sci 2020; 250: 117591.

Nazari A, Khorramdelazad H, Hassanshahi G. Biological/pathological functions of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axes in the pathogenesis of bladder cancer. Int J Clin Oncol 2017; 22: 991-1000.

Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. Nat Rev Drug Discov 2011; 10: 767-77.

Nibbs RJB, Graham GJ. Immune regulation by atypical chemokine receptors. Nat Rev Immunol 2013; 13: 815-29.

Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. Acta Neuropathol 2013; 126: 931-7.

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. Cancer Cell 2010; 17: 510-22.

Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Nature 1996; 382: 833-5.

Odemis V, Boosmann K, Heinen A, Kury P, Engele J. CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. J Cell Sci 2010; 123: 1081-8.

Offermanns S. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. Prog Biophys Mol Biol 2003; 83: 101-30.

Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. Clin Cancer Res 2013; 19: 764-72.

Okada M, Sato A, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Suzuki S, et al. JNK contributes to temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via regulation of MGMT expression. Int J Oncol 2014; 44: 591-9.

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. Cancer Res 1999; 59: 5002-11.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell 2005; 121: 335-48.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. Response to "the epidemiology of glioma in adults: a 'state of the science' review". Neuro Oncol 2015; 17: 624-6.

Ottaiano A, Franco R, Aiello Talamanca A, Liguori G, Tatangelo F, Delrio P et al. Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. Clin Cancer Res 2006; 12: 2795-803.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. Science 2008; 321: 1807-12.

Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, et al. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio- neuronal tumors. BMC Cancer 2010; 10: 66.

Pattarozzi A, Gatti M, Barbieri F, Würth R, Porcile C, Lunardi G, et al. 17beta-estradiol promotes breast cancer cell proliferation-inducing stromal cell-derived factor-1-mediated epidermal growth factor receptor transactivation: reversal by gefitinib pretreatment. Mol Pharmacol 2008; 73: 191-202.

Peled A, Abraham M, Avivi I, Rowe JM, Beider K, Wald H, et al. The high-affinity CXCR4 antagonist BKT140 is safe and induces a robust mobilization of human CD34+ cells in patients with multiple myeloma. Clin. Cancer Res 2014; 20: 469-79.

Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. Nature 2006; 444: 761-5.

Pillarisetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. Inflammation 2001; 25: 293-300.

Ping YF, Yao XH, Jiang JY, Zhao LT, Yu SC, Jiang T, et al. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling. J Pathol 2011; 224: 344-54.

Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, et al. Induction of the chemokine stromalderived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. J Clin Invest 2000; 106: 1331-9.

Proost P, Struyf S, van Damme J, Fiten P, Ugarte-Berzal E, Opdenakker G. Chemokine isoforms and processing in inflammation and immunity. J Autoimmun 2017; 85: 45-57.

Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 1885-90.

Proudfoot AEI, Johnson Z, Bonvin P, Handel TM. Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System. Pharmaceuticals (Basel) 2017; 10: 70.

Qin L, Kufareva I, Holden LG, Wang C, Zheng Y, Zhao C, et al. Structural biology. Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. Science 2015; 347: 1117-22.

Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 628-32.

Rajagopalan L, Rajarathnam K. Structural basis of chemokine receptor function—A model for binding affinity and ligand selectivity. Biosci Rep 2006; 26: 325-39.

Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. Exp Cell Res 2010; 316: 2713-22.

Ratajczak MZ, Kim C, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. The expanding family of bone marrow homing factors for hematopoietic stem cells: stromal derived factor 1 is not the only player in the game. Scientific World Journal 2012; 2012: 758512.

Regenass P, Abboud D, Daubeuf F, Lehalle C, Gizzi P, Riché S, et al. Discovery of a Locally and Orally Active CXCL12 Neutraligand (LIT-927) with Anti-inflammatory Effect in a Murine Model of Allergic Airway Hypereosinophilia. J Med Chem 2018; 61: 7671-86.

Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism. J Natl Cancer Inst 2010; 102: 932-41.

Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutierrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF-1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. Clin Cancer Res 2000; 6: 102-11.

Rettig MP, Ansstas G, DiPersio JF. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of CXCR4 and VLA-4. Leukemia 2012; 26: 34-53.

Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. Acta Neuropathol 2015; 129: 867-73.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001; 414: 105-11.

Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. Nature 2010; 468: 824-8.

Richardson PJ. CXCR4 and Glioblastoma. Anticancer Agents Med Chem 2016; 16: 59-74.

Richert MM, Vaidya KS, Mills CN, Wong D, Korz W, Hurst DR, et al. Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. Oncol Rep 2009; 21: 761-7.

Richter MF, Drown BS, Riley AP, Garcia A, Shirai T, Svec RL, et al. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic. Nature 2017; 545: 299-304.

Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme : A prospective randomized clinical trial. J Clin Oncol 2004; 22: 1583-8.

Roland J, Murphy BJ, Ahr B, Robert-Hebmann V, Delauzun V, Nye KE, et al. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. Blood 2003; 101:399-406.

Romain B, Hachet-Haas M, Rohr S, Brigand C, Galzi JL, Gaub MP, et al. Hypoxia differentially regulated CXCR4 and CXCR7 signaling in colon cancer. Mol Cancer 2014; 13: 58.

Rot A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. Eur J Immunol 1993; 23: 303-6.

Ruiz-Ontanon P, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, et al. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. Stem Cells 2013; 31: 1075-85.

Salanga CL, O'Hayre M, Handel TM. Modulation of Chemokine Receptor Activity through Dimerization and Crosstalk. Cell Mol Life Sci 2009; 66: 1370-86.

Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, Calatozzolo C, Ciusani E, et al. Glioblastoma derived tumorospheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. Glia 2006; 54: 850-60.

Sánchez-Martín L, Sánchez-Mateos P, Cabañas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. Trends Mol Med 2013; 19: 12-22.

Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. J Clin Oncol 2009; 27: 4150-4.

Sathornsumetee S, Cao Y, Marcello JE, Herndon JE, McLendon RE, Desjardins A, et al. Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. J Clin Oncol 2008; 26: 271-8.

Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, et al. MEK-ERK Signaling Dictates DNA-Repair Gene MGMT Expression and Temozolomide Resistance of Stem-Like Glioblastoma Cells via the MDM2-p53 Axis. Stem Cells 2011; 29: 1942-51.

Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. Clin Cancer Res 2005; 11: 1835-41.

Schulte A, Gunther HS, Phillips HS, Kemming D, Martens T, Kharbanda S, et al. A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. Glia 2011; 59: 590–602.

Sciaccaluga M, D'Alessandro G, Pagani F, Ferrara G, Lopez N, Warr T, et al. Functional cross talk between CXCR4 and PDGFR on glioblastoma cells is essential for migration. PLoS One 2013; 8: e73426.

Sciaccaluga M, Fioretti B, Catacuzzeno L, Pagani F, Bertollini C, Rosito M, et al. CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca2+-activated K+ channel activity. Am J Physiol Cell Physiol 2010; 299: C175-184.

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer : Cancer stem cells versus clonal evolution. Cell 2009; 138: 822-9.

Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. Genomics 1995; 28: 495-500.

Shu HK, Yoon Y, Hong S, Xu K, Gao H, Hao C, et al. Inhibition of the CXCL12/CXCR4-axis as preventive therapy for radiation-induced pulmonary fibrosis. PLoS ONE 2013; 8: e79768.

Sierro F, Biben C, Martínez-Muñoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 14759-64.

Silvestre DC, Pineda JR, Hoffschir F, Studler JM, Mouthon MA, Pflumio F, et al. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. Stem Cells 2011; 29: 440-51.

Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, et al. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. Cytokine Growth Factor Rev 2013; 24: 41-9.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 2003; 63: 5821-8.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 2004; 432: 396-401.

Smith JS, Alagesan P, Desai NK, Pack TF, Wu JH, Inoue A, et al. C-X-C Motif Chemokine Receptor 3 Splice Variants Differentially Activate Beta-Arrestins to Regulate Downstream Signaling Pathways. Mol Pharmacol 2017; 92: 136-50.

Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108: 4274-80.

Soriano SF, Serrano A, Hernanz-Falcón P, Ana AMD, Monterrubio M, Martínez-a C, et al. Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. Eur J Immunol 2003; 33: 1328-33.

Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. Nat Rev Cancer 2014; 14: 611-22.

Spence AM, Muzi M, Swanson KR, O'Sullivan F, Rockhill JK, Rajendran JG, et al. Regional Hypoxia in Glioblastoma Multiforme Quantified with [18F]Fluoromisonidazole Positron Emission Tomography before Radiotherapy: Correlation with Time to Progression and Survival. Clin Cancer Res 2008; 14: 2623-30.

Stevenson CB, Ehtesham M, McMillan KM, Valadez JG, Edgeworth ML, Price RR et al. CXCR4 expression is elevated in glioblastoma multiforme and correlates with an increase in intensity and extent of peritumoral T2 weighted magnetic resonance imaging signal abnormalities. Neurosurgery 2008; 63: 560-9.

Stone MJ, Hayward JA, Huang C, E Huma Z, Sanchez J. Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. Int J Mol Sci 2017; 18: 342.

Stumm RK, Rummel J, Junker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Krieglstein J, et al. A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. J Neurosci 2002; 22: 5865-78.

Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2014; 25: iii93-101.

Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, et al. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma : A randomized clinical trial. JAMA 2015; 314: 2535-43.

Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. Cancer Cell 2012; 22: 425-37.

Sugii M, Ohkita M, Taniguchi M, Baba K, Kawai Y, Tahara C, et al. Xanthoangelol D isolated from the roots of Angelica keiskei inhibits endothelin-1 production through the suppression of nuclear factor-κB. Biol Pharm Bull. 2005; 28: 607-10.

Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. Cancer Metastasis Rev 2010; 29: 709-22.

Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. J Biol Chem 2002; 277: 49212-19.

Sun YX, Schneider A, Jung Y, Wang J, Dai J, Wang J, et al. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. J Bone Miner Res 2005; 20: 318-29.

Sungkaworn T, Jobin ML, Burnecki K, Weron A, Lohse MJ, Calebiro D. Single-molecule imaging reveals receptor-G protein interactions at cell surface hot spots. Nature 2017; 550: 543-7.

Sutter R, Yadirgi G, Marino S. Neural stem cells, tumour stem cells and brain tumours: dangerous relationships? Biochim Biophys Acta 2007; 1776: 125-37.

Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM, Patel AP, Wakimoto H, Rabkin SD, et al. Reconstructing and Reprogramming the Tumor-Propagating Potential of Glioblastoma Stem-like Cells. Cell 2014; 157: 580-94.

Suzuki H, Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. Biochem Biophys Res Commun 2014; 455: 35-42.

Suzuki Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4 (+) T cells to stromal cell- derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4(+) T cells. J Immunol 2001; 167: 3064-73.

Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. Cancer Res 2012; 72: 2473-80.

Szpakowska M, Perez Bercoff D, Chevigné A. Closing the ring: a fourth extracellular loop in chemokine receptors. Sci Signal 2014; 7: pe21.

Tabouret E, Tchoghandjian A, Denicolai E, Delfino C, Metellus P, Padovani L, et al. Angiogenic switch from VEGFR2/HF1a in newly diagnosed glioblastoma to CXCR4- SDF-1 pathway in recurrent paired tumour after radiotherapy and temozolomide. Neuro Oncol 2014; 16: S5-S7.

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature 1998; 393: 591-4.

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. Cancer Res 2002; 62: 1832-7.

Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T. Inhibition of the NF-kappaB transcriptional activity by protein kinase A. Eur J Biochem 2002; 269: 4559-65

Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Gotoh K, Kanamoto T, Xu Y, et al. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. Bioorg Med Chem Lett 2001; 11: 1897-902.

Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. Cell Res 2012; 22: 457-72.

Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. Science 1993; 261: 600-3.

Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. Clin Cancer Res 2010; 16: 2927-31.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz- Sloan JS, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. Cancer Epidemiol Prev Biomark 2014; 23: 1985-96.

Thelen M, Muñoz LM, Rodríguez-Frade JM, Mellado M. Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. Curr Opin Pharmacol 2010; 10: 38-43.

Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. Nat Immunol 2001; 2: 129-34.

Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: An eccentric trio? J. Neuroimmunol 2008;198:9-13.

Thèse Marie Fève. Utilisation d'une approche de chimie biologie intégrative dans la recherche de nouvelles molécules actives sur la prolifération et la différenciation des cellules souches cancéreuses. Université de strasbourg 2012.

Thirant C, Bessette B, Varlet P, Puget S, Cadusseau J, Tavares Sdos R, et al. Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. PLoS One 2011; 6: e16375.

Thompson S, Martínez-Burgo B, Sepuru KM, Rajarathnam K, Kirby JA, Sheerin NS, et al. Regulation of Chemokine Function: The Roles of GAG-Binding and Post-Translational Nitration. Int J Mol Sci 2017; 18: 1692.

Trautmann F, Cojoc M, Kurth I, Melin N, Bouchez LC, Dubrovska A, et al. CXCR4 as biomarker for radioresistant cancer stem cells. Int J Radiat Biol 2014; 90: 687-99.

Tripathi V, Verma R, Dinda A, Malhotra N, Kaur J, Luthra K. Differential expression of RDC1/CXCR7 in the human placenta. J Clin Immunol 2009; 29: 379-86.

Tuinstra RL, Peterson FC, Kutlesa S, Elgin ES, Kron MA, Volkman BF. Interconversion between two unrelated protein folds in the lymphotactin native state. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105: 5057-62.

Uemae Y, Ishikawa E, Osuka S, Matsuda M, Sakamoto N, Takano S, et al. CXCL12 secreted from glioma stem cells regulates their proliferation. J Neurooncol 2014; 117: 43-51.

Uto-Konomi A, McKibben B, Wirtz J, Sato Y, Takano A, Nanki T, et al. CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. Biochem Biophys Res Commun 2013; 431: 772-6.

van den Bent MJ, Hartmann C, Preusser M, Ströbel T, Dubbink HJ, Kros JM, et al. Interlaboratory comparison of IDH mutation detection. J Neurooncol 2013; 112: 173-8.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer Res 1989; 49: 6449-65.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell 2010; 17: 98-110.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 2008; 8: 755-68.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. Cell Stem Cell 2012; 10: 717-28.

Visvader JE. Cells of origin in cancer. Nature 2011; 469: 314-22.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. J Clin Oncol 2007; 25: 4722-9.

Wakimoto H, Mohapatra G, Kanai R, Curry WT Jr, Yip S, Nitta M, et al. Maintenance of primary tumor phenotype and genotype in glioblastoma stem cells. Neuro Oncol 2012; 14: 132-144.

Walden D, Kunnimalaiyaan S, Sokolowski K, Clark TG, Kunnimalaiyaan M. Antiproliferative and apoptotic effects of xanthohumol in cholangiocarcinoma. Oncotarget 2017; 8: 88069-78.

Walters MJ, Ebsworth K, Berahovich RD, Penfold ME, Liu SC, Al Omran R, et al. Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats. Br J Cancer 2014; 110: 1179-88.

Wang A, Guilpain P, Chong BF, Chouzenoux S, Guillevin L, Du Y, et al. Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2010c; 62: 3436-46.

Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. Stem Cells 2010a; 28: 17-28.

Wang L, Babikir H, Müller S, Yagnik G, Shamardani K, Catalan F, et al. The Phenotypes of Proliferating Glioblastoma Cells Reside on a Single Axis of Variation. Cancer Discov 2019; 9: 1708-19.

Wang L, Chen W, Gao L, Yang Q, Liu B, Wu Z, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. World J Surg Oncol 2012; 10: 212-19.

Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. Cancer Cell 2017a; 32: 42-56.

Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. Nature 2010b; 468: 829-33.

Wang X, Cao Y, Zhang S, Chen Z, Fan L, Shen X, et al. Stem cell autocrine CXCL12/CXCR4 stimulates invasion and metastasis of esophageal cancer. Oncotarget 2017b; 8: 36149-60.

Wang Y, Li G, Stanco A, Long JE, Crawford D, Potter GB, et al. CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. Neuron 2011; 69: 61-76.

Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. Science 1956; 123: 309-14.

Weber M, Hauschild R, Schwarz J, Moussion C, de Vries I, Legler DF, et al. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. Science 2013; 339: 328-32.

Wehler T, Wolfert F, Schimanski CC, Gockel I, Herr W, Biesterfeld S, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease. Oncol Rep 2006; 16: 1159-64.

Wei Y, Jiang Y, Zou F, Liu Y, Wang S, Xu N, et al. Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110: 6829-34.

Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? Neuro Oncol 2013; 15: 4-27.

Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, Van den Bent MJ, Wick W et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? Nat Rev Neurol 2010b; 6: 39-51.

Weller M. Temozolomide and MGMT forever? Neuro Oncol 2010a; 12: 219-20.

Werner L, Guzner-Gur H, Dotan I. Involvement of CXCR4/CXCR7/CXCL12 Interactions in Inflammatory bowel disease. Theranostics 2013; 3: 40-6.

Wong D, Korz W. Translating an antagonist of chemokine receptor CXCR4: from bench to bedside. Clin Cancer Res 2008; 14: 7975-80.

Wu B, Chien EYT, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. Science 2010; 330: 1066-71.

Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. Nat Genet 2014; 46: 444-50.

Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. Cancer Lett 2017; 387: 61-8.

Würth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. Front Cell Neurosci 2014; 8: 144.

Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N, et al. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. EBioMedicine 2015; 2: 1351-63.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med 2009; 360: 765-73.

Yoon Y, Liang Z, Zhang X, Choe M, Zhu A, Cho HT, et al. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. Cancer Res 2007; 67: 7518-24.

Young KC, Torres E, Hatzistergos KE, Hehre D, Suguihara C, Hare JM. Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension. Circ Res 2009; 104: 1293-301.

Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, et al. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. Gene 2006; 374: 174-9.

Yu L, Hales CA. Effect of chemokine receptor CXCR4 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats. Respir Res 2011; 12: 21.

Zabel BA, Lewén S, Berahovich RD, Jaen JC, Schall TJ. The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. Mol Cancer 2011; 10: 73.

Zabel BA, Wang Y, Lewen S, Berahovich RD, Penfold ME, Zhang P, et al. Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. J Immunol 2009; 183: 3204-11.

Zadeh G, Bhat KPL, Aldape K. EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma: Partners in Crime. Cancer Cell 2013; 24: 403-4.

Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smirnova I, Huang Y, et al. Hypoxia– and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. Am J Pathol 2008; 173: 545-60.

Zagzag D, Krishnamachary B, Yee H, Okuyama H, Chiriboga L, Ali MA, et al. Stromal cellderived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-offunction induces expression of a ligand and its receptor. Cancer Res 2005; 65: 6178-88.

Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. Lab Invest 2006; 86: 1221-32.

Zeniou M, Fève M, Mameri S, Dong J, Salomé C, Chen W, et al. Chemical Library Screening and Structure-Function Relationship Studies Identify Bisacodyl as a Potent and Selective Cytotoxic Agent Towards Quiescent Human Glioblastoma Tumor Stem-Like Cells. PLOS ONE 2015; 10: e0134793.

Zhang SS, Han ZP, Jing YY, Tao SF, Li TJ, Wang H, et al. CD133(+) CXCR4(+) colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. BMC Med 2012; 10: 85.

Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1α. Science 2009; 324: 261-5.

Zheng X, Xie Q, Li S, Zhang W. CXCR4-positive subset of glioma is enriched for cancer stem cells. Oncol Res 2012; 19: 555-61.

Zhong C, Wang J, Li B, Xiang H, Ultsch M, Coons M, et al. Development and preclinical characterization of a humanized antibody targeting CXCL12. Clin Cancer Res 2013; 19: 4433-45.

Zhou Q, Wang Y, Ma W. The progress of immunotherapy for glioblastoma. Hum Vaccines Immunother 2015; 11: 2654-8.

Zhuang C, Zhang W, Sheng C, Zhang W, Xing C, Miao Z. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. Chem Rev 2017; 117: 7762-810.

Ziarek JJ, Kleist AB, London N, Raveh B, Montpas N, Bonneterre J, et al. Structural basis for chemokine recognition by a G protein-coupled receptor and implications for receptor activation. Sci Signal 2017; 10: eaah5756.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 2000; 12: 121-7.

Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. Immunity 2012; 36: 705-16.

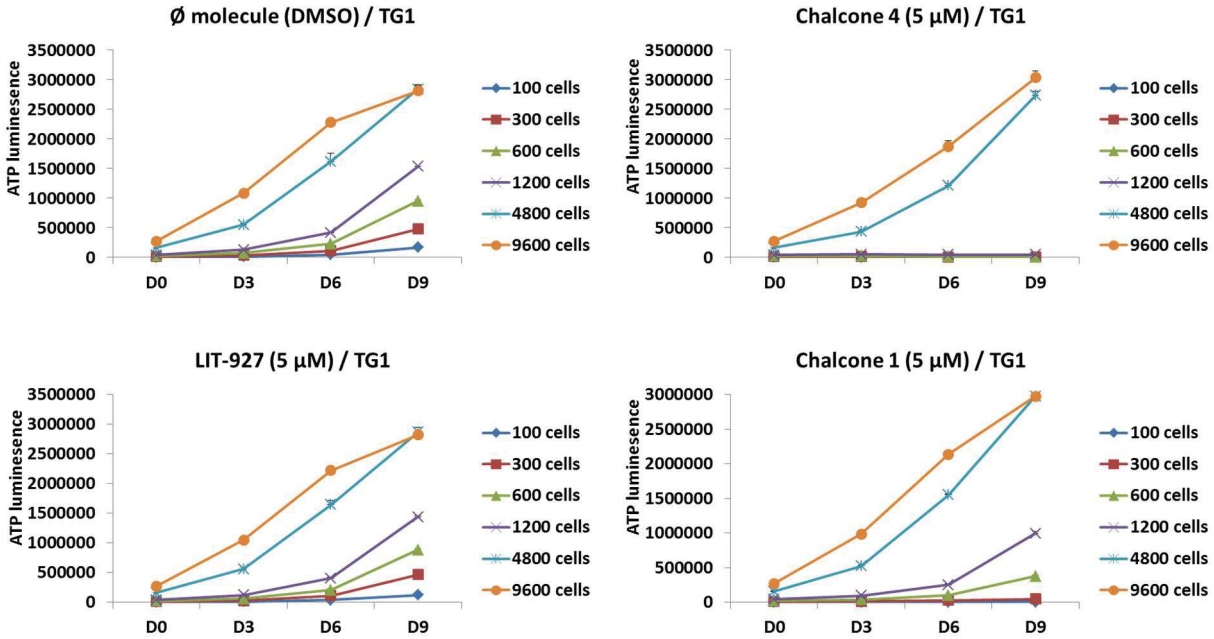
Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. Nature 1998; 393: 595-9.

Zweemer AJM, Toraskar J, Heitman LH, IJzerman AP. Bias in chemokine receptor signalling. Trends Immunol 2014; 35: 243-52.

Annexes

ANNEXE I : Effet des chalcones 1, 4, LIT-927 sur la prolifération et la survie de cellules CI-GBM

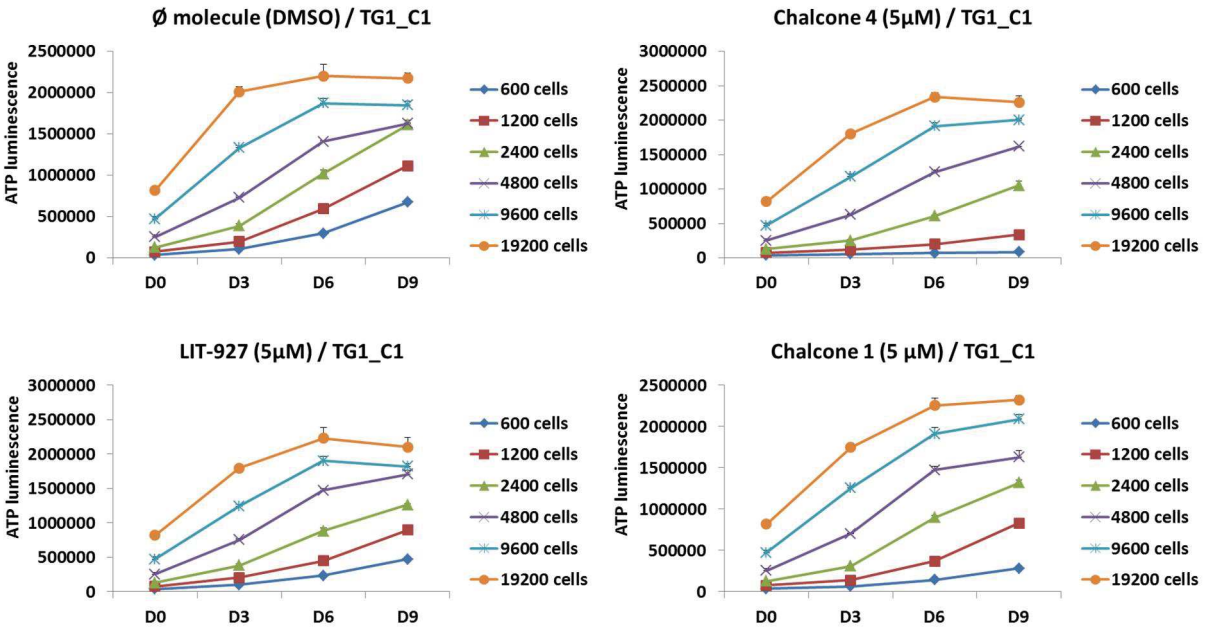
Annexe IA : TG1



Effet des molécules chalcones sur la croissance des cellules TG1.

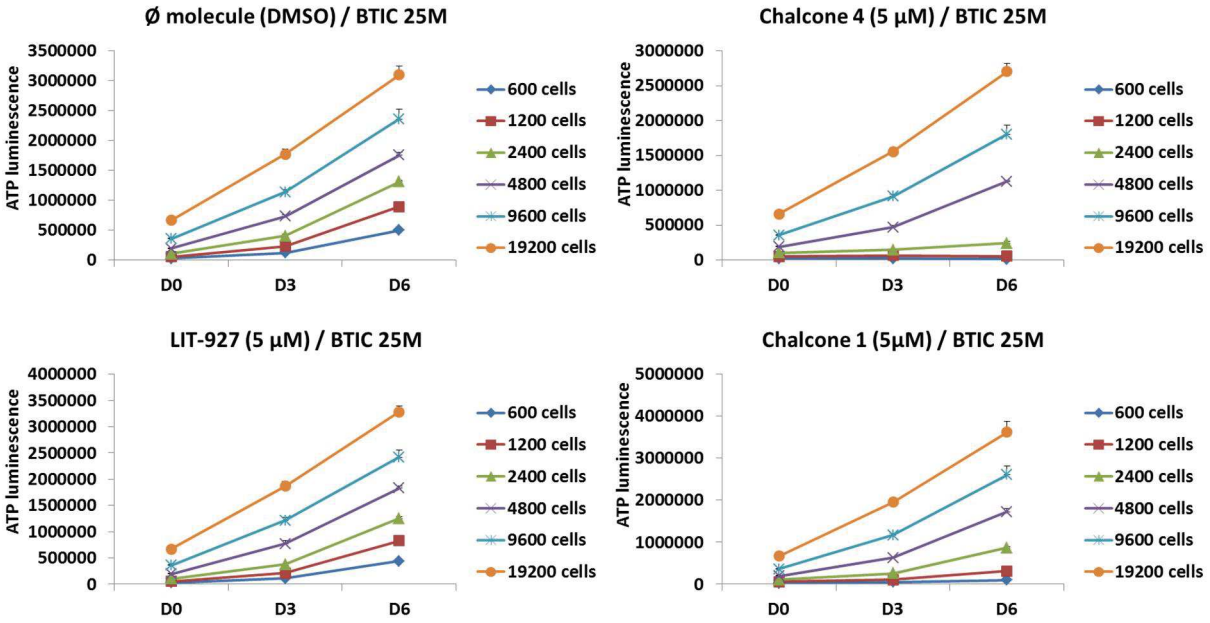
Les cellules en prolifération ont été ensemencées à différentes densités de 100 à 9600 cellules par puits dans une plaque greiner 96 puits (réf. 6550990), en absence ou en présence des molécules chalcones à une concentration de 5 µM et une concentration finale de 0,1 % de DMSO dans tous les puits. Chaque condition est testée en triplicata. La croissance cellulaire a été évaluée par la mesure du taux d'ATP à l'aide du système CellTiter-Glo ATP luminescent assay, comme indiqué dans la section "Matériels et Méthodes". Les taux d'ATP ont été mesurés à 3 jours (D3), 6 jours (D6) ou 9 jours (D9), et un changement du milieu NS34 avec et sans les molécules est également effectué dans les plaques des prochaines lectures.

Annexe IB : TG1_C1



Effet des molécules chalcones sur la croissance et la survie des cellules TG1_C1.
La croissance cellulaire a été évaluée par la mesure du taux d'ATP à l'aide du système CellTiter-Glo ATP luminescent assay, comme indiqué dans la section "Matériels et Méthodes". Les taux d'ATP ont été mesurés à 3 jours (D3), 6 jours (D6) ou 9 jours (D9).

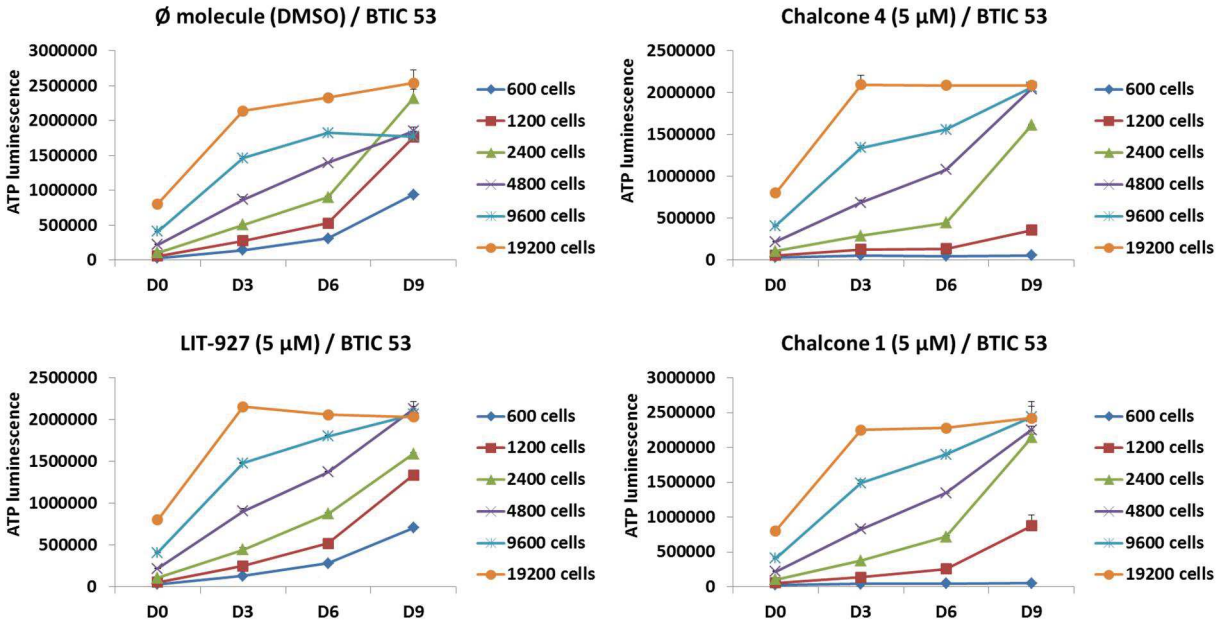
Annexe IC : BTIC 25M



Effet des molécules chalcones sur la croissance et la survie des cellules BTIC 25M.
Les cellules en prolifération ont été ensemencées à différentes densités dans une plaque greiner 96 puits (réf. 6550990), en absence ou en présence des molécules chalcones à une

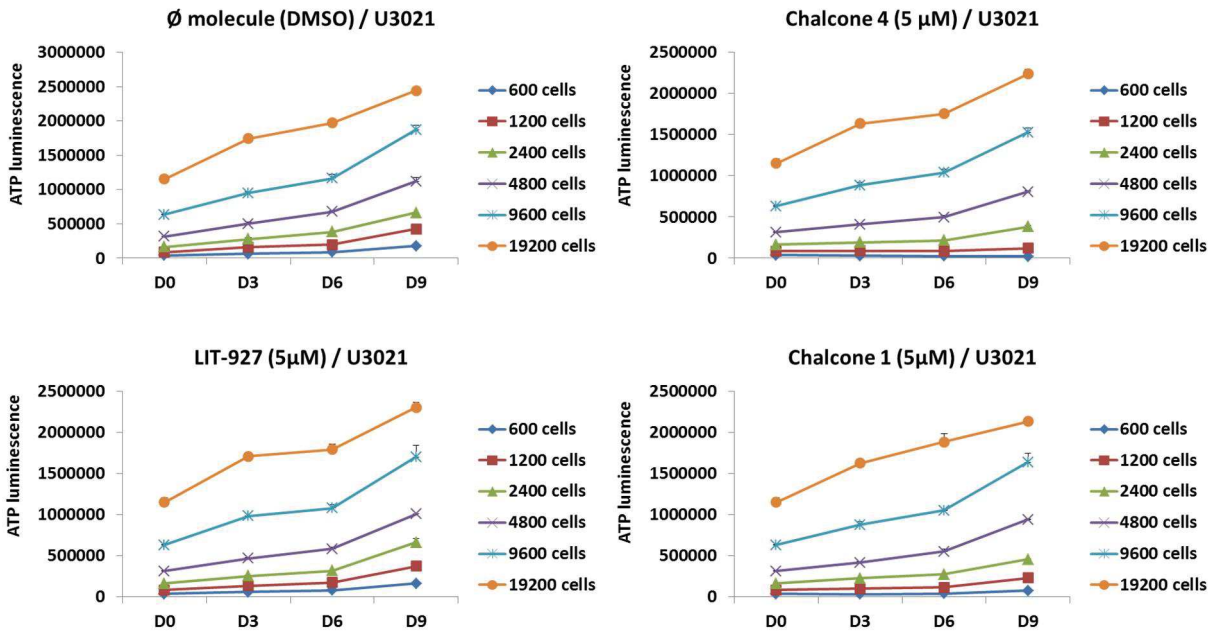
concentration de 5 µM, en présence de 0,1 % de DMSO (concentration finale) dans tous les puits. Chaque condition est testée en triplicata. La mesure de la luminescence (taux d'ATP) représentant la viabilité cellulaire est effectuée tous les 3 jours, et un changement du milieu NS34 avec et sans les molécules est également effectué dans les plaques des prochaines lectures.

Annexe ID : BTIC 53



Effet des molécules chalcones sur la croissance et la survie des cellules BTIC 53.
Les cellules en prolifération ont été ensemencées à différentes densités de 100 à 19200 cellules par puits dans une plaque greiner 96 puits (réf. 6550990), en absence ou en présence des molécules chalcones à une concentration de 5 µM, en présence de 0,1 % de DMSO (concentration finale) dans tous les puits. Chaque condition est testée en triplicata. Les taux d'ATP ont été mesurés à 3 jours (D3), 6 jours (D6) ou 9 jours (D9) à l'aide du système CellTiter-Glo ATP luminescent assay, et un changement du milieu NS34 avec et sans les molécules est également effectué dans les plaques des prochaines lectures.

Annexe IE : U3021



Effet des molécules chalcones sur la croissance et la survie des cellules U3021.
Les cellules en prolifération ont été ensemencées à différentes densités de 100 à 19200 cellules par puits dans une plaque greiner 96 puits (réf. 6550990), en absence ou en présence des molécules chalcones à une concentration de 5 µM, en présence de 0,1 % de DMSO (concentration finale) dans tous les puits. Chaque condition est testée en triplicata. Les taux d'ATP ont été mesurés à 3 jours (D3), 6 jours (D6) ou 9 jours (D9) à l'aide du système CellTiter-Glo ATP luminescent assay, et un changement du milieu NS34 avec et sans les molécules est également effectué dans les plaques des prochaines lectures.

ANNEXE II : Fiche descriptive de la chimiokine recombinante CXCL12 ajoutée lors de la culture de CI-GBMs pour tester son rôle sur la prolifération cellulaire

ALMAC

T +44 (0)28 3839 5717 • E chemokines@almacgroup.com • W www.almacgroup.com

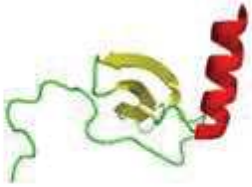
h-SDF-1α, synthetic

100 µg

Catalog number: CN-11

Almac Peptide and Protein Technologies

- **Chemokines**
- Custom Peptides
- Site-Specific protein labelling
- Modified Histones
- Ubiquitylated peptides



Product Information	
Product Name:	h-SDF-1α CXCL12
Synonyms:	CXCL12 human.
Swiss Prot Accession No:	P48061
Sequence:	KPVSLSYRCP CRFFESHVAR ANVKHLKILN TPNCALQIVA RLKNNNRQVC IDPKLKWIQE YLEKALN
Modifications:	None
Specification	
HPLC Purity:	>95% area/area at 214nm
Determined Mass:	7.8 kDa
Formulation / Appearance:	White powder lyophilized from water/acetonitrile/ TFA to generate the TFA salt form. Peptide content determined by UV analysis at 280nm.
Preparation and Storage	
Reconstitution / Storage:	It is recommended that unopened vials are stored at -20 ℃ to -70 ℃ for periods of up to 18 months. Avoid repeat freeze-thaw cycles. It is recommended vials be centrifuged prior to opening. Water can be used to prepare stock solutions of 20 µmol.L^{-1}. Stock solutions with up to 30% DMSO/water can also be prepared.

For research use only. Not for use in human diagnostic or therapeutic procedures.

ANNEXE III : Valeurs de Ct (cycle threshold) des gènes *CXCL12*, *CXCR4* et *ACKR3* (ou *CXCR7*) pour les cinq types de CI-GBM (TG1, TG1_C1, BTIC 53, BTIC 25M et U3021)

Puits	Nom de l'échantillon	Détecteur	CT	Std. Dev. CT
A1	TG1	CXCL12	23.70	0.365
A2	TG1	CXCL12	23.27	0.365
A3	TG1	CXCL12	22.97	0.365
A4	TG1	CXCR4	22.05	0.051
A5	TG1	CXCR4	22.15	0.051
A6	TG1	CXCR4	22.13	0.051
A7	TG1	CXCR7	31.48	0.324
A8	TG1	CXCR7	31.01	0.324
A9	TG1	CXCR7	30.86	0.324
A10	TG1	RPLPO	19.51	0.889
A11	TG1	RPLPO	19.76	0.889
A12	TG1	RPLPO	21.16	0.889
B1	BTIC 53	CXCL12	27.38	0.204
B2	BTIC 53	CXCL12	27.08	0.204
B3	BTIC 53	CXCL12	26.99	0.204
B4	BTIC 53	CXCR4	25.53	0.086
B5	BTIC 53	CXCR4	25.40	0.086
B6	BTIC 53	CXCR4	25.56	0.086
B7	BTIC 53	CXCR7	28.04	0.230
B8	BTIC 53	CXCR7	27.95	0.230
B9	BTIC 53	CXCR7	27.60	0.230
B10	BTIC 53	RPLPO	19.37	0.052
B11	BTIC 53	RPLPO	19.28	0.052
B12	BTIC 53	RPLPO	19.30	0.052
C1	BTIC 25M	CXCL12	26.97	0.114
C2	BTIC 25M	CXCL12	27.01	0.114
C3	BTIC 25M	CXCL12	26.79	0.114
C4	BTIC 25M	CXCR4	29.30	0.246
C5	BTIC 25M	CXCR4	28.83	0.246
C6	BTIC 25M	CXCR4	28.92	0.246
C7	BTIC 25M	CXCR7	27.55	0.256
C8	BTIC 25M	CXCR7	27.42	0.256
C9	BTIC 25M	CXCR7	27.05	0.256
C10	BTIC 25M	RPLPO	18.33	0.134
C11	BTIC 25M	RPLPO	18.39	0.134
C12	BTIC 25M	RPLPO	18.14	0.134

D1	TG1_C1	CXCL12	24.13	0.065
D2	TG1_C1	CXCL12	24.03	0.065
D3	TG1_C1	CXCL12	24.02	0.065
D4	TG1_C1	CXCR4	21.98	0.136
D5	TG1_C1	CXCR4	21.92	0.136
D6	TG1_C1	CXCR4	21.72	0.136
D7	TG1_C1	CXCR7	35.26	0.621
D8	TG1_C1	CXCR7	34.20	0.621
D9	TG1_C1	CXCR7	34.16	0.621
D10	TG1_C1	RPLPO	18.59	0.101
D11	TG1_C1	RPLPO	18.67	0.101
D12	TG1_C1	RPLPO	18.80	0.101
E1	U3021	CXCL12	27.81	0.124
E2	U3021	CXCL12	27.58	0.124
E3	U3021	CXCL12	27.63	0.124
E4	U3021	CXCR4	25.15	0.091
E5	U3021	CXCR4	25.04	0.091
E6	U3021	CXCR4	25.22	0.091
E7	U3021	CXCR7	23.87	0.326
E8	U3021	CXCR7	23.35	0.326
E9	U3021	CXCR7	23.28	0.326
E10	U3021	RPLPO	19.46	0.097
E11	U3021	RPLPO	19.36	0.097
E12	U3021	RPLPO	19.56	0.097
F1	eau	CXCL12	Undetermined	
F2	eau	CXCL12	Undetermined	
F4	eau	CXCR4	Undetermined	
F5	eau	CXCR4	Undetermined	
F7	eau	CXCR7	Undetermined	
F8	eau	CXCR7	Undetermined	
F10	eau	RPLPO	Undetermined	
F11	eau	RPLPO	Undetermined	

Tableau 13. Mesure de l'expression des gènes *CXCL12*, *CXCR4* et *ACKR3* (ou *CXCR7*) par RT-QPCR.

Les valeurs en CT affichées par l'appareil ABI Prism® 7000HT d'Applied Biosystems™, représentent l'expression des ARNm des trois gènes à étudier *CXCL12*, *CXCR4* et *ACKR3* et du gène contrôle *RPLP0*. Contrôle négative = eau.

Annexe IV

Protocole n°1 : culture et comptage des cellules CI-GBM

Le passage des cellules se fait deux fois par semaine, en commençant par une observation des cellules au microscope, puis en prenant 4 photos d'endroits différents. Ensuite l'ensemble de culture (10 mL) est collecté et centrifugé à 11000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est conservé, il constitue le milieu conditionné des cellules. Le culot cellulaire est dissocié mécaniquement dans 1 mL du milieu conditionné en effectuant 100 allers-retours avec une pipette 1000.

Pour le comptage, prélever 20 µL de cellules dissociées dans le milieu conditionné et les transférer dans un tube eppendorf contenant 4 µL de bleu trypan, puis déposer 20 µL de ce mélange dans une cellule de comptage (Quick read precision cell slide, Globe Scientific INC). Le bleu de trypan entre dans toutes les cellules mais les cellules vivantes l'expulsent grâce à leur pompe ATPase. Les cellules vivantes apparaissent donc blanches et les mortes sont bleues. Cependant le bleu de trypan est toxique et toutes les cellules finissent par devenir bleues, il faut donc compter assez rapidement.

Comptage du nombre N de cellules vivantes contenues dans un grand carré, puis détermination du nombre de cellules par mL :

$$\textbf{Nombre de cellules/ml} = \mathbf{N \times 10^4 \times 1{,}2}$$

Le calcul effectué pour obtenir cette équation :

Un grand carré représente 0,1 µL ce qui donne **N/0,1 µL = N x 10^4/mL**.

N x 10^4 pour 20 µL déposé pour le comptage, donc pour le volume total 24 µL (20 µL + 4 µL bleu de trypan), la valeur N x 10^4 va être donc multipliée par 1,2 d'où la formule :

N x 10^4 x 1,2 = le nombre de cellules/mL

Les cellules dissociées sont mises ensuite en culture dans un milieu composé de 90 % de milieu NS34 frais et 10 % de milieu conditionné à une densité à 2,5 x 10^5 cellules/mL. Les cellules sont incubées à 37 °C, 5 % CO_2 sous atmosphère humide et à l'obscurité.

Protocole n° 2 : préparation du milieu de culture défini NS34.

Produit	Référence	Concentration final
DMEM en poudre 5x	31600091 Invitrogen	1x
F12 Nutrient mix, Hams 5x	21700018 Invitrogen	1x
D-glucose anhydre	15023021 Invitrogen	0,6 %

GlutaMAX-I (100X)	35050038 Invitrogen	1x
Hepes Buffer 1M	15630056 Invitrogen	5 mM
Sodium Bicarbonate 7,5 %	25080060 Invitrogen	0,1 %
Penicillin/Streptomycin (10000 : 10000)	15140148 Invitrogen	10 unités/mL : 10 µg/mL
N2 Supplement (100x)	17502048 Invitrogen	1x
G5 Supplement (100x)	17503012 Invitrogen	1x
B27 Supplement (50x)	17504044 Invitrogen	0,5x

Tableau 14. Composition du milieu de culture NS34.
Les suppléments N2, G5 et B27 sont nécessaires au maintien de l'état souche des cellules et le supplément G5 contient le facteur de croissance EGF et bFGF.

Protocole n°3 : congélation des CI-GBM

Afin de préparer un stock de cellules, il est donc nécessaire de procéder à la congélation des cellules. Le stock de cellules est préparé à partir des cellules stockées à faible passage (autour de 10 passages) constitue la Master cell Bank.

L'ensemble de la culture est récolté et centrifugé à 1100 rpm pendant 5 minutes. Le maximum de surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans un mélange de 90 % de FBS (Invitrogen) et 10 % de DMSO (Sigma Aldrich) à une densité d'environ 2 x 10^6 cellules/mL. La suspension cellulaire est aliquotée rapidement en fractions de 1 mL dans les cryotubes. Les tubes de congélation sont placés pendant une semaine à -80 °C et puis transférés dans l'azote liquide.

Protocole n°4 : décongélation des CI-GBM

La décongélation des cellules est effectuée avec 30 mL de milieu NS34 chauffé à 37 °C dans un tube falcon stérile de 50 mL. 1 mL de milieu chauffé est ajouté dans le cryotube contenant les cellules congelées. Les cellules décongelées sont ensuite transférées dans le tube de centrifugation. L'opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de cellules dans le cryotube. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1100 rpm. Le maximum de surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu sans dissociation dans 10 mL de milieu NS34 et mise en culture dans une flasque T75 à 37 °C sous 5 % de CO_2.

Protocole n°5 : extraction des ARN totaux

Etape 1 « homogénéisation » : 500 µL du TRI REAGENT (réf. TR-118-200 Euromedex) est ajouté au culot cellulaire 3×10^6 cellules. Homogénéiser à l'aide de la micropipette par aspiration et refoulement. Incuber l'homogénat pendant 5 minutes à température ambiante

pour permettre une dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Si l'extraction de l'ARN n'est pas faite immédiatement, il est préférable de congeler les culots cellulaires déjà repris dans le TRI REAGENT à -80 °C.

Etape 2 « phase de séparation » : Ajouter à l'homogénat 60 µL de bromochloropropane (BCP), vortexer et incuber le mélange pendant 5 minutes sur glace puis centrifuger à 12000 g pendant 15 minutes à 4 °C, prélever la phase aqueuse contenant les ARN dans un tube eppendorf RNAse free.

Etape 3 « Précipitation de l'ARN » : En ajoutant 500 µL d'isopropanol (1 volume d'isopropanol/1 volume de phase aqueuse contenant l'ARN). Vortexer brièvement puis effectué une centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Elimination du surnageant et lavage des ARN avec 500 µL d'éthanol 75 % stocké à -20 °C, vortexer puis effectuer une dernière centrifugation à 8000 g pendant 8 minutes à 4 °C. Eliminer l'éthanol et laisser sécher le culot d'ARN à température ambiante pendant 5 minutes puis récupérer le culot d'ARN dans 50 µL d'eau traité au DEPC (réf. AM9920 Ambion®).

Annexe V : Séquençage des produits PCR réalisé avec les amorces CXCL12-Fwd3/Rev3 à une T° d'hybridation de 60 °C pour les cellules TG1 non transfectées

a) Résultats séquençage TG1 non transfectées

Séquence TG1/CXCL12-Fwd3 :

TACCTATGATTTGTCTCATATGGCTTGAAAGGTCTTGCCCTCTGCACCTGGCCCAGAAGGAAGCAGG
ATGTAATCCAGCACCCTTTGAATCCTAGAATATTTGTCTTTCCATTAAATTCACAAGAGCAAAAAGTTA
CGGTTCTGCAATTGCTCCATTTATTCTGAGGCCCCCTAGGAACCCTAGGAAGATCAGGTCAGCCAGA
GCCCAGCAGTGAATGTTCACTTCAGCCACACATATTTATGATCTCAAGCATCGGATCATCCTCTTCTG
GGTTTCTAAACATTCAGGAGTCTGAGATCCTTACAGATCCATATTTTCTTTTTGACATTTCACTTTCTCC
TCCAGAATCAAGGGGATTCTTCTTTCCTGGCCCTGGAGGGTTGTTGAGAGGTTATAGGGAGAAGACT
TGATTTCTGAAATACCGTGGACTAGGATTCATCCACTGTTCAAAGATGCGGTGAAGCTTCAATGGGG
TTAGAGGCCCATTTCCCTGGCCCTGTTCCCATCACCAATTCCATTTCTAAGCTCCTGTGTGAACCGGAG
TCCTGCTGCGTAACCTTT

Séquence TG1/CXCL12-Rev3 :

GGGGGATTTCCCTTTTAATTTTTTTGTTGCGGGGTACGGCAGGGCTATGGGCCACTAACCCCGCGGA
ATCTTCACCTCTTCTCTGATGGTTTAATGAATCCTATTCCTTCCTATTTCAAAAATCAAGTCTTCTCCCTA
TAACCTCTCCCACCGCTCCATGGCCCCGAACCTCCCATCCCCTTGATCCGGGAGGATAAACCGTGATG
TCTCAAATAAAATATGGTTCTGTCAGGATCTCAGACTCCTGAATGTTTATAAACCTAGAATCCTTGATC
CGATGCTTGCCATCATTATTATGTTTGGTTGAATGGAATTTCACTGCTGTTGTCTGCCTGACCTGACCT
TCCTAGGGTGCTAGGGGGTCTCAGAATTAATGGGTCAATTGCCTAACTCCACTTTTTTTCTCTTGTAAT
TTTAATGGAAAGACAACTATTCTAAGATTCTGTGGCTGATGAATTACATCTCGCTTCCTTCTGGGACA
TGGGCATATGTTTGACTTTCCAGACCATCTTAGCCATTCCATGCGCCTTTTTCCGGGTTTTACCTTGCTT
TGCTAT

b) Résultats de l'alignement des séquences des produits de PCR en utilisant le logiciel BLAST et IGV version 2.5.2. Les PCR ont été réalisés en utilisant comme matrice l'ADN génomique des cellules TG1 et les amorces suivantes : i) CXCL12-Fwd3, ii) CXCL12-Rev3

i)

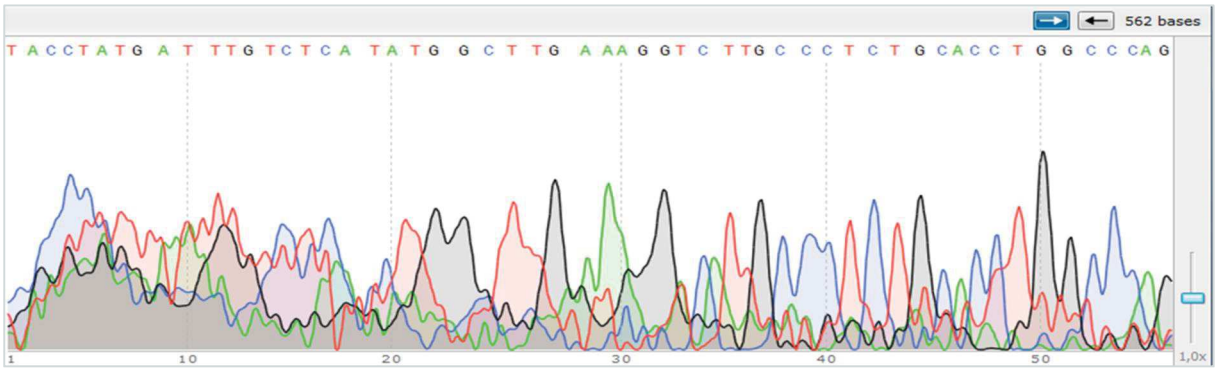
chr	start	end	strand	score	match	mis-match	rep. match	N's	Q gap count	Q gap bas...	T gap count	T gap bases
chr7	30967434	30967925	+	809	473	18	0	0	0	0	0	0
chr6	125912113	125912143	-	48	29	1	0	0	1	11	0	0
chr5	169231855	169231906	-	48	30	0	0	0	2	2	1	21
chr4	106851758	106851786	-	48	28	0	0	0	1	4	0	0
chr2	240558299	240558327	-	46	27	1	0	0	0	0	0	0

ii)

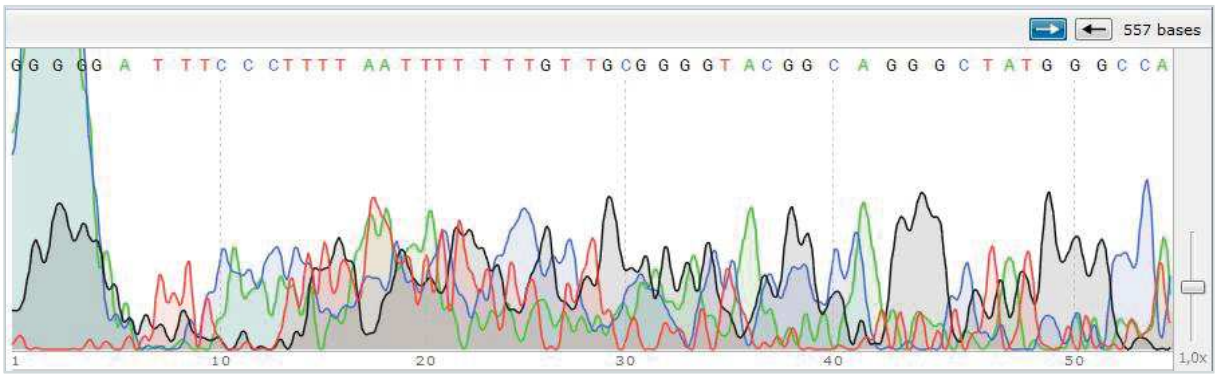
chr	start	end	strand	score	match	mis-match	rep. match	N's	Q gap count	Q gap bases	T gap count	T gap bases
chr7	30967465	30967908	-	430	290	38	0	0	6	111	6	115
chr3	96923810	96923845	-	52	33	1	0	0	2	10	1	1
chr1	31544355	31544393	-	41	25	0	0	0	1	1	1	13
chr4	120080280	120080302	-	39	22	0	0	0	0	0	0	0
chr1	236805085	236805109	-	39	23	0	0	0	0	0	1	1
chr5	112762424	112762445	+	37	21	0	0	0	0	0	0	0
chr3	152268105	152268128	+	37	22	1	0	0	0	0	0	0
chr1	144954420	144954443	+	37	22	0	0	0	0	0	1	1
chr5	108521156	108521176	+	35	20	0	0	0	0	0	0	0

c) Chromatogramme présentant le résultat du séquençage des produits de PCR en utilisant comme matrice l'ADN génomique des cellules TG1 et les amorces : i) CXCL12-Fwd3, ii) CXCL12-Rev3. La visualisation est faite en utilisant le logiciel SnapGene Viewer version 4.2.5.

i)



ii)



Annexe VI : Résultats du séquençage des deux bandes de PCR (a et b) des clones C35 et C36 (voir figure 37)

(TG1 CXCL12 KO-C35a)/Fwd3 :

GTCCAAGAAGGAATCCTGCCCTCTTGCCTTCCGGTTTGTATGCTGTTCGCTTAGTTGGGCGCTCTGGT
GCGGTGTCGCGTTCTAAGCCCTACTTTTGCGCCGAGGGTTTGTGACCTTCAGAGAGCGACCGCCTGA
CCTCAAGCTGGTTGCAGAGCGAGGTCAGCCGGGACAACTGGGCGGGAACGCCCCAAGAGAGCGTT
CGGGACTGGCGCGGGAAGGCTCGAGGTTGGGGAGCCCTGTACCCCCGTCCCCTGCCTGCCCACCCT
CTCCCCCCTCCATACAACCAGAGGGCTCGGTTTCCTAGGCGTTATGGGCTCCGTGGTCCTGCTGCGCA
TTT

(TG1 CXCL12 KO-C35b)/Fwd3 :

CCGGGCCCGCGCTCACCGCCGCACTTGGGGGTGGAGGCAGCTCGCTTAGCTGGGCGCTCTGGTGCG
GTGTCGCGTTCAAAGCCCTACTTTTGCGCCGAGGGTTTGTGACCTGCAGAGAGCGACCGCCTGACCT
CAAGCTGGCTGCAGAGCGAGGTCAGCCGGGACAACTGGGCAGGAACGCCCCAAGAGAGCGTTCGG
GACTGGCGCGGGAAGGCGCGAGGGTGGGGAGCCGCGGACCCCAGACCCCTGCCTGCCCACCCTCC
ACCCACTGCCTTCCCGCTGCGGGCTCGGTTTCCACAGGCGAATGGGCTCCGAGGTCCTGCTGCGCAA

(TG1 CXCL12 KO-C35b)/Rev3 :

GGGCTTGGGGACGAGACGCAGCGGGAGGCAGTGGGTGGAGGGTGGGCAGGCAGGGGTCTGGGG
TCCGCGGCTCCCCACCCTCGCGCCTTCCCGCGCCAGTCCCGAACGCTCTCTTGGGGCGTTCCTGCCCA
GTTGTCCCGGCTGACCTCGCTCTGCAGCCAGCTTGAGGTCAGGCGGTCGCTCTCTGCAGGTCACAAA
CCCTCGGCGCAAAAGTAGGGCTTTGAACGCGACACCGCACCAGAGCGCCCAGCTAAGCGAGCTGCC
TCCACCCCCAAGTGCGGCGGTGGGAGGCGCGCGCCGGGCGCTTTAGAGGGGAGAGCCAGGCGGG
G

(TG1 CXCL12 KO-C36a)/Rev3 :

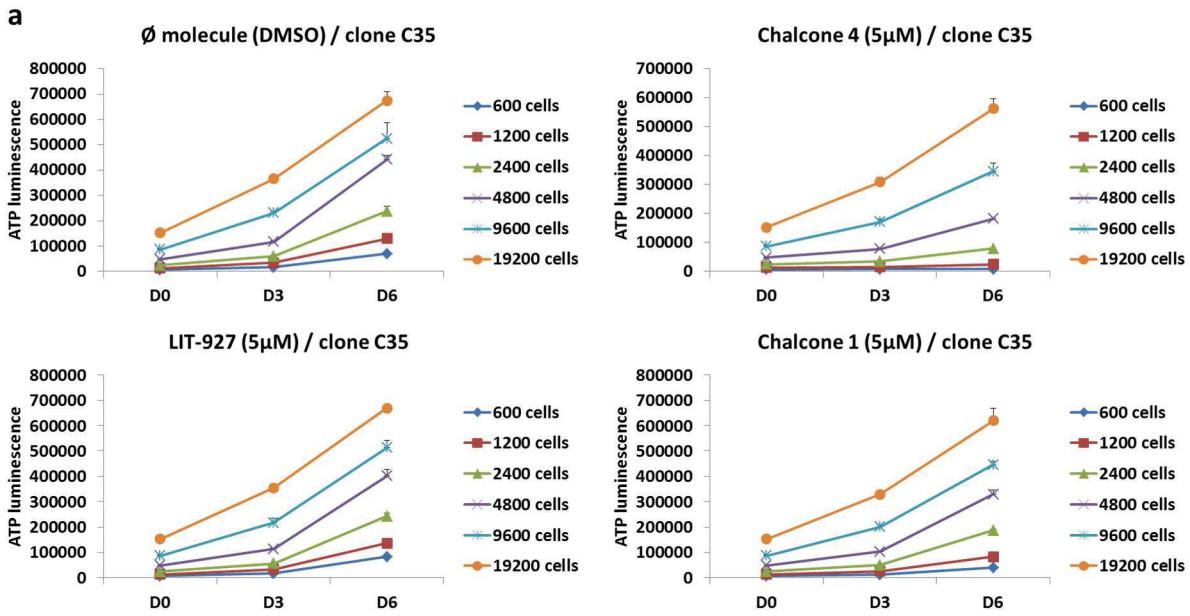
AGCCCTTTGCACGGAAGTCGCATGCGGTGAGGCAGTGGGTGGAGGGTGGCAGGCAGGGGTCTGGG
GTCCGCGGCTCCCCACGTGAGCCTTCCCGCGCCAGTCCCGAACGCTCTCTTGGGGCGTTCCTGCCCAG
TTGTCCCGGCTGACCTCGCTCTGCAGCCAGCTTGAGGTCAGGCGGTCGCTCTCTGCAGGTCACAAAC
CCTCGGCGCAAAAGTAGGGCTTTGAACGCGACACCGCACCAGAGCGCCCAGCTAAGCGAGCTGCCT
CCACCCCCAAATGTGCGGCGGGGAGGTGCGCGCTCTGGGCTTTTTTAGAGGAGAGACACTCGGGGA
GACACA

(TG1 CXCL12 KO-C36b)/Rev3 :

GGCGTGTGACGAGACGCAGCGGGAGGCAGTGGGTGGAGGGTGGGCAGGCAGGGGTCTGGGGTCC
GCGGCTCCCCACCCTCGCGCCTTCCCGCGCCAGTCCCGAACGCTCTCTTGGGGCGTTCCTGCCCAGTT
GTCCCGGCTGACCTCGCTCTGCAGCCAGCTTGAGGTCAGGCGGTCGCTCTCTGCAGGTCACAAACCC

TCGGCGCAAAAGTAGGGCTTTGAACGCGACACCGCACCAGAGCGCCCAGCTAAGCGAGCTGCCTCC
ACCCCCAAAAGCGGCGGGGGGAGGCGCGCGCCCCGGGCTTTTTAGAGGAGAGACCCGGGGGGGG

ANNEXE VII : Effet des chalcones 1, 4, LIT-927 sur la prolifération des cellules TG1 CXCL12 KO



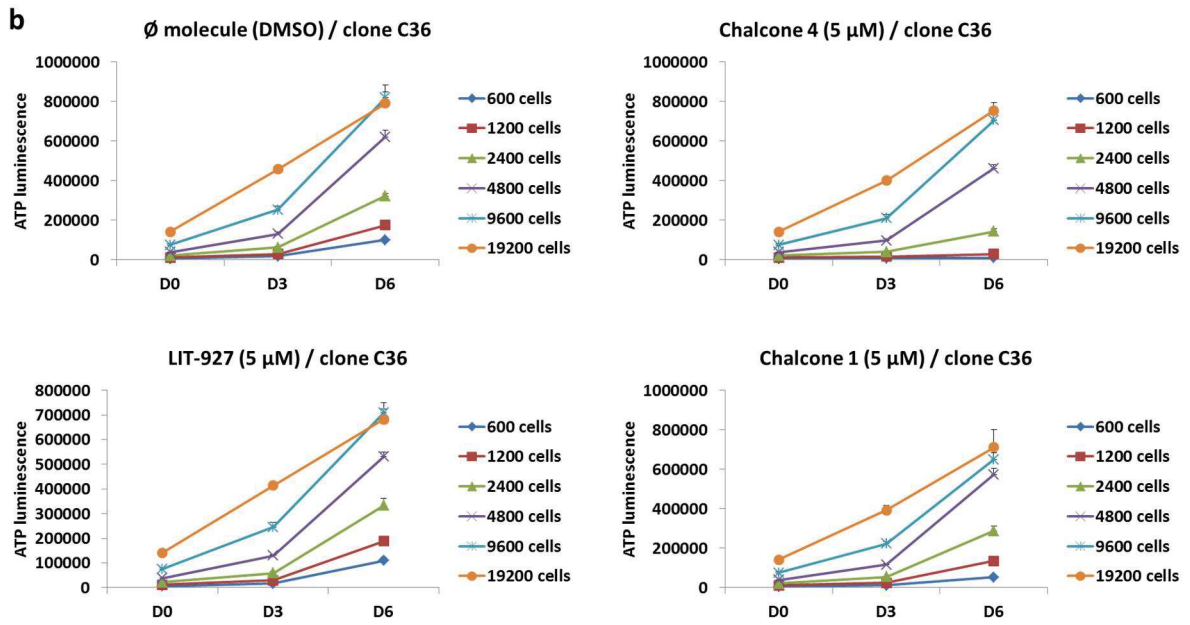


Figure 45. Effet des molécules chalcones sur la croissance des clones C35 (a) et C36 (b) de cellules TG1 CXCL12 KO.

Les cellules ont été ensemencées à différentes densités dans une plaque Greiner 96 puits. Les molécules chalcones ont ensuite été ajoutées à une concentration finale de 5 µM. Chaque puits contient une concentration de DMSO de 0,1 %. Aux différents temps J0 (D0), J3 (D3) et J6 (D6) l'ATP cellulaire a été mesuré à l'aide du test CellTiter-Glo® 2.0 Assay qui conduit à une émission de luminescence. Tous les 3 jours le milieu de culture NS34 est renouvelé en conservant la concentration de chalcones à 5 µM et le DMSO à 0,1 %. Chaque condition est réalisée en triplicata.