



HAL
open science

Caractérisation du rôle des p21-activated kinases dans la physiopathologie des gliomes

Nathalie Magne

► **To cite this version:**

Nathalie Magne. Caractérisation du rôle des p21-activated kinases dans la physiopathologie des gliomes. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS146 . tel-03712481

HAL Id: tel-03712481

<https://theses.hal.science/tel-03712481>

Submitted on 4 Jul 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.

NNT : 2017SACLS146

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Ecole Doctorale n° 568
BIOSIGNE Signalisations et réseaux intégratifs en biologie

Aspect Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Nathalie MAGNE

Caractérisation du rôle des p21-activated kinases
dans la physiopathologie des gliomes

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 3 juillet 2017 :

Composition du Jury :

M. Saule	Simon	Professeur, Université Paris-Sud	Président
Mme. Morin	Nathalie	Directrice de recherche, CRBM	Rapporteur
M. Hugnot	Jean-Philippe	Maître de conférences, INM	Rapporteur
Mme. Huillard	Emmanuelle	Chargée de recherche, ICM	Examinatrice
M. Pouponnot	Celio	Chargé de recherche, Institut Curie	Examineur
M. Barnier	Jean-Vianney	Directeur de recherche, CNRS	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du Jury, M. Simon Saule pour avoir accepté de participer à mon jury, M. Jean-Philippe HUGNOT et Mme Nathalie MORIN pour avoir accepté de corriger mes travaux, Mme Emmanuelle HUILLARD et M. Celio POUPONNOT pour avoir accepté de faire partie de mon comité et de mon jury de thèse. Les discussions sur mes travaux m'ont beaucoup apporté et motivée.

Au cours de ma thèse j'ai été accueillie au sein de plusieurs laboratoires et équipes, et je tiens donc à remercier Messieurs Serge LAROCHE, Philippe VERNIER ainsi que Cyrille VAILLEND et Jean-Vianney BARNIER pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du CNPS et de Neuro-PSI.

Merci à Marc SANSON, Ahmed IDBAIH, Charlotte SCHMITT et Vincent GLEIZE de l'ICM pour nous avoir gentiment donné les lignées cellulaires sur lesquelles j'ai travaillé pendant ma thèse, et pour l'accès et l'analyse des données de la cohorte de patients atteints de gliome de la Pitié-Salpêtrière.

A Jean-Vianney BARNIER et Véronique ROUSSEAU, merci pour m'avoir acceptée comme étudiante. Merci pour m'avoir encadrée, formée et supportée pendant ces années de thèse, vous m'avez transmis le virus de la recherche pour le meilleur ou pour le pire.

Merci à Sandrine GUYON pour nos discussions scientifiques et techniques, et pour les nombreux fous rires des repas de midi.

A l'équipe animalerie, en particulier Aurélie, Céline et Caroline, merci pour votre aide et d'avoir pris soin de mes petites nudes.

Merci au personnel de gestion pour leur aide, à Bruno, et à tous les membres de mon équipe.

A toutes les personnes de Neuro-PSI et du département CogComp en particulier, merci pour votre accueil pendant ces 3 années qui ont débordé.

Claire, nous avons réalisé la majorité de notre parcours ensemble et celui-ci se termine, merci pour ta présence, le partage de coups au self-defence, ton soutien moral et ton amitié. J'attends avec impatience de voir la bouille du mélange Claire/Thierry !

Kevin, je suis ravie que tu aies partagé mon bureau, m'ai fourni en thé et en ragots. La vie au labo n'aurait pas été la même sans toi ! Je te souhaite bon courage pour la suite, j'ai confiance en ta capacité de travail et la fonctionnalité de ton cerveau.

Lulu, Florian, Samira et Victor, merci pour votre amitié, votre aide et votre soutien. Lulu, Florian, vous y êtes passé et vous m'avez montré la voie, Victor et Samira, c'est votre tour !

A mes amis, vous avez supporté mes absences, mon caractère, mes oublis et j'en oublie pendant ces trois années de thèse. Je n'aurais pas pu traverser certaines périodes sans votre soutien indéfectible. Clems et Marion, je n'aurais jamais assez de place pour détailler ce que vous m'apportez depuis plus de 15 ans, merci à vous.

Merci à ma famille. Mes très chers parents, sans vous je n'aurais jamais pu être là et je profite de la possibilité de l'écrire noir sur blanc. Vous avez toujours respecté mes choix de carrière et cru en moi. Sans vous je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout de ce travail. Sandrine et Seb, c'est bon, j'ai enfin fini mes études ! J'espère que vous êtes fiers de votre sœur, qui elle est très fière de vous. Je fais miens les mots de Zola, « je crois que l'avenir de l'humanité est dans le progrès de la raison par la science ».

Je pense également à tous ceux qui étaient présents au commencement de ce travail et qui n'en auront pas vu l'aboutissement.

Je dédie cette thèse à mon grand-père, j'ai toujours pensé qu'il en verrait la fin.

« La science n'a jamais tout à fait raison, mais elle a rarement tout à fait tort, et, en général, elle a plus de chance d'avoir raison que les théories non scientifiques. Il est donc rationnel de l'accepter à titre d'hypothèse »

Bertrand Russel

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE 1

LISTE DES FIGURES..... 5

LISTE DES ABREVIATIONS..... 7

LES GLIOMES..... 11

I. Généralités sur les gliomes 12

II. Les classifications des gliomes..... 13

1. La classification histologique de l'OMS 13

2. Le glioblastome 14

3. Caractéristiques moléculaires des gliomes 15

3.1 Altérations génétiques 15

3.2 Altérations épigénétiques..... 18

4. Classifications moléculaires 20

4.1 Classification de Phillips - 2006 21

4.2 Les classifications établies à partir des données du TCGA 22

4.3 Changements apportés dans la classification OMS des gliomes adultes en 2016 25

5. Hétérogénéités intra et inter-tumorale des gliomes 27

III. Altérations de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire..... 27

1. Notch 27

1.1 La signalisation Notch..... 27

1.2 Notch dans les gliomes..... 28

2. Hedgehog..... 30

2.1 La signalisation HedgeHog 30

2.2 Hedgehog dans les gliomes 31

3. Wnt 32

3.1 La signalisation Wnt..... 32

3.2 Wnt dans les gliomes..... 33

4. Voies de signalisation des récepteurs RTK 34

4.1 Signalisation RTK..... 34

4.2 La signalisation RTK dans les gliomes..... 35

5. Multiples croisements entre les voies de signalisation 37

IV. Cellules souches initiatrices de gliome 37

1. Les cellules initiatrices de gliomes..... 37

2. Lignées de cellules de gliome..... 39

V. Cellule d'origine des tumeurs gliales..... 39

1. Cellule souche 40

2. Cellule progénitrice d'oligodendrocytes 40

3. Cellule mature différenciée 41

VI. Traiter les gliomes..... 42

1. Les thérapies 42

2. Les thérapies moléculaires 43

3. Les thérapies géniques..... 44

LES P21ACTIVATED KINASES.....	46
I. Les PAK du groupe I	46
1. Expression des PAK du groupe I.....	46
2. Structure des PAK du groupe I.....	47
3. Régulation de l'activité des PAK du groupe I.....	48
3.1 Activation des PAK.....	48
3.2 Interaction avec les adaptateurs PIX/COOL, NCK et GRB	48
3.3 Régulateurs de l'activité des PAK.....	49
4. Effecteurs des PAK	51
5. Fonctions biologiques des PAK du groupe I.....	52
5.1 Dynamique du cytosquelette	52
5.2 Progression du cycle cellulaire et mitose.....	54
5.3 Apoptose et survie cellulaire	56
5.4 Différenciation et physiologie neuronale.....	57
II. La p21-activated kinase 3.....	59
1. Expression, structure et régulation de PAK3.....	59
2. PAK3 dans les pathologies neurologiques et mentales	61
3. Fonctions spécifiques de PAK3.....	62
3.1 Morphogenèse dendritique, synaptogenèse et plasticité synaptique.....	62
3.2 Cycle cellulaire et différenciation.....	64
III. Les PAK du groupe I et cancer.....	64
1. Défauts de régulation de l'expression des PAK dans les cancers	65
2. Les PAK du groupe I et la progression tumorale	66
2.1 Altération de la prolifération cellulaire.....	67
2.2 PAK et résistance à la mort cellulaire	68
2.3 Invasion et métastase.....	70
2.4 Angiogenèse et vascularisation.....	70
3. PAK et gliomes	72
4. Inhiber les PAK du groupe I dans les cancers	72
4.1 Les inhibiteurs compétitifs de l'ATP	73
4.2 Les inhibiteurs allostériques.....	73
4.3 Autres inhibiteurs.....	73
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	75

RESULTATS	79
I. Expression des PAK dans les gliomes.....	79
1. Expression des PAK dans les tumeurs	79
2. Expression des PAK et survie des patients.....	81
3. Expression de PAK3 et groupes moléculaires et histologiques.....	81
3.1 Association avec des critères histologiques	82
3.2 Association avec des critères moléculaires	83
3.3 Confirmation des résultats dans une autre base de données	84
II. Caractérisation des lignées cellulaires de GBM.....	85
1. Caractéristiques prolifératives des cellules en condition non adhérente	86
2. Expression de gènes souches et de différenciation dans les sphères	88

3.	Analyse de l'expression de gènes marqueurs de profils transcriptomiques	90
4.	Caractérisation de la tumorigénicité des lignées GBM <i>in vivo</i>	91
III.	Etude des variations d'expression de PAK1 et PAK3 au cours de la différenciation des cellules de GBM.....	92
	1. Différenciation des cellules de GBM induite par le retrait des facteurs et l'ajout de sérum	92
1.1	Analyse de la prolifération.....	93
1.2	Analyse de la différenciation.....	95
1.3	Analyse des variations d'expression de PAK1 et PAK3 au cours de la différenciation induite par le retrait des facteurs en présence de SVF	97
2.	Différenciation des cellules de GBM induite par l'AR et le BMP4	99
2.1	Analyse de la prolifération par marquage Ki67.....	100
2.2	Analyse de la différenciation induite par l'AR et le BMP4	100
2.3	Effet de la différenciation gliale ou neuronale sur l'expression de <i>PAK1</i> et <i>PAK3</i>	104
IV.	Inhibition de l'expression de PAK3 par shRNA dans les cellules de gliome	105
1.	Sélection des shRNA.....	105
2.	Analyse de l'effet de l'expression des sh dirigés contre PAK3 sur les propriétés des cellules cultivées en sphère	106
3.	Efficacité de l'extinction de l'expression des gènes PAK1 et PAK3 par les sh RNA dans les cellules cultivées en monocouche	107
4.	Effet de l'inhibition de l'expression de PAK3 par shRNA dans les cellules de GBM 3731a	109
4.1	Analyse de l'effet de l'inhibition de l'expression de PAK3 sur la prolifération et la différenciation des cellules 3731a.....	109
4.2	Analyse de l'inhibition de PAK3 sur les propriétés d'invasion et de tumorigénicité des cellules 3731a <i>in vitro</i>	110
4.3	Analyse de l'inhibition de PAK3 sur la tumorigénicité et la croissance des cellules 3731a <i>in vivo</i>	111
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	115
I.	PAK3 à l'opposé de PAK1 et PAK2 dans les gliomes	115
II.	PAK3 et différenciation	116
III.	PAK3 et tumorigénicité	117
IV.	Mécanismes possibles qui permettraient un rôle spécifique de PAK3.....	118
1.	PAK3 aurait des substrats spécifiques.....	118
2.	Voies de régulations différentes	118
3.	Localisations différentes.....	119
4.	Les hétérodimères PAK1/PAK3.....	119
5.	Régulation de l'activité de PAK3 et variants d'épissage	120
V.	Implication thérapeutiques et perspectives.....	120
1.	Hétérogénéité de la réponse à la différenciation des cellules de GBM	120
2.	L'acide rétinoïque et PAK.....	121
3.	PAK3 et différenciation neuronale	122
VI.	CONCLUSION.....	123
	BIBLIOGRAPHIE	127
	ANNEXE I : ARTICLE	157

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Statistiques des cancers du système nerveux central	11
Figure 2. Gliome visualisé par IRM et anatomie du cerveau	12
Figure 3. Fonctions des gènes IDH.	16
Figure 4. La codélétion 1p/19q	17
Figure 5. Les voies p53 et Rb.....	18
Figure 6. Méthylation du promoteur MGMT et réponse au TMZ	19
Figure 7. Vue d'ensemble des principaux sous-types de gliomes adultes.	26
Figure 8. Vue d'ensemble de la signalisation Notch.....	29
Figure 9. Vue d'ensemble de la signalisation Hedgehog	31
Figure 10. Vue d'ensemble de la signalisation Wnt.....	33
Figure 11. Brève vue d'ensemble de la signalisation par les RTK.	35
Figure 12. Altérations des voies RTK/RAS/PI3K dans les GBM.....	36
Figure 13. Zones de neurogenèse du cerveau humain adulte.....	38
Figure 14. Hypothèses sur la cellule d'origine d'un gliome.	40
Figure 15. Structures des PAK du groupe I.	47
Figure 16. Les voies de recrutement membranaire des PAK.	49
Figure 17. PAK1 et ses régulateurs.....	50
Figure 18. Mécanismes de régulation du cytosquelette d'actine par PAK1	53
Figure 19. Substrats de PAK1 impliqués dans la régulation du cytosquelette au cours du cycle cellulaire.....	55
Figure 20. Rappel des complexes Cdk/Cycline et des CdkI associés	54
Figure 21. Structure et organisation d'un neurone. Les principaux compartiments d'une cellule neuronale sont le corps cellulaire, l'axone, les dendrites, les terminaisons pré-synaptiques et les terminaisons post-synaptiques (épines dendritiques).....	58
Figure 22. PAK3 et ses variants d'épissage.	60
Figure 23. Les mutations de PAK3 responsables de pathologies.....	62
Figure 24. PAK3 et la régulation de la morphogenèse dendritique	63
Figure 25. Caractéristiques fondamentales acquises par les cellules cancéreuses	67
Figure 26. Implication des PAK dans les mécanismes de résistance à l'apoptose et d'indépendance aux signaux de croissances.	69
Figure 27. Implication de la signalisation PAK dans l'angiogenèse et la modulation de la perméabilité vasculaire.....	71
Figure 28. Expression des PAK dans les tumeurs.....	80
Figure 29. Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie globale des patients atteints de gliome en fonction de l'expression des PAK dans la tumeur.	82
Figure 30. Expression des PAK dans des gliomes répartis selon des critères histologiques. ..	83
Figure 31. Expression des PAK dans des gliomes répartis selon des critères moléculaires	84
Figure 32. Analyse de l'expression de <i>PAK1</i> et <i>PAK3</i> dans les gliomes de la cohorte French85	
Figure 33. Caractéristiques prolifératives des gliomasphères	88
Figure 34. Les cellules de sphères de GBM expriment des gènes marqueurs de cellules souches, ainsi que des gènes de cellules différenciées.....	89

Figure 35. Les lignées de GBM appartiennent à des profils transcriptomiques différents.	91
Figure 36. Tumorigénicité des cellules de GBM <i>in vivo</i>	92
Figure 37. La prolifération des cellules de GBM diminue en présence de SVF 3 jours et 8 jours après le retrait des facteurs	95
Figure 38. Augmentation de l'expression de <i>Dcx</i> et <i>GFAP</i> après le retrait des facteurs de croissance	96
Figure 39. Analyse de l'expression des gènes marqueurs de différenciation <i>β3tubuline</i> et <i>OLIG2</i>	97
Figure 40. Analyse des variations de l'expression de <i>PAK1</i> et <i>PAK3</i> avant et après le retrait des facteurs de croissance.....	99
Figure 41. Prolifération des cellules de GBM en condition AR et BMP4.....	101
Figure 42. Analyse de l'expression des gènes <i>PAK</i> , ainsi que des gènes marqueurs de différenciation <i>DCX</i> et <i>GFAP</i> , après induction de la différenciation par l'AR et le BMP4 ..	102
Figure 43. Analyse de l'expression de gènes marqueurs de différenciation astrocytaire, oligodendrogliale et neuronale après induction de la différenciation par l'AR et le BMP4..	103
Figure 44. Inhibition de l'expression de <i>PAK1</i> et de <i>PAK3</i> dans des cellules COS et efficacité de l'infection des cellules de GBM par les lentivirus..	105
Figure 45. Extinction de l'expression de <i>PAK3</i> par les shRNA en condition proliférative ..	106
Figure 46. Effet de l'inhibition de l'expression de <i>PAK3</i> sur les propriétés d'auto-renouvellement et de prolifération des cellules de GBM en culture en sphère.....	107
Figure 47. Inhibition de l'expression du gène <i>PAK3</i> dans les cellules de GBM infectées par des lentivirus permettant l'expression de shRNA.	108
Figure 48. Effet de l'inhibition de l'expression du gène <i>PAK3</i> sur la prolifération des cellules de GBM.....	109
Figure 49. Effet de l'inhibition de l'expression du gène <i>PAK3</i> sur la différenciation des cellules de GBM.....	110
Figure 50. Effet de l'inhibition de l'expression de <i>PAK3</i> par shRNA sur l'auto-renouvellement et la motilité des cellules de GBM.	111
Figure 51. Effet de l'inhibition de l'expression de <i>PAK3</i> par shRNA sur la tumorigénicité <i>in vivo</i>	112
Figure 52. Modèle hypothétique 'Expression de <i>PAK3</i> au cours de la différenciation neurale'	117

Liste des abréviations

2-HG : 2-hydroxyglutarate
 α KG : α -cétoglutarate
AID : Auto-Inhibitory Domain
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isolaxone propionate
Arp : Actin related protein
CaMK : Calcium/Calmodulin dependent protein Kinase II
Cdc42 : Cell division cycle 42
CHL1 : cell adhesion molecule Close Homologue of L1
CREB : cAMP Response Element-Binding
DI : Déficience intellectuelle
EGF/R : Epidermal Growth Factor / receptor
ERK : Extracellular-Signal Regulated Kinase
GAP : GTPase Activating Protein
GBM/I/II : Glioblastome/primaire/secondaire
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
KO : Knock-out
LIMK : Lin11, Isl-1 & Mec-3 Kinase
LTD : Long Term Depression
LTP : Long Term Potentiation
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
mGluR : Récepteur métabotropique au glutamate
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
MGMT : O6-méthylguanine-DNA méthyl transférase
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Nck : Non-Catalytic region of tyrosine Kinase
NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
PAK : P21-activated kinase
PBD : P21-Binding Domain
PDGF/R : Plated-Derived Growth Factor/Receptor
PIX : PAK-interacting exchange factor
PKA : Protein Kinase A
PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
Rac : Ras-Related C3-botulinum toxin substrate
Rho : Ras Homologous
SH2/SH3 : Src Homology domain 2/Src Homology domain 3
TERT : Telomerase reverse transcriptase
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

LES GLIOMES

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini le cancer comme « un terme générique appliqué à un grand nombre de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. Les autres termes employés sont ceux de tumeurs malignes et de néoplasmes. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases». Les cancers figurent parmi les principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde, l'OMS estime qu'ils sont responsables de 13% de la mortalité mondiale, et le nombre de cas devrait augmenter de 70% dans les deux prochaines décennies principalement à cause du vieillissement et de l'augmentation de la population mondiale. Il existe plus d'une centaine de types de cancer différents et parmi eux, toujours selon l'OMS, les tumeurs primaires du système nerveux central représentent environ 2% de l'ensemble des cancers, et sont représentées en majorité par les méningiomes et les gliomes.

International Agency for Research on Cancer

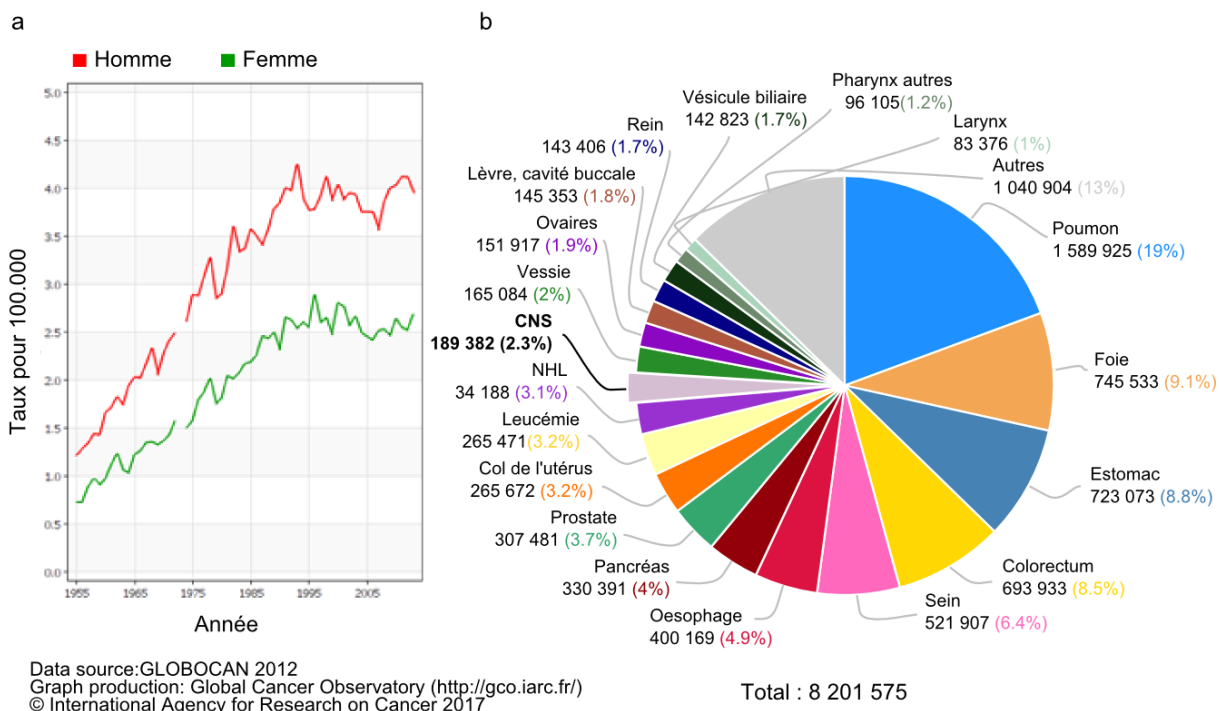


Figure 1. Statistiques des cancers du système nerveux central. (a) Mortalité des cancers du cerveau et du système nerveux central en France. (b) Mortalité mondiale par cancer. World Health Organization, Department of Information, Evidence and Research, mortality database. <http://gco.iarc.fr/>

I. Généralités sur les gliomes

Le cerveau est composé par deux grands groupes cellulaires principaux : les neurones et les cellules gliales. Les cellules gliales regroupent la macroglie, représentée par les astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes, et la microglie qui constitue le système immunitaire du cerveau. Les astrocytes sont des cellules ayant un rôle de nutrition, d'homéostasie du milieu extracellulaire et de recapture de molécules. Ils participent à la formation de la barrière hématoencéphalique et à la réparation du tissu cérébral après une lésion. La fonction principale des oligodendrocytes est la formation de la gaine de myéline autour de l'axone d'un neurone, mais ces cellules ont également un rôle métabolique. Les cellules épendymaires constituent la barrière qui tapisse les parois des ventricules.

Les gliomes sont des tumeurs du système nerveux central. Elles constituent un ensemble hétérogène dont les cellules possèdent des caractéristiques de cellules gliales : principalement des caractéristiques astrocytaires, oligodendrocytaires, ou de cellules épendymaires. Les gliomes astrocytaires et oligodendrocytaires sont les tumeurs primaires cérébrales les plus communes. La plupart sont des tumeurs diffuses infiltrantes localisées au niveau des hémisphères cérébraux chez l'adulte. Les gliomes sont en général incurables en dépit de thérapies agressives mêlant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (Arko *et al.*, 2010). Ils sont traditionnellement subdivisés sur des critères histologiques, mais des critères moléculaires sont maintenant également utilisés.

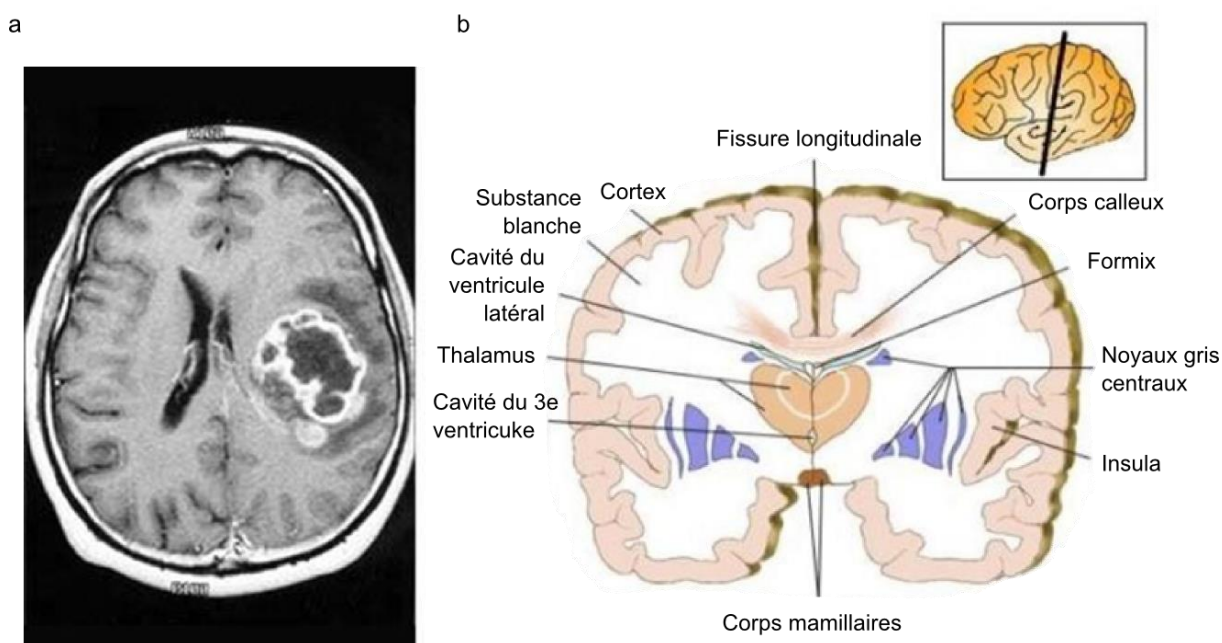


Figure 2. Gliome visualisé par IRM et anatomie du cerveau. (a) IRM cérébrale axiale T1 après injection d'un produit de contraste, le gadolinium. Image extraite de <http://www.artc.asso.fr>, la tumeur est dans l'hémisphère gauche, zone temporale. (b) Anatomie du cerveau, coupe frontale.

II. Les classifications des gliomes

1. La classification histologique de l'OMS

La plupart des classifications actuelles des gliomes sont basées sur l'analyse de l'apparence histologique des tumeurs et réalisent un parallèle entre l'apparence histologique des cellules de la tumeur et les étapes de différenciation des cellules de la glie, en se basant sur la ressemblance histologique et les similitudes d'expression protéique entre types cellulaires. Les tumeurs de plus haut grade sont les tumeurs les moins différenciées.

La classification de l'OMS, établie pour la première fois en 1979 par Zülch, est la première classification des tumeurs du système nerveux central, destinée à être une référence unique permettant d'adopter la démarche thérapeutique la plus adaptée selon le type de la tumeur (Kleihues, Burger et Scheithauer, 1993). Il s'agit d'une classification basée sur des critères histologiques et l'identification du type cellulaire prédominant dans la tumeur. Elle est depuis sa création sans cesse améliorée afin de définir plus spécifiquement les sous-types tumoraux. Elle contient des caractéristiques concernant l'épidémiologie, les signes cliniques et les symptômes, l'imagerie tumorale, le pronostic et les facteurs prédictifs. Il s'agit de la classification de référence la plus couramment utilisée dans le monde, révisée successivement en 1993, 2000 et 2007 (Kleihues, Burger et Scheithauer, 1993; Kleihues et Sobin, 2000; Louis *et al.*, 2007). Elle prend donc en compte le type histologique du gliome et son grade, un facteur clé qui permet de prédire le comportement d'une tumeur et influence le choix des thérapies et qui est évalué par des critères de malignité (densité cellulaire, atypies nucléaires, mitoses, prolifération microvasculaire et nécrose). En 2016, la classification OMS a été remaniée pour intégrer des données moléculaires (Louis *et al.*, 2016).

La classification OMS divise les gliomes en trois catégories histologiques, astrocytomes, oligodendrogliomes et gliomes mixtes. Chacune de ces catégories est divisée en quatre sous-groupes, en fonction de la composante cellulaire prédominante et du grade de malignité. Le grade de malignité est défini par la présence d'atypies nucléaires, d'activité mitotique (déterminé par l'index de marquage Ki67), d'angiogenèse et de nécrose qui sont des critères d'anaplasie, c'est-à-dire d'évolution vers une perte de l'état différencié. Il est en lien avec la médiane de survie qui est plus faible pour les tumeurs de haut grade. Le grade I correspond à des lésions bénignes peu prolifératives, donc à croissance lente, et dont l'exérèse chirurgicale permet la guérison. Le grade II inclut des lésions qui peuvent progresser vers des grades plus élevés, avec une activité mitotique faible et une tendance à l'infiltration et à la récurrence. Les tumeurs de grade III quant à elles sont des tumeurs malignes : elles présentent une grande activité mitotique, des anaplasies, et un caractère infiltrant important. Enfin, le grade le plus malin (grade IV) regroupe les tumeurs présentant des zones nécrotiques ainsi qu'une forte activité mitotique, associée à une évolution rapide de la maladie et à une angiogenèse importante (Louis *et al.*, 2007). La classification est résumée par le tableau 1. Cette classification reste imparfaite, car elle repose sur des critères parfois difficiles à évaluer pouvant laisser place à une certaine subjectivité.

Grade, tumeur	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Prolifération endothéliocapillaire	Nécrose	Médiane de survie
Tumeurs Astrocytaires						
Astrocytome diffus de grade II : -Fibrillaires -Gémistocytiques -Protoplasmiques	+	+/-	-	-	-	6 à 8 ans
Astrocytome anaplasique de grade III	++	+	++	-	-	2 à 3 ans
Glioblastome de grade IV	+++	+++	+++	+	+	< 1 an
Tumeurs Oligodendrocytaires						
Oligodendrogliome de grade II	+	+/-	+	-	-	> 10 ans
Oligodendrogliome de grade III	+++	++	++	+	+/-	2 à 3 ans
Tumeurs Oligoastrocytaires						
Oligoastrocytome de grade II	+ / ++	+/-	+	-	-	6 ans
Oligoastrocytome de grade III	+++	++	+++	+	-	3ans
Glioblastome à composante oligodendrogliale (GBMO)	+++	+++	+++	+	+	< 1 an

Tableau 1. Classification histopathologique des astrocytomes, oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de l'adulte selon l'OMS 2007 (D'après Louis *et al.*, 2007).

2. Le glioblastome

Le gliome de plus mauvais pronostic est le glioblastome (GBM), ou gliome de grade IV. Il s'agit de la tumeur cérébrale la plus fréquente, qui peut survenir *de novo* (glioblastome primaire ou GBMI), ou résulter de l'évolution d'une tumeur de grade inférieur (glioblastome secondaire ou GBMII). Les GBMII se développent à partir d'un astrocytome diffus de bas grade ou d'un astrocytome anaplasique. Les GBM primaires représentent 90% des GBM. Ils se développent rapidement et sont considérés comme incurables, avec une médiane de survie de 15 mois après chirurgie et sous thérapie (Aldape *et al.*, 2015). Histologiquement GBMI et GBMII sont semblables, mais ils diffèrent par leurs profils génétiques et épigénétiques. Ainsi, ils ne sont pas traités de la même manière. Le cas des GBM montre l'importance d'une caractérisation moléculaire précise par rapport à une simple identification histologique et radiologique.

3. Caractéristiques moléculaires des gliomes

Les principales anomalies récurrentes caractéristiques des gliomes ont été décrites dans de nombreuses études d'analyses génétiques. Certaines de ces anomalies sont clairement impliquées dans la croissance tumorale et sont parfois spécifiques de sous-groupes de gliomes, ce qui a une répercussion sur leur évolution et leur sensibilité aux traitements. Ainsi, la découverte des altérations moléculaires présentes dans les gliomes a participé à l'amélioration de leur caractérisation. Ces changements génétiques retrouvés dans les gliomes peuvent être des gains chromosomiques, des pertes d'hétérozygotie ou des altérations épigénétiques comme l'hyperméthylation de promoteurs. Ce sont des mécanismes qui conduisent à la surexpression ou l'inhibition de gènes. Plusieurs groupes ont analysé des tumeurs issues de cohortes de patients et ont pu établir des classifications sur la base de signatures moléculaires et géniques. Ils ont ainsi identifié plusieurs marqueurs comme le statut de mutation du gène de l'isocitrate déshydrogénase (statut IDH), la méthylation du promoteur de la O6-méthylguanine-DNA méthyl transférase (MGMT), la codéletion 1p/19q, et les mutations des gènes de *p53* et du récepteur au facteur de croissance épidermique (*EGFR*). Les altérations génétiques et épigénétiques observées dans les gliomes commencent à être mieux identifiées, mais leurs conséquences fonctionnelles ne sont pas toujours claires. La plupart modifient l'expression génique des cellules de la tumeur et en affectent la signalisation.

3.1 Altérations génétiques

3.1.1 Mutations IDH ½

Les gènes IDH codent pour l'enzyme Isocitrate Déshydrogénase, qui catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate (α KG) en réduisant le NADP⁺ en NADPH (Figure 3). Le gène *IDH1* code pour l'isoforme cytoplasmique, alors que le gène *IDH2* code pour la forme mitochondriale de la protéine. Ces enzymes métaboliques font partie des mécanismes de protection contre le stress oxydatif (Ohgaki et Kleihues, 2013). Les mutations du gène *IDH1* ont été identifiées pour la première fois en 2008 dans une cohorte de GBM, en majorité dans des GBMII (Parsons *et al.*, 2008). Elles se situent au niveau du site catalytique de la protéine et entraînent un changement de fonction : l'enzyme n'exerce plus la décarboxylation oxydative mais devient capable de réduire l' α KG en 2-hydroxyglutarate (2-HG). L'accumulation de 2-HG perturbe l'activité des enzymes dioxygénases α KG-dépendantes. La perte de fonction de ces enzymes est associée à l'augmentation du facteur de transcription HIF-1 α et de ses cibles comme GLUT1, VEGF ou PGK1 (Dang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009). De telles mutations sont fréquentes dans les gliomes diffus de grade II et III (70-90%) et les GBM secondaires (85%), mais sont rarement observées chez les patients atteints de GBM primaires (5%) (Nobusawa *et al.*, 2009; Ceccarelli *et al.*, 2016). Il s'agit donc probablement d'un évènement génétique précoce survenant dans les lésions de bas grade, mais qui n'intervient que marginalement dans les GBM primaires. Ces mutations IDH ne sont pas retrouvées dans les autres types de tumeurs cérébrales et semblent donc spécifiques des gliomes diffus (Bleeker *et al.*, 2009). Le statut IDH est un marqueur

pronostique pour les patients atteints de gliomes de grade II et III et de GBM (Sanson *et al.*, 2009; TCGA Network, 2015). Il est majoritairement associé à la signature proneurale (Verhaak *et al.*, 2010) et à la présence d'une hyperméthylation des îlots CpG (Décrit en 3.2.1, (Noushmehr *et al.*, 2010)).

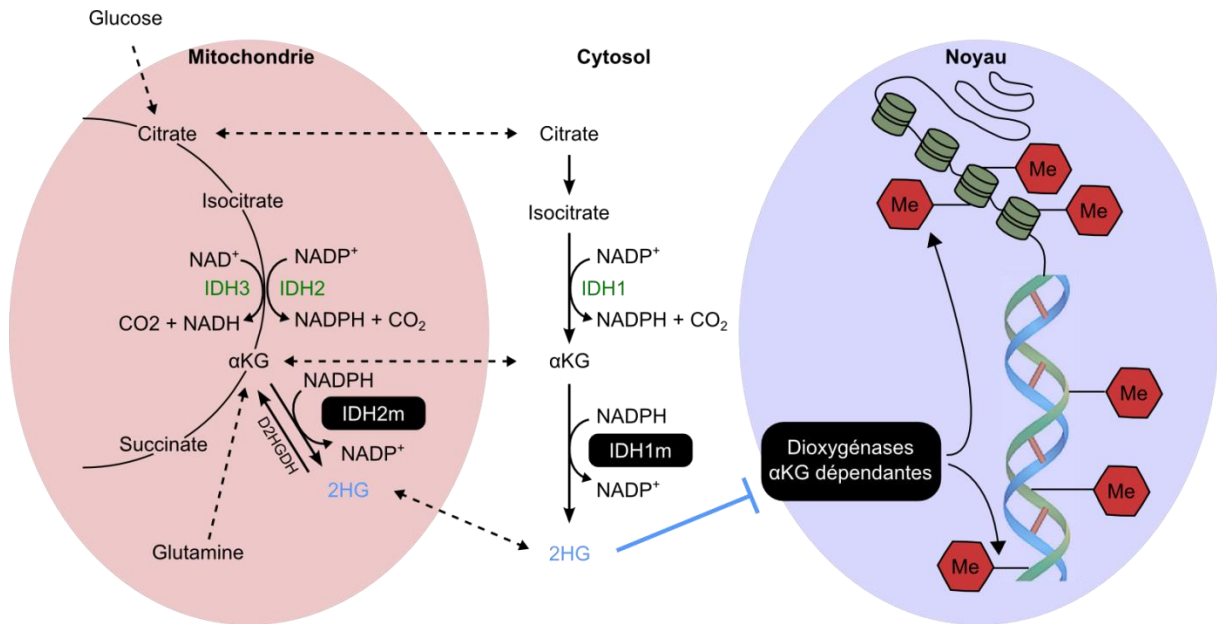


Figure 3. Fonctions des gènes IDH. Illustration des fonctions des IDH non mutées (en vert) et des IDH mutées (sur fond noir). 2HG, D-2-hydroxyglutarate; α KG, α -cétoglutarate; IDH, isocitrate déshydrogénase; IDHm, mutant IDH. Adapté de Dang *et al.*, (2015).

3.1.2 Modifications chromosomiques

i. La codéletion 1p/19q

La perte d'hétérozygotie 1p/19q est présente dans 40% des gliomes et caractérise un sous-ensemble de tumeurs oligodendrogliales de bon pronostic sensibles à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Elle est le résultat d'une translocation centromérique déséquilibrée dont l'effet est la perte complète des bras court du chromosome 1 et long du chromosome 19 (Cairncross *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 2006). Il existe une corrélation entre la présence d'une mutation IDH et la codéletion 1p/19q : tous les gliomes présentant la codéletion possèdent également une mutation IDH (Sanson *et al.*, 2009). Dans 90% des cas on observe également une méthylation du promoteur de la *MGMT* dans ces tumeurs. Cette codéletion est observée dans 80 à 90% des oligodendrogliomes de grade II et dans 50 à 70% des oligodendrogliomes de grade III (Reifenberger *et al.*, 1994). Elle est mutuellement exclusive avec les mutations de *p53* et l'amplification de l'*EGFR*. La perte partielle du chromosome 1 est associée à un phénotype astrocytaire et un mauvais pronostic.

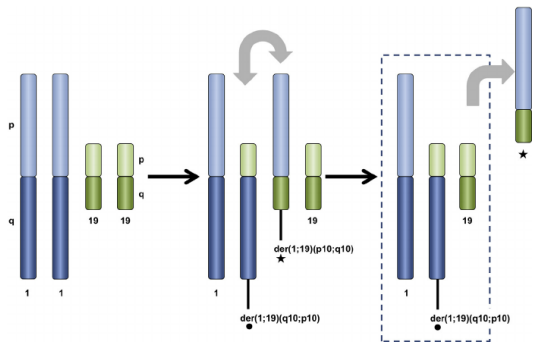


Figure 4. La codéletion 1p/19q. La codéletion 1p19q est le résultat d'une translocation centromérique déséquilibrée

- ii. Perte d'hétérozygotie du chromosome 10, gain du chromosome 7

La perte d'hétérozygotie du chromosome 10, sur lequel est localisé *PTEN*, et l'amplification du chromosome 7, sur lequel sont localisés *PDGFRA* et *EGFR*, sont les anomalies les plus fréquentes. Elles sont presque toujours associées avec des anomalies de l'expression de *Telomerase reverse transcriptase (TERT)*, mais d'autres délétions et amplifications peuvent être observées, qui touchent des régions contenant des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs.

3.1.3 Altérations des voies p53 et Rb

p53 est un gène suppresseur de tumeur bien connu et très largement étudié dont l'activation en réponse aux signaux de stress et à l'altération de l'ADN mène à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G1 ou G2/M, et/ou à l'initiation de l'apoptose. Ceci est réalisé à travers l'activation de la transcription de *p21*, qui inhibe la fonction des cyclines D, et d'autres protéines pro-apoptotiques. *p53* est principalement contrôlée par le gène *MDM2*. Ce gène code pour une E3-ubiquitine ligase qui induit la dégradation de *p53* par le protéasome et inhibe son activité transcriptionnelle en se liant à son domaine de transactivation. Cette ligase est elle-même régulée par *CDKN2A* (Van Meir *et al.*, 2010; Hernández-Monge *et al.*, 2016). Les complexes Cdk/Cycline, dont Cdk4/6-Cycline D, phosphorylent et ainsi inactivent la protéine retinoblastoma (Rb), ce qui permet la progression du cycle cellulaire. La protéine Rb empêche l'entrée en phase S par sa fonction inactivatrice sur le facteur de transcription E2F. Lorsque Rb est phosphorylée, E2F1 est libéré ce qui active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Les gènes *P53* et *RB* peuvent être inactivés par mutation, ou délétion (Watanabe *et al.*, 2001). La perte de leur fonction est un événement précoce participant à l'échappement à la mort cellulaire et favorisant l'instabilité génétique et donc la transformation cellulaire. Cette perte est donc observée dans les gliomes de bas grade, les astrocytomes anaplasiques et les GBM (Yin *et al.*, 2009; Leiserson *et al.*, 2013; TCGA Network, 2015). Les voies Rb et *p53* peuvent être inactivées de manière indirecte par mutation d'autres gènes participant à ces voies de régulation. Des répresseurs comme *CDK4* ou *MDM2* sont fréquemment amplifiés. L'amplification de *CDK4*, identifiée dans 15% des gliomes de haut grade, entraîne l'inactivation de Rb et donc les arrêts de la transition G1/S

(Yin *et al.*, 2009; Leiserson *et al.*, 2013; TCGA Network, 2015). Dans les gliomes il existe également fréquemment des mutations ou délétions de *CDKN2A*. Le locus de *CDKN2A* code pour les protéines Ink4A et Arf qui sont des activateurs de Rb et P53 respectivement (Aldape *et al.*, 2015). Une faible expression de *CDKN2A* est associée à un plus mauvais pronostic (W. Liu *et al.*, 2011).

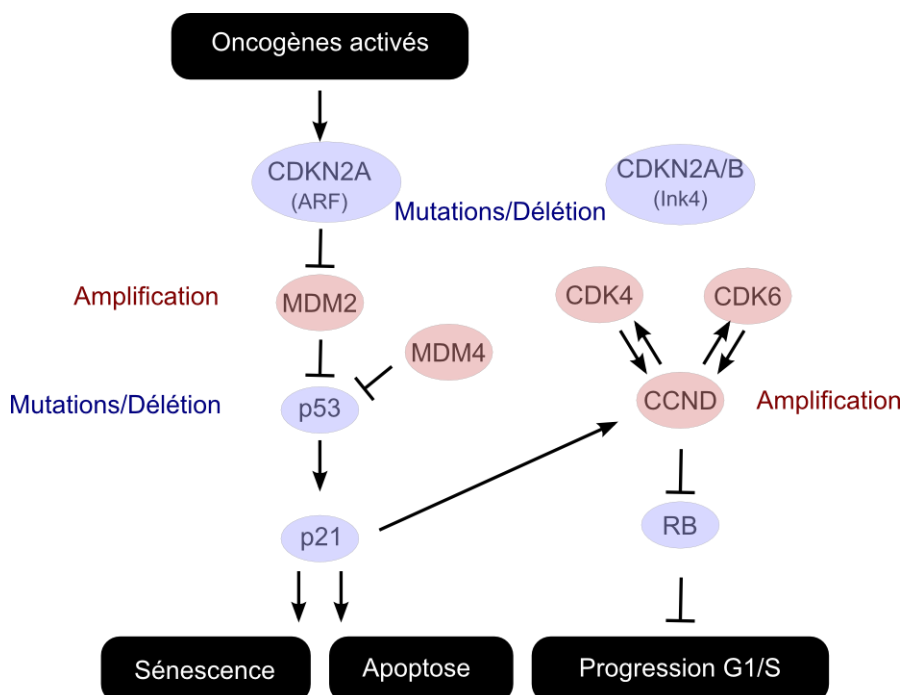


Figure 5 : Les voies p53 et Rb. Les activateurs du cycle, représentés sur fond rouge, sont amplifiés ou suractivés dans les gliomes, tandis que les déclencheurs d'apoptose et d'arrêt du cycle sont délévés ou inactivés (bleu). Adapté de Van Meir *et al.*, (2010).

3.2 Altérations épigénétiques

Les mécanismes épigénétiques contrôlent l'expression des gènes sans modifier la séquence ADN, en régulant des facteurs permettant des modifications de la chromatine. La chromatine est composée de nucléosomes, eux même constitués de huit histones enroulés autour de l'ADN. Le plus souvent, les modifications de la chromatine sont le résultat de modifications des histones. Il peut s'agir de leur acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitylation, qui sont réalisées par des enzymes (Yong et Tsankova, 2015). Le dérèglement de ces mécanismes épigénétiques contribue à la gliomagenèse en entraînant soit l'ouverture de la chromatine au niveau de promoteurs de proto oncogène ce qui favorise leur transcription, soit la condensation de la chromatine au niveau des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui les inhibe.

3.2.1 Hyperméthylation de l'ADN

Plusieurs études ont montré que les mutations des gènes *IDH* sont responsables du phénotype « CpG island methylator phenotype » (CIMP) qui définit un sous-groupe de

tumeurs avec une hyperméthylation de l'ADN (Glioma-CIMP-high) (Noushmehr *et al.*, 2010). Comme décrit précédemment (Partie I.1.1) l'accumulation de 2HG perturbe l'activité des enzymes dioxygénases α KG dépendantes. Parmi elle se trouvent les histones et ADN déméthylases, et leur inhibition entraîne l'hyperméthylation des îlots CpG. Le phénotype G-CIMP-high est associé à un pronostic favorable, et à l'hyperméthylation de plusieurs loci, dont celui du promoteur de *O*⁶-méthyl-guanine-méthyltransférase (*MGMT*) (Noushmehr *et al.*, 2010). Le phénotype G-CIMP-low est associé à l'activation de gènes impliqués dans la division et le cycle cellulaire (Ceccarelli *et al.*, 2016) ;

MGMT encode une enzyme de réparation nucléaire (alkyltransférase) qui enlève les *O*⁶-alkylants liés aux guanines et permet ainsi de maintenir l'intégrité de l'ADN des cellules. L'expression de la *MGMT* est donc protectrice et favorise la survie cellulaire. Le promoteur *MGMT* peut être méthylé dans les gliomes, ce qui inhibe la transcription du gène et rend les cellules plus sensibles aux agents alkylants comme le Témolozomide (TMZ, Figure 6). La méthylation du promoteur de la *MGMT* est donc corrélée à une meilleure réponse à la chimiothérapie. L'inhibition de la *MGMT* augmente l'instabilité génomique en diminuant la capacité de réparation de l'ADN (Esteller *et al.*, 2000; Stupp *et al.*, 2009).

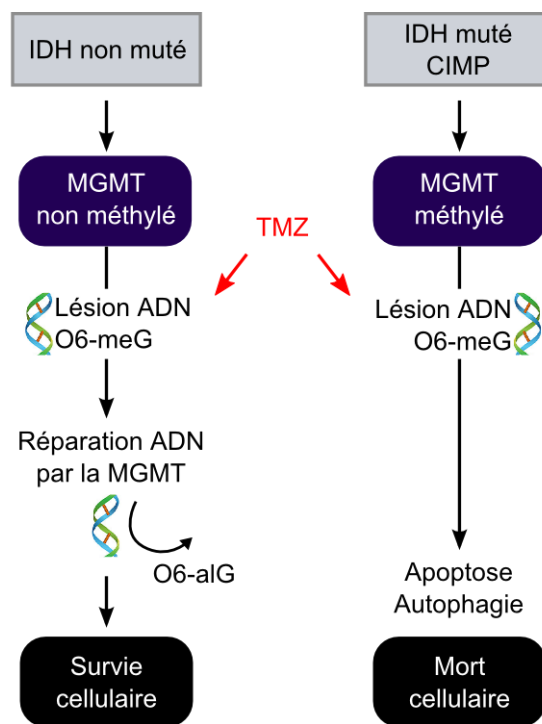


Figure 6. Méthylation du promoteur *MGMT* et réponse au TMZ. Le TMZ est un agent alkylant utilisé en chimiothérapie. Il cause des lésions des bases nucléotidiques comme les *O*⁶-méthylguanines (*O*⁶-meG) ou les *N*³-méthyladénines. La *MGMT* restaure la guanine en éliminant l'*O*⁶-alkylguanines (*O*⁶-alG). L'hyperméthylation de son promoteur empêche sa transcription et donc la réparation de l'ADN. Adapté d'après Aldape *et al.*, (2010).

3.2.2 Modifications des télomères

Les télomères sont des séquences ADN non codantes hautement répétitives situées aux extrémités des chromosomes. Leur raccourcissement au cours des divisions cellulaires détermine le nombre de cycles pouvant être réalisés par la cellule. La maintenance des télomères est un des mécanismes par lesquels s'établit la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses. Dans les GBM, l'inactivation du gène *Alpha thalassemia/Mental retardation Syndrome X-Linked (ATRX)* est associée à un phénotype d'allongement des télomères par mécanisme alternatif de recombinaison. Une des fonctions d'ATRX est de réguler l'incorporation de l'histone H3.3 dans les nucléosomes au niveau des télomères (Wong *et al.*, 2010). Les mutations de ce gène entraînent le plus souvent son inactivation par la perte du domaine hélicase. Plusieurs mutations ont été identifiées en 2011 (Heaphy *et al.*, 2011). Elles sont mutuellement exclusives de la délétion 1p/19q dans les gliomes mutés IDH, associées aux altérations de *p53*, et représentent un marqueur potentiel du lignage astrocytaire des gliomes. L'inactivation de ATRX est probablement un événement précoce dans la gliomagenèse permettant la maintenance des télomères (Jiao *et al.*, 2012).

Des mutations du promoteur *TERT* ont été observées dans 50% des gliomes d'une cohorte en 2013 (Killela *et al.*, 2013). Les mutations de *ATRX* et *TERT* sont mutuellement exclusives (Killela *et al.*, 2013; Eckel-Passow *et al.*, 2015). Ce gène code pour la sous-unité catalytique de la télomérase qui régule la longueur des télomères. Ces mutations entraînent la surexpression de la sous unité. Cependant l'étude récente de Ceccarelli et collègues réalisée à partir de la base de données du TCGA suggère que les mutations du promoteur *TERT* n'entraînent pas un allongement des télomères et ne sont pas prédictives de la survie, contrairement à celles touchant *ATRX* (Ceccarelli *et al.*, 2016).

4. Classifications moléculaires

Les anomalies génétiques récurrentes identifiées dans les gliomes ont permis la création de sous-types moléculaires, en permettant la distinction entre des types de tumeurs proches histologiquement. Le développement de thérapies personnalisées selon les caractéristiques de la tumeur a été utilisé avec succès pour plusieurs types de cancers, ce qui montre bien l'importance de ces caractérisations moléculaires. Les données génétiques, de transcriptomique et de protéomique ont permis à plusieurs équipes de réaliser des analyses de bioinformatique de manière à définir des sous-groupes moléculaires reliés ensuite à l'histologie, aux marqueurs biomoléculaires et à la survie des patients. Les différentes équipes se sont surtout intéressées aux gliomes les plus agressifs, les gliomes diffus, et en particulier les glioblastomes. L'analyse des anomalies génétiques observées dans les tumeurs de différents grades permet également de comprendre les mécanismes de la gliomagenèse, ce qui est indispensable pour la création de nouvelles thérapies ciblées.

Tout d'abord, les travaux se sont concentrés sur les tumeurs de haut grade comme les GBM, et sur l'identification des caractéristiques moléculaires partagées par un groupe de

tumeur cliniquement défini par les classements histologiques existants. Puis en 2006, Phillips et collègues se sont intéressés à l'expression de nouveaux marqueurs potentiels associés au pronostic clinique et ils ont pu isoler des profils différents dans des gliomes diffus de grade III et IV (Phillips *et al.*, 2006).

4.1 Classification de Phillips - 2006

Cette étude transcriptomique distingue trois sous-ensembles de GBM : les signatures proneurale (PN), proliférative (Prolif) et mésenchymateuse (Mes) définissent des populations de tumeurs qui diffèrent au niveau du grade, des caractéristiques histologiques de la tumeur et de l'âge du patient (Phillips *et al.*, 2006). Cette classification est basée sur les profils d'expression de 35 gènes déterminés à partir de 76 échantillons de GBM et réalise un parallèle entre les gènes exprimés par la cellule tumorale et le profil d'expression d'un type cellulaire normal.

Les gliomes proneuraux expriment fortement des gènes impliqués dans le développement du système nerveux central, des marqueurs caractéristiques des neurones et des neuroblastes (OLIG2, DLL3, GABBR1, SNAP91, MAP2, NeuN, GFAP), et sont de meilleur pronostic. Ils surexpriment également des gènes de la voie Notch. Il s'agit de quasiment toutes les tumeurs de grade III, et de quelques tumeurs de grade IV. Leurs profils d'expression de gènes présentent des similitudes avec les profils d'expression des cerveaux adulte et fœtal.

Les gliomes mésenchymateux sont majoritairement des tumeurs de grade IV de mauvais pronostic. Elles présentent un profil d'expression corrélé à celui des os, de la synovie, des muscles lisses, et des cellules endothéliales et dendritiques. Les tumeurs Mes surexpriment des marqueurs d'angiogenèse (CD44, VEGF), et présentent souvent une perte du chromosome 10 et un gain du chromosome 7, la perte de PTEN, des mutations de l'EGFR, et des modifications de la voie AKT. Leur profil d'expression se rapproche de celui d'astrocytes de cellules souches neurales et progénitrices en amplification transitoire TAP (Transit amplifying progenitor).

Les gliomes prolifératifs sont également des tumeurs de grade IV de mauvais pronostic. Leur profil d'expression est similaire à celui de cellules hautement prolifératives comme les cellules Jurkat, à celui de cellules souches hématopoïétiques, et à celui de cellules souches neurales après traitement et retrait du BDNF. Elles présentent une surexpression de marqueurs de prolifération comme PCNA et TOP2A et un marquage Ki67 élevé. C'est un profil qui correspond aux cellules souches neurales. Il a été observé dans ces tumeurs une perte du chromosome 10 et de PTEN, un gain du chromosome 7 et de l'EGFR, et une modification de la voie AKT. Un résumé de la classification est présenté tableau 2. Avec la récurrence, les tumeurs dérivent et se rapprochent du phénotype mésenchymateux (Phillips *et al.*, 2006). Le rapprochement entre ces sous-types de tumeur et les cellules neurales permet de réaliser un parallèle entre neurogenèse et gliomagenèse, les tumeurs les plus agressives étant les moins différenciées.

	Proneural	Prolifératif	Mésenchymateux
Grade histologique	OMS grade III ou IV, avec ou sans nécrose	OMS grade IV avec nécrose	OMS grade IV avec nécrose
Morphologie cellulaire	Astrocytique ou oligodendrogial	Astrocytique	Astrocytique
Age du patient	Jeune (~40 ans)	Agé (~50 ans)	Agé (~50 ans)
Pronostic	Survie plus longue	Survie courte	Survie courte
Marqueurs histologiques	Olig2, DLL3, BCAN	PCNA, TOP2A	CHI3L1/YKL40, CD44, VEGF
Similarité tissulaire	Cerveau adulte et fœtal	Cellule souche hématopoïétique, lymphoblaste	Os, cartilage, muscle lisse, endothélium, cellules dendritiques
Processus biologique	Neurogenèse	Prolifération	Angiogenèse
Cellule cérébrale analogue	Neuroblaste	Cellule souche neurale/ TAP	Cellule souche neurale
Gain et perte de chromosome	Aucun	Gain du 7, perte du 10 ou 10q	Gain du 7, perte du 10
Locus PTEN	PTEN intact	Perte de PTEN	Perte de PTEN
Locus EGFR	EGFR normal	EGFR amplifié ou normal	EGFR amplifié ou normal
Signalisation	Activation Notch	Activation Akt	Activation Akt

Tableau 2. Principales caractéristiques des différents sous-types de gliomes de haut grade selon la classification établie par Phillips (Phillips *et al.*, 2006).

4.2 Les classifications établies à partir des données du TCGA

Les glioblastomes furent les premières tumeurs analysées par le TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network), et en 2010 Verhaak et collègues proposèrent une classification divisant les GBM en quatre groupes en se basant sur leurs profils d'expression : proneural, neural, classique et mésenchymateux. Les différents sous-types ont ensuite été reliés à des données génomiques et chromosomiques pour identifier les anomalies les plus souvent retrouvées. Certaines anomalies sont partagées par les tumeurs d'un même groupe (Verhaak *et al.*, 2010). Chaque profil transcriptomique de sous-type moléculaire a ensuite été associé à celui d'un type cellulaire murin sur la base des profils définis par Cahoy et collègues : neurone, astrocyte, oligodendrocyte ou cellule astrogliale en culture (Cahoy *et al.*, 2008).

Les GBM du sous-type **classique** sont des tumeurs possédant une amplification du chromosome 7 et une perte du chromosome 10, associées à une altération de l'*EGFR*, en particulier l'amplification et/ou surexpression de l'*EGFR* (dont la mutation *EGFRvIII* qui rend le récepteur constitutivement actif). Des acteurs des voies Notch (*Notch3*, *Jag*, *FLNG*) et Sonic Hedgehog (*SMO*, *GAS1*, *GLI2*) y sont surexprimées, ainsi que le marqueur de cellule

souche *NES*. Le profil d'expression classique est associé aux gènes de la signature astrocytaire.

Les GBM **mésenchymateux** sont caractérisés par la délétion de la région 17q11 contenant le gène *NF1*, et des mutations ou perte de PTEN (qui entraîne l'altération de la voie PI3K/AKT). Plusieurs gènes de la voie NFκB sont fortement exprimés. Ces GBM surexpriment des marqueurs mésenchymateux similaires à ceux identifiés dans l'étude de Phillips et coll. (2006) : *YKL40*, *MET*, *CD44*, *MERTK*. Leur profil d'expression est associé à celui des cellules astrogliales en culture. La majorité des lignées de cellules immortalisées sont classées mésenchymateuses.

Le sous-type **proneural** est défini par deux caractéristiques majeures, les altérations du *PDGFRA* (majoritairement des amplifications), et les mutations des gènes *IDH1/2*. Les mutations et la perte d'hétérozygotie de *p53* sont aussi fréquentes. Ils expriment fortement des gènes de la différenciation oligodendrocytaire (*PDGFRα*, *Nkx2.2*, *OLIG2*) et plusieurs gènes du développement proneural (*Dcx*, *DLL3*, *ASCL1* et *TCF4*, gènes *SOX*), en accord avec les travaux précédents de Phillips et coll. (2006). Ce sous-type peut être divisé en gliomes CIMP positifs ou négatifs en se basant sur les caractéristiques de méthylation de l'ADN qui sont directement liées au statut IDH.

Les GBM de type **neural** sont caractérisés par l'expression de marqueurs neuronaux comme NEFL, GABRA1, SYT1 et SLC12A5, des gènes impliqués dans la projection axonale et la transmission synaptique. Le profil d'expression est similaire à celui du cerveau sain, avec une signature de gènes de la différenciation astrocytaire et oligodendrocytaire, et un enrichissement en gènes exprimés dans les neurones.

Depuis cette classification sur les tumeurs de haut grade par le groupe de Verhaak, la caractérisation des cohortes a continué et s'est étendue aux gliomes de bas grade, pour finalement définir précisément les caractéristiques moléculaires les plus représentatives des sous-types. L'analyse de 293 oligodendrogliomes, astrocytomes et oligoastrocytomes de grade II et III a été réalisée et publiée en 2015 (TCGA Network, 2015). Cette étude prend en compte le nombre de copie ADN, le statut de méthylation de l'ADN, le profil transcriptomique ARN et microARN. Ces analyses multiples ont déterminé des sous types associés au pronostic, à l'histologie et aux altérations moléculaires. Trois sous-types différents sont caractérisés par des marqueurs moléculaires (décrits en 3) : Les tumeurs de bas grade *IDH* wt, avec une médiane de survie de 1.7 ans, les tumeurs de bas grade *IDH* muté à codélétion 1p/19q (*IDH*-m/1p19q) ayant une médiane de survie de 8 ans, et les autres tumeurs de bas grades *IDH* muté sans codélétion (*IDH*-m) avec une survie médiane de 6.3 ans. Le premier groupe *IDH*-wt présente des anomalies ressemblant à celles retrouvées dans les tumeurs de haut grade, les tumeurs *IDH*-m/1p19q présentent des mutations du promoteur *TERT* et des mutations dans les gènes *FUBP1* (locus 1p) et *CIC* (locus 19q), et les *IDH*-m ne présentent pas de mutations de *TERT*, mais fréquemment des mutations *ATRX* et *p53*. Les GBM *IDH*-m sont hyperméthylés, et les *IDH* wt de bas grade sont hypométhylés (TCGA Network, 2015).

Classique	<p>EGFR : amplification/mutation/surexpression PTEN : perte/mutation CDKN2A : perte NES : surexpression Voies de signalisation Notch et SHH activées</p>
Mes	<p>NF1 : perte/mutation p53 : perte/mutation PTEN : perte/mutation MET, CHL3L1, CD44, MERTK : surexpression Famille TNF et signalisation NFkB : activation</p>
Neural	<p>EGFR : amplification/surexpression Signature de cerveau normal Expression de gènes marqueurs de neurones (NEFL, GABRA1, SYT1, SLC12A5)</p>
Proneural	<p>PDGFRA : amplification IDH1 : mutation PI3KA/PI3KR1 : mutations p53, PTEN, CDKN2A : perte/mutation Expression de marqueurs proneuraux (SOX, DCX, DLL3, ASCL1, TCF4) Expression de gènes marqueurs d'oligodendrocytes (PDGFRA, OLIG2, TCF3, NKX2.2) Voies de signalisation PI3K, PDGFRA et HIF activées</p>

Tableau 3. Principales altérations génétiques observées dans les sous-types de GBM décrits par Verhaak. Mes, Mésenchymateux; EGFR, epidermal growth factor receptor; PTEN, phosphatase and tensin homolog; TNF, tumor necrosis factor; PDGFRA, platelet-derived growth factor receptor-A; IDH, isocitrate dehydrogenase; PI3K, phosphoinositol 3-kinase; HIF, hypoxia-inducible factor. D'après Van Meir *et al.*, 2010.

Pour finir, une étude globale sur les gliomes a été réalisée en prenant en compte des tumeurs de tout grade et toute classification histologique (Ceccarelli *et al.*, 2016). Réalisée sur de très nombreux échantillons, il s'agit de la plus grande analyse effectuée à ce jour, comprenant 819 exomes, 932 méthylomes, 1084 profils ADN, et 1045 profils transcriptomiques. Les marqueurs moléculaires identifiés les plus pertinents sont le statut de mutation IDH1/2 et la présence de la codélétion 1p/19q. L'étude détermine sept sous-types principaux de gliomes, différents par leur statut de méthylation, les altérations somatiques et les caractéristiques d'âge et de survie des patients (Ceccarelli *et al.*, 2016).

Dans le groupe de tumeurs IDH muté, un sous-groupe de mauvais pronostic est identifié (6%) caractérisé par un phénotype déméthylé. Cette déméthylation est observée dans 50% des gliomes récurrents. Dans les IDH-wt, un sous-groupe est détecté possédant une méthylation de l'ADN et des caractéristiques ressemblant aux astrocytomes pylocytiques, qui sont des gliomes de grade I chez l'enfant. L'analyse montre qu'une prise en compte du grade,

de l'âge du patient et de la méthylation est la meilleure méthode prédictive pour déterminer le pronostic du patient. L'ensemble des résultats est présenté figure 7.

L'analyse des voies de signalisation altérées dans les différents sous-types permet d'identifier les mécanismes sous-jacents à l'apparition et l'évolution des gliomes, et ouvre la voie à l'identification de cibles moléculaires pertinentes pour la thérapie ciblée. Ces différentes études ont finalement abouti à une révision de la classification de l'OMS qui incorpore les données moléculaires au diagnostic pathologique en 2016 (Louis *et al.*, 2016).

4.3 Changements apportés dans la classification OMS des gliomes adultes en 2016

Cette actualisation de la classification de l'OMS intègre pour la première fois des paramètres moléculaires tout en gardant des caractéristiques histologiques. Elle ajoute de nouveaux sous-groupes de tumeurs, et supprime certaines entités n'ayant pas d'intérêt diagnostique ou biologique. Les tumeurs pour lesquelles aucun diagnostic moléculaire n'est réalisable, ou pour lesquelles les informations moléculaires sont insuffisantes ou non déterminantes, sont désignées NOS (Not Otherwise Specified). Cette désignation ne définit pas une catégorie mais un ensemble de tumeurs qui ne peut être classé dans un groupe bien caractérisé moléculairement. Une des modifications les plus notables de cette classification est le regroupement des gliomes astrocytiques et oligodendrogliaux sur la base de leur statut IDH1/2. Dans cette nouvelle classification, les gliomes diffus comprennent les tumeurs astrocytiques de grade II et III, les oligodendrogliomes de grade II et III, les glioblastomes de grade IV, et certains gliomes diffus pédiatriques. Ne sont pas inclus les astrocytomes n'ayant pas de mutation IDH ou BRAF (astrocytomes pylocytiques, xanthastrocytomes pleiomorphiques), ou de mutations TSC1/2. Les astrocytomes diffus de grade II et astrocytomes anaplasiques de grade III sont chacun divisés en 3 catégories : IDH muté, IDH wt et NOS. La majorité des tumeurs de grade II et III entre dans la catégorie IDH muté (Louis *et al.*, 2016).

Les **glioblastomes** sont divisés en : **(1) GBM IDH-wt** (90% des cas), correspondant le plus souvent avec le diagnostic clinique de GBM, possédant des amplifications de l'EGFR et une perte du chr10, **(2) GBM IDH mutés** (10%), correspondant en général aux GBMII, et **(3) les GBM NOS**, dans lesquels le diagnostic IDH n'a pu être réalisé. Deux types de GBM particuliers sont décrits : (1) les GBM à composante primaire neuronale, qui comprennent généralement des astrocytomes diffus de tous grades dans lesquelles des nodules contiennent des cellules présentant une différenciation neuronales, et (2) les GBM/astrocytomes à petites cellules ou à cellules granulaires, caractérisés respectivement par la présence de petites cellules néoplasiques ressemblants à des cellules d'oligodendrogliomes, et par des cellules à phénotype granulaires à macrophagiques riches en lysosomes.

Pour être qualifiées d'**oligodendrogliomes** les tumeurs doivent être mutées dans un gène IDH en combinaison avec la codélétion 1p/19q. En l'absence de la possibilité de tests génétiques, la tumeur peut être qualifiée histologiquement d'oligodendrogliome NOS.

Le diagnostic d'**oligoastrocytome** est réservé à des tumeurs NOS, la caractérisation génétique permettant dans la très grande majorité des cas de les classer en astrocytome ou oligodendrocytome.

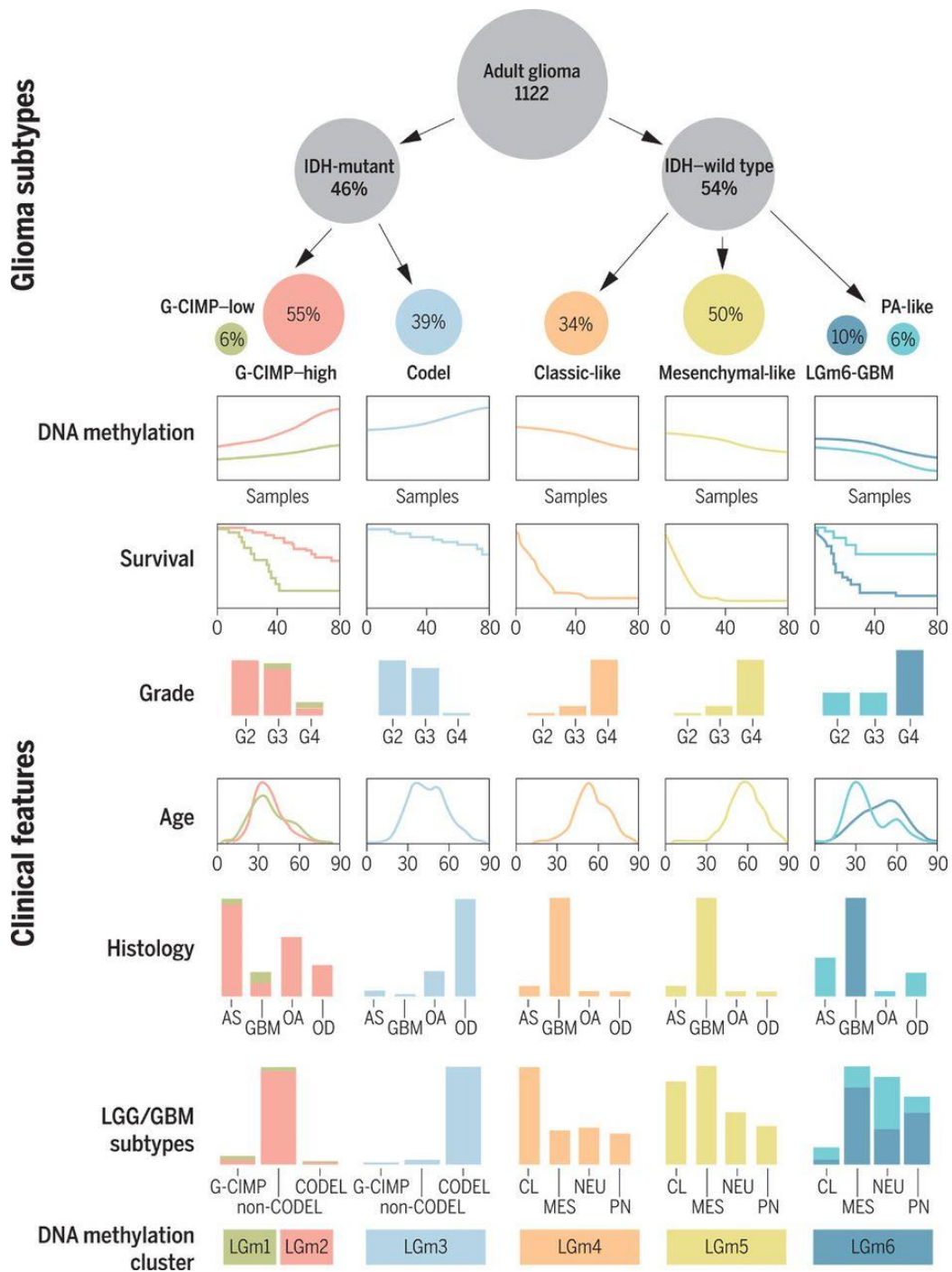


Figure 7. Vue d'ensemble des principaux sous-types de gliomes adultes. La taille des cercles est proportionnelle au pourcentage d'échantillons dans chaque groupe. La survie est représentée par des courbes de Kaplan-Meier, le nombre d'échantillons par grade, histologie et sous-types de LGG/HGG dans chaque groupe est représenté par des histogrammes. L'âge est représenté en densité (Ceccarelli *et al.*, 2016).

Cette classification 2016 de l'OMS représente une avancée conceptuelle et pratique. Elle introduit le concept de la caractérisation moléculaire pour le diagnostic tumoral, ce qui devrait faciliter les études cliniques, expérimentales et épidémiologiques et par là être bénéfique pour les patients atteints de tumeurs cérébrales. Les entités définies sont plus objectives et plus précises, ce qui permet entre autre une meilleure adaptation thérapeutique.

5. Hétérogénéités intra et inter-tumorale des gliomes

L'hétérogénéité tumorale est une des raisons de la difficulté de prise en charge des patients atteints de gliome de haut grade. Elle existe entre tumeurs, où les différences de grade, d'altérations génétiques et d'expression déterminent le pronostic et la réponse thérapeutique, mais également à l'intérieur de la tumeur. L'hétérogénéité intra tumorale cellulaire et moléculaire a été démontrée par l'utilisation de techniques comme le séquençage sur cellule unique (Sottoriva *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2015). Les cellules d'une même tumeur ne portent pas toutes les mêmes altérations génétiques, et n'ont pas toutes le même phénotype. Les mutations apparaissent successivement, dans des clones différents, et entraînent l'apparition de populations différentes. La présence de ces différentes populations cellulaires peut déterminer le succès ou l'échec d'un traitement (Patel *et al.*, 2014).

III. Altérations de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire

Les voies Notch, Hedgehog (HH) et Wnt (Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site) sont les trois principales voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale des GBM. Initialement, elles ont été décrites dans le cadre du développement embryonnaire. Les acteurs de ces voies sont des morphogènes de la phase précoce de l'embryogenèse participant au développement du système nerveux. Elles permettent le maintien du stock de cellules souches normales, en particulier au niveau cérébral. De plus, plusieurs études ont montré l'altération des voies liées aux récepteurs à activité tyrosine-kinase et impliquées dans la modification de la chromatine et le contrôle du cycle cellulaire. En particulier, les travaux réalisés par le TCGA identifient trois voies majeures altérées dans les GBM : la réponse au stress par p53, le contrôle du cycle par Rb, et les voies des RTK (Ras-Raf-MEK-ERK, PI3K/AKT/mTOR) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Ceccarelli *et al.*, 2016).

1. Notch

1.1 La signalisation Notch

La signalisation Notch est une voie très conservée au cours de l'évolution. Elle régule le développement neural embryonnaire mais est également active dans le cerveau adulte où elle joue un rôle important dans des processus variés comme l'apoptose, la prolifération cellulaire, et la différenciation cellulaire. La signalisation Notch est initiée lorsqu'un ligand transmembranaire des familles Jagged (JAG) ou ligand delta-like (DLL) d'une cellule se lie

au récepteur transmembranaire NOTCH de la cellule adjacente, ceci entraîne la libération du domaine intracellulaire de NOTCH (NICD), clivé par des sécrétases. NICD transloque dans le noyau où il interagit avec des co-activateurs comme la protéine mastermind-like (MAML) pour transformer le répresseur transcriptionnel RBPJ/CBF1 en activateur (Figure 9). Celui-ci active la transcription de gènes cibles comme les gènes de la famille Hairy and Enhancer of Split (HES), qui sont des acteurs des différenciations gliale et neuronale. Les gènes cibles de la voie Notch incluent des facteurs de transcription comme NFkB, PPAR et c-Myc, et des régulateurs du cycle cellulaire comme la cycline D1 (Ables *et al.*, 2011). La signalisation Notch peut également être active à travers des voies non canoniques indépendantes de CBP1 (Sanalkumar, Dhanesh et James, 2010). L'activation de la voie Notch affecte la prolifération, la spécification et la différenciation des cellules souches et progénitrices. Le niveau de signalisation Notch régule la balance entre quiescence et prolifération. Dans le cerveau post-natal, NOTCH2 favorise la prolifération et empêche la différenciation neuronale des cellules, favorise la survie et la différenciation astrocytaire (Borghese *et al.*, 2010; Tchorz *et al.*, 2012). Dans le cerveau adulte la voie Notch est essentielle pour le maintien d'un stock de cellules souches et progénitrices neurales et le déroulement de la neurogenèse (Hitoshi *et al.*, 2002; Borghese *et al.*, 2010; Imayoshi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). L'activation de la voie Notch inhibe la différenciation terminale des oligodendrocytes, mais peut favoriser la différenciation astrocytaire ou gliale (Wang *et al.*, 1998). NOTCH1 seul est capable d'inhiber la neurogenèse (Yang *et al.*, 2011). La signalisation Notch favorise la différenciation gliale au dépend de la différenciation neuronale (Gaiano et Fishell, 2002).

1.2 Notch dans les gliomes

Il s'agit d'une des voies ciblées dans les thérapies moléculaires. Dans les gliomes, plusieurs protéines de la voie Notch peuvent être surexprimées. Les gliomes de haut grade sont enrichis en gènes de la signalisation Notch (Chen *et al.*, 2010; Bozdogan *et al.*, 2014), et cette signalisation est activée dans les GBM classique (Verhaak *et al.*, 2010) ou Mes (Phillips *et al.*, 2006) de mauvais pronostic. L'expression de NOTCH1 est corrélée positivement avec la progression tumorale (J. Li *et al.*, 2011), et la surexpression des gènes cibles de NOTCH est liée à un mauvais pronostic. Dans les gliomes de bas grade, *NOTCH1* est plus faiblement exprimé dans les tumeurs avec mutation IDH sans codélétion 1p19q, donc dans les tumeurs avec mutation de *p53*, qui sont de meilleur pronostic que les tumeurs non mutées (TCGA Network, 2015; Teodorczyk et Schmidt, 2015). Des mutations inactivatrices de *NOTCH1* sont fréquentes dans les gliomes de bon pronostic IDH mutés arborant la codélétion 1p/19q (TCGA 2015). D'autres travaux ont identifié un rôle contraire pour la signalisation Notch : l'expression de NOTCH1 est plus élevée dans les tumeurs de bas grade que dans les GBM, avec peu ou pas de NOTCH1 nucléaire dans les GBM (Purow *et al.*, 2005). Ce rôle contradictoire de la voie NOTCH est appuyé également par le fait que certains gènes de la voie Notch sont surexprimés dans les gliomes proneuraux, et que l'activation de la voie Notch est associée à un meilleur pronostic (Phillips *et al.*, 2006; Teodorczyk et Schmidt, 2015). A l'inverse *NOTCH2* est plus fortement exprimé dans les GBM par rapport aux

oligodendrogliomes, et la perte de ce gène dans les GBM et les oligodendrocytes a une valeur pronostique (Boulay *et al.*, 2007; Sivasankaran *et al.*, 2009).

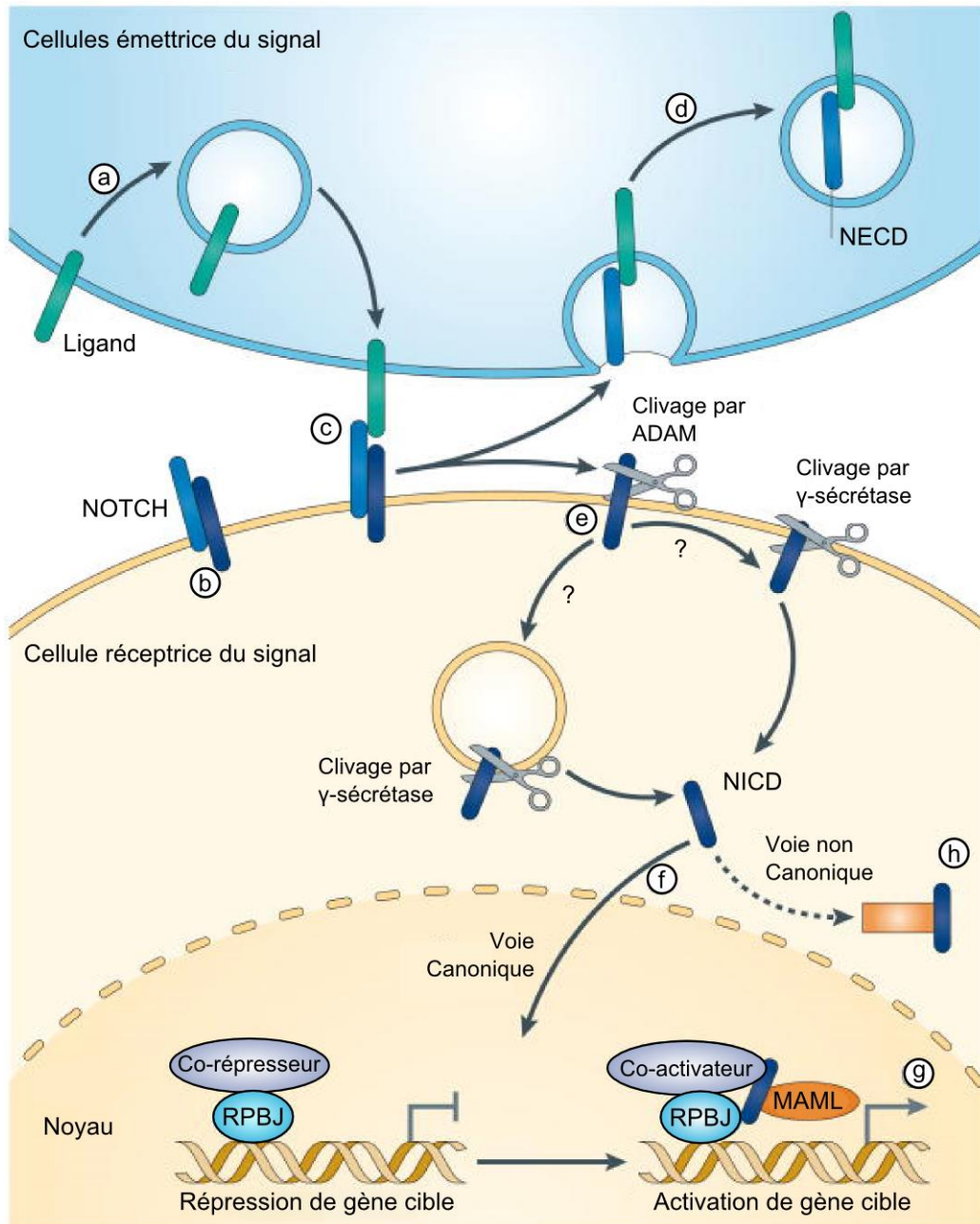


Figure 8. Vue d'ensemble de la signalisation Notch. La signalisation Notch est induite dans une cellule réceptrice par une cellule émettrice. (a) les ligands comme DLL1 sont activés et présentés à la membrane. (b) le récepteur NOTCH est présenté à la membrane sous forme d'hétérodimère. (c) Le ligand se lie à Notch. (d) Selon un modèle, le dimère peut être séparé par la force de l'endocytose de la cellule émettrice qui récupère le domaine extracellulaire de NOTCH (NECD). (e) NOTCH est clivé par des désintégrines et des protéines ADAM (metalloprotéinase domain-containing protein), puis par la γ -sécrétase. (f) Après le clivage, NICD transloque dans le noyau. (g) Dans le noyau NICD déstabilise la liaison de RBPJ au complexe de répression, et forme un complexe stabilisé par les protéines MAML capable de recruter des co-activateurs. (h) La signalisation Notch peut se produire indépendamment de l'activation transcriptionnelle, à travers des interactions protéiques (d'après Ables *et al.*, 2011).

Plusieurs groupes ont montré que les cellules souches tumorales expriment les gènes de la voie Notch, et que les cellules de gliomasphère obtenues à partir des tumeurs surexpriment plusieurs gènes de la voie Notch (J. Lee *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010). L'inhibition de *NOTCH1* par siRNA dans des cellules de gliome entraîne l'augmentation de la mort cellulaire, la diminution de la prolifération et l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que l'augmentation de l'expression de GFAP (Purow *et al.*, 2005). La surexpression du domaine intracellulaire de Notch dans des cellules souches neurales est tumorigène (Zhang *et al.*, 2008) et l'acide rétinoïque induit les cellules de GBM à différencier en partie à travers l'inhibition de la voie Notch (Ying *et al.*, 2011). De même, l'inhibition de la voie Notch par des inhibiteurs de la γ -sécrétase ou des shRNA dirigés contre NOTCH1 induit l'arrêt de la prolifération et la différenciation des cellules de gliome (Hu *et al.*, 2011; Rampazzo *et al.*, 2013; Saito *et al.*, 2014). A l'inverse la surexpression d'une forme de NOTCH2 active constitutivement augmente la croissance tumorale et l'utilisation d'inhibiteurs de la γ -sécrétase bloque le développement de la tumeur et allonge la survie des souris greffées, elle diminue la prolifération cellulaire et entraîne la différenciation des cellules. Elle entraîne également une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales associée à une diminution de la phosphorylation de AKT et STAT3 (Chen *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2010). Des ligands non canoniques de NOTCH comme Dlk1 sont également surexprimés dans les gliomes par rapport au cerveau sain (Teodorczyk et Schmidt, 2015), et la surexpression de Dlk1, inhibiteur de Notch, dans des cellules de GBM entraîne l'augmentation de leur prolifération. Il a été montré que la signalisation Notch favorisait la résistance à la radiothérapie, probablement en favorisant la maintenance de cellules en quiescence dans la tumeur (Wang *et al.*, 2010). Le rôle de la signalisation Notch dans les tumeurs cérébrales n'est pas clairement défini. Elle pourrait avoir différentes fonctions dépendantes de l'environnement cellulaire, mais dans les lignées de cellules de gliomes elle semble préférentiellement oncogène.

2. Hedgehog

2.1 La signalisation HedgeHog

La voie Hedgehog (HH) est très conservée et joue un rôle clé dans la neurogenèse et le développement. Elle régule la prolifération et la différenciation cellulaire, et permet la maintenance des cellules souches et de la neurogenèse dans le cerveau adulte. Chez les mammifères, les protéines HH comprennent Sonic (SHH), Indian (IHH), et Desert (DHH) Hedgehog, qui sont sécrétées par la cellule grâce au transporteur membranaire Dispatched. La signalisation est activée par la liaison d'un ligand HH, principalement SHH, sur le récepteur transmembranaire patched 1 (PTCH1). PTCH1 forme un complexe inhibiteur avec un récepteur couplé aux protéines G, Smoothed (SMO). La liaison d'un ligand lève l'inhibition qu'exerce PTCH1 sur le récepteur SMO, qui s'internalise et active les protéines de la famille glioma-associated-oncogene (GLI). Ces protéines GLI entrent dans le noyau et activent (Gli1/2), ou répriment (Gli2/3), la transcription de gènes cibles de Shh, dont *PTCH1* et des gènes impliqués dans la prolifération et la survie comme les Cyclines D. PTCH1 interagit également avec PTCH2, la protéine de surface Growth arrest specific (GAS) et d'autres molécules fonctionnant comme co-récepteurs (Petrova et Joyner, 2014). Il existe également

une voie non canonique indépendante des protéines GLI. Il existe au moins deux voies non canoniques, fonctionnant à travers Smo, capable d'activer les petites GTPases, et Patch1 (Brennan *et al.*, 2012).

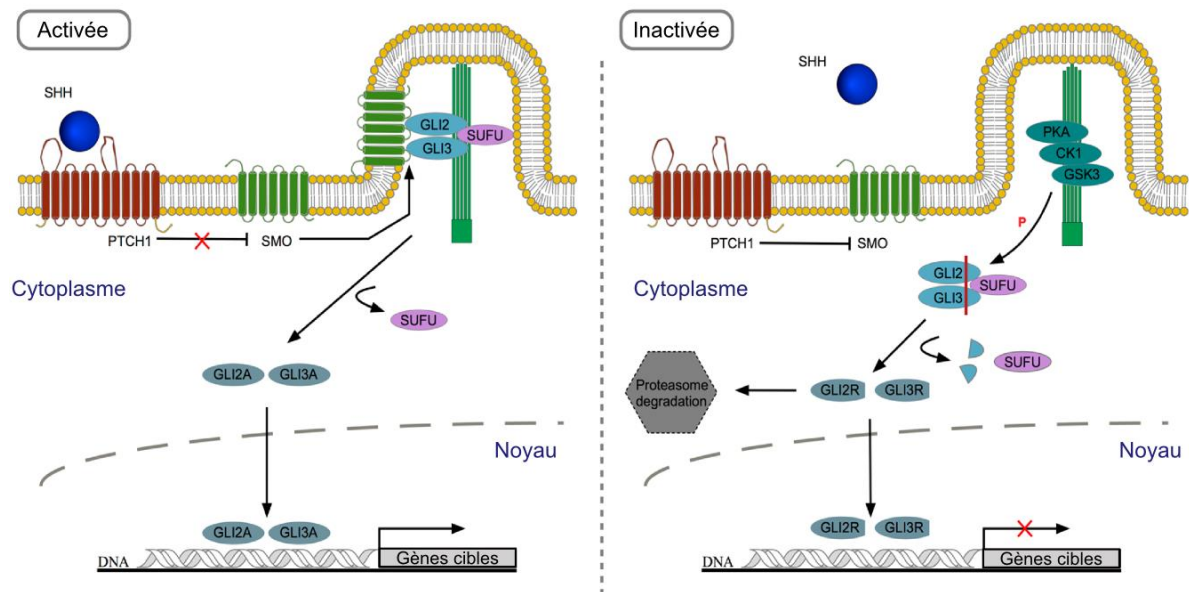


Figure 9. Vue d'ensemble de la signalisation Hedgehog. L'activation de la voie SHH (gauche) est initiée par la liaison d'un ligand à PTCH. La liaison du ligand dé-réprime Smo, une protéine à sept domaines transmembranaires, ce qui active une cascade qui mène à la translocation de GLI dans le noyau en le séparant de SUFU (Fused and Suppressor of fused). Dans le noyau GLI active la transcription de gènes cibles. En l'absence du ligand, la signalisation est inactive (droite). Dans ce cas, PTCH inhibe Smo. Les GLI sont alors phosphorylées par un complexe et ne peuvent pas entrer dans le noyau, notamment à cause de leur interaction avec SUFU. Les gènes cibles de SHH ne sont donc pas transcrits (Adapté de Fernandes-Silva *et al.*, 2017).

2.2 Hedgehog dans les gliomes

La dérégulation de la voie HH est associée à l'initiation de la croissance tumorale. *GLI* a été originellement identifié dans un gliome en 1987 (Kinzler *et al.*, 1987). Les cellules de gliome surexpriment PTCH1, ainsi que *GLI* qui peut également être amplifié dans les GBM (Dahmane *et al.*, 2001; Clement *et al.*, 2007). *GLI1* est un marqueur de mauvais pronostic. Cette voie est surexprimée dans les GBM classiques (Verhaak *et al.*, 2010). Une isoforme tronquée de *Gli1*, *Gli1t* est liée à l'augmentation de la motilité et de l'invasion et n'est exprimée que dans les GBM (Lo *et al.*, 2009). En 2015, une étude a confirmé l'activation de la voie HH dans une cohorte de GBM du TCGA (Chandra *et al.*, 2015). *In vitro*, l'activation de la voie HH est nécessaire au maintien et à la prolifération de la population de cellules souches de cancer. *Gli1* induit la prolifération cellulaire (Dahmane *et al.*, 2001). La voie HH est activée dans les cellules de gliomasphères issues de patients, et son inhibition notamment par des siRNA dirigés contre *GLI* ou des shRNA dirigés contre *SMO*, entraîne l'arrêt du cycle

cellulaire et l'induction de l'apoptose, ainsi qu'une diminution de l'auto-renouvellement *in vitro* (Chandra *et al.*, 2015), et de la croissance tumorale *in vivo* (Clement *et al.*, 2007; Takezaki *et al.*, 2011). L'utilisation de la cyclopamine, un inhibiteur de SMO, inhibe la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et réduit la croissance tumorale *in vivo* (Dahmane *et al.*, 2001; Clement *et al.*, 2007).

3. Wnt

3.1 La signalisation Wnt

La signalisation Wnt régule un grand nombre de gènes impliqués dans des mécanismes comme la morphogénèse, la neurogénèse, la différenciation et la prolifération (Varela-Nallar et Inestrosa, 2013). La signalisation Wnt est activée par la liaison des ligands WNT aux récepteurs et co-récepteurs transmembranaires des familles Frizzled et LRP. En absence du ligand WNT, la β -caténine est phosphorylée par un complexe de dégradation qui comprend les protéines adaptatrices Axine et APC (Adenomatous polyposis coli), des kinases comme CK1 α (Caséine kinase 1) et glycogène synthase kinase3 (GSK3 β), et Dishevelled (Dvl). L'activation de la voie Wnt induit le recrutement de Dvl à la membrane ce qui entraîne la destruction du complexe de dégradation. La β -caténine peut donc entrer dans le noyau où elle forme un complexe avec les facteurs TCF/LEF (T-Cell factor/Lymphoid enhancer factor). Ce complexe active la transcription de gènes cibles tels que c-Myc et la cycline D1 en levant l'inhibition exercée par des répresseurs comme Groucho (Mohammed *et al.*, 2016). Cette voie de signalisation régule l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches et progénitrices neurales directement *in vivo* et *in vitro* (Kalani *et al.*, 2008; Munji *et al.*, 2011). L'expression d'une β -caténine constitutivement active augmente la prolifération alors que sa délétion diminue la prolifération et la migration des progéniteurs neuraux et augmente la différenciation neuronale (Woodhead *et al.*, 2006; Wexler *et al.*, 2009). Une autre voie Wnt est β -caténine indépendante et régule la polarité cellulaire et des processus de migration. Dans cette voie, la liaison du ligand WNT au récepteur permet le recrutement de Dvl et Dvl-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) qui initie une cascade qui active les RhoGTPases, ou entraînent un relargage de calcium activant la PKC ou la CamKII. Ces deux voies de signalisations, canonique et non canonique, sont déclenchées par deux domaines différents de Dvl (Varela-Nallar et Inestrosa, 2013). Les signalisations Wnt sont résumées figure 10.

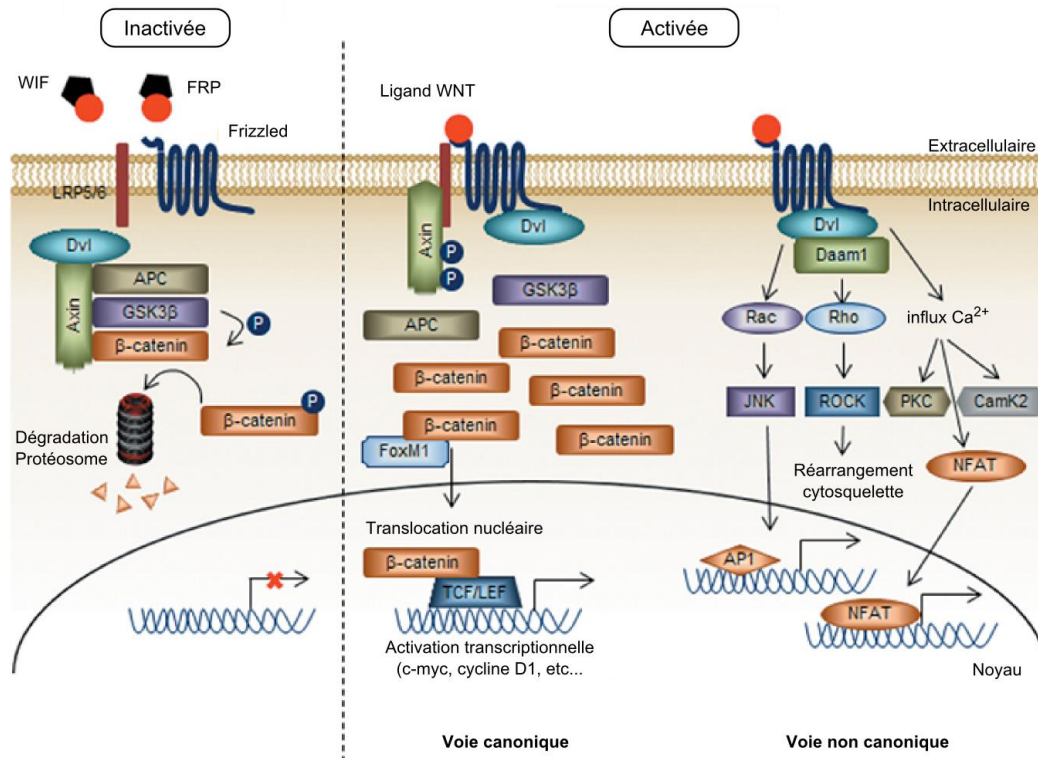


Figure 10 : Vue d'ensemble de la signalisation Wnt. A gauche: Wnt est inactive en absence de ligand WNT. Dans ces conditions, la β -caténine est en complexe avec Dischevelled, AXIN, APC et GSK3 β . La β -caténine est phosphorylée par GSK3 puis dégradée. Au milieu: L'activation de la voie canonique par WNT entraîne l'entrée de la β -caténine dans le noyau, et la transcription de gène. Droite : Les voies non canoniques de Wnt sont la polarité cellulaire planaire (PCP) et la voie Ca²⁺ (d'après Lee et al., 2016).

3.2 Wnt dans les gliomes

Une activation aberrante de la voie Wnt a été observée dans plusieurs types de cancer y compris les gliomes. La progression et la formation des gliomes sont associées à l'activation de la voie Wnt : ainsi Dvl2 est surexprimé dans 70% des GBM (Pulvirenti *et al.*, 2011; Schüle *et al.*, 2012). Elle peut être activée par des mutations de plusieurs de ses protéines, que ce soit des régulateurs positifs (ligand Wnt, PLAGL2, FoxM1, récepteur Dvl) ou négatifs (Figure 10). Les régulateurs négatifs peuvent notamment être inhibés par la méthylation de leurs promoteurs, ce qui est fréquent dans les gliomes (Foltz *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2016). Des travaux ont montré que ces facteurs étaient impliqués dans la régulation de la migration, de l'invasion, de l'auto-renouvellement et de la prolifération des cellules de gliome. L'activation de la voie Wnt favorise le caractère souche et la prolifération des cellules de gliome, et son inhibition favorise leur apoptose et leur différenciation (Zheng *et al.*, 2010; Pulvirenti *et al.*, 2011). Le gène *PLAG2*, qui inhibe la différenciation des cellules de GBM et a été identifié comme proto-oncogène dans les gliomes, entraîne une augmentation de β -caténine dans le noyau et son inhibition par shRNA diminue la tumorigénicité des cellules *in vivo* (Zheng *et al.*, 2010). FoxM1 est surexprimé dans les GBM récurrents et son expression est corrélée à la résistance au TMZ, il favorise l'état souche des cellules à travers la régulation positive de SOX2. Son inhibition sensibilise les cellules de GBM au TMZ (Zhang *et al.*, 2012; Lee *et al.*,

2015). Or FoxM1 est un facteur de transcription qui favorise la translocation et la stabilisation de la β -caténine dans le noyau (Zhang *et al.*, 2011). L'inhibition de la β -caténine, de Dvl2 ou de Wnt2 par siRNA dans des cellules de GBM induit l'apoptose des cellules, une inhibition de la prolifération et un arrêt du cycle cellulaire en G1 ainsi qu'une diminution des niveaux d'expression de la cycline D1, PI3K et Akt, et un ralentissement de la progression tumorale *in vivo* (Pu *et al.*, 2009; Pulvirenti *et al.*, 2011; X. Liu *et al.*, 2011). A l'inverse, une étude par Rampazzo et collègues a mis en évidence un effet pro-différenciation neuronale de l'activation de la voie Wnt par Wnt3 lors de l'hypoxie *in vivo* et *in vitro* (Rampazzo *et al.*, 2013). De plus, l'inhibition de la GSK3 donc l'activation de la voie Wnt bloque la migration et la prolifération, diminue les marqueurs souches tels que Sox2 et Nestin, et réduit la tumorigénicité des cellules de gliome (Kotliarova *et al.*, 2008; Korur *et al.*, 2009). Ces contradictions illustrent la complexité de cette voie dans la régulation de la différenciation des cellules.

4. Voies de signalisation des récepteurs RTK

4.1 Signalisation RTK

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des protéines transmembranaires impliquées dans la transduction du signal. Ils sont composés d'une partie extracellulaire permettant la fixation du ligand et la dimérisation, d'un domaine transmembranaire, et d'une partie intracellulaire comportant le domaine tyrosine kinase et des régions régulatrices. Ils peuvent être activés par une grande variété de ligands, et sont impliqués dans la régulation de processus cellulaires fondamentaux comme la prolifération, la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, la survie cellulaire, la migration cellulaire et le métabolisme (Lemmon et Schlessinger, 2010). Les RTK d'intérêt dans les gliomes comprennent le récepteur à l'EGF (EGFR), le récepteur c-met (HGF), le récepteur au PDGF (PDGFR), et le récepteur au VEGF (VEGFR) (Van Meir *et al.*, 2010). Suite à leur activation, ces récepteurs recrutent des protéines à domaine SH2 ou PTB (phosphotyrosin-binding), qui peuvent être des kinase (comme Src) ou des adaptateurs (comme Grb2), ce qui entraîne l'activation d'un grand nombre de voies de signalisation, dont les plus connues sont les voies Ras/MAPK, PI3K/AKT, et PLC γ /PKC (Lemmon et Schlessinger, 2010). Ras (sarcome de rat) interagit avec la PI3K, Cdc42 et Raf. Raf stimule la voie des MAP kinase (mitogene-activated protein kinase) MAPKK et MEK par phosphorylation, ce qui conduit à l'activation des facteurs de transcriptions CREB (cAMP response element-binding), c-jun/c-fos et Myc. La voie de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) conduit entre autre à l'activation des sérines/thréonines kinases PDK1 et AKT, à travers la production de PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). AKT inactive GSK3 et active mTor (cible de la rapamycine chez les mammifères). La stimulation de l'activité des facteurs de transcription CREB, c-Jun/c-Fos et Myc ainsi que de la kinase mTor conduit à une augmentation de la croissance, de la survie et de la migration cellulaire. Cependant la régulation de ces voies est très complexe, basée sur des boucles de régulation positives et négatives, ainsi que sur les gradients, la localisation et les durées d'activation des différents acteurs de ces voies (Lemmon et Schlessinger, 2010).

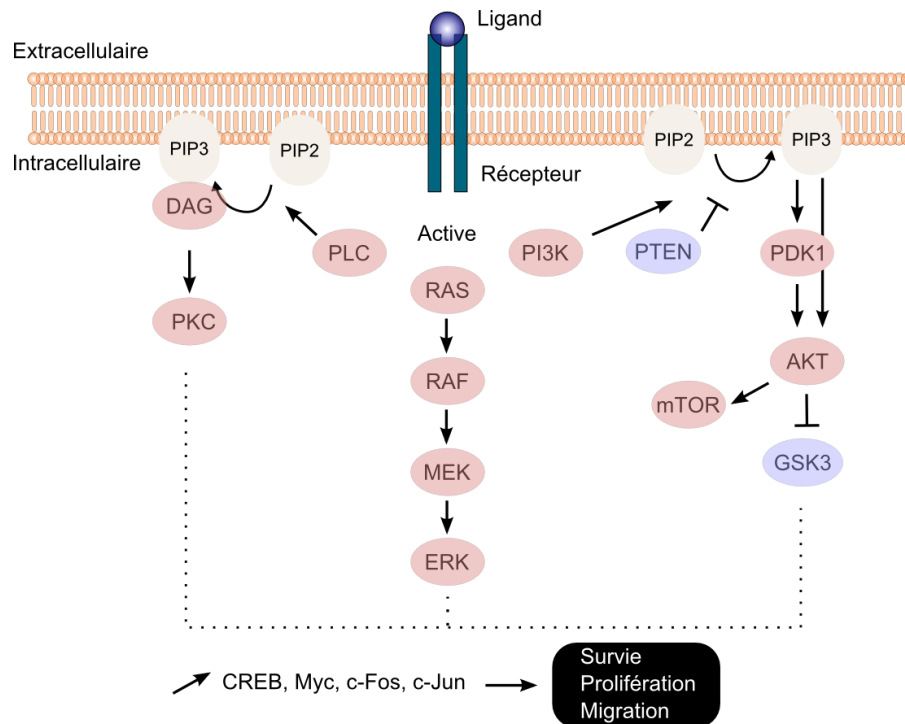


Figure 11. Brève vue d'ensemble de la signalisation par les RTK.

4.2 La signalisation RTK dans les gliomes

Dans les cancers, l'activation aberrante de la signalisation RTK est due à quatre mécanismes principaux : l'activation autocrine, les translocations chromosomiques, la surexpression des RTK ou les mutations gains de fonction. Parmi les altérations retrouvées dans les gliomes, celles touchant les récepteurs tyrosine-kinase (RTK) font partie des plus fréquentes. Les gènes *PDGFR* et *EGFR* sont amplifiés et/ou mutés dans les gliomes de bas grade IDH non mutés et les GBM, et de nombreuses mutations convergent vers l'activation des voies Ras-raf-MEK-ERK et PI3K/AKT/mTOR, ce qui met en évidence le rôle des voies de signalisation des récepteurs tyrosine-kinase dans la gliomagenèse (TCGA Network, 2015; Ceccarelli *et al.*, 2016). Les mutations les plus fréquentes affectent le récepteur de l'EGF et conduisent à la synthèse d'un récepteur constitutivement actif (EGFRvIII) procurant une indépendance au facteur EGF (Libermann *et al.*, 1985; J. C. Lee *et al.*, 2006). Les altérations de l'EGFR sont fréquentes dans les GBM classiques ou Mes/Prolif (Phillips *et al.*, 2006; Verhaak *et al.*, 2010). La surexpression de PDGFR et du PDGF est observée dans des tumeurs de tous grades, et l'amplification du PDGFRA est associée au sous type proneural (Verhaak *et al.*, 2010; TCGA Network, 2015). Les amplifications de *MET* sont moins fréquentes mais présentes. La dérégulation positive de ces voies inclut la présence de mutations activatrices dans les gènes codant pour les sous-unités de la PI3K, des mutations ou délétion du gène suppresseur de tumeur neurofibromine 1 (*NF1*) antagoniste de Ras/mTOR, des délétions ou mutations invalidant *PTEN* (phosphatase and tensine homologue) un régulateur négatif de la voie PI3K/AKT (Aldape *et al.*, 2015). La perte de *PTEN* et les mutations de *NF1* sont

associées aux GBM classiques et mésenchymateux, alors que les mutations des gènes de la PI3K sont observées dans les gliomes IDH mutés/codéletés 1p/19q et les GBM proneuraux de bon pronostic (Verhaak *et al.*, 2010; TCGA Network, 2015). Les mutations inactivatrices de *NF1* sont responsable de la neurofibromatose de type 1, un syndrome de prédisposition au cancer. Dans des modèles souris, la perte de *NF1* dans les cellules gliales ou les cellules souches neurales, en concomitance avec celle de *p53*, entraîne l'apparition d'astrocytomes, qui peuvent progresser en GBM suite à la délétion de *PTEN* (Aldape *et al.*, 2015).

La surexpression de l'*EGFR* et la mutation de *p53* sont mutuellement exclusives, la première étant fréquente dans les GBMI et la seconde dans les GBMII (Watanabe *et al.*, 1996). Dans les cellules de gliome, l'utilisation d'inhibiteurs de MEK1/2 et PI3K/mTOR induit la différenciation des cellules *in vitro* et inhibe leur tumorigénicité *in vivo* (Sunayama, Matsuda, *et al.*, 2010; Sunayama, Sato, *et al.*, 2010). De plus la suractivation de AKT et Ras dans des progéniteurs neurales entraîne la formation de GBM chez la souris (Holland *et al.*, 2000). Jusqu'à présent les essais de thérapies ciblant les RTK n'ont pas été probants. Des mutations ou altérations activatrices peuvent exister dans plusieurs voies RTK simultanément, créant des sous-populations cellulaires distinctes, ce qui laisse penser que ne cibler qu'un seul type de récepteur pourrait dans certains cas être inefficace, au contraire d'un ciblage global des RTK (Snuderl *et al.*, 2011; Szerlip *et al.*, 2012; Aldape *et al.*, 2015).

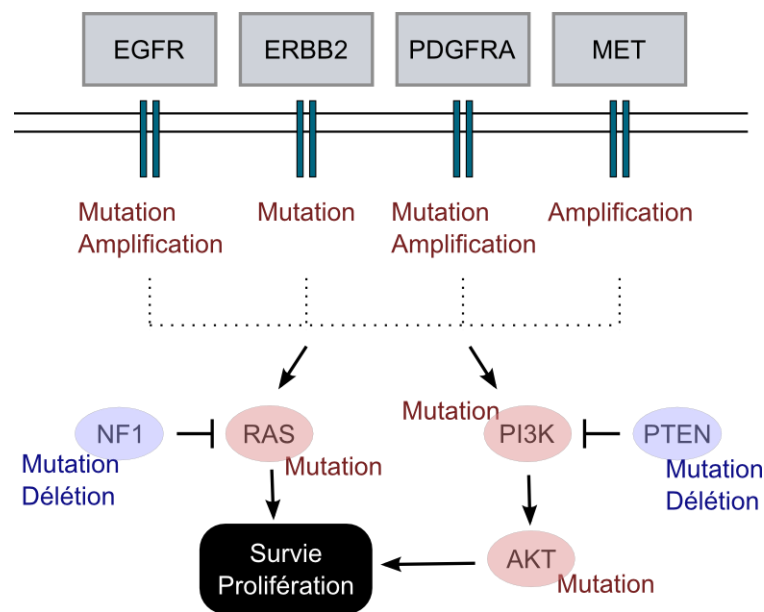


Figure 12 : Altérations des voies RTK/RAS/PI3K dans les GBM. Les gènes les plus fréquemment amplifiés sont l'*EGFR* et le *PDGFR α* . Les gènes les plus souvent délétés dans cette voie sont les gènes *PTEN*, un suppresseur de tumeur inhibant la PI3K, et *NF1* un régulateur négatif de Ras. Les gènes les plus souvent mutés sont *PTEN*, *NF1*, *EGFR*, *PIK3R1* et *PIK3CA*. Adapté du TCGA 2008.

5. Multiples croisements entre les voies de signalisation

De nombreuses intersections existent entre ces voies majeures impliquées dans la gliomagenèse, et de manière générale ces voies de signalisations interfèrent, se chevauchent et se complètent, par leur cibles ou leurs acteurs intermédiaires. Dans le contexte des cellules de gliome, il a été montré que la voie Notch interagit avec la signalisation RTK et Wnt principalement à travers AKT (Pu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2015; Teodorczyk et Schmidt, 2015). Il en est de même pour la signalisation Shh qui interagit avec les signalisations RTK, Wnt et Notch à travers le facteur de transcription GLI ou le ligand SHH (Paul *et al.*, 2013 ; Morris et Huang, 2016). Des cellules résistantes à l'inhibition d'une voie deviennent apoptotiques face à une double inhibition (Cenciarelli *et al.*, 2014). Il est connu que les signalisations Wnt/ β -caténine et EGFR interagissent dans un contexte tumoral, Wnt peut favoriser l'activité de phosphorylation de mTOR (Paul *et al.*, 2013), et la signalisation EGFR peut inhiber l'activité de la β -caténine. Dans les cellules souches neurales la suractivation de la voie SHH entraîne l'induction de la voie Notch et la prolifération, dans les cellules de gliomes elle augmente la phosphorylation de Akt (Ferent *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015). Ces interactions complexifient la compréhension des dérégulations favorisant l'oncogenèse et des mécanismes de réponse cellulaire à un agent thérapeutique, et il devient évident qu'il est nécessaire de cibler des acteurs centraux et communs de ces voies de signalisation dans les thérapies.

IV. Cellules souches initiatrices de gliome

1. Les cellules initiatrices de gliome

Au sein de la tumeur, toutes les cellules n'ont pas les mêmes propriétés. Seule une partie des cellules est capable de donner naissance à une tumeur. L'existence de cellules souches tumorales (cellules initiatrices de gliomes GIC) dans les tumeurs cérébrales et dans les gliomes en particulier a été montrée dans les années 2003-2004 (Ignatova *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003, 2004; Galli *et al.*, 2004). Différentes équipes ont utilisé les techniques de cultures utilisées pour isoler les cellules souches neurales sur les cellules provenant de tumeurs cérébrales. Ils ont ainsi pu isoler des cellules multipotentes capables de s'autorenouveler et de générer des tumeurs similaires à la tumeur d'origine une fois greffées chez l'animal (Ignatova *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003, 2004; Galli *et al.*, 2004).

Ces cellules sont caractérisées par l'expression de gènes marqueurs de cellule souche comme Sox2, Musashi ou Nestine, mais aucun de ces marqueurs n'est spécifique des GIC. Initialement, le marqueur CD133 (une glycoprotéine de surface) était considéré comme caractéristique de ces cellules propagatrices de tumeurs, et était utilisé pour séparer les cellules tumorigènes des cellules non tumorigènes (Singh *et al.*, 2004). Cependant des travaux ont depuis montré que des cellules en culture pouvait perdre ce marqueur, et que des cellules CD133- pouvaient également propager la tumeur (Joo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Une

tumeur contient donc plusieurs sous-populations de cellules en proportions variables, dont des cellules GIC et des cellules plus ou moins différenciées.

Ces cellules souches tumorales seraient responsables de la résistance aux chimio- et radiothérapies et de la récurrence des tumeurs de haut grade (Bao *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012). Depuis leur identification, l'une des priorités dans le traitement des gliomes est d'éliminer ces cellules, d'où la nécessité d'une meilleure compréhension de leurs caractéristiques biologiques et moléculaires. L'une des difficultés rencontrée est l'hétérogénéité et la plasticité des GIC. Plusieurs groupes ont caractérisé des populations différentes au sein des GIC, une diversité qui est reflétée dans les lignées cellulaires issues de tumeurs. La capacité d'une cellule de la tumeur à être tumorigène ne semble pas être une caractéristique stable déterminée par le profil génétique de la cellule. Le caractère « souche » d'une cellule pourrait être déterminé par son environnement, par exemple les cellules cancéreuses en contact avec les cellules endothéliales sont maintenue dans un état « souche » par les facteurs sécrétés (Calabrese *et al.*, 2007; de Almeida Sassi *et al.*, 2012). Il a également été montré qu'une cellule pouvait changer de phénotype, et pouvait acquérir des propriétés de GIC en fonction de son état d'hypoxie par exemple (Wang *et al.*, 2008; Seidel *et al.*, 2010). Ainsi, le changement d'environnement occasionné par la chirurgie ou les traitements pourrait être capable de reprogrammer n'importe quelle cellule en cellule souche de cancer. Cette fonction de l'environnement cellulaire est supportée par le fait que, par exemple, les zones neurogéniques du cerveau adulte semblent être favorables à l'apparition de tumeurs (Figure 13). Ce concept de GIC plastique remet en question l'utilisation de techniques ne ciblant que ces cellules.

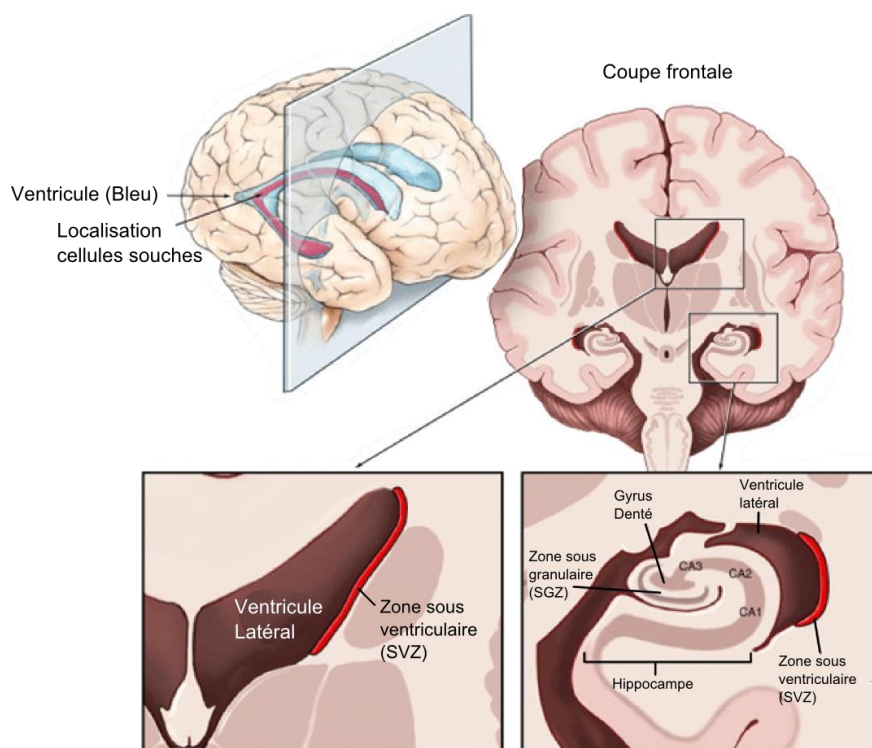


Figure 13. Zones de neurogenèse du cerveau humain adulte. Banque d'images MediVisual Inc.

2. Lignées de cellules de gliome

L'existence de ces cellules souches de cancer permet de mettre en culture des cellules de tumeur et d'obtenir des lignées de cellules de gliome, majoritairement de GBM, qui peuvent proliférer sous forme de sphères en culture non adhérente sans sérum, en présence de FGF et EGF. Ces gliomasphères ressemblent aux neurosphères obtenues lorsque des cellules souches neurales sont mises en culture dans les mêmes conditions (Cusulin *et al.*, 2015).

V. Cellule d'origine des tumeurs gliales

Même si l'hypothèse de l'existence d'une neurogenèse adulte chez l'humain existait depuis plusieurs années, c'est seulement en 1998 qu'en furent produites les premières preuves *in vivo*, avec l'analyse histologique de cerveaux après incorporation de BrdU (Eriksson *et al.*, 1998). Cette découverte de la présence de cellules souches a grandement influencé la recherche sur les tumeurs cérébrales, en ajoutant l'hypothèse de la cellule souche transformée à celle de la dédifférenciation d'une cellule mature comme cellule d'origine de la tumeur. Cette idée renforce le parallèle déjà réalisé entre neuro-oncogenèse et neurogenèse. Chez les mammifères adultes, la neurogenèse est restreinte à deux zones principales, la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (SVZ) et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (DG) (Figure 13).

De manière intéressante, les gliomes de haut grade expriment des gènes associés à l'activation de voies de signalisation qui contrôlent le cycle cellulaire et la prolifération, alors que les gliomes de bas grades sont enrichis en gènes associés à la différenciation neuronale, ce qui confirme le lien étroit entre dérégulation de la neurogenèse et gliomagenèse (Phillips *et al.*, 2006; Ceccarelli *et al.*, 2016).

La ressemblance entre cellule initiatrice de gliome et cellule souche neurale, et entre dérégulation de la gliomagenèse et neurogenèse, a donné naissance à plusieurs théories sur l'origine d'un gliome : la cellule d'origine pourrait être une cellule différenciée, un progéniteur glial ou une cellule souche neurale (CSN). Le type de gliome pourrait être lié à la cellule d'origine étant donné les similitudes de profil transcriptomique (Phillips *et al.*, 2006; Verhaak *et al.*, 2010). Trois hypothèses principales se dégagent : la dédifférenciation d'un astrocyte/oligodendrocyte/neurone, la transformation maligne d'une CSN, ou la transformation maligne d'une cellule progénitrice (Figure 14). Les CSN et les progéniteurs gliaux existent dans le cerveau adulte et continuent à générer des cellules, ce sont des cellules candidates idéales pour l'origine des gliomes.

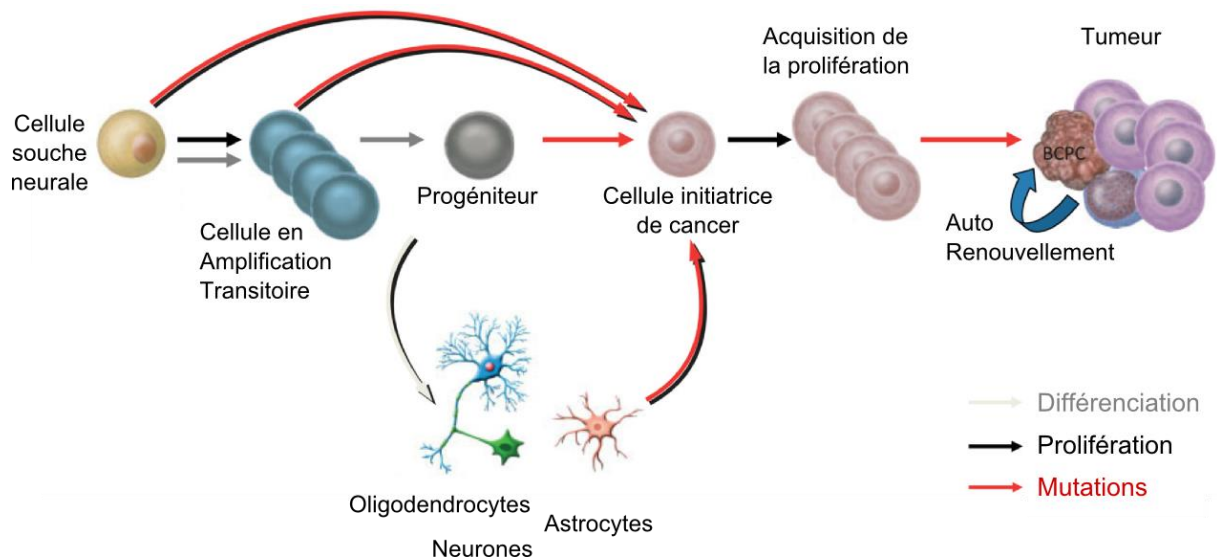


Figure 14. Hypothèses sur la cellule d'origine d'un gliome.

1. Cellule souche

C'est depuis la mise en évidence de CSN chez l'adulte qu'existe cette théorie. La théorie des cellules souches comme origine clonale des GBM postule que des cellules souches acquièrent des altérations génétiques et épigénétiques qui leur confèrent les caractéristiques de la cellule tumorale. Ces mutations s'accompagneraient de changements conférant un avantage sélectif. Cette théorie est soutenue par le fait que les cellules souches neurales partagent des caractéristiques avec leurs homologues cancéreuses, comme l'activation de certaines voies de signalisation (cf partie III). L'utilisation de modèles souris a montré que des délétions des gènes *TP53*, *NF1* et *PTEN* ciblées dans des cellules souches et progénitrices neuronales, entraînent la formation de tumeurs astrocytaires. De plus, ces délétions réalisées dans des zones non neurogéniques n'entraînent pas la formation de tumeur au contraire de celles réalisées dans des zones neurogéniques SVZ et DG (Alcantara Llaguno *et al.*, 2009). Ceci est confirmé par une autre étude, démontrant que la délétion de *PTEN* et *p53* dans des CSN adultes de la SVZ, et non dans des astrocytes, donnait naissance à des tumeurs (Jacques *et al.*, 2010). De même, Holland et collègues ont montré que la surexpression du PDGF dans des progéniteurs neurax, ainsi que l'expression de AKT et Ras mutés dans des progéniteurs neurax et non des astrocytes, entraîne la formation de gliomes chez la souris (Holland *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2001).

2. Cellule progénitrice d'oligodendrocytes

Les gliomes peuvent apparaître dans n'importe quelle partie du cerveau, ce qui suggère que leurs cellules d'origine ne sont pas restreintes à une zone cérébrale, et appuie la théorie selon laquelle les progéniteurs des oligodendrocytes (OPC) pourraient être les cellules d'origine des gliomes. Les OPC expriment les marqueurs *Olig2*, *NG2* et *PDGFRa*, sont abondantes et

réparties dans tout le cerveau, et en culture ces cellules peuvent être reprogrammées pour devenir des pseudo-cellules souches. Il est donc possible qu'une OPC subisse une dédifférenciation et soit à l'origine d'une gliomagenèse. Plusieurs études supportent cette hypothèse. La surexpression du PDGF dans des OPC induit leur différenciation et la formation de gliome (Assanah *et al.*, 2006; Lindberg *et al.*, 2009). Les OPC surexprimant le PDGF peuvent recruter des OPC non transduits en favorisant leur prolifération, ce qui suggère un effet paracrine (Assanah *et al.*, 2006). De même l'introduction des délétions *PTEN* et *p53* associées à l'expression du PDGF, ou les délétions de *p53* et *NF1* dans des OPC NG2+ donne naissance à des gliomes chez la souris, avec une étape de prolifération des OPC (Lei *et al.*, 2011; Galvao *et al.*, 2014; Alcantara Llaguno *et al.*, 2015). La surexpression d'un EGFR activé dans des cellules S100beta+ (spécifique des astrocytes et des OPC) donne des tumeurs, ce qui suggère également une cellule d'origine d'un profil OPC plutôt que CSN (Persson *et al.*, 2010). En utilisant un système MADM (Mosaic Analysis with Double Markers), qui permet de suivre une cellule et sa descendance, Liu et collègues ont pu générer des astrocytomes en déléant *p53* et *NF1* spécifiquement dans des CSN, mais de manière intéressante, la population cellulaire responsable de la progression et de l'expansion tumorale est la population OPC, et non les CSN ou les cellules des autres lignages (Liu, Sage et Miller, 2011). De plus, l'introduction de ces délétions directement dans les OPC et non les CSN entraîne la formation de tumeurs, et les cellules filles des OPC transformés sont capables de migrer dans la SVZ et le DG (Liu, Sage et Miller, 2011). Ces différents travaux suggèrent que les altérations génétiques pourraient survenir aussi bien dans les CSN que dans les OPC, mais que ce sont les OPC qui seraient les cellules affectées par ces altérations, deviendraient prolifératrices de manière incontrôlée, et seraient donc responsables de l'apparition et de l'expansion de la tumeur (Assanah *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Liu, Sage et Miller, 2011; Galvao *et al.*, 2014).

3. Cellule mature différenciée

Les premières théories sur l'origine des tumeurs gliales, avant la découverte de cellules souches neurales adultes, étaient basées sur l'aspect histologique des cellules de la tumeur. Ces théories postulaient donc que les tumeurs provenaient d'astrocytes ou d'oligodendrocytes matures ayant subi un processus de dédifférenciation avec l'accumulation d'anomalies génomiques. De nombreux modèles animaux de gliomes utilisent un promoteur *GFAP* pour introduire des mutations oncogènes, or les astrocytes expriment aussi la *GFAP*, donc sont ciblés par les oncogènes et peuvent donner des tumeurs. De plus, comme mentionné dans le paragraphe précédent (cf V.2), l'introduction d'un EGFR activé dans des cellules S100beta+, dont font partie les astrocytes, entraîne la formation de tumeurs (Persson *et al.*, 2010). La surexpression du PDGF dans des astrocytes *GFAP+*, ou celle d'un EGFR muté dans des astrocytes mutés *Ink4a* et *Arf*, capables de proliférer indéfiniment, entraîne leur dédifférenciation et l'apparition de gliomes (Dai *et al.*, 2001; Bachoo *et al.*, 2002). De manière surprenante, la suppression de *p53* et *NF1* dans des neurones matures (exprimant la synapsine ou la *CamK2*) par injection d'un lentivirus shRNA entraîne la formation de tumeurs ressemblant à des GBM. De même, cibler des astrocytes matures avec un vecteur

permettant l'expression de RasV12 (forme constitutivement active de Ras) associée à la délétion de P53 induit la formation de tumeurs de type mésenchymal (Friedmann-Morvinski *et al.*, 2012). La délétion de PTEN et p53 dans des SNC comme dans des astrocytes entraîne l'apparition de gliomes (Chow *et al.*, 2011). Ces différentes études montrent que des cellules différenciées peuvent se dédifférencier ou se transdifférencier et être à l'origine de gliomes.

L'ensemble de ces données suggère que différents types de tumeurs pourraient avoir pour origine différents types cellulaires associées à des mutations spécifiques, mais il a été également montré que la localisation de la tumeur pouvait influencer son type histologique indépendamment de la cellule d'origine. La diversité des possibilités reflète l'hétérogénéité cellulaires retrouvée dans les gliomes, de manière inter et intra-tumorale. Finalement c'est l'élucidation du contexte cellulaire dans lequel des cellules deviennent tumorigènes qui pourrait avoir un intérêt dans le traitement des gliomes.

VI. Traiter les gliomes

1. Les thérapies

Les thérapies standard actuelles de radio- et chimiothérapies n'ont que peu d'effet sur les gliomes de haut grade, qui développent une résistance et deviennent récurrents. La dernière grande avancée dans le traitement des gliomes de haut grade est l'utilisation du TMZ associé à la radiothérapie (Stupp *et al.*, 2005, 2009). Les nouvelles caractérisations moléculaires constituent une avancée réelle dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant la gliomagenèse, mais les études sur l'origine des gliomes et les voies de signalisation responsables des propriétés des GIC montrent que ces mécanismes sont loin d'être compris. Le succès des thérapies moléculaires ciblées dans d'autres types de cancer a incité le développement de telles thérapies pour les gliomes de haut grade. Les différentes voies décrites dans un chapitre précédent, Wnt, Notch, Shh et RTK font déjà l'objet de recherche, voire d'essais cliniques, mais pour l'instant une réelle amélioration de la survie n'est pas encore obtenue et il est nécessaire de continuer la caractérisation des sous-types de GBM et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (Arko *et al.*, 2010). Les GIC sont une cible privilégiée dans les thérapies contre les gliomes de haut grade en raison de leurs propriétés, et plusieurs stratégies peuvent être utilisées : cibler les voies impliquées dans l'auto-renouvellement et la survie, induire leur différenciation et/ou les sensibiliser aux traitements.

L'une des stratégies, la plus prometteuse et la moins toxique est l'induction de la différenciation des cellules. Contrairement aux thérapies ciblant les cellules proliférantes, qui ne peuvent atteindre les GIC, ce genre de thérapie touche aussi bien les GIC que les cellules proliférantes. La plupart du temps induire la différenciation peut aussi entraîner la mort cellulaire et l'arrêt du cycle. Les facteurs utilisés sont majoritairement des facteurs entraînant la différenciation des cellules souches normales. De nombreux agents thérapeutiques ont été étudiés, mais peu agissent sur la différenciation cellulaire. Il s'agit surtout de l'acide

rétinoïque (AR), des BMP (Bone morphogenetic proteins) et de drogues agissant épigénétiquement.

2. Les thérapies moléculaires

Les mécanismes moléculaires de l'action de l'AR sont mal connus. Dérivé actif de la vitamine A, il joue un rôle important de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Son mode d'action implique son transport vers le noyau et sa liaison à un récepteur nucléaire, où il agit ensuite sur la transcription de gènes cibles. L'AR induit l'expression des CDKI et donc la sortie du cycle cellulaire en phase G1 (Janesick, Wu et Blumberg, 2015). Au cours du développement, l'AR agit en opposition aux facteurs de croissance pour arrêter la prolifération des progéniteurs neuraux et stimuler la différenciation neuronale. Sur les cellules souches neurales, l'AR induit la différenciation neuronale, et inhibe la différenciation gliale après induction de la différenciation. L'AR est déjà utilisé dans le traitement de certains cancers. Sur les cellules de gliome, il a été montré *in vitro* qu'il entraînait la différenciation, avec l'augmentation de l'expression de marqueurs comme Tuj1 et GFAP, l'augmentation de l'expression de p21, et l'arrêt du cycle en G1/G0, ainsi que la diminution de l'expression de la cycline D2 et de marqueurs souches comme Nestine et Sox2. Le traitement par l'AR, même transitoire, diminue la capacité des cellules à former des sphères et leur tumorigénicité *in vivo*, cependant, les résultats varient selon les études et les cellules traitées (Campos *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2010; Ying *et al.*, 2011; Balasubramanian *et al.*, 2015). Malheureusement, malgré des premiers essais encourageants, l'utilisation chez les patients est pour le moment décevante (Yung *et al.*, 1996; See *et al.*, 2004). Même si l'AR a été identifié comme agent de différenciation il y a plusieurs décennies, et que certains de ses dérivés sont utilisés dans le traitement de certains cancers, il n'a pas tenu ses promesses comme agent thérapeutique pour les gliomes.

Les (BMP) forment une famille de facteurs de croissance morphogènes appartenant majoritairement à la famille des transforming growth factor- β (TGF- β). Leurs fonctions dépendent du tissu et du contexte. Les BMP existent sous forme de dimères qui sont clivés par des protéases pour être activés. Ils sont sécrétés et se fixent aux récepteurs transmembranaires des cellules cibles, principalement des récepteurs serine-thréonine kinase, et activent les voies MAPK, mais peuvent également agir sur les voies Notch et Wnt (Singh et Morris, 2010). Dans les cellules neurales adultes, le BMP4 régule la différenciation neuronale (Cole, Murray et Xiao, 2016). Sur les cellules souches neurales adultes, les BMP induisent une différenciation astrocytaire. De même sur les cellules de gliome, les BMP peuvent induire une différenciation majoritairement astrocytaire (Piccirillo *et al.*, 2006). Le traitement par les BMP inhibe la prolifération, induit la différenciation avec l'augmentation de marqueurs neuronaux et gliaux, et réduit la capacité des cellules à s'autorenouveler. *In vivo*, le traitement transitoire des cellules par du BMP4 diminue leur croissance et leur prolifération, et les cellules issues de ces tumeurs n'engendrent pas de nouvelles tumeurs (Piccirillo *et al.*, 2006; B. Liu *et al.*, 2010). Dans des études récentes, des virus ou des cellules modifiées pour produire du BMP4 ont été utilisés avec succès (Duggal *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016; Mangraviti *et al.*, 2016). Un virus Vaccinia permettant l'expression du BMP4 entraîne la

différenciation des cellules de GBM *in vivo* et *in vitro*, permet la régression de la tumeur *in vivo* et une amélioration de la survie des souris injectées (Duggal *et al.*, 2013). De même du BMP4 délivré par des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (hAMPSC) permet de diminuer la migration et la prolifération, et induit la différenciation de cellules de GBM *in vitro* et entraîne une amélioration de la survie *in vivo* (Liu *et al.*, 2016; Mangraviti *et al.*, 2016). Cependant, l'utilisation des BMP et de l'AR pourrait ne pas être idéale : les différenciations induites par l'AR et les BMP s'avèrent parfois réversibles, et sur certaines lignées les BMP entraînent l'apparition d'une prolifération accrue et augmentent la tumorigénicité (Lee *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2010; Balasubramanian *et al.*, 2015; Carén *et al.*, 2015).

Sato et collègues se sont intéressés à des agents de différenciation comme le peroxyde d'hydrogène, et le Resveratrol. Le peroxyde d'hydrogène induit la différenciation des cellules de gliomes à travers l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires. Il diminue la capacité des cellules à former des sphères et l'expression de marqueurs souches, et induit l'expression de marqueurs comme Tuj1 ou GFAP. L'augmentation des ROS entraîne la diminution de l'expression de Bmi1, ce qui diminue l'auto-renouvellement cellulaire, et active Foxo3 à travers la voie p38/MAPK, ce qui entraîne la différenciation (Sato *et al.*, 2014). Le Resveratrol est déjà utilisé dans les traitements anti-cancéreux. Il inhibe Nanog, ce qui entraîne la différenciation, la mort cellulaire et la perte de tumorigénicité *in vitro* et *in vivo*, avec une amélioration de la survie des animaux (A. Sato *et al.*, 2013). Le N-Acetylaspartate (NAA) est l'un des dérivés d'acide aminé les plus abondant dans le cerveau. C'est une source d'acétate métabolique pour la myélinisation et un précurseur du neurotransmetteur N-acétylaspartylglutamate (NAAG). Le NAA et le NAAG favorisent la croissance des cellules tumorales et inhibe leur différenciation gliale ainsi que celle des OPC. Ces deux métabolites sont diminués dans les tumeurs IDH muté (Long *et al.*, 2013).

3. Les thérapies géniques

Des stratégies de reprogrammation cellulaire utilisent la surexpression de gènes impliqués dans la différenciation neuronale, ce qui semble une stratégie prometteuse. Rampazzo et collègues ont utilisé Wnt3 ou une surexpression de la β -caténine pour induire la différenciation neuronale des cellules. Ceci entraîne l'arrêt de la prolifération et une diminution de l'auto-renouvellement qui ne disparaissent pas après remise en culture pendant 7 jours en présence de facteurs. La tumorigénicité *in vivo* est également diminuée (Rampazzo *et al.*, 2013). La surexpression de plusieurs gènes de différenciation neuronale comme Ngn2, NeuroD1 ou Dcx inhibe l'auto-renouvellement et la tumorigénicité des cellules en favorisant la différenciation neuronale sur les cellules de lignées comme U87 et U251 aussi bien que sur celles de lignées primaires de GBM (Santra *et al.*, 2010; Guichet *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2014). La surexpression de la *NGN2* induit l'apoptose et l'arrêt de la prolifération, et diminue la capacité des cellules à former des sphères. Elle induit l'expression de *Dcx* et *NeuroD1* et diminue l'expression de la *GFAP*, *Olig2*, *Shh*, et *Myc*, en favorisant la différenciation neuronale par rapport à la différenciation astrocytaire. *In vivo*, les cellules Ngn+ ne sont pas tumorigènes. De plus la surexpression de *Ngn2* dans des tumeurs préexistantes par vecteur

lentiviral induit une différenciation neuronale, la mort cellulaire des cellules, et améliore la survie des animaux (Guichet *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2014). La surexpression de Dcx par vecteur lentiviral dans des tumeurs U87 établies chez le rat nude permet la diminution du volume tumoral (Santra *et al.*, 2010). L'identification et la surexpression ou activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la différenciation neuronale semble donc être une voie prometteuse.

Dans tous ces travaux, les effets des gènes et agents testés peuvent varier selon les cellules de gliome utilisées. Il s'agit donc, en plus de trouver des gènes et agents de différenciation efficaces, de déterminer sur quel type de tumeurs leur utilisation sera appropriée. Les thérapies moléculaires futures doivent donc cibler toutes les populations cellulaires, cellules plus ou moins différenciées comme cellules à caractère souche, et elles doivent de préférence cibler plusieurs voies de signalisation, soit en prenant pour cible plusieurs protéines, ou une protéine agissant sur plusieurs voies de signalisation. Les gliomes de haut grade étant particulièrement hétérogènes, il faut continuer à caractériser les différents sous-types pour créer des thérapies efficaces sur chaque type de gliome.

LES p21 ACTIVATED KINASES

Les p21-activated kinases (PAK) font partie d'une famille de sérine/thréonine kinases très conservées chez tous les eucaryotes dont le génome a été séquencé à ce jour à l'exception des plantes, ce qui indique une fonction importante et une origine très ancienne de ces gènes (Hofmann, Shepelev et Chernoff, 2004). Elles ont été identifiées pour la première fois en 1994 dans le cerveau de rat, au cours d'un criblage de protéines interagissant directement avec les petites GTPases Rac1 et Cdc42 (Manser *et al.*, 1994). Chez les mammifères il existe 6 isoformes, possédant une importante identité de séquence, et divisées en deux sous-groupes en fonction de leur structure et de leurs mécanismes de régulation (Bokoch, 2003).

Les PAK du groupe II ont été caractérisées plus tardivement que les PAK du groupe I. Ce groupe est principalement étudié pour son importance dans la biologie des cancers. Il comprend la kinase ubiquitaire PAK4, qui possède plusieurs variants, ainsi que les kinases PAK5 et PAK6. PAK5 est exprimé presque exclusivement dans le cerveau et le pancréas, et PAK6 dans le cerveau, les testicules, la prostate, les reins, et le placenta. Ces PAK ont des mécanismes de régulation et d'activation différents des autres PAK. Seules les PAK du groupe I seront traitées dans cette partie.

I. Les PAK du groupe I

Les isoformes PAK1, PAK2 et PAK3 constituent le groupe I de la famille des PAK. Ces protéines ont des structures et des modes de régulation similaires mais une expression et potentiellement des fonctions différentes, comme le montre les phénotypes différents obtenus pour les souris knock-out. Les souris KO PAK1 et PAK3 sont viables et fertiles mais présentent des défauts cognitifs et des dysfonctionnements synaptiques, différents selon la souris (Meng *et al.*, 2005; Asrar *et al.*, 2009). Le KO de PAK2 est létal au stade embryonnaire (Leung et Jia, 2016).

1. Expression des PAK du groupe I

La distribution de l'expression tissulaire des PAK du groupe I a été déterminée par de nombreuses techniques. PAK1, la mieux étudiée des isoformes des PAK du groupe I, est exprimée fortement dans le cerveau, le muscle et la rate. Elle est également présente dans le foie. La kinase PAK3 est exprimée principalement dans le cerveau, et en particulier dans les cellules neuronales (Arias-Romero et Chernoff, 2008; Kreis *et al.*, 2008). Au contraire des deux autres isoformes, PAK2 est exprimée de manière ubiquitaire (Arias-Romero et Chernoff, 2008). Au niveau cellulaire, ces kinases sont localisées aussi bien à la membrane plasmique ou nucléaire que dans le noyau ou les adhésions cellulaires (Lightcap *et al.*, 2009; King, Nicholas et Wells, 2014).

2. Structure des PAK du groupe I

Toutes les kinases PAK possèdent une structure organisée en deux régions, une région régulatrice en N-terminal et un domaine catalytique sérine/thréonine kinase en C-terminal, très conservé chez toutes les isoformes, dans lequel se trouve un site d'autophosphorylation. Les PAK du groupe I sont caractérisées par leur région N-terminale très conservée entre PAK1-2 et 3. Elle contient un domaine de liaison aux p21 (p21-binding domain = PBD), dans lequel se trouve un motif CRIB (Cdc42 and Rac Interactive Binding), et un domaine auto-inhibiteur (autoinhibitory domain = AID) se chevauchant (Figure 15). Le domaine PBD permet la liaison aux GTPases actives Cdc42 et Rac1, alors que le domaine AID permet le contrôle de l'activité basale des PAK du groupe I en inhibant le domaine kinase. Dans cette région N-terminale se trouve également plusieurs domaines riches en prolines qui permettent la liaison à des protéines possédant des domaines SH3. Deux domaines riches en prolines classiques, permettent le recrutement des adaptateurs Nck et Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) et la translocation à la membrane, et un domaine atypique impliqué dans le recrutement du facteur d'échange PIX (Pak-interacting exchange factor). Entre le domaine kinase et la partie N-terminale se trouve une région riche en résidus acides donc le rôle est pour le moment inconnu (Bokoch, 2003).

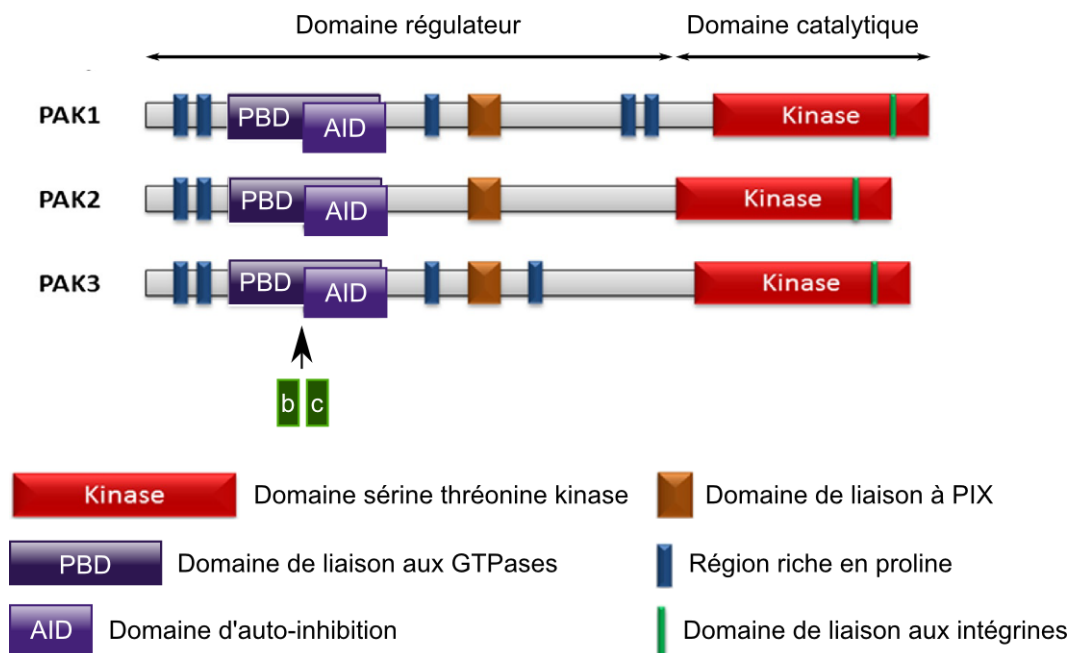


Figure 15. Structures des PAK du groupe I. Les PAK possèdent un domaine kinase carboxy terminal et un domaine régulateur amino-terminal. Les régions principales sont indiquées pour chaque isoforme. Les exons alternatifs de PAK3 (b,c) sont représentés en vert. Adapté de King *et al.*, (2014).

3. Régulation de l'activité des PAK du groupe I

3.1 Activation des PAK

Les PAK du groupe I et celles du groupe II ont des mécanismes de régulation différents, et dans cette partie nous ne nous intéresserons qu'aux PAK du groupe I. Les kinases PAK peuvent être cytosoliques ou membranaires. De manière générale, leur localisation à la membrane favorise leurs phosphorylations activatrices. Plusieurs processus ont été décrits pour leur activation et le maintien de leur état activé, le plus connus étant l'interaction avec les petites protéines G Rac et Cdc42. Des études de cristallisation réalisées sur la kinase PAK1 ont permis d'élaborer un mécanisme d'activation qui a été généralisé pour toutes les kinases du groupe I en raison de leur forte similarité structurale. Dans sa forme inactive, une kinase PAK est sous forme d'homodimère en conformation de trans-inhibition, dans laquelle le domaine AID d'une protéine se lie au domaine catalytique de l'autre protéine (Lei *et al.*, 2000; Parrini *et al.*, 2002). La liaison avec Rac1 ou Cdc42 activées entraîne une série de changements conformationnels qui mènent à la séparation du dimère en déstabilisant la liaison entre le domaine AID et le domaine catalytique. L'arrêt des interactions trans-inhibitrices permet l'autophosphorylation d'une thréonine de la boucle activatrice (423 pour PAK1, 421 pour PAK3) de la kinase et donc l'activation du domaine catalytique. La GTPase se dissocie ensuite des PAK qui demeurent activées. D'autres phosphorylations de résidus peuvent contribuer à l'activation ou au maintien de l'activité de la kinase (Bokoch, 2003). Nous verrons que la kinase PAK3 possède quelques spécificités au niveau des mécanismes d'activation.

L'interaction avec Rac1 et Cdc42 n'est pas le seul mécanisme capable d'activer les kinases PAK. PAK1 peut également être activée par la liaison aux phosphatidyl sérine ou aux phosphatidyl inositol phosphates. De plus l'interaction avec des lipides comme la sphingosine est capable d'activer PAK en l'absence de RAC1 *in vitro* (Bokoch *et al.*, 1998; Bokoch, 2003). Une fois activées, les kinases PAK modifient leurs substrats par phosphorylation ou par leur activité d'échafaudage indépendante de l'activité kinase (Obermeier *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 2008).

3.2 Interaction avec les adaptateurs PIX/COOL, NCK et GRB

Plusieurs mécanismes permettent la translocation des PAK à la membrane. Elle se produit par l'interaction avec les adaptateurs de la famille Nck et Grb2, ainsi qu'avec les facteurs d'échange de la famille PIX/COOL (PAK-interacting exchanger/Cloned out of a library) possédant des domaines SH3 (Lu et Mayer, 1999; Puto *et al.*, 2003). Dans le cytoplasme, Nck interagit avec le premier domaine riche en prolines des PAK, et GRB2 interagit avec le deuxième domaine riche en prolines de PAK1. L'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase entraîne le recrutement du complexe Nck/PAK à la membrane plasmique, ce qui active la kinase (Lu *et al.*, 1997; Lu et Mayer, 1999). La liaison Nck-PAK est régulée par phosphorylation : il a été montré que suite à son activation, PAK1 s'autophosphoryle sur la

sérine 21 ce qui entraîne la dissociation du complexe (Zhao, Manser et Lim, 2000). Ce n'est pas le cas pour PAK3 (Thévenot *et al.*, 2011)

Une autre voie de recrutement à la membrane implique les facteurs PIX. La famille PIX contient deux membres chez les mammifères, α PIX et β PIX, ce dernier possédant plusieurs variants d'épissage. Les PIX interagissent avec Rac et Cdc42 sur lesquelles elles ont une activité GEF. Les GRK-interacting target (GIT) possèdent une activité GAP (GTPase activating protein) sur les GTPase de la famille Arf et peuvent lier la paxilline (Hoefen et Berk, 2006). Le complexe formé par GIT/PIX permet le recrutement de PAK au niveau des adhésions focales et induit son activation, d'une manière concomitante ou indépendante de sa liaison à Rac ou Cdc42. Le recrutement de PAK à la membrane plasmique par des adaptateurs est suffisant pour stimuler partiellement son activité kinase, en induisant un léger changement de conformation du dimère qui devient semi-ouvert (Lu *et al.*, 1997; Bagrodia *et al.*, 1998, 1999; Manser *et al.*, 1998). Sous forme de complexe PAK/GIT/PIX les PAK peuvent être activées par GIT1 (Loo *et al.*, 2004). Ce même complexe peut recruter PAK1 au centrosome (Zhao *et al.*, 2005).

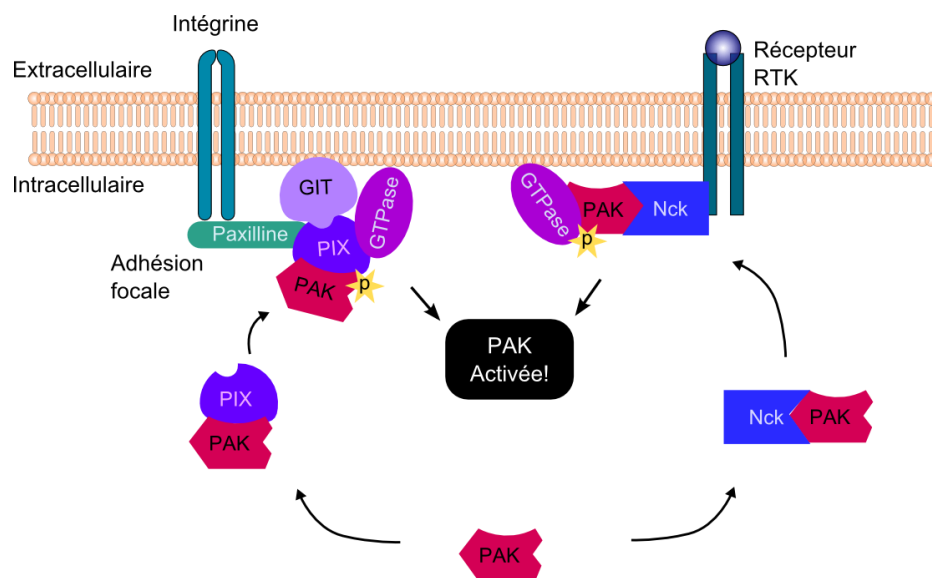


Figure 16 : Les voies de recrutement membranaire des PAK. Les kinases PAK sont activées par les GTPases ancrées à la membrane. Ce recrutement peut être réalisé via les adaptateurs Nck ou via le complexe GIT/PIX.

3.3 Régulateurs de l'activité des PAK

En plus des mécanismes d'autophosphorylation et de phosphorylation liés à la dimérisation, plusieurs partenaires protéiques permettent de moduler l'activité des PAK soit en régulant leur état de phosphorylation, soit en modulant leurs interactions protéiques. Une fois encore la majorité des travaux a été réalisée sur PAK1. Les phosphorylations des sérines, thréonines et tyrosine et les interactions protéiques sont résumées dans la figure 17.

Plusieurs sérines et thréonines nécessaires à l'activation de la kinase PAK peuvent être auto-phosphorylées mais également être les cibles d'autres kinases. La PKA et la sérine thréonine kinase LKB1 phosphorylent et inhibent l'activité de PAK1 *in vivo* et *in vitro* (Howe et Juliano, 2000, Deguchi *et al.*, 2010). Dans les neurones, le complexe p35/Cdk5 s'associe à PAK1 et inhibe son activité, notamment en phosphorylant la Thr212 ce qui hyperphosphoryle la kinase et inhibe ses interactions. Cette même thréonine peut être ciblée par Cdk1 au cours du cycle cellulaire (Thiel *et al.*, 2002, Banerjee *et al.*, 2002). PAK peut être activée par la 3-phosphoinositide-dépendent kinase-1 (PDK1) *in vivo*. PDK1 phosphoryle PAK1 en présence de sphingosine et permet son activité, ces deux protéines pouvant interagir *in vitro* (King *et al.*, 2000). L'interaction Nck/PAK1 peut être inhibée par phosphorylation par AKT, ce qui stimule l'activation de PAK1 par les GTPases (Zhou *et al.*, 2003).

Les tyrosines des PAK peuvent être les cibles de phosphorylations activatrices par des tyrosines kinases. ETK et JAK2 se lient à PAK1 et sont capables de stimuler son activité par phosphorylation des tyrosines (Rider *et al.*, 2007). La co-expression des tyrosines kinases de la famille Src avec PAK2 augmente son activation par Rac1 ou Cdc42 (Bokoch, 2003). A l'inverse, *in vivo* la tyrosine kinase Abl s'associe à PAK2 et diminue son activité en phosphorylant plusieurs tyrosines sur la kinase (Roig *et al.*, 2000).

Plusieurs protéines régulent l'activité des PAK par interaction. La nischarine, une protéine cytoplasmique exprimée notamment dans les cellules neuronales, interagit avec le domaine C-terminal de PAK1/2 et régule négativement leur phosphorylation, ce qui inhibe la croissance neuritique (Alahari, Reddig et Juliano, 2004; Y. Ding *et al.*, 2015). Une autre protéine, human Gβ-like WD-repeat (hPIP1), se lie au domaine régulateur N-terminal de PAK1 ce qui empêche son activation par Rac/Cdc42 (Xia *et al.*, 2001).

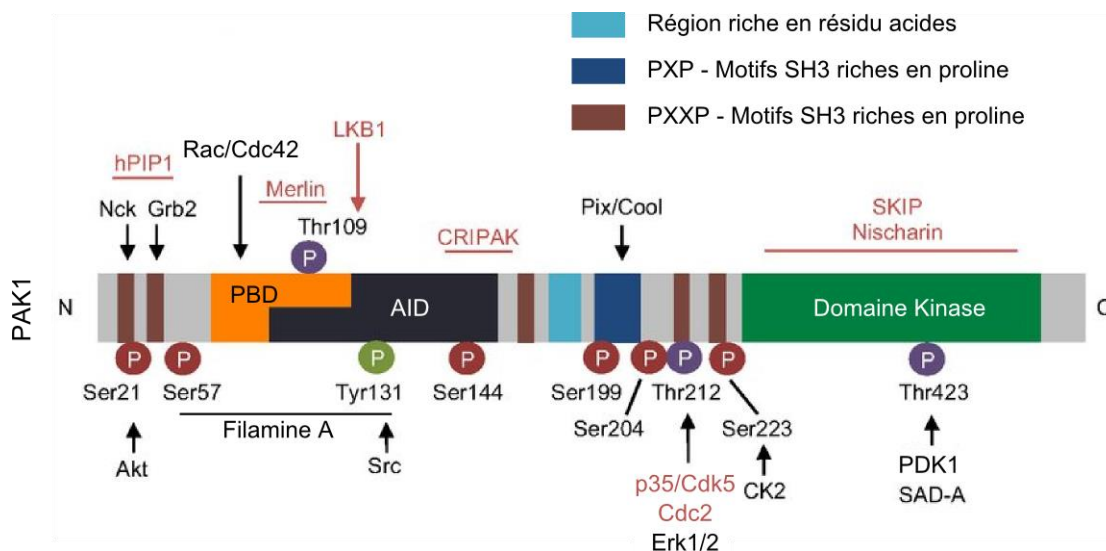


Figure 17. PAK1 et ses régulateurs. Rac/Cdc42 se lie au PBD (Orange). Les sites de phosphorylation sont indiqués. Les interactions inhibitrices sont indiquées en rouge. hPIP1, Merlin, LKB1, CRIPAK et la nischarine font partie des inhibiteurs endogènes de PAK1. Cdc2 (=Cdk1) empêche l'interaction de PAK1 avec des partenaires. D'après Chiang & Jin (2014).

En plus de ces régulateurs, certains substrats de PAK sont capables de réguler son activité par leur liaison directe. Ces substrats peuvent avoir une activité inhibitrice, comme le produit du gène suppresseur de tumeur *NF2*, Merlin, qui interagit avec le domaine PBD de PAK1 ou activatrice comme la filamine A et la Cx43 (Kissil *et al.*, 2002, Vadlamudi *et al.*, 2002, Kameritsch *et al.*, 2015). L'interaction de la filamine A avec le domaine CRIB de PAK1 stimule l'activité de la kinase (Vadlamudi *et al.*, 2002). La connexine 43 (Cx43) est une protéine impliquée dans la formation des jonctions communicantes entre cellules. Elle se lie à PAK1 et l'active (Kameritsch *et al.*, 2015).

Cytosquelette		Prolifération		Divers	
α-PIX	PAK1	Abl1	PAK2	ARHGAP15	PAK1, PAK2
β-PIX	PAK1, PAK2	Aurora A	PAK1	CtBP1	PAK1
Caldesmon	PAK1, PAK2	B-Raf	PAK1	ESE1	PAK1
CPI17	PAK1	c-Myc	PAK2	Gaz	PAK1
Desmine	PAK1	C-Raf1	PAK1, PAK2, PAK3	MORC2	PAK1
Filamine A	PAK1	ERα	PAK1	p47phox	PAK1
GEFH1	PAK1	Erk3	PAK2	p67phox	PAK1
GIT1	PAK1	Histone H3	PAK1	PGAM-B	PAK1
ILK	PAK1	MEK1	PAK1	PGM	PAK1
LIMK	PAK1	MEKK1	PAK1	PREX1/2	PAK1
MBS	PAK1	Merlin	PAK1	SHARP	PAK1
MLCK	PAK1, PAK2	MNK1	PAK2	SNAIL	PAK1
NET1	PAK1	PDK1	PAK1	STAT5a	PAK1
Op18/Stathmine	PAK1	PLK1	PAK1	Syk	PAK2
Paxilline	PAK1, PAK2, PAK3	Prolactine	PAK2	Synapsine I	PAK1
RhoGDI	PAK1			Troponine I	PAK1
RMLC	PAK2	Survie			
Shootin-1	PAK1				
SRC-3Δ4	PAK1	BAD	PAK1, PAK2		
TCoB	PAK1	Caspase-7	PAK2		
VE-Cadhérine	PAK1	DLC1	PAK1		
Vimentine	PAK1	FKHR	PAK1		

Tableau 4. Substrats phosphorylable par les kinases PAK du groupe I. Liste non exhaustive des protéines phosphorylables par les kinases PAK du groupe I. Ces substrats sont impliqués dans diverses voies de signalisation auxquelles participent les kinases PAK du groupe I. Adapté à partir de Ye et Field (2012).

4. Effecteurs des PAK

Les kinases PAK interagissent avec un grand nombre de partenaires protéiques. PAK1/2 et 3 partagent 93% d'identité au niveau du domaine kinase, pour cette raison, il est communément admis que les PAK du groupe I partagent des substrats identiques. Cependant l'affinité pour leurs substrats n'a jamais été comparée entre les différentes isoformes. Il existe près de 50 substrats directs potentiels des kinases PAK du groupe I (Tableau 4) Parmi ces protéines se trouvent des régulateurs de la dynamique du cytosquelette d'actine et de la motilité, des signaux de mort et de survie cellulaire, des acteurs de la transcription génique et

de la transduction du signal par les cascades de MAPK, et des protéines de régulation du cycle cellulaire. Les substrats les plus étudiés des PAK du groupe I (majoritairement identifiés pour PAK1 et PAK2) sont les LIMK (LIM domain kinase), la myosin light-chain kinase (MLCK), BAD (Bcl-2/Bcl-XL-antagonist), Raf, MEK1 (mitogen-activated protein kinase 1), et Merlin (Bokoch, 2003). L'activité des PAK sur la majorité de ces substrats est décrite dans la partie 4.

5. Fonctions biologiques des PAK du groupe I

Comme le révèle leurs très nombreux substrats et régulateurs, les PAK possèdent des fonctions régulatrices dans un grand panel de fonctions biologiques, notamment à travers leurs rôles dans les voies Ras/Erk, PI3K/Akt et Wnt/ β -caténine.

5.1 Dynamique du cytosquelette

Une fonction majeure des PAK est la régulation de la dynamique du cytosquelette, ce qui impacte la motilité, l'adhésion et donc les fonctions de la cellule. La régulation par les PAK de la dynamique du cytosquelette d'actine est leur fonction cellulaire la plus connue, mais elles peuvent également agir sur l'organisation des microtubules. Selon les études, la fonction de PAK peut être activatrice ou inhibitrice de la migration. Dans les cellules de mammifères, l'expression d'une kinase PAK constitutivement active induit des changements dans la morphologie cellulaire (formation de structures d'actine comme les lamellipodes et les filopodes), la perte des fibres de stress (des fibres constituées d'actine-myosine liant le cytosquelette aux adhésions focales) et la déstabilisation des complexes d'adhésion focale (complexes protéiques qui lient la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine à travers les récepteurs intégrines) (Sells *et al.*, 1997; Bokoch, 2003; Nayal *et al.*, 2006). Ces effets peuvent être dépendants ou indépendants de l'activité kinase.

- Les PAK agissent sur la polymérisation de l'actine par la régulation de l'activité des LIMK, la phosphorylation de la MLCK, et celle de la filamine A. Les LIMK font partie d'une petite famille de protéines qui régule la polymérisation et dépolymérisation de l'actine. Leur activité est entre autre dépendante d'une activation par les kinases PAK. PAK1 phosphoryle le résidu thréonine 508 de la LIMK1 situé dans sa boucle activatrice, ce qui active la LIMK et conduit à la phosphorylation de la cofiline, ce qui stabilise les filaments d'actine (Edwards *et al.*, 1999; Dan *et al.*, 2001). La filamine A est une protéine de grande taille qui participe à l'organisation et la formation des réseaux d'actine. Elle lie le réseau d'actine et la membrane cellulaire, notamment par sa liaison aux intégrines, et participe à la transduction du signal et à l'endocytose. Sa phosphorylation par PAK1 est indispensable à la formation des repliements membranaires induits par PAK1 (Vadlamudi *et al.*, 2002). La filamine A peut également activer PAK1 à travers sa fonction de plateforme au niveau de la membrane. Elle interagit avec Rac/Cdc42, GIT/PIX et le domaine CRIB de PAK1, ce qui active la kinase (Vadlamudi *et al.*, 2002). Les myosines sont des moteurs moléculaires qui interagissent avec l'actine. Dans les cellules neurales, PAK1 et 2 peuvent phosphoryler la chaîne légère de la myosine II (RMLC). PAK1 et PAK2 peuvent aussi phosphoryler sa kinase régulatrice, la MLCK, ce qui

entraîne son inhibition, donc la diminution de la phosphorylation de la MLC (Sanders *et al.*, 1999; Sells, Boyd et Chernoff, 1999). Ces deux fonctions pourraient expliquer la perte des fibres de stress et la déstabilisation des adhésions focales observées après surexpression de PAK. Les PAK peuvent aussi réguler la structure des adhésions focales à travers la phosphorylation de la paxilline et du complexe Arp2/3 (Hashimoto *et al.*, 2001; Vadlamudi, Li, *et al.*, 2004; Nayal *et al.*, 2006). Le complexe Arp2/3 contrôle l'assemblage du cytosquelette d'actine : la phosphorylation d'une de ses sous-unités par PAK1 stimule la formation du complexe et favorise la migration cellulaire (Vadlamudi, Li, *et al.*, 2004).

- Après activation par Rac, PAK1 et 2 permettent l'augmentation de la production de GMP cyclique via une interaction directe activatrice avec la guanylyle cyclase transmembranaire ce qui augmente la migration cellulaire et la formation des lamellipodes (Guo *et al.*, 2007).

- Les PAK agissent sur les microtubules à travers leur action sur la stathmine, qui régule l'état de polymérisation des microtubules, et la phosphorylation de TCoB (tubuline cofacteur B) (Bokoch, 2003). PAK1 phosphoryle la stathmine ce qui l'inactive, or celle-ci inhibe la polymérisation de la tubuline. PAK1 colocalise et phosphoryle TCoB au niveau du centrosome et des microtubules néoformés. La phosphorylation de TCoB par PAK1 permet de générer de nouveaux microtubules (Vadlamudi, Barnes, *et al.*, 2005; King, Nicholas et Wells, 2014). L'activation de PAK favorise donc la stabilisation et la croissance des MT à l'avant de la cellule.

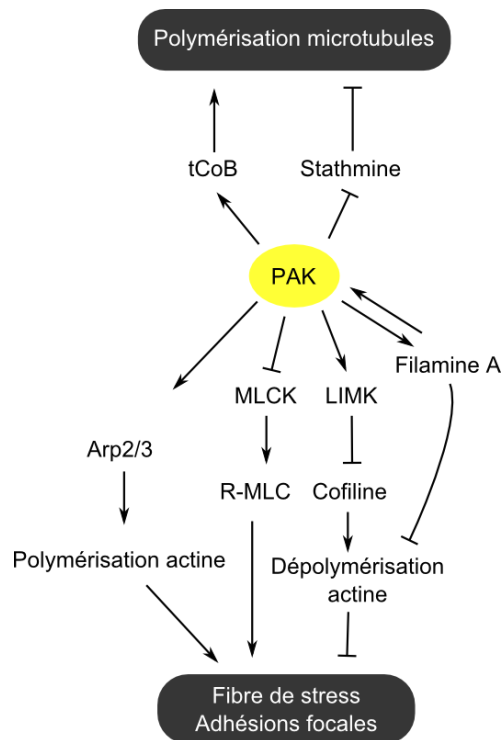


Figure 18. Mécanismes de régulation du cytosquelette d'actine par PAK1

5.2 Progression du cycle cellulaire et mitose

Les PAK sont des acteurs de la régulation de la progression du cycle cellulaire à plusieurs niveaux, notamment à travers la régulation des transitions entre phases du cycle, la régulation de la formation du fuseau mitotique et de la morphologie cellulaire. Ainsi il a été montré que la phosphorylation de la Thréonine 212 inhibe l'interaction de PAK1 avec plusieurs partenaires protéiques impliqués dans les modifications morphologiques accompagnant la division cellulaire (Thiel *et al.*, 2012). Cette thréonine peut être phosphorylée par la cycline-dépendent kinase 1 (Cdk1) au cours de la mitose ce qui aurait un effet inhibiteur sur sa liaison avec ses partenaires protéiques et donc sa signalisation (Banerjee *et al.*, 2002, Cau *et al.*, 2000; Thiel *et al.*, 2002). Les complexes Cdk/Cyclines contrôlent la progression du cycle cellulaire. Ces complexes permettent la phosphorylation de substrats de manière spécifique de chaque phase (Figure 19).

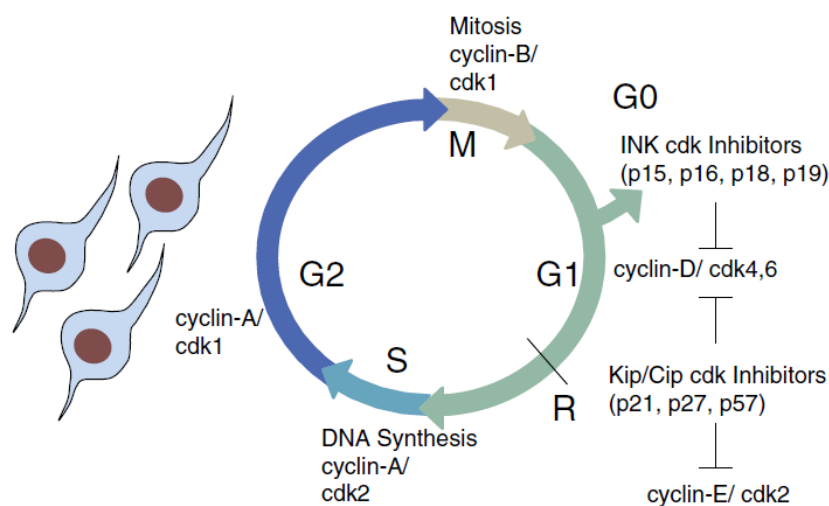


Figure 19. Rappel des complexes Cdk/Cycline et des CdkI associés. R, point de restriction. Les cyclines dépendante kinases (Cdk) forment des complexes avec les cyclines, qui sont synthétisées de manière transitoire au cours du cycle cellulaire. PAK1 stimule la transcription des cyclines D et donc la transition G1/S

Les PAK peuvent agir sur les partenaires des complexes Cdk/Cycline, principalement sur l'expression des cyclines D, ce qui impacte les transitions entre phases du cycle. L'équipe de Chernoff a montré que dans des fibroblastes de rat, l'expression d'un dominant négatif de PAK1 empêche la progression du cycle cellulaire durant la phase G1 en inhibant l'expression des cyclines D1 et D2, au contraire d'une forme de PAK1 activée (Balasenthil *et al.*, 2004; Thullberg *et al.*, 2007). De plus PAK1 favorise l'expression de la cycline D1 à travers son rôle de stabilisateur de la β -caténine. La première étude à montrer une interaction PAK/ β -caténine, et donc l'implication de PAK dans la voie Wnt, est celle de He *et al.*, en 2008. PAK1 s'associe avec la β -caténine et la phosphoryle sur plusieurs sites, ce qui la stabilise et favorise sa translocation au noyau et son activité transcriptionnelle (He, Shulkes et Baldwin,

2008). Ceci entraîne l'augmentation de la transcription de MYC et de la cycline D1. Une autre voie pour activer le promoteur de la cycline D1 passe par l'activation de la voie JAK2/Stat, celle-ci incluant l'activation de PAK1 (Tao *et al.*, 2011). PAK1 est donc un des régulateurs de la transition G1/S. Quelques données impliquent PAK1 dans la transition G2/M. Chez le Xénope, cette transition est contrôlée entre autre par XPAK1 (Faure *et al.*, 1999) et PAK1 peut participer à l'augmentation de l'expression de la cycline B1 à travers l'activation du facteur de transcription NfκB.

La capacité des PAK à réguler la dynamique du cytosquelette en fait des acteurs indispensables au bon déroulement du cycle cellulaire. En effet la coordination de l'assemblage et du désassemblage des réseaux d'actine et de microtubules sont des événements critiques durant le déroulement du cycle cellulaire, notamment à travers la formation du fuseau mitotique (Figure 20). En plus de ces fonctions, PAK1 participe à l'activation par phosphorylation de plusieurs kinases qui permettent le bon déroulement de la mitose. Il a été décrit que le complexe GIT/PIX, déjà décrit dans un chapitre précédent, est retrouvé au centrosome, où il interagit avec la tubuline (Zhao *et al.*, 2005; Černohorská *et al.*, 2016). PAK1 une fois activée par GIT/PIX se dissocie du complexe et phosphoryle Aurora A et la polo like kinase 1 (PLK1) ce qui les active. Avec Aurora A, la PLK1 est l'une des kinases clés de la mise en place du fuseau mitotique et donc de la régulation de la division cellulaire, et Maroto *et al.* ont montré en 2008 que l'activité des PAK était nécessaire pour l'entrée en mitose en partie par leur régulation activatrice de PLK1 (Maroto *et al.*, 2008). En plus de ces deux cibles, PAK1 (et non PAK2 ou PAK3) interagit avec et phosphoryle l'histone H3, ce qui permet la condensation des chromosomes et donc la progression vers la mitose (Li *et al.*, 2002) (Figure 20).

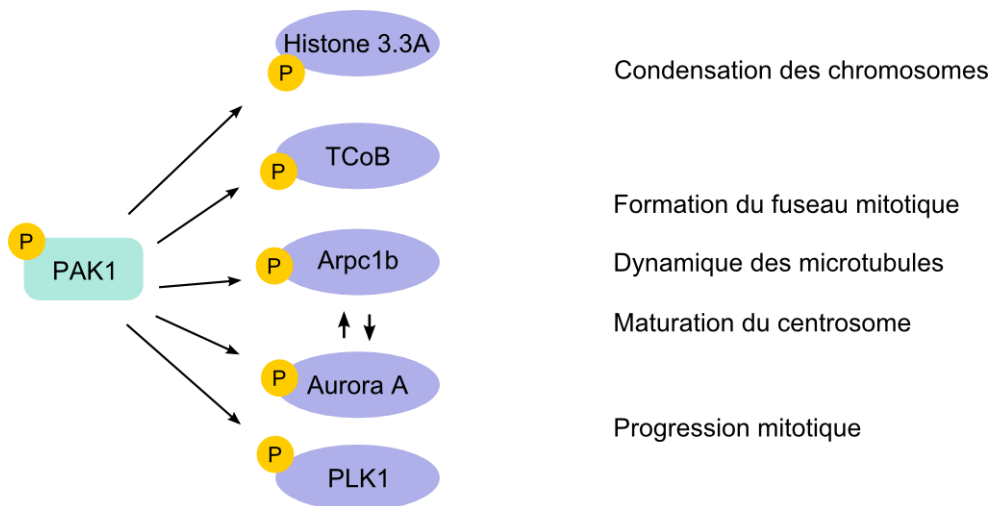


Figure 20. Substrats de PAK1 impliqués dans la régulation du cytosquelette au cours du cycle cellulaire. Une fois recruté au centrosome par GIT/PIX, PAK1 régule l'organisation du cytosquelette durant la mitose à plusieurs niveaux en phosphorylant ses cibles.

Les cascades de MAPK régulent de nombreux processus biologiques, comme l'embryogenèse, la prolifération, la différenciation, et l'apoptose. Elles sont initiées par l'activation d'un récepteur tyrosine-kinase (RTK) qui induit la phosphorylation successive des différents effecteurs (Higuchi *et al.*, 2008) (cf. Gliomes II.4). Plusieurs travaux ont montré le rôle des PAK dans la modulation de la voie Ras-RAF-MERK-ERK dans laquelle Raf1 et MEK1 sont des substrats des PAK (Tang *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2003; Beeser *et al.*, 2005), et dans la voie PI3K/Akt/mTor. Un des premiers travaux décrivant l'activation de ERK par PAK1 est l'étude par Lu *et al.*, (1999) qui montre que l'activation de PAK1 par son recrutement membranaire déclenche la stimulation de p38/JNK et ERK1. PAK1 peut phosphoryler MEK1 et Raf1 ce qui augmente l'affinité de MEK1 pour ERK et/ou Raf1, en réponse aux facteurs de croissance comme le PDGF (Park, Eblen et Catling, 2007). La phosphorylation de Raf1 par les PAK augmente son activité (King *et al.*, 1998, 2001). Les PAK sont donc majoritairement des activateurs des voies MAPK.

5.3 Apoptose et survie cellulaire

La régulation de l'apoptose, la mort programmée de la cellule, est une balance entre les signaux de survie et les signaux de mort reçus par la cellule, ceux-ci pouvant être extérieurs ou internes à la cellule. Les voies de l'apoptose convergent toutes vers la signalisation en cascade des caspases. Plusieurs membres de la famille des PAK interviennent dans les voies de signalisation régulant la mort et la survie cellulaire comme les voies PI3K/Akt et Wnt/ β -caténine et exercent des fonctions pro ou anti-apoptotiques. L'activation pro-apoptotique de PAK2 a lieu dans une phase tardive de l'apoptose alors que l'activation précoce de PAK1 permet la survie cellulaire. PAK1 exerce ses fonctions anti-apoptotique à travers des cibles comme Raf1, NF κ B, ou DLC1.

Après activation de la cascade de caspases, PAK2 est clivée en deux fragments sous l'action de la caspase 3, au niveau d'un résidu absent de PAK3 et inaccessible sur PAK1. Un des fragments libéré contient le domaine kinase qui devient constitutivement actif. Dans des lignées cellulaires, ce fragment C-ter induit des altérations de la morphologie cellulaire et nucléaire, ce qui déclenche l'apoptose, alors que l'expression d'un mutant dépourvu d'activité kinase a un effet anti-apoptotique. A l'inverse, PAK1 favorise la survie cellulaire par son action sur BAD. PAK1 phosphoryle BAD (Bcl2-antagonist of cell death/ BCL2 Associated Death Promoters), directement mais aussi indirectement en phosphorylant Raf1 qui à son tour phosphoryle BAD (Schürmann *et al.*, 2000). En l'absence de signaux de survie, BAD n'est pas phosphorylée et forme un complexe inhibiteur avec Bcl2 (B-Cell Leukaemia-2), ce qui inhibe son activité anti-apoptotique. La phosphorylation de BAD entraîne sa dissociation de Bcl2, qui exerce alors sa fonction pro-survie (Schürmann *et al.*, 2000). La protéine DLC1 (Dynéine light chain 1) forme un dimère avec BimL (Bcl-2-interacting mediator of cell death). Ce dimère BimL/DLC1 inhibe Bcl2, or, PAK1 phosphoryle DLC1 et BimL, ce qui dissocie le dimère et l'empêche d'exercer sa fonction inhibitrice (Vadlamudi, Bagheri-Yarmand, *et al.*, 2004). PAK1 favorise aussi la survie par sa fonction dans la voie de signalisation Akt, dont l'une des cibles est BAD. Il a également été montré que les PAK sont nécessaires à l'activation du facteur de transcription NF κ B. Ainsi une forme constitutivement

active de PAK1 stimule l'activité de NFκB, ce qui favorise la survie cellulaire (Frost *et al.*, 2000). De manière contradictoire avec son action inductrice de l'apoptose, PAK2 peut contribuer à la survie cellulaire en phosphorylant la caspase 7 ce qui inhibe son activité (King, Nicholas et Wells, 2014).

5.4 Différenciation et physiologie neuronale

Les voies de signalisation intervenant dans la différenciation et le développement impliquent entre autre la signalisation par les facteurs de croissance, les interactions intercellulaires, et le contrôle du cycle cellulaire. La place des PAK dans la régulation de ces différents mécanismes en fait des acteurs potentiels de la différenciation.

4.4.1 Développement du système nerveux

La migration est un des mécanismes principaux du développement du cerveau. La migration cellulaire est un processus qui repose principalement sur la dynamique d'organisation du cytosquelette. Or, comme montré précédemment (cf. 4.1), les kinases PAK en sont des régulateurs à travers des substrats comme la LIMK, la myosine ou la guanylyle cyclase et l'expression d'une forme active ou inactive de PAK modifie la motilité cellulaire (Sells, Boyd et Chernoff, 1999). Les PAK peuvent également participer au développement du système nerveux en régulant la localisation d'autres protéines, comme chez le Xénope où X-PAK1 contrôle la distribution d'une protéine impliquée dans la morphogenèse du tube neural (Wu *et al.*, 2007).

Le développement du cerveau nécessite une migration importante des cellules mais également la croissance et l'allongement des axones des neurones et la mise en place des branchements neuronaux (Figure 21). Les PAK ont un rôle dans certaines étapes de la formation du système nerveux, comme la migration neuronale ainsi que la croissance et le guidage des neurites et des axones (Kreis et Barnier, 2009). Les premières preuves de l'implication des PAK dans la mise en place des projections axonales ont été établies chez la drosophile. Dans ce modèle, l'interaction de DPAK (homologue des protéines PAK du groupe I de mammifères) avec son adaptateur Dreadlocks (DOCK, homologue de la famille NCK) est indispensable à la mise en place des projections axonales dans le système visuel de la drosophile (Hing *et al.*, 1999). Depuis, l'utilisation de souris mutantes *Dlx1/2* a permis de mettre en évidence le rôle de PAK3 dans l'arrêt de la migration d'interneurones au cours du développement (Cobos, Borello et Rubenstein, 2007). De plus, dans le cerveau embryonnaire de la souris, il a été montré que PAK1 activée est nécessaire à la migration, et la croissance de l'axone et des dendrites des neurones du cortex (Jacobs *et al.*, 2007, Causeret *et al.*, 2009). D'autres données valident ces fonctions, comme indiqué précédemment (I.3.3) PAK1 interagit avec p35/Cdk5, or, la Cdk5 et son régulateur, p35 sont requis pour la mise en place correcte de la migration radiale, de la morphologie et des connexions des neurones post-mitotiques. Ils sont localisés dans les cônes de croissance des neurones corticaux et régulent la croissance des neurites. L'interaction de p35/Cdk5 avec PAK1 qui entraîne

l'hyperphosphorylation de la kinase et affecte la migration neuronale et la pousse des neurites (Nikolic *et al.*, 1998). Enfin, au cours du développement PAK1 et PAK3 colocalisent avec la protéine cell adhesion molecule Close Homologue of L1 (CHL1), une molécule d'adhésion neurale dont les mutations sont également responsables de DI. Ils agissent en synergie avec cette protéine au cours de la différenciation neuronale. L'électroporation du AID dans des neurones n'exprimant pas CHL1 induit des branchements anormaux des neurones du cortex (Demyanenko *et al.*, 2010).

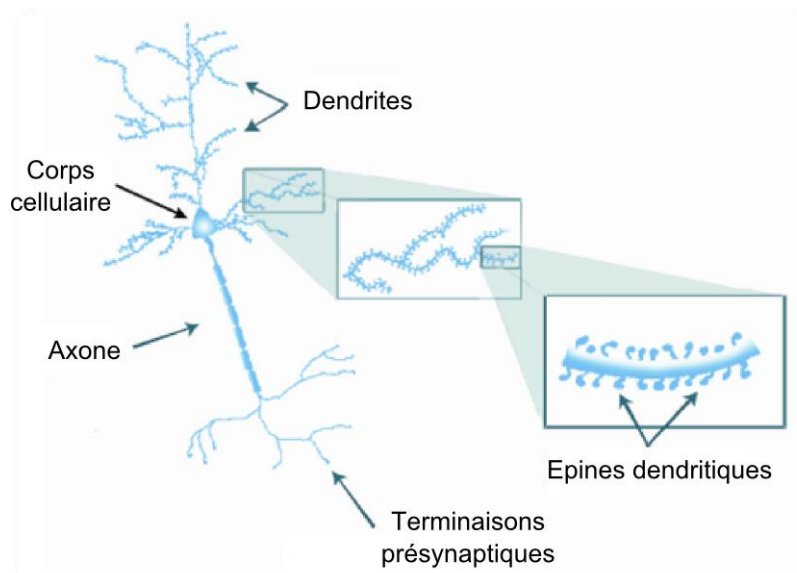


Figure 21. Structure et organisation d'un neurone. Les principaux compartiments d'une cellule neuronale sont le corps cellulaire, l'axone, les dendrites, les terminaisons pré-synaptiques et les terminaisons post-synaptiques (épines dendritiques).

4.4.2 Morphogenèse des épines dendritiques et plasticité synaptique

La plasticité synaptique est une propriété d'adaptation des neurones. Elle repose sur plusieurs mécanismes, dont la morphogenèse dendritique, la formation de nouvelles synapses et la modification de la transmission synaptique notamment à travers les mécanismes de potentialisation et dépression à long terme (LTP et LTD respectivement). Les épines dendritiques sont des excroissances riches en actine qui reçoivent la majorité des connexions excitatrices dans les neurones. De nombreux travaux montrent que les PAK régulent la morphogenèse des épines dendritiques et sont impliquées dans les mécanismes de plasticité synaptique. Par exemple, l'inhibition de l'activité des PAK du groupe I par l'expression du domaine AID des PAK sous le contrôle du promoteur de la calcium-calmodulin-dependent-kinase type II (CamkII), qui ne s'exprime que dans des neurones post-mitotiques, entraîne des défauts de mémorisation chez la souris, une augmentation de la transmission synaptique et de la LTP, une diminution de la LTD, ainsi que des anomalies du nombre et de la morphologie des épines dendritiques des neurones corticaux (Hayashi *et al.*, 2004). Les PAK peuvent également réguler la plasticité synaptique à travers leur interaction

avec Rac. Rac1 joue un rôle important dans la régulation de la plasticité. Il a été montré dans les neurones d'hippocampe en culture (dans les conditions basales) que la protéine Rac est localement activée au niveau des épines dendritiques (Murakoshi, Wang et Yasuda, 2011). Les formes activées des protéines PAK sont enrichies dans les épines au niveau des densités post-synaptiques (Hayashi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Une fois activée, Rac se lie à PAK1 et PAK3, qui modulent la formation des épines dendritiques (Zhang *et al.*, 2005; Kreis *et al.*, 2007). L'expression de mutants des protéines PAK montre que l'activité kinase de PAK1 tout comme celle de PAK3 est nécessaire à la formation des épines (Zhang *et al.*, 2005). Cette nécessité de l'activité kinase des PAK pour la régulation du nombre et de la morphologie des épines a également été montrée dans des neurones d'hippocampe (Boda *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005).

4.4.3 Différenciation neuronale

Plusieurs travaux ont attribué un rôle aux PAK dans la spécification et la différenciation cellulaire. PAK2 est essentiel pour la différenciation des mégacaryocytes *in vitro* et *in vivo* (Kosoff *et al.*, 2015) et l'expression des PAK est augmentée pendant la différenciation induite par l'acide rétinoïque de cellules humaine HL-60 (Nisimoto et Ogawa, 2002). Les PAK sont impliquées dans la spécification et la différenciation cellulaire principalement via la voie Notch. Suite au clivage du récepteur transmembranaire NOTCH, le fragment intracellulaire (NICD) est transloqué dans le noyau, où il active la transcription de gènes en levant l'inhibition de co-répresseurs comme SHARP. PAK1 phosphoryle SHARP, ce qui augmente l'activité de répression génique de SHARP sur les cibles de la voie Notch. Cette activation de SHARP par PAK1 inhibe la neurogenèse (Vadlamudi, Manavathi, *et al.*, 2005). Jacobs et coll. ont montré en 2007 chez la souris que PAK1 contrôlait la croissance et la spécification de l'axone des neurones d'hippocampe en cours de différenciation. L'activation asymétrique de PAK1 dans les neurones permet la polarisation de la cellule, et PAK1 activée est enrichie dans les axones. Les fonctions spécifiques de PAK3, l'isoforme le plus impliqué dans la différenciation neuronale, seront abordées plus précisément dans une partie consacrée.

II. La p21-activated kinase 3

PAK3, dont le gène est localisé sur le chromosome X, est la moins étudiée des kinases PAK du groupe I. Elle se distingue des autres kinases de ce groupe par son expression restreinte, son implication dans le retard mental non syndromique, et ses variants d'épissages.

1. Expression, structure et régulation de PAK3

PAK3 est exprimée dans les neurones, au niveau du corps cellulaire et des dendrites, en particulier dans les épines dendritiques, mais également dans les oligodendrocytes (Boda *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2004; Cahoy *et al.*, 2008; Maglorius Renkilaraj *et al.*, 2017). Elle possède des spécificités fonctionnelles : en 2007, mon équipe a montré que les affinités de PAK3 envers RAC et CDC42 n'étaient pas les mêmes, PAK3 se lie plus fortement avec

CDC42 (Kreis *et al.*, 2007). L'activité des PAK étant régulée par la dimérisation, l'affinité de PAK3 pour les différentes isoformes des PAK du groupe I a été quantifiée, et mon équipe a montré que PAK3a forme des homodimères avec une faible affinité, et préfère former des hétérodimères avec PAK1 (Combeau *et al.*, 2012). *In vivo* et *in vitro*, PAK3 interagit majoritairement avec l'adaptateur Nck2 par rapport à Nck1, et n'interagit pas avec Grb2 (Thévenot *et al.*, 2011).

Parmi les PAK du groupe I, la kinase PAK3 a la particularité de posséder des exons alternatifs dans la région codante. Ils sont situés entre les exons codants 2 et 3, au niveau des domaines PBD/AID juste après le domaine CRIB mais dans le domaine AID (Figure 22). Ces exons, appelés b et c, ont été mis en évidence successivement par mon équipe en 2003 et 2008 et codent pour des inserts de 15 et 21 acides aminés respectivement (Rousseau *et al.*, 2003; Kreis *et al.*, 2008). Ils permettent la synthèse de quatre variants d'épissage nommés PAK3a, PAK3b, PAK3c et PAK3cb (appelé également PAK3d). Les différents exons sont apparus successivement au cours de l'évolution, l'exon b est présent chez les tétrapodes tandis que l'exon c n'existe que chez les mammifères (Kreis *et al.*, 2008). Tous les variants sont exprimés dans le cerveau, à des niveaux différents (Figure 22), PAK3a et PAK3b sont les formes les plus abondantes, tandis que PAK3c est la forme la moins exprimée (Rousseau *et al.*, 2003; Kreis *et al.*, 2008).

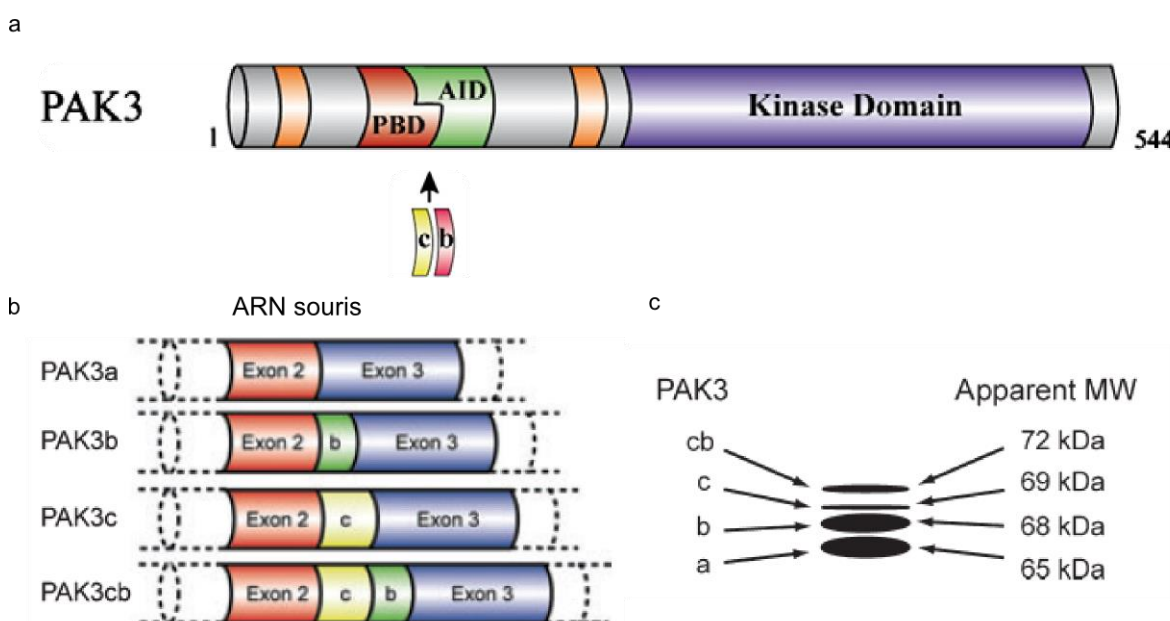


Figure 22. PAK3 et ses variants d'épissage. PAK3 code pour quatre variants d'épissage PAK3a ; PAK3b ; PAK3c et PAK3cb. (a) Représentation schématique de la protéine PAK3. Les inserts c et b se localisent dans la région d'interaction avec les GTPases et au début du domaine d'auto-inhibition, dans le domaine IS. (b) Structures des différents variants de PAK3. (c) Représentation de l'abondance relative de chaque protéine dans le cerveau de souris, selon leur poids moléculaire apparent. Les isoformes a et b sont les plus abondantes, et c est la moins exprimée (Kreis *et al.*, 2008).

Mon équipe a initié la caractérisation de ces variants. Les exons étant situés dans le domaine régulateur, il était possible que l'insertion d'une séquence modifie les mécanismes de régulation de la kinase. Mon équipe a ainsi montré que les trois variants d'épissage sont constitutivement actifs *in vitro* et *in vivo*, leur domaine AID ne permettant pas leur inhibition : la présence de l'exon b au niveau du domaine AID l'empêche d'inhiber l'activité kinase, l'exon c aurait le même effet, étant localisé au même endroit (Rousseau *et al.*, 2003). Il a également été montré que PAK3b n'était pas inhibé par la dimérisation avec PAK1, au contraire de PAK3a (Combeau *et al.*, 2012). De plus, PAK3b, c et cb ont une affinité pour CDC42/Rac plus faible que PAK3a (Kreis *et al.*, 2008). La présence des inserts, en particulier l'insert b, favorise l'interaction avec Nck. Les variants auraient donc un/des mécanisme/s de régulation différents de la forme PAK3a. Ces variants ont des propriétés biochimiques différentes et donc probablement des fonctions différentes. Dans les cellules, l'expression de ces variants conduit au collapse de la cellule, ce qui est similaire à ce que donne l'expression d'un variant constitutivement actif.

2. PAK3 dans les pathologies neurologiques et mentales

L'une des caractéristiques les plus importantes de PAK3 est l'implication de ses mutations dans la déficience intellectuelle (DI). La première mutation a été décrite en 1998, et depuis une dizaine d'autres ont été décrites (Figure 23). Ces mutations sont associées à des pathologies neurologiques diverses, allant de défauts cognitifs légers (Allen *et al.*, 1998, première mutation décrite) à des défauts de développement cérébral comme de l'hypoplasie cérébelleuse ou la microcéphalie (Bienvenu *et al.*, 2000; Gedeon *et al.*, 2003; Peippo *et al.*, 2007; Rejeb *et al.*, 2008; Magini *et al.*, 2014). Ces mutations sont localisées à des endroits différents dans la séquence, elles modifient ou suppriment son activité kinase et affectent la morphologie et la densité des épines dendritiques (Figure 24 a) (Boda *et al.*, 2004; Kreis *et al.*, 2007). Les mutations nouvellement identifiées responsables d'anomalies morphologiques, suggèrent un rôle neuro-développemental de PAK3.

De plus, l'expression de PAK3 est dérégulée dans plusieurs pathologies neurodégénératives et psychiatriques. L'analyse par qPCR de l'expression des PAK du groupe I dans le cerveau de patients atteints de dépression a montré une diminution de l'expression de PAK1 et PAK3, respectivement dans le cortex pré-frontal et l'hippocampe, ainsi qu'une désorganisation de leur co-expression (Fuchsova *et al.*, 2016). PAK3 pourrait aussi être impliquée dans les déficits synaptiques observés chez certains patients atteints de schizophrénie. En effet certaines formes de GIT1 mutées exprimées par ces patients sont incapables d'activer PAK3 et la cascade de MAPK en aval (Kim *et al.*, 2017). Dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (AD) et des modèles cellulaires et animaux d'AD, PAK1 et PAK3 sont sous-exprimés, or, ces deux PAK ont des fonctions dans la plasticité synaptique (cf I.4.4.2). De plus, PAK3 interagit avec le peptide précurseur de la protéine amyloïde (APP) en C-ter, et une forme dominante négative de PAK3 inhibe l'apoptose neuronale induite par APP (McPhie *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006). Le déficit de PAK3 pourrait être une des causes de l'augmentation de la mort neuronale et les déficits cognitifs observés chez ces patients AD.

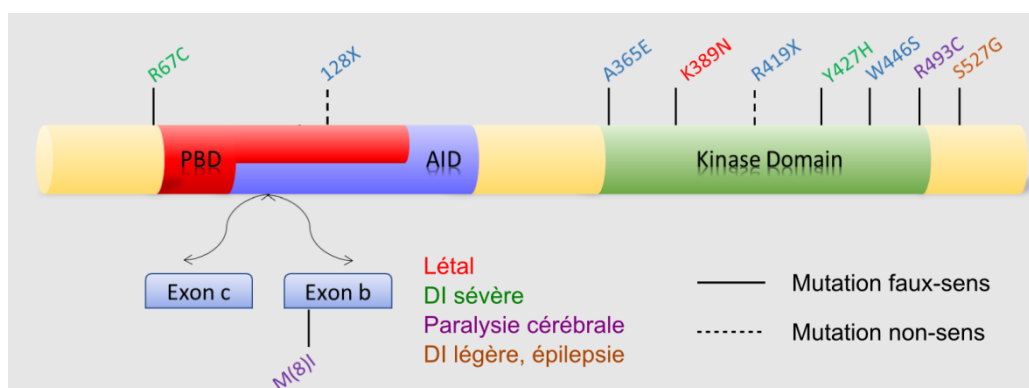


Figure 23. Les mutations de PAK3 responsables de pathologies.

3. Fonctions spécifiques de PAK3

Dans le modèle invalidé pour *PAK3*, les souris présentent des défauts de plasticité synaptique, et des défauts de mémoire et d'apprentissage (Meng *et al.*, 2005). Ces données, en corrélation avec les données cliniques sur les mutations de *PAK3*, suggèrent que cette kinase aurait des fonctions spécifiques propres, non compensées par les autres kinases du groupe I.

3.1 Morphogenèse dendritique, synaptogenèse et plasticité synaptique

Comme présenté précédemment (I.4.4.2) les kinases PAK neuronales jouent un rôle crucial dans la formation des épines dendritiques, la genèse des synapses et la plasticité synaptique. Le fait que les mutations du gène conduisent à des DI dans un certain nombre de cas non syndromiques, suggère fortement que PAK3 possède des caractéristiques spécifiques auxquelles sont associées des fonctions spécifiques dans ces processus neuronaux, non compensées par les autres kinases de cette famille. PAK3 phosphorylée est très enrichie dans les densités post-synaptiques par rapport à PAK1, et l'induction d'une LTP chimique induit l'enrichissement de la protéine PAK3 phosphorylée dans les densités post-synaptiques (Hayashi *et al.*, 2004) (Figure 24 b). De plus, la souris invalidée pour le gène PAK3 montre des défauts d'apprentissage et de LTP tardive, mais ne présente pas d'anomalies de morphologie des épines dendritiques (Meng *et al.*, 2005).

Les analyses dans d'autres modèles, sur tranche ou dans des neurones en culture nuancent ces données suggérant toutefois un rôle de PAK3 dans la spinogenèse et la synaptogenèse. Ainsi, par exemple, la surexpression d'une forme de PAK3 dépourvue d'activité kinase ou la diminution de l'expression de *PAK3* perturbe la formation des épines. La perte d'expression de PAK3 par Si-RNA augmente le nombre d'épines immature et diminue le nombre d'épines normales suggérant un rôle de PAK3 dans la maturation des épines (Boda *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Dubos *et al.*, 2012). Elle peut également affecter la croissance axonale (Dai *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'inhibition de PAK3 bloque également la mise en place des branchements

synaptiques et permet la migration des neurones dans le cortex (Cobos, Borello et Rubenstein, 2007; Dubos *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2014). Mon équipe a montré que l'expression d'une protéine PAK3 portant la mutation R67C, qui supprime l'activation de PAK3 par la voie Cdc42, diminue la densité des épines alors que celle de formes mutées de PAK3 supprimant l'activité kinase induisent des défauts de maturation des épines (Figure 24 a), suggérant que PAK3 est impliquée dans plusieurs étapes de la spinogénèse (Kreis *et al.*, 2007). En accord avec cette hypothèse, mon équipe a montré que PAK3 interagit préférentiellement avec Cdc42 plutôt que Rac1. Or Cdc42 est la GTPase qui contrôle la formation des filopodes, et ceux-ci sont une des premières étapes dans la formation des épines et interviennent également dans leur maintien (Kreis *et al.*, 2007; Murakoshi, Wang et Yasuda, 2011). Une autre voie importante implique le complexe GIT/PIX/PAK3 qui permet l'activation de la kinase PAK3 par les GTPases et en la recrutant à la membrane et au niveau des densités post-synaptiques (Zhang *et al.*, 2005).

En 2015, Hussain et collègues ont démontré dans des neurones de rats que PAK3 phosphoryle GluA1, une sous unité des récepteurs AMPA, ce qui localise et maintient le récepteur à la membrane (Hussain *et al.*, 2015). Ceci pourrait être un autre mécanisme par lequel PAK3 participe à la plasticité synaptique.

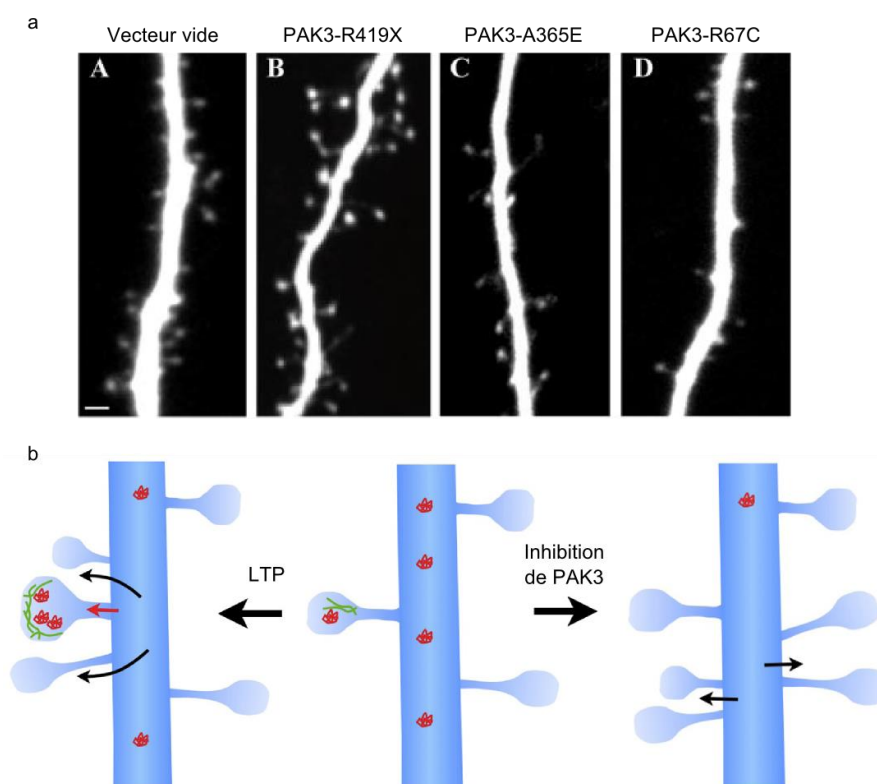


Figure 24. PAK3 et la régulation de la morphogénèse dendritique. (a) Altérations des épines associées aux mutations de PAK3 dans des neurones pyramidaux (Kreis *et al.*, 2007). (b) Schéma illustrant le rôle de PAK3 dans la dynamique des épines dendritiques induite par l'activité synaptique. La stimulation de l'épine entraîne le recrutement de PAK3 dans la tête de l'épine, où elle contribue à la régulation de la taille et stabilise l'épine. Simultanément, la quantité de PAK3 diminue des épines adjacentes, ce qui permet la formation de nouvelles épines. En cas de perte de fonction de PAK3, l'apparition d'épines n'est plus contrôlée.

3.2 Cycle cellulaire et différenciation

Il a été montré que la kinase PAK3 est impliquée dans la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des progéniteurs neuraux au cours de l'embryogenèse chez le Xénope (Souopgui, Sölter et Pieler, 2002). La réduction de l'expression de PAK3 par morpholinos dans les embryons de Xénope est corrélée à une hyperprolifération des cellules du tissu neural et à l'inhibition de la différenciation neuronale. Au contraire une forme constitutivement active de PAK3 induit la sortie du cycle cellulaire et une différenciation neuronale précoce. Il en est de même dans le pancréas de souris, où PAK3 est impliquée dans l'arrêt de la prolifération des précurseurs des cellules β (Piccand *et al.*, 2014).

Plusieurs données suggèrent que PAK3 agirait en aval des facteurs de transcription proneuraux. Chez le Xénope, les facteurs de transcription Neurog2, NeuroD1 et ebf3 peuvent induire une expression ectopique de PAK3, alors que la perte de PAK3 peut empêcher la capacité de ces facteurs à induire la neurogenèse (Souopgui, Sölter et Pieler, 2002). Toujours chez le Xénope, la maturine, exprimée fortement dans les neurones en cours de différenciation, agirait en synergie avec PAK3 pour favoriser la différenciation neuronale (Martinez-De Luna *et al.*, 2013). Dlx1/2 inhibe l'expression de PAK3 dans les neurones, ce qui empêche l'augmentation du nombre de dendrites et d'épines dendritiques (Cobos, Borello et Rubenstein, 2007). Dans un autre système, au cours du développement embryonnaire du pancréas chez la souris, l'expression de PAK3 est stimulée par la neurogénine (Neurog3) (Piccand *et al.*, 2014).

De plus, des travaux très récents ont étudié l'impact de la perte de PAK3 sur la différenciation oligodendrogliale. Maglorius Renkilaraj et coll. ont ainsi montré que PAK3 était fortement exprimée dans les précurseurs des oligodendrocytes (OPC) par rapport aux oligodendrocytes différenciés de rats et de souris, et a mis en évidence des défauts de myélinisation consécutifs à une différenciation oligodendrocytaire altérée chez la souris KO pour PAK3 (Maglorius Renkilaraj *et al.*, 2017). L'ensemble de ces données obtenues dans différents modèles suggère que PAK3 pourrait posséder des fonctions dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire et la régulation de la différenciation, dans différents types cellulaires et en aval des facteurs de transcription proneuraux.

III. Les PAK du groupe I et cancer

Les PAK sont au centre de plusieurs voies de signalisation centrales dans l'oncogenèse. Elles ne sont pas fréquemment mutées mais la plupart des isoformes des PAK ont des effets oncogènes lorsqu'elles sont activées, par une surexpression ou par des mutations touchant leurs régulateurs, ce qui est fréquemment décrit dans diverses tumeurs humaines. En effet elles activent des processus cellulaires typiquement impliqués dans les cancers, comme l'acquisition de signaux de croissance autonomes, d'échappement à l'apoptose et l'augmentation de la capacité migration et d'invasion cellulaire (Radu *et al.*, 2014). En 1997, le groupe de Chernoff et Field a produit la première preuve de l'implication de PAK1 dans la

transformation en cellule tumorale. Ils ont montré dans des fibroblastes de rat que l'inhibition de PAK1 par l'utilisation d'un dominant négatif dépourvu d'activité kinase empêchait la transformation médiée par Ras (Tang *et al.*, 1997). Les PAK du groupe I comme celles du groupe II sont actuellement des cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer, et l'étude de leur fonctionnement dans de nombreux types de tumeurs fait l'objet de très nombreux travaux.

1. Défauts de régulation de l'expression des PAK dans les cancers

Les PAK sont amplifiées, surexprimées ou sur-activées dans un très grand nombre de cancers humains (Tableau 6). PAK1 est surexprimée dans une grande variété de tumeurs, alors que la dérégulation de l'expression de PAK2 n'a été observée que dans les cancers du sein et du poumon. En ce qui concerne PAK3, et bien que quelques mutations dans ce gène ait été identifiées dans des cancers (Greenman *et al.*, 2007), sa surexpression n'a été décrite que dans une étude et pour un seul type de tumeur, les tumeurs neuroendocrines à ACTH (R. Liu *et al.*, 2010). Le mécanisme de surexpression des PAK le mieux décrit est l'amplification génique, mais la surexpression peut également être le résultat d'une augmentation du messenger ou de la protéine, en absence d'une amplification génique. De plus, les PAK peuvent être sur-activées par la mutation de leurs régulateurs (King, Nicholas et Wells, 2014; Radu *et al.*, 2014). L'activité des kinases PAK est influencée par leur localisation, or dans certains cancers cette localisation peut être perturbée : augmentation de PAK1 phosphorylée (PAK1p) dans le cytoplasme observée dans les glioblastomes, augmentation de PAK1p nucléaire dans les cancers du sein (Tableau 6). Ces augmentations de PAK1p sont corrélées négativement à la survie des patients et à la progression tumorale (Aoki *et al.*, 2007; King, Nicholas et Wells, 2014). Des modifications de la phosphorylation de PAK1/2 ont également été trouvées, dans des tumeurs de cancer du sein et des reins par exemple (Tableau 6). Un résumé de l'expression des PAK du groupe I dans les cancers est présenté dans le tableau suivant.

Isoforme	Cancer	Altération	Référence	Signes cliniques associés
PAK1	Carcinome gastrique	Exp	Wu et al., 2013, Li et al., 2013,2015	Invasion et métastase
	Carcinome hépatique	Exp Amp	Ching et al., 2007, Xu et al., 2012	Métastase, mauvais pronostic, infection HBV
	Carcinome oral	Amp	Tu et al., 2011	Progression tumorale
	Colorectal	Exp	Carter et al., 2004, Qing et al., 2012, Song et al., 2015	Progression maligne, mauvais pronostic
	Endométrial	Exp	Lu et al., 2013	Progression et métastase
	Œsophage	Exp	Gan et al., 2015	Métastase et mauvais pronostic
	Gastrique	Exp Amp	Li et al., 2012, Wang et al., 2015, Qian et al., 2014	Métastase et mauvais pronostic Croissance tumorale

	Glioblastome	Act	Aoki et al., 2007	Survie plus courte
	Lymphome à cellules T	Amp	Mao et al., 2003	
	Mélanome	Exp, Amp	Ong et al 2013	Croissance tumorale
	Ovaire	Ampl	Brown et al., 2008, Schraml et al., 2003, Siu, Wong et al., 2010	Tumeur de haut grade, mauvais pronostic
		Exp, Act	Davidson et al., 2008, Siu et al., 2010a,b	
	Pancréas	Exp	Jagadeeshan et al., 2015, Zhou et al., 2014	Tumorigenèse et invasion
	Peau	Exp	Chow et al., 2012,	Grade avancé
	Poumon	Exp	Ong et al., 2011	Survie et prolifération cellulaire
	Prostate	Exp	Goc et al., 2013	Croissance tumorale et microinvasion
	Rein	Act, Exp	O'Sullivan et al., 2007	Croissance tumorale et résistance au 5-fluorouracil
	Sein	Exp	Balasenthil et al., 2004, Holm et al., 2006; Bostner et al., 2010, Kok et al., 2011, Ong et al., 2015	Résistance au tamoxifène, mauvais pronostic
		Act, Amp	Bostner et al., 2007, Vadlamudi et al., 2000, Ong et al., 2015	
	Tête et cou	Exp	Park et al., 2015	Agressivité tumorale et mauvais pronostic
	Vessie	Am, Exp	Ito et al., 2007, Huang et al., 2015	Développement et progression tumorale
	Voies urinaires	Exp, Act	Kamai et al., 2010	Invasion et métastase
	Trophoblastie gestationnelle	Exp, Act	Siu et al., 2010	Phénotype agressif, prolifération et invasion
	Thyroïde	Exp, Act	McCarty et al., 2010	Migration et invasion
PAK2	Foie	Exp	Sato et al., 2013	Migration cellulaire
	Gastrique	Exp	Gao et al., 2014	Progression tumorale et pronostic mauvais
	Ovaire	Act	Siu et al., 2010a,b	
	Sein	Exp Act	Li et al., 2011, Vadlamudi et al., 2000, Stofega et al., 2004	Résistance à la chimiothérapie
PAK3	Neuroendocrine	Exp	Liu et al., 2010	Migration et invasion

Tableau 5. Altérations des PAK du groupe I dans les cancers humains. Act, Suractivation ; Exp, Surexpression ; Amp, Amplification. Adapté à partir de Kumar et Li 2016.

2. Les PAK du groupe I et la progression tumorale

La transformation d'une cellule en cellule cancéreuse est un processus qui comprend généralement une accumulation progressive d'erreurs génétiques qui entraînent une

dérégulation des voies de signalisation et de l'expression d'oncogènes, ce qui a pour conséquence une modification des processus de migration, différenciation et de prolifération cellulaires. Depuis 1996 les PAK du groupe I, et en particulier PAK1 font l'objet de recherches intensives pour comprendre leurs dérégulations dans les cancers et leur intérêt en tant que cibles thérapeutiques. La transformation tumorale est associée à la dérégulation de plusieurs mécanismes fondamentaux entraînant l'acquisition de plusieurs propriétés fondamentales (Hanahan et Weinberg, 2011) : La prolifération indépendante des facteurs de croissance, l'échappement au contrôle de la croissance cellulaire, la résistance à la mort cellulaire, l'induction de l'angiogenèse, l'activation de la métastase et l'invasion, l'immortalité (Figure 25).

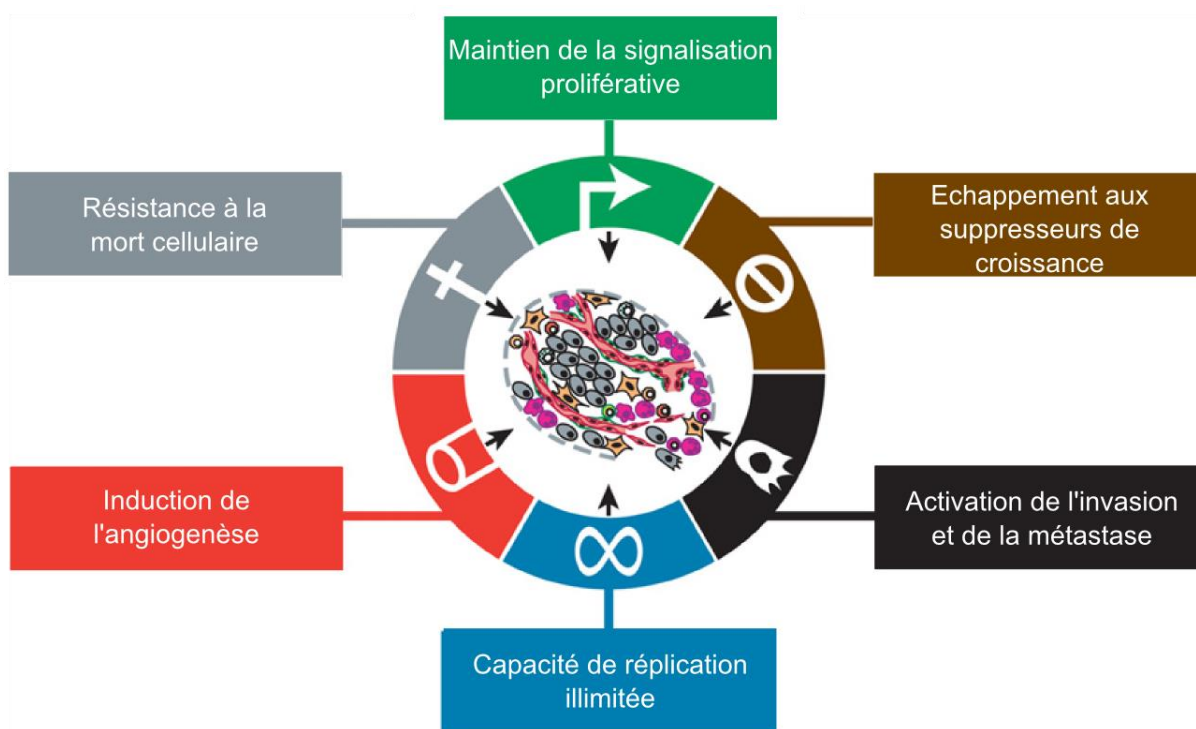


Figure 25. Caractéristiques fondamentales acquises par les cellules cancéreuses. (Hanahan et Weinberg, 2011)

2.1 Altération de la prolifération cellulaire

La signalisation PAK a un rôle critique lors de la progression du cycle cellulaire. De manière générale, les kinases PAK favorisent la progression du cycle cellulaire lorsqu'elles sont surexprimées et l'empêche lorsqu'elles sont inhibées ou délétées (cf I.4.2). Les surexpressions et sur-activations des PAK dans les cancers entraînent donc la dérégulation de la prolifération cellulaire, et cette dérégulation permet, entre autre, la croissance indépendante de l'ancrage et de la stimulation par des facteurs de croissance. Les mécanismes sous-jacents

connus sont liés à l'intervention des PAK dans les signalisations ERK, Akt et Wnt, et aux cibles des PAK comme Aurora A ou la PLK1, décrites dans un chapitre précédent (cf I.5.2). Une grande partie des études sur les fonctions des PAK dans les cancers ont été réalisées dans des cellules de cancer du sein.

Des travaux ont mis en évidence que la croissance indépendante de l'ancrage de cellules épithéliale mammaire requière une kinase PAK1 activée pour stimuler les voies MAPK et MET. Cette croissance indépendante de l'ancrage peut être induite par l'expression d'une PAK1 constitutivement active dans les cellules, et entraîne des défauts de la mitose (Howe et Juliano, 2000; Vadlamudi *et al.*, 2000). Dans les tumeurs portant des mutations de K-Ras ou B-Raf, PAK1 permet la prolifération cellulaire d'une manière indépendante, inconnue, des voies RAF/ERK/MEK ou PI3K/Akt (Tabusa, Brooks et Massey, 2013). Inversement, l'inhibition de PAK1 bloque la progression de la phase G1, en supprimant les activations de ERK et Akt par K-Ras, et l'expression d'une kinase PAK1 dépourvue d'activité kinase dans des fibroblastes permet d'empêcher la croissance indépendante de l'ancrage induite par Ras, ce qui montre bien la nécessité de l'activité kinase de PAK1 dans l'acquisition de cette propriété (Chow *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 1997). PAK1/ et 2 agirait principalement à travers les voies PI3K et JAK2/STAT5, mais aussi par la voie Wnt (Balasenthil *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2011). Ainsi, dans des cellules de schwannome, PAK2 est vitale pour la prolifération et active la voie Wnt. Les premières études sur PAK1, réalisées notamment dans le laboratoire de Rakesh Kumar, se sont focalisées sur l'activation de PAK1 par ErbB2, un de ses régulateurs (Kumar et Li, 2016). L'amplification ou la surexpression d'ErbB2 peut induire la prolifération cellulaire via l'activation de PAK1, et cette activation mène à la prolifération et la transformation cellulaire par les voies MAPK/ERK et Akt. *In vivo* l'inhibition de l'activité de PAK1 empêche cette transformation (Arias-Romero *et al.*, 2010).

Les neurofibromatoses (NF) sont causées par la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeur NF1 ou NF2. Ces maladies entraînent des tumeurs du système nerveux. Des données montrent les liens entre NF et PAK. Dans les NF, PAK1 favorise la croissance tumorale. Dans la neurofibromatose de type 2 (NF2), PAK1 et PAK2 sont suractivées. PAK1 et PAK2 phosphorylent et inhibent Merlin (Kissil *et al.*, 2002). Merlin permet l'inhibition de la croissance cellulaire en absence de signaux de croissance, et il existe une boucle de régulation négative de Merlin sur les PAK : Merlin s'associe aux PAK inactives et empêche leur activation. La phosphorylation de Merlin empêche également cette régulation (Ye et Field, 2012).

2.2 PAK et résistance à la mort cellulaire

L'inhibition de l'apoptose cellulaire est une étape indispensable de la tumorigenèse. Les PAK du groupe I peuvent y jouer un rôle à travers plusieurs substrats et voies de signalisations (cf I.4.3). Bcl-2 et Bcl-X sont des protéines proto-oncogènes. Comme décrit précédemment, BAD forme un complexe inhibiteur avec Bcl2 qui permet l'apoptose. PAK1 protège les cellules de l'apoptose de plusieurs manières : Tout d'abord, PAK1 induit la phosphorylation de Raf1, ce qui stimule sa translocation à la membrane et la formation d'un

complexe Raf1/Bcl2 qui permet la phosphorylation de BAD et inhibe l'apoptose (Jin *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2011; King, Nicholas et Wells, 2014). De plus, PAK1 favorise la survie cellulaire en phosphorylant DLC1 et BimL (Vadlamudi, Bagheri-Yarmand, *et al.*, 2004). PAK1 est donc lié à de nombreuses protéines intervenant dans la voie Bcl2 qui peuvent favoriser la survie cellulaire. L'isoforme PAK2 quant à elle peut favoriser la survie via la phosphorylation de la caspase 7, ce qui inhibe son activité et réduit l'apoptose (X. Li *et al.*, 2011). PAK2 peut également inhiber sa propre activité apoptotique en empêchant son propre clivage. Dans des modèles de cancer du sein, PAK1 pourrait inhiber une autre caspase, la caspase 3, et la polymérase PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) qui interviennent dans le déclenchement de la mort cellulaire par anoïkis. La diminution de l'activité de PAK1 initie le clivage de la caspase3 pendant l'anoïkis dans des cellules MCF10 (King, Nicholas et Wells, 2014). PAK1 est aussi impliquée dans l'augmentation de la résistance à l'apoptose à travers l'activation de la voie NFκB (cf I.4.3).

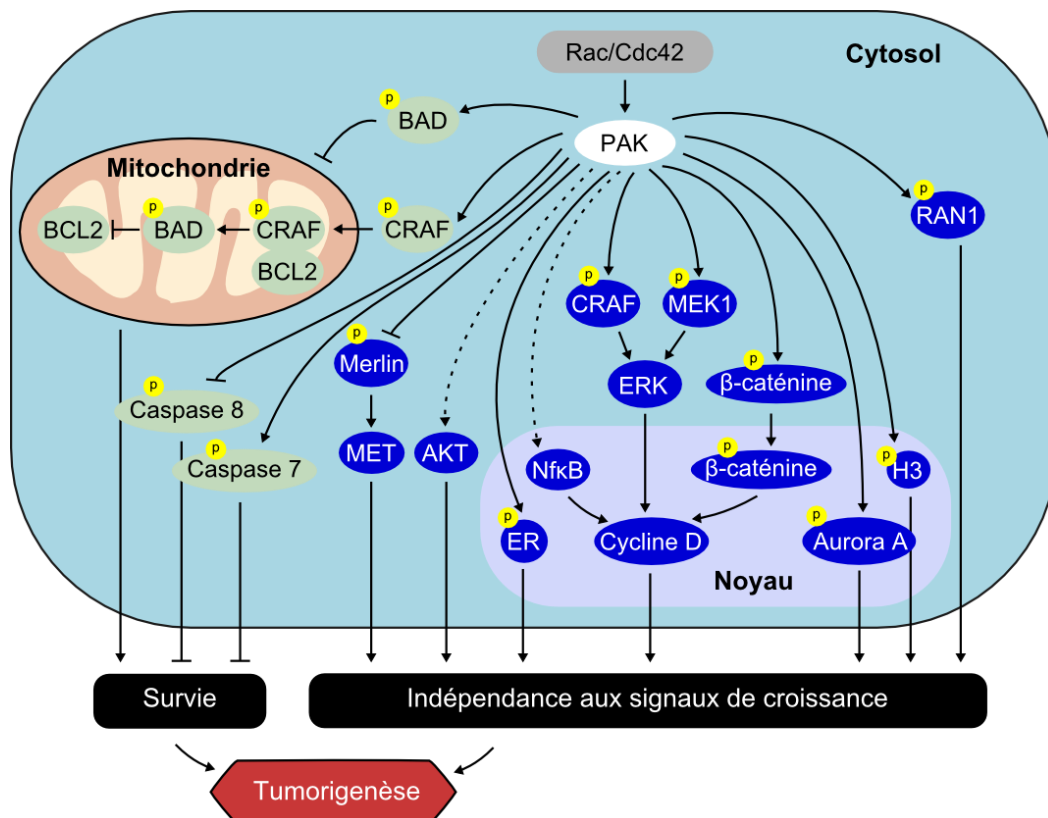


Figure 26. Implication des PAK dans les mécanismes de résistance à l'apoptose et d'indépendance aux signaux de croissances. Les flèches en pointillé indiquent que PAK est impliqué dans l'activation du substrat, mais que le mécanisme n'est pas connu. ER, oestrogen receptor; H3, histone 3; NF-κB, nuclear factor-κB; RAN1, Ras-related nuclear protein 1. D'après Radu *et al.*, 2104.

2.3 Invasion et métastase

La migration et l'invasion cellulaires sont des propriétés clés dans les mécanismes métastatiques. Elles nécessitent le remodelage du cytosquelette, la disparition des adhésions cellulaires, et le relargage de protéines qui digèrent la matrice extracellulaire. Les PAK jouent un rôle important dans la régulation de ces mécanismes, auxquels participent des GEFs, des GAPs, et des GDI qui régulent l'activité des GTPases, et des protéines agissant directement sur l'actine (cf I.4.1) Etant donné les connaissances sur l'implication des PAK dans le remodelage du cytosquelette, la stimulation de la migration et de l'invasion par PAK1 a été étudiée de manière intensive, en particulier dans le contexte du cancer du sein. La disparition des adhésions cellulaires favorise l'invasion et la métastase. En réalisant des gains et des pertes de fonction, plusieurs équipes et en particulier celle de R. Kumar, ont établi que l'inactivation de PAK par l'expression d'un dominant négatif dans des cellules diminuait leur capacité de migration et d'invasion, en favorisant entre autre la formation d'adhésions focales stables, à travers le complexe PIX/GIT1/paxilline. PAK1 peut également augmenter la motilité à travers la réduction des fibres de stress (cf I.4.1). La phosphorylation de SNAIL et CRKII par PAK1 induit l'inhibition de l'expression de la cadhérine E (Elloul *et al.*, 2010; Rettig *et al.*, 2012). Ceci favorise la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules. L'isoforme PAK2 est également impliquée dans la motilité des cellules tumorales. La diminution de l'expression de PAK2 par siRNA entraîne une augmentation de la taille des adhésions focales et une diminution de la migration cellulaire (M. Sato *et al.*, 2013). PAK1 et PAK2 augmenteraient la migration et l'invasion cellulaire en partie à travers leur capacité à activer les voies Akt et Erk (Huynh *et al.*, 2010).

L'invasion tumorale nécessite également des changements dans la matrice extracellulaire. La destruction de la matrice est contrôlée en partie par le relargage de métalloprotéases (MMP). PAK1, 2, 4 et 5 régulent l'expression des MMP dans plusieurs types de cellules cancéreuses. L'augmentation des MMP serait due à l'activation de JNK par les PAK (Radu *et al.*, 2014). Ceci est en accord avec le résultat de la suppression de l'expression de PAK1 dans des cellules de cancer de la prostate, qui est associée à une motilité et une sécrétion de MMP6 réduite (Goc *et al.*, 2013; Rider, Oladimeji et Diakonova, 2013).

2.4 Angiogenèse et vascularisation

L'angiogenèse et la vascularisation reposent pour la plus grande partie sur les mécanismes de migration des cellules endothéliales et des fibroblastes. Etant donné les fonctions des PAK dans ces mécanismes, il n'est pas surprenant qu'elles soient impliquées dans l'angiogenèse. Rac1 et Cdc42 ont été associés avec la formation des vaisseaux sanguins, avec la prolifération et la migration des cellules vasculaires. Il n'a pas encore été démontré si ces effets sont dus à une voie de signalisation passant par PAK. Cependant les KO de *PAK2* et *PAK4* sont létaux au stade embryonnaire en raison de défauts de développement des organes, et la délétion de *PAK2* au niveau endothélial est létale et entraîne des défauts de la formation des vaisseaux sanguins (Leung et Jia, 2016). Il n'y a pas de phénotype vasculaire, c'est-à-dire aucun défaut de la vascularisation, sur les modèles de KO *PAK1* et *PAK3*, mais ces kinases sont peu

exprimées dans les cellules endothéliales où PAK2 est l'isoforme dominante (Radu *et al.*, 2014). Dans un autre modèle, *Danio rerio* (poisson-zèbre), les mutations inactivatrices de PAK2 entraînent l'apparition d'hémorragies cérébrales (Buchner *et al.*, 2007). Dans les modèles de KO de Rac et Akt, la surexpression d'une forme constitutivement active de PAK1 est suffisante pour rétablir la migration des fibroblastes et des cellules endothéliales (Maroto *et al.*, 2008; Somanath *et al.*, 2009). À l'inverse, l'inhibition de PAK1 réduit la motilité de ces cellules et l'angiogenèse (Kiosses *et al.*, 1999, 2002). Les PAK sont également des régulatrices de la perméabilité de la barrière endothéliale. La régulation de l'activation de la VE-cadhérine par la voie Rac-PAK stabilise ou déstabilise les jonctions endothéliales. En 2015, l'équipe de Chernoff a démontré que la délétion spécifique de PAK2 dans les cellules endothéliales était létale au stade embryonnaire chez la souris. PAK2 est indispensable à l'angiogenèse et la maintenance de la barrière endothéliale à travers une voie Bmk1/Erk5 (Radu *et al.*, 2015).

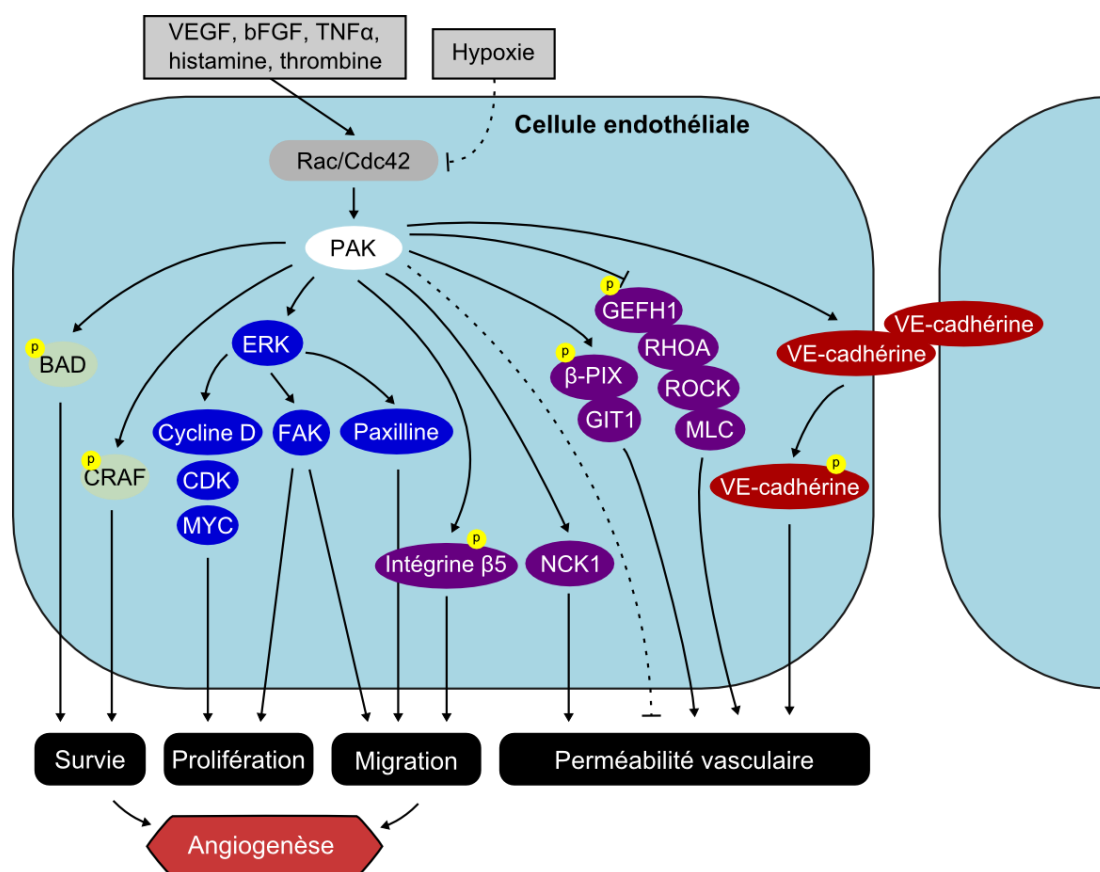


Figure 27. Implication de la signalisation PAK dans l'angiogenèse et la modulation de la perméabilité vasculaire. Les PAK contrôlent des mécanismes cellulaires cruciaux pour l'angiogenèse, comme la prolifération, la survie, les adhésions et la survie des cellules endothéliales. Dans les cellules endothéliales, la phosphorylation de BAD et CRAF par PAK protège la cellule contre l'apoptose et la voie Rac-PAK-ERK régule la prolifération et la migration. Le contrôle de la perméabilité vasculaire est réalisé par la modulation de la contractilité et des adhésions cellule-cellule. La phosphorylation de la VE-cadhérine entraîne son internalisation et sa dégradation. bFGF, basic fibroblast growth factor; CDC42, cell division control protein 42; CDKs, cyclin-dependent kinases; FAK, focal adhesion kinase; GIT1, ARF GTPase-activating protein; NCK1, NCK adaptor protein 1; TNFα, tumour necrosis factor-α; VEGF, vascular endothelial growth factor.

3. PAK et gliomes

L'expression et les fonctions des PAK du groupe I dans les tumeurs cérébrales ont été peu étudiées, alors qu'il existe quelques données concernant les PAK du groupe II : Dans les gliomes, la surexpression de PAK4 est associée à un grade avancé de la tumeur, et favorise la métastase et la résistance à l'anoïkis et à la sénescence (Kesanakurti *et al.*, 2012; Franovic *et al.*, 2015), la surexpression de PAK5 favorise la croissance tumorale (Gu *et al.*, 2015). La première et unique étude s'étant intéressée aux PAK du groupe I a été réalisée par Aoki et collègues en 2007. Cette étude réalisée sur 136 patients atteints de glioblastome met en évidence une corrélation entre la présence d'une protéine PAK1p dans le cytoplasme des cellules tumorales et un mauvais pronostic. La suppression de l'expression de PAK1 par siRNA n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire mais diminue la capacité des cellules à envahir le tissu environnant (Aoki *et al.*, 2007). Il n'existe aucune étude rapportant la mutation ou la surexpression/suractivation de PAK3 dans les gliomes. Récemment, une étude a suggéré l'implication de PAK1 dans le développement d'un glioblastome après un traitement par du Fingolimod, un agent pharmaceutique utilisé dans le traitement de prévention des récives de la sclérose en plaque (Sharim *et al.*, 2016).

Si les PAK du groupe I n'ont été que peu étudiées en elles-mêmes dans les gliomes, les voies qu'elles régulent ou qui les régulent l'ont été. Il existe plusieurs preuves de l'implication de la voie PI3K/Akt dans la croissance tumorale des gliomes, de la dérégulation des voies ERK/MAPK et NFκB, et de celle de Rac1 (Voir Gliomes III). Rac1 favorise le maintien des cellules souches de cancer. En effet l'utilisation de siRNA dirigés contre *Rac* diminue l'auto-renouvellement des cellules, leur propriété invasive, et la formation de tumeurs après injection sous-cutanées chez la souris (Yoon *et al.*, 2011). Dans une autre étude, la suppression de l'activité de Rac1 par l'utilisation d'un dominant négatif induit l'apoptose dans des lignées cellulaires de glioblastome et d'oligodendrogliome, et non celle de cellules astrocytaires normales (Senger *et al.*, 2002).

4. Inhiber les PAK du groupe I dans les cancers

Le lien entre PAK et cancer a motivé la recherche et le développement d'inhibiteurs des kinases PAK. La difficulté principale dans le développement d'inhibiteurs de protéines kinases spécifiques est la forte conservation du domaine catalytique. Même si certains inhibiteurs de kinases, comme l'imatinib mesylate (Glivec®), sont des succès pharmaceutiques, la plupart ciblent un grand nombre de kinases différentes et entraînent des effets secondaires importants. Le développement d'inhibiteurs spécifiques d'isoforme est rendu très difficile par la forte similarité structurale entre les isoformes des PAK. Différents inhibiteurs ont été générés, en utilisant des stratégies différentes (Coleman et Kissil, 2012).

4.1 Les inhibiteurs compétitifs de l'ATP

Ces inhibiteurs ciblent le site de liaison à l'ATP. Plusieurs composés ont été identifiés, mais ce type d'inhibiteur manque de spécificité et inhibe un trop grand nombre de kinases pour être utilisé en thérapie. Les plus connus des inhibiteurs pan-kinases ayant une forte activité sur PAK1 sont le CEP-1347, un dérivé de la staurosporine, et l'OSU-03012, dérivé du celecoxib (Coleman et Kissil, 2012). L'OSU-03012, un inhibiteur de PDK1, s'est révélé efficace pour diminuer la phosphorylation de PAK1. Parmi les inhibiteurs créés pour être spécifiques des PAK, un seul a été testé chez les patients. Le PF-3758309 de Pfizer, un inhibiteur réversible des PAK des groupes I et II, s'est révélé efficace pour diminuer la croissance de plusieurs types de cellules tumorales (Murray *et al.*, 2010). Ce composé a été testé en phase clinique de type I, mais ce test n'a pas été mené à son terme à cause d'effets secondaires non désirés et d'un manque d'efficacité. Un autre inhibiteur, FL172, s'est révélé posséder une certaine spécificité envers les PAK du groupe I par rapport aux PAK du groupe II en raison de la taille imposante de son groupement métallique s'adaptant à la poche de liaison à l'ATP de PAK1 (Maksimoska *et al.*, 2008). Cependant ce type de composé ne peut être utilisé *in vivo* en raison de sa toxicité. Le FRAX597, d'Afraxis, permet l'inhibition des PAK du groupe I *in vitro*, ce qui entraîne la diminution de la croissance tumorale d'un modèle de schwannome (Licciulli *et al.*, 2013).

4.2 Les inhibiteurs allostériques

Les mécanismes de régulation de l'activité des PAK du groupe I permettent le développement d'inhibiteurs allostériques. Un inhibiteur allostérique régule l'activité d'une protéine en se liant à un site différent des sites catalytiques. Cette approche permet une plus grande spécificité des inhibiteurs et a été utilisée pour la création de l'IPA-3 par le Fox Chase Cancer. L'IPA-3 est spécifique des PAK du groupe I par rapport aux PAK du groupe II et a une action limitée sur les autres kinases, car cette petite molécule cible le mécanisme de régulation par l'AID (Deacon *et al.*, 2008). L'IPA-3 empêche l'auto-phosphorylation de PAK1 déclenchée par la liaison d'une GTPase en se liant de manière covalente au domaine régulateur (Viaud et Peterson, 2009). Cependant, même si cet inhibiteur est utilisé *in vitro* avec succès, il est peu probable qu'il devienne un agent thérapeutique. Sa composition est peu propice à une utilisation chez les patients, en raison de son instabilité après délivrance par voie orale. Des dérivés de ce composé ont été récemment créés, mais il n'existe que peu de données sur l'inhibition spécifique des PAK chez l'humain à l'heure actuelle.

4.3 Autres inhibiteurs

D'autres types de molécules ont été générés pour inhiber les PAK du groupe I. Elles sont principalement utilisées pour l'étude des PAK *in vitro* en raison des difficultés de délivrance de la molécule chez les patients. Tout d'abord des peptides sont utilisés, comme le peptide inhibiteur AID, qui a malheureusement des effets secondaire indépendants des PAK, et le peptide TAT-PAK18, pouvant pénétrer la membrane cellulaire (Hashimoto *et al.*, 2010). Une

autre approche est l'utilisation d'ARN interférents. Mais se pose toujours la question de la délivrance et de la stabilité de l'inhibition du gène.

Même si les PAK sont maintenant clairement identifiées comme des cibles thérapeutiques intéressantes, leur inhibition reste problématique. En raison de leurs distributions et de leur spécificité de substrats, inhiber toutes les PAK peut donner lieu à de nombreux effets secondaires, comme cela a été observé pour le PF-3758309. Il est donc nécessaire de mettre au point des composés inhibant de manière spécifique les différents isoformes. Les inhibiteurs fonctionnant de manière allostériques semblent les plus prometteurs.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les p21-activated kinases (PAK) interviennent dans de nombreux processus biologiques allant de la régulation de la dynamique du cytosquelette et de la motilité à la tumorigenèse et la survie cellulaire. La plupart des fonctions biologiques des kinases PAK du groupe I ont été décryptées par l'utilisation du domaine auto inhibiteur de PAK1 et il existe peu d'études spécifiques des autres isoformes des PAK du groupe I et en particulier de PAK3. Dans le contexte de la physiopathologie des gliomes, les kinases PAK1 et PAK3 pourraient jouer des rôles différents. *PAK1* est un oncogène souvent sur-activé et surexprimé dans différents types de cancers et est intimement lié à la progression tumorale et la résistance aux thérapies. En effet de nombreux substrats identifiés de PAK1 sont impliqués dans des voies de signalisation mitogènes, angiogéniques et métastatiques. Ces données et la place de PAK1 comme acteur centrale de voies de signalisation en font une cible très attractive pour les thérapies anti cancéreuses. A l'inverse, PAK3 est plutôt impliqué dans les mécanismes de différenciation et de sortie de cycle, et aucune étude n'a relié son amplification ou sur-activation avec la progression tumorale.

Les kinases PAK possédant de fortes identités de séquences, il est généralement admis qu'elles possèdent des fonctions similaires et des substrats identiques. Toutefois, dans les gliomes, très peu d'études se sont concentrées sur les kinases PAK et plusieurs arguments nous permettent de proposer un rôle de PAK3 très différent de celui de PAK1 dans l'oncogénèse.

Mon travail de thèse a donc consisté à explorer la possibilité que la kinase PAK3 inhibe la prolifération des cellules et ralentirait la croissance tumorale, en contrôlant la transition post-mitotique des cellules immatures des gliomes. *PAK3* posséderait dans ce cas certaines caractéristiques de gène suppresseur de tumeur, ce qui l'opposerait à l'oncogène *PAK1*. Mon objectif était d'amorcer l'étude des rôles respectifs des kinases PAK1 et PAK3 dans la physiopathologie des gliomes malins.

Mon travail a consisté tout d'abord en l'étude de l'expression des PAK dans les gliomes humains. La seconde partie de mon travail a été réalisée sur des lignées de cellules de gliomes. J'ai d'abord caractérisé le phénotype de ces lignées, avant de m'intéresser aux variations de l'expression de PAK1 et PAK3 au cours de la différenciation des cellules de gliome *in vitro*. Enfin j'ai entamé l'étude du rôle de PAK3 par gain et perte de fonction en réalisant la suppression de son expression dans ces cellules.

RESULTATS

RESULTATS

1. Expression des PAK dans les gliomes

1. Expression des PAK dans les tumeurs

Nous avons débuté notre travail par l'observation des niveaux d'expression des gènes des p21-activated kinases du groupe I dans plusieurs types de tumeurs ainsi que dans du cerveau normal. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R2 (Genomic analysis and Visualization platform <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) de la plateforme d'analyse de l'Academic Medical Center (AMC) sur les données mesurées par puces Affymetrix issues de plusieurs études.

Au contraire de *PAK2*, *PAK1* et *PAK3* sont plus fortement exprimés dans le cerveau sain que dans les tumeurs (Figure 28.a), ce qui est probablement dû à la différence de composition en cellules neuronales et gliales entre ces tissus, *PAK1* et *PAK3* étant peu exprimés dans les cellules astrocytaires (Cahoy *et al.*, 2008; Kreis et Barnier, 2009). La base de données de RNAseq établie par Zhang *et al.*, nous a permis de comparer l'expression de *PAK1*, *PAK2* et *PAK3* entre les types cellulaires du cerveau de souris (Figure 28.b) ; 2014, http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html). Comme décrit précédemment, *PAK1* et *PAK3* ne sont que peu ou pas exprimés dans les astrocytes et les cellules endothéliales, au contraire de *PAK2*. *PAK3* a l'expression la plus restreinte. Il est principalement exprimé dans les neurones, puis dans les OPC et les oligodendrocytes néoformés. L'expression de *PAK3* diminue donc au cours de la différenciation des oligodendrocytes. *PAK1* est exprimé de manière équivalente dans les différents types de tumeurs, et pour un même type de tumeur son expression varie peu entre individus. L'expression de *PAK2* est assez homogène, il est surexprimé dans tous les types de tumeurs par rapport au cerveau normal. A l'inverse, *PAK3* est plus fortement exprimé dans les tumeurs du système nerveux, les gliomes et les neuroblastomes, et pour chaque type de tumeur les valeurs sont très dispersées, la plus grande variabilité étant observée pour les gliomes (Figure 28.a). Les gliomes sont des tumeurs très hétérogènes que ce soit au niveau inter comme intra-tumoral. Sachant que *PAK3* est préférentiellement exprimé dans les cellules neurales, la dispersion de ses données d'expression pourrait refléter les différences de composition cellulaires entre tumeurs. **L'expression de *PAK3* pourrait donc être un paramètre discriminant pour différencier des sous-types de gliomes.** L'expression de certains gènes exprimés préférentiellement dans des types cellulaires particuliers a également été analysée (Figure 28.c). Il s'agit de gènes neuronaux (*DCX*, *CAMK2*) ainsi que des gènes exprimés par les cellules de type glial (*S100 β* , *GFAP*, *OLIG2*), et le marqueur nestine (NES) de cellule souche neurale. Les gènes *GFAP* (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), astrocytaire *S100 β* (*S100 Calcium-Binding protein β*) et oligodendrocytaire *OLIG2* (*oligodendrocyte transcription*

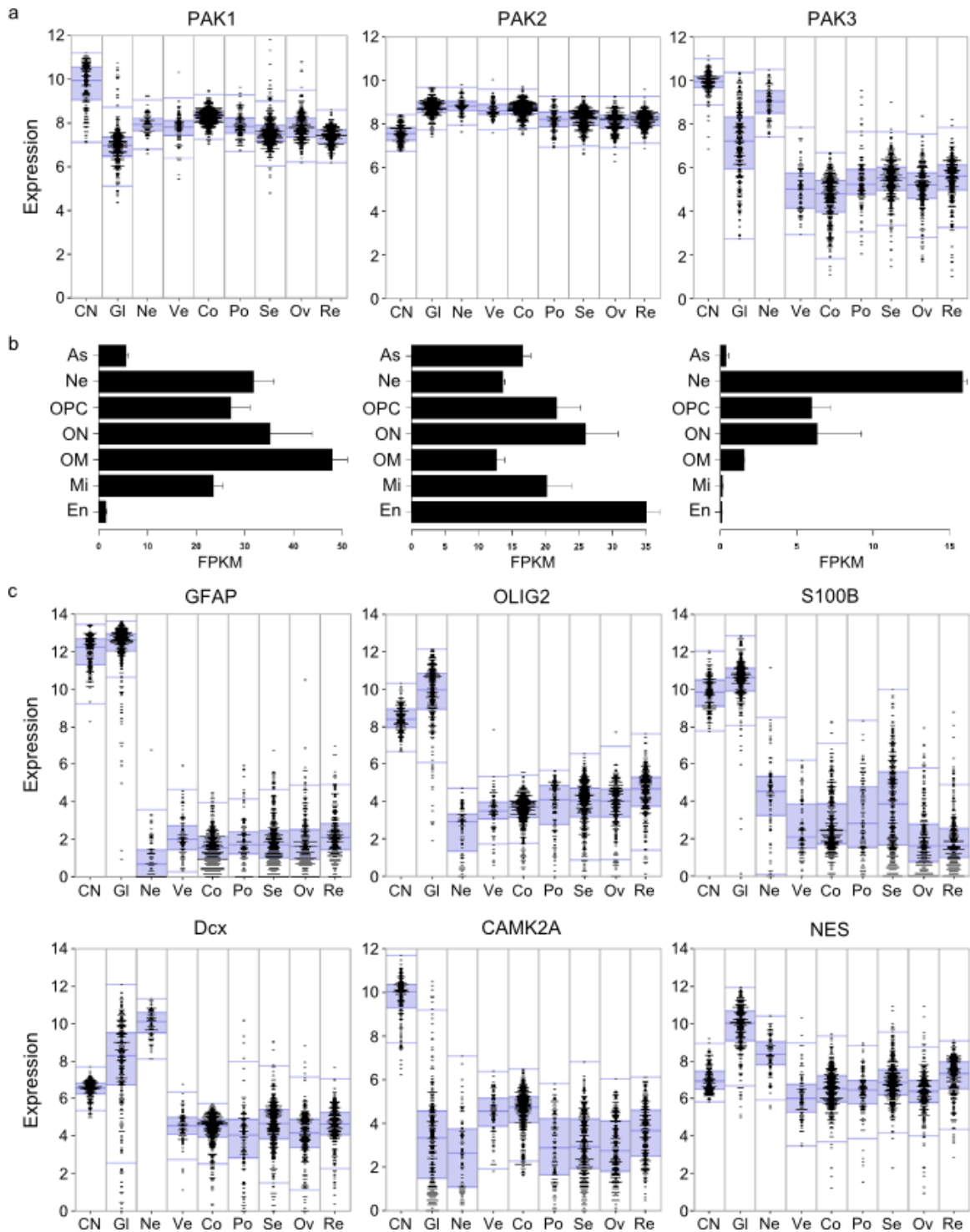


Figure 28. Expression des PAK dans les tumeurs. (a) et (c) Box plots d'expression de gènes dans des tumeurs. Pucés Affymetrix (sonde u133p2, représentation en log2). Academic Medical Center database (AMC). Données extraites des cohortes suivantes : cerveau normal (CN, Berchtold, n = 172) ; gliome (GI, French, n = 284) ; neuroblastome (Ne, Versteeg, n = 88) ; vessie (Ve, Riestter, n = 93) ; côlon (Co, Sieber Smith, n = 355) ; poumon (Po, Expo, n = 114) ; sein (Se, Bos, n = 204) ; ovaire (Ov, Expo, n=256) ; rein (Re, Expo, n = 261). (b) Expression des gènes PAK analysée par RNAseq, données obtenues par Zhang et al., (2014), FPKM = Fragments Per Kilobase Million, à partir d'astrocytes (As), neurones (Ne), OPC, oligodendrocytes nouvellement formés (ON), oligodendrocytes myélinisants (OM), microglie (Mi), cellules endothéliales (En)

factor 2) sont exprimés dans les gliomes à des niveaux élevés, ce qui est dû à la composition cellulaire majoritairement gliale de ces tumeurs. Le gène *NES* est plus fortement exprimé dans les gliomes, alors que les gènes *CAMKII* ou *CALB1* (*Calbindine 1*, non montrée) sont très peu exprimés dans tous les types de tumeurs. Il est intéressant de constater que, dans les gliomes, la dispersion des valeurs mesurées par individu pour le gène *PAK3* est similaire à celle observée pour *DCX* (*doublecortine*) marqueur précoce neuronal. Ceci conforte l'hypothèse que le niveau d'expression de *PAK3* pourrait être relié à l'état de différenciation neuronale des cellules de la tumeur.

2. Expression des PAK et survie des patients

Nous avons ensuite observé le lien entre le niveau d'expression d'une PAK dans la tumeur et la survie du patient (Figure 29). Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R2 sur les données de la cohorte de gliomes French issues de l'étude de Gravendell *et al.*, (Can. Res. 2009). La cohorte de patients est divisée selon l'expression du gène étudié (forte expression en **bleu**, faible expression en **rouge**), de manière à créer deux groupes de patients ayant des survies le plus statistiquement différentes possible. La technique utilisée est celle du « scan », qui détermine la valeur d'expression de séparation des deux groupes (cut-off) en fonction de la p-value associée à cette valeur, déterminée par test du log-rank. La valeur de cut-off choisie est celle associée à la meilleure p-value, et deux courbes de Kaplan Meier sont réalisées. Aucune valeur d'expression de *PAK2* ne permet d'obtenir deux groupes de patients avec des survies significativement différentes (Figure 29). Ceci pourrait indiquer que *PAK2* n'a pas de fonction biologique particulière dans un type de gliome. Les deux courbes de survie obtenues sont significativement différentes pour *PAK1* et *PAK3*, et l'on peut observer une relation entre l'expression du gène et la survie, négative pour *PAK1* et positive pour *PAK3* (Figure 29). Ces relations entre l'expression de *PAK* dans la tumeur et la survie sont observables également lorsque l'on s'intéresse à des sous-types de gliomes. Que le sous-groupe de tumeurs soit défini par un critère histologique, comme le grade, ou un critère moléculaire (amplification de l'*EGFR*, codélétion 1p/19q), les relations entre survie et expression des gènes *PAK1* et *PAK3* dans la tumeur restent les mêmes : une forte expression de *PAK1* est liée à un mauvais pronostic, alors qu'une forte expression de *PAK3* est associée à une meilleure survie (Courbes non montrées). Cette constance du résultat selon le groupe de tumeurs sélectionné suggère que l'expression des PAK pourrait être un critère pronostic indépendant. **Les relations opposées obtenues entre survie et expression supportent l'idée de deux rôles opposés de PAK1 et PAK3 dans la physiopathologie des gliomes.**

3. Expression de PAK3 et groupes moléculaires et histologiques

L'analyse de l'expression de *PAK1* et *PAK3* par RT-qPCR dans une cohorte de 135 gliomes de patients de la Pitié-Salpêtrière a été réalisée par Vincent Gleize à l'Institut de la Moelle et du Cerveau (Equipe Marc Sanson, ICM). Nous avons ainsi pu observer les différences d'expression des PAK dans les tumeurs groupées en fonction de critères

histologiques ou moléculaires. *PAK1* et *PAK3* sont plus faiblement exprimés dans les gliomes par rapport à du cerveau épileptique (Figure 30 b), en accord avec les résultats obtenus par puce (Figure 28 a). Dans la base de données French de l'AMC, l'expression de *PAK1* ou *PAK3* est liée au pronostic (Figure 29). Nous avons donc examiné la possibilité que les expressions de *PAK1* et *PAK3* soient associées à des sous-groupes ou des caractéristiques de plus ou moins bon pronostic dans la cohorte de l'ICM.

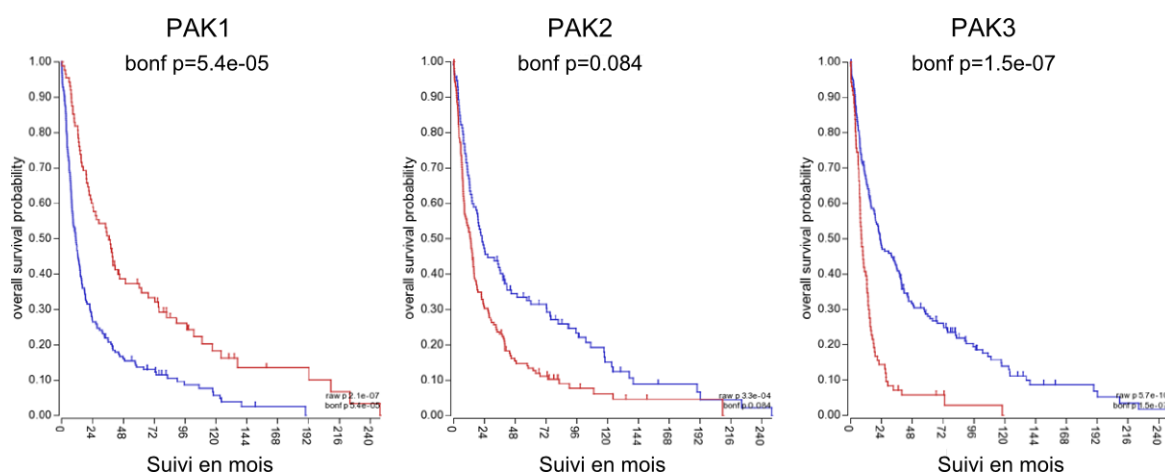


Figure 29. Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie globale des patients atteints de gliome en fonction de l'expression des PAK dans la tumeur. Données issues de l'AMC, cohorte French, n=284). Les courbes sont réalisées à l'aide du logiciel R2 de l'AMC, le cutt-off est déterminé par la méthode scan qui choisit la valeur associée à la meilleure p-value. Test du logrank avec correction de bonferroni pour comparaisons multiples.

3.1 Association avec des critères histologiques

Nous avons d'abord analysé l'expression de *PAK1* et *PAK3* dans les tumeurs réparties en fonction de leur grade. Bien que les expressions de *PAK1* et *PAK3* soient légèrement augmentées dans les gliomes de grade II par rapport aux autres grades, la différence n'est pas significative (Figure 30 a). Le grade étant déterminé par la présence d'atypies nucléaires, de nécrose et de néo-vaisseaux (prolifération endothéliale), les mécanismes de mort cellulaire et d'angiogenèse ne dépendent peut-être pas de l'expression de *PAK1* et *PAK3* dans les gliomes. Dans cette même cohorte, les gliomes ont été répartis selon leur grade et leur type histologique (Figure 30 b). Ceci nous a permis de comprendre que la plus forte expression de *PAK3* et *PAK1* observée dans les gliomes de grade II était due majoritairement aux oligodendrogliomes de grade II. Cependant, alors que l'expression de *PAK1* est légèrement plus importante dans toutes les tumeurs de grade II par rapport aux tumeurs de grade III et IV, il n'en est pas de même pour *PAK3*. Dans cette cohorte, il existe une augmentation de l'expression de *PAK3* dans les oligodendrogliomes, qu'ils soient de grade II ou III, par rapport aux autres types histologiques. Il est intéressant de noter que le niveau d'expression de *PAK3* est aussi important dans les oligodendrogliomes de grade II et III que dans du cerveau

contrôle épileptique (Figure 30 b). Aucune différence n'est significative, ce qui est probablement dû au faible nombre de patients par groupe, mais ces résultats suggèrent une relation entre le phénotype oligodendrocytaire et l'expression de *PAK3*.

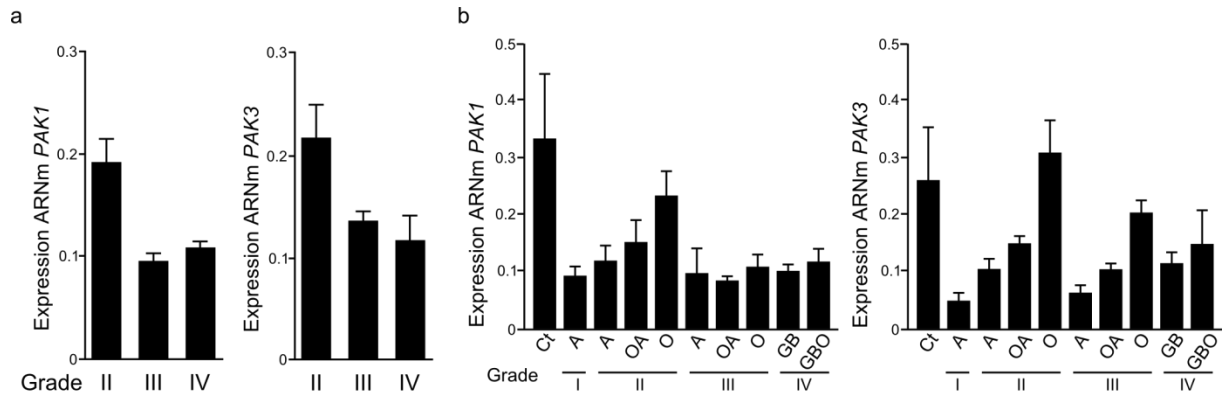


Figure 30. Expression des PAK dans des gliomes répartis selon des critères histologiques. Expression de *PAK1* et *PAK3* analysée par qPCR dans des gliomes répartis selon le grade (a) ou selon le type histologique et le grade (b). n = 135, cohorte de l'ICM. Ct, cerveau épileptique ; A, astrocytome ; OA, oligoastrocytome ; O, oligodendrogliome ; GB, glioblastome ; GBO, glioblastome à composante oligodendrocytaire.

3.2 Association avec des critères moléculaires

Les gliomes sont maintenant caractérisés plus précisément par des critères moléculaires, la présence de certaines altérations ayant une valeur pronostique. Nous avons examiné la possibilité que l'expression de *PAK1* ou *PAK3* soit associée à certaines altérations dans les gliomes dans une cohorte de 259 gliomes de grade II et III de la Pitié Salpêtrière. Le statut de mutation du gène *IDH* (statut *IDH*) ainsi que la présence de la codélétion 1p/19q, deux altérations de bon pronostic, sont connues dans ces gliomes. Le meilleur pronostic est associé à la présence de la codélétion 1p/19q sachant que la plupart des gliomes 1p/19q sont *IDH* mutés. Alors que *PAK1* est exprimé à des niveaux similaires dans les différents sous-types de gliomes, l'expression de *PAK3* varie en fonction de la présence de la codélétion 1p/19q (Figure 31 a). Dans les gliomes de grade II et III, l'expression de *PAK3* est plus importante dans les tumeurs possédant une codélétion 1p/19q. Cette surexpression est indépendante du statut *IDH*, car les gliomes non codélétés expriment *PAK3* à des niveaux similaires qu'ils soient *IDH* muté ou non muté, en absence de codélétion (Figure 31 b). Les résultats obtenus dans cette cohorte soutiennent la corrélation entre l'expression de *PAK3* et un meilleur pronostic dans les gliomes observée dans l'analyse des données de l'AMC.

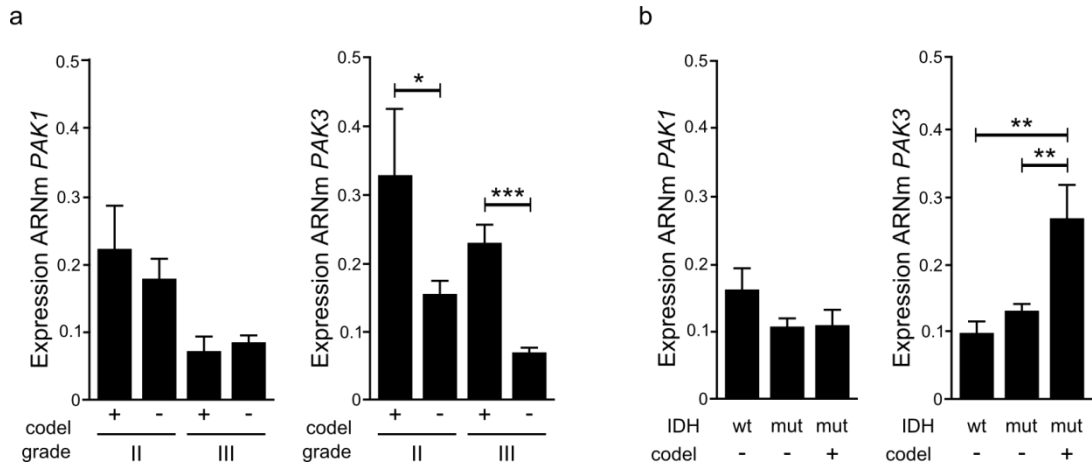


Figure 31. Expression des PAK dans des gliomes répartis selon des critères moléculaires. Expression de *PAK1* et *PAK3* analysée par qPCR dans des gliomes en fonction de la présence de la codélation 1p/19q et du grade (a), et en fonction de la présence d'une mutation IDH et/ou de la présence de la codélation (b). n = 135, cohorte de l'ICM

3.3 Confirmation des résultats dans une autre base de données

L'association de l'expression de *PAK3* avec la présence de certaines caractéristiques moléculaires et histologiques a été confirmée dans la base de données de l'AMC (Figure 32). Tout d'abord l'expression de *PAK3* la plus importante est retrouvée dans les gliomes avec une composante oligodendrocytaire, alors que l'expression de *PAK1* ne varie pas selon le type histologique de la tumeur. Ceci confirme le lien entre l'expression de *PAK3* et une composante cellulaire oligodendrocytaire dans la tumeur. Ensuite, l'expression de *PAK3* est plus importante dans les gliomes possédant la codélation 1p/19q. A l'inverse, l'expression de *PAK3* est plus faible dans les gliomes avec une amplification de l'*EGFR*. La codélation 1p/19q et l'amplification de l'*EGFR* étant mutuellement exclusives, l'expression de *PAK3* plus importante dans les gliomes *EGFR* wt pourrait être due aux gliomes 1p/19q contenus dans ce groupe. De manière inattendue, l'expression de *PAK1* est plus faible dans les gliomes avec amplification de l'*EGFR*. Il est intéressant de noter que le gène *PAK3* fait partie de la signature proneurale des gliomes de haut grade définie par Phillips *et al.* Dans cette étude réalisée en 2006, les gliomes proneuraux sont des gliomes de haut grade de meilleur pronostic que les gliomes des autres signatures moléculaires (Phillips *et al.*, 2006).

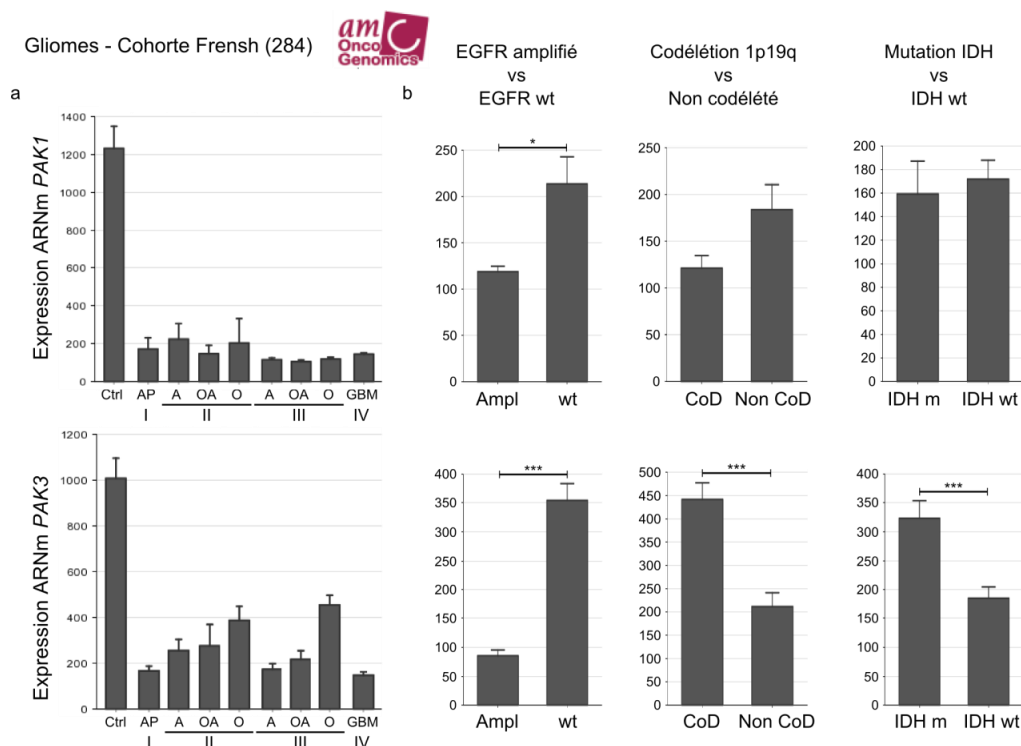


Figure 32. Analyse de l'expression de PAK1 et PAK3 dans les gliomes de la cohorte French. Données issues de l'AMC, n=284). L'expression de PAK1 et PAK3 est analysé dans les gliomes répartis en fonction de leur type histologique (a), ainsi qu'en fonction de la présence ou non d'altérations moléculaires (b). Ampl, amplification de l'EGFR ; wt, EGFR non muté ; CoD, présence de la codéletion 1p/19q ; Non CoD, pas de codéletion. Les grades sont indiqués en chiffres romains.

II. Caractérisation des lignées cellulaires de GBM

Ce travail de caractérisation de l'expression de PAK1 et PAK3 dans les gliomes nous ayant permis d'identifier un lien entre pronostic, sous-type de gliomes, et expression des PAK, nous avons ensuite réalisé une étude *in vitro* sur des lignées de cellules de GBM pour chercher à comprendre le rôle de PAK3 dans ces cellules.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié 3 lignées cellulaires de GBM isolées à partir de tumeurs humaines :

- Les trois lignées présentent une perte de 10q
- Les lignées 3731a et 3731b expriment la forme tronquée constitutivement active du récepteur à l'EGF (EGFRvIII), 3731b étant une lignée clonale dérivée de la lignée 3731a.
- La lignée 4371 possède une amplification de l'EGFR.

Ces trois lignées ont été générées par l'équipe du Pr.Sanson (ICM) à partir de glioblastomes de patients de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Ces cellules sont capables de générer une tumeur ressemblant histologiquement à un GBM après une greffe orthotopique dans des souris SCID. En présence de sérum, ces cellules sont capables d'exprimer les protéines Tuj1, O4 et GFAP. Elles possèdent donc les caractéristiques de cellules souches initiatrices de gliomes : multipotence, auto-renouvellement, et formation de tumeur chez l'animal. (S. Nwagby-Bikeye, thèse, (Bikeye *et al.*, 2010)).

1. Caractéristiques prolifératives des cellules en condition non adhérente

Nous avons d'abord caractérisé ces lignées en culture non adhérente de gliomasphères. Les lignées de GBM sont établies à partir de tumeurs de patients en utilisant la technique de mise en culture des cellules souches neurales mise au point chez la souris (Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004). Les lignées de cellules de GBM dérivées de tumeurs et entretenues en culture non adhérente, en présence de facteurs de croissance, sont considérées comme un modèle plus adéquat que les lignées de cellules adhérentes entretenues en présence de sérum. Ces cellules conservent les caractéristiques génétiques et phénotypiques de la tumeur originelle et forment des tumeurs similaires à la tumeur originelle après greffe orthotopique chez la souris (J. Lee *et al.*, 2006). Les cellules d'une sphère ne sont pas homogènes, leur environnement est différent selon qu'elles se trouvent au centre ou en contact direct avec le milieu de culture. Il existe donc des cellules plus ou moins différenciées et une certaine quantité de mort cellulaire au cœur de la sphère, mais cela est également le cas dans une tumeur (Galli *et al.*, 2004; J. Lee *et al.*, 2006; Pollard *et al.*, 2009).

Tout d'abord nous nous sommes intéressés à la capacité des cellules à former des sphères. Dans une culture non adhérente, seule une partie des cellules a la capacité de s'auto-renouveler. Cette capacité a été évaluée par le calcul du pourcentage de cellules capables de donner naissance à une sphère après dissociation et ensemencement à faible densité, ce qui permet d'estimer la proportion de cellules souches dans une culture. De manière surprenante, c'est la lignée de cellules 4371 qui possède le plus fort taux de cellules capables de former des sphères (~20%), et la lignée 3731a qui a le taux le plus faible (~10%) (Figure 33 a). Ces valeurs sont dans l'ordre de grandeur des résultats obtenus par Cusulin et collègues sur de nombreuses autres lignées, pour lesquelles les taux de cellules capables de reformer des sphères varient entre 7.8% et 22.3% (Cusulin *et al.*, 2015).

La capacité de prolifération est distincte de la capacité d'auto-renouvellement, une cellule quiescente est capable de donner des sphères mais prolifère peu. Nous avons estimé la vitesse de prolifération de nos cellules par plusieurs techniques. D'abord nous avons réalisé une courbe de prolifération pour chaque lignée. Les cellules sont dissociées, ensemencées en flacons puis comptées après 1, 4 et 7 jours de culture. Les cellules 3731a et 3731b possèdent des taux de prolifération similaires, alors que celui des cellules 4371 est plus faible (Figure 33 b). Pour compléter cette analyse, les cellules ont été ensemencées à 2.10^5 cellules/ml dans du DMEM/F12 et la taille des sphères obtenues mesurée 5 et 7 jours après ensemencement. Les

lignées 3731a et b forment des sphères de tailles similaires, plus grandes que celles formées par les cellules de la lignée 4371. Cependant, alors que les sphères formées par la lignée 3731b sont de tailles plutôt homogènes, ne variant que peu selon l'expérience, la grosseur des sphères 3731a varie beaucoup, notamment à cause de leur tendance à s'agréger à partir d'une certaine taille, entraînant la formation de sphères particulièrement grosses sans forcément qu'il y ait un lien avec la prolifération cellulaire (Figure 33 c et d). Cette tendance à s'agréger est un problème rencontré fréquemment qui peut impacter certaines expériences reposant sur une prolifération clonale (Singec *et al.*, 2006). Une des hypothèses permettant d'expliquer le fait que les cellules 4371 sont capables de former plus de sphères, mais plus petites, serait que cette lignée compte beaucoup de cellules type 'progénitrices', encore capable de réaliser un nombre de cycle limité, et peu de cellules capable de proliférer indéfiniment, au contraire des cellules 3731a et b.

Les cyclines et CDKI ont une expression variable selon les phases du cycle cellulaire, les cyclines D permettent l'entrée en phase S, et une expression forte de *p27* indique un arrêt du cycle. Nous avons analysé l'expression de la cycline D1 (*CcnD1*) et de *p27* par qPCR (Figure 33 e). Les cellules 4371 expriment *p27* de manière plus importante que les cellules 3731a et b, ce qui pourrait indiquer un nombre de cellules non prolifératives plus important, en accord avec l'index prolifératif (Figure 33 b). Il est également intéressant de noter que les cellules 4371 sont plus difficiles à dissocier que les cellules 3731a ou b, ce qui pourrait indiquer un potentiel migratoire, et donc métastatique, moindre. A l'inverse, les cellules 3731a sont très mobiles.

Ces premiers résultats permettent déjà de distinguer deux profils différents parmi ces lignées cellulaires de GBM : Les lignées 3731 sont hautement prolifératives et forment des sphères plus grosses, au contraire de la lignée 4371 qui prolifère moins, mais dont le taux de cellules capables de former des sphères est plus important. Ces deux types de lignées correspondent aux deux groupes décrits par Cusuline et collègues. Cette étude décrit deux groupes de phénotypes différents parmi les lignées cellulaires de gliomes, respectivement nommés PL (Progenitor-like) et SL (Stem-like). Les lignées de type SL sont des lignées moins prolifératives, moins tumorigènes une fois greffées chez l'animal, et leur profil d'expression de gènes correspond à celui trouvé dans les tumeurs proneurales de la classification de Verhaak. A l'inverse les cellules PL sont fortement prolifératives, ont un taux de cellules capables de former des sphères plus important, sont très tumorigènes, et leur profil d'expression de gènes se rapproche de celui des tumeurs de type Mes. Les cellules 3731a et 3731b ont donc un phénotype PL, au contraire des cellules 4371 qui sont de phénotype SL. L'expression de PAK1 et PAK3 a été analysée dans les lignées de GBM par qPCR. **Ce sont les cellules 4371, de phénotype SL, qui expriment le plus PAK3. L'expression de PAK1 ne semble pas liée à un phénotype de lignée particulier (Figure 33 f).**

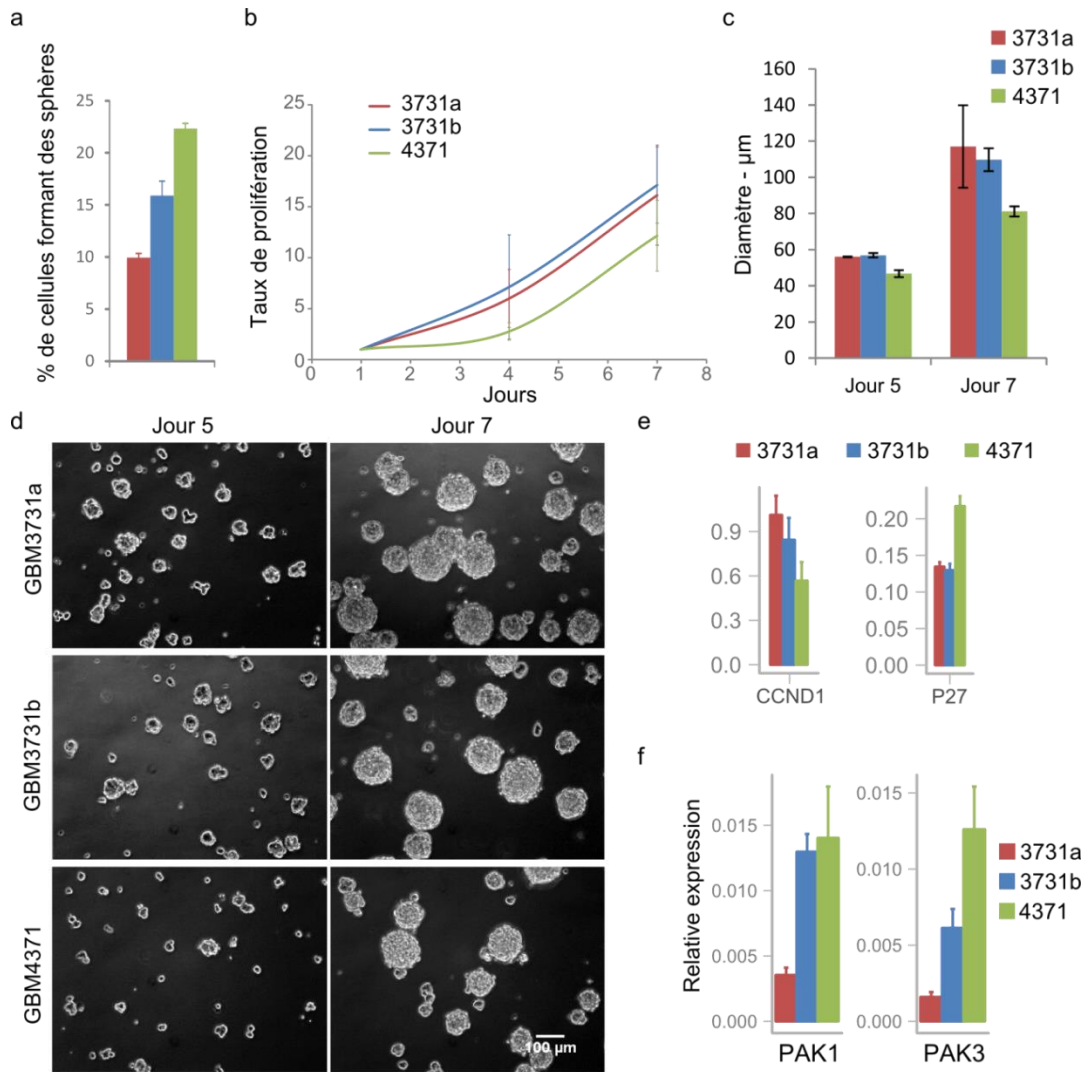


Figure 33. Caractéristiques prolifératives des gliosphères. (a) Taux de cellules formant une sphère après dissociation et mise en culture à faible densité. (b) Taux de prolifération des cellules mises en culture en milieu non adhérent après dissociation. (c,d) Diamètre des sphères obtenues 5 et 7 jours après dissociation et mise en culture (c), images représentatives des sphères obtenues à 5 et 7 jours (d). (e,f) Analyse qPCR de l'expression des gènes *NES*, *Cycline D1*, *p27* et des gènes *PAK* dans les sphères de cellules par rapport à du cerveau fœtal embryonnaire, n=3.

2. Expression de gènes souches et de différenciation dans les sphères

Pour continuer la caractérisation de ces lignées, l'expression de différents gènes marqueurs du caractère souche ou différencié a été analysée par qPCR et visualisée par immunofluorescence (Figure 34). Les trois lignées expriment des gènes marqueurs 'souche' tels que *SOX2* et *NES* à des niveaux identiques. Ces cellules n'expriment que peu ou pas *CD133*.

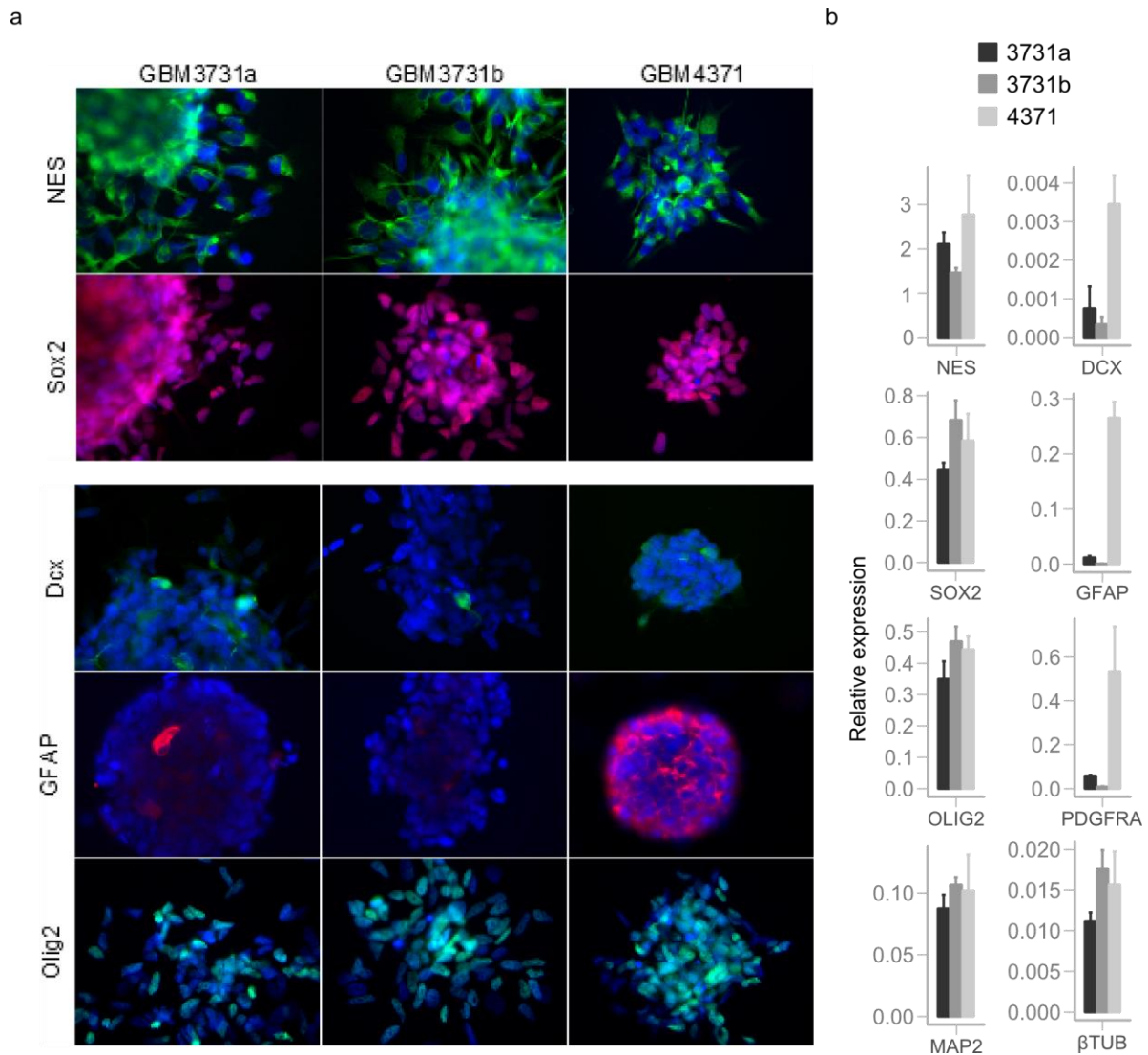


Figure 34. Les cellules de sphères de GBM expriment des gènes marqueurs de cellules souches, ainsi que des gènes de cellules différenciées. (a) Analyse de l'expression de *NES*, *Sox2*, *Dcx*, *GFAP* et *Olig2* par immunofluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par marquage DAPI (Bleu). (b) Analyse qPCR de l'expression de gènes marqueurs de types cellulaires par rapport à du cerveau fœtal embryonnaire, n=3.

Les cellules expriment des marqueurs de cellules plus différenciées, que ce soit du lignage oligodendrocytaire (*Olig2*, *PDGFRA*), astrocytaire (*GFAP*), ou neuronal (*Dcx*, *bTub*), à des niveaux différents selon la lignée (Figure 34 b). Les cellules 4371 se distinguent par leur forte expression des marqueurs de différenciation *Dcx* et *GFAP*, ainsi que *PDGFRA*. Ce phénotype de cellules différenciées est également observable à travers les différences de morphologies observées entre les cellules 3731a, b et 4371. En monocouche, les cellules 4371 présentent de longs prolongements fins alors que les cellules 3731a et 3731b n'en ont pas. Par immunofluorescence, on peut voir que la plupart des cellules d'une sphère expriment *NES* et *SOX2*, alors que seules quelques cellules expriment *Dcx* ou *GFAP*, excepté parmi les cellules de 4371 (Figure 34 a). Encore une fois les lignées 4371 et 3731a/b possèdent des caractéristiques distinctes. **La lignée 4371, qui exprime le plus fortement PAK3 (Figure 33**

f) est plus différenciée que les lignées 3731a et b, que ce soit dans le lignage oligodendroglial ou neuronal.

Ces résultats nous indiquent une différence claire entre les lignées 3731a/b, fortement prolifératives et peu différenciées, et les cellules 4371 qui prolifèrent plus lentement et sont plus différenciées. ***PAK3* pourrait donc dans les lignées de gliomasphère être impliqué dans des mécanismes anti-prolifératifs et de différenciation. Il est à noter que l'expression du gène *PAK1* n'apparaît pas être liée à un phénotype plus prolifératif.**

3. Analyse de l'expression de gènes marqueurs de profils transcriptomiques

Ces caractérisations révélant des différences entre les trois lignées, et sachant que *PAK3* est un gène participant à la signature proneurale dans les classification moléculaires des gliomes de haut grade, nous avons ensuite mesuré par qPCR l'expression d'un certain nombre de gènes caractéristiques des profils transcriptomiques de GBM (Verhaak *et al.*, 2010). Des cellules de chaque lignée ont été récupérées sous forme de sphère pour permettre l'analyse, et un échantillon d'ADNc humain de cerveau fœtal est utilisé comme référence. Les cellules 3731a et b ont des profils d'expression relativement similaires, et surexpriment l'*EGFR* et *RunX2*, des gènes appartenant aux profils Classique et Mesenchymateux, par rapport aux cellules 4371. A l'inverse, les cellules 4371 expriment plus fortement des gènes des profils Neural et Proneural : *SGK3*, *Ascl1*, *Nkx2.2*, *Dcx*, ainsi que *PAK3* (Figure 35 a). Pour mieux visualiser les différences d'expression de gènes entre lignées, les médianes et écarts à la médiane des expressions de chaque gène ont été calculées. Les écarts ont ensuite été représentés sous forme de Heatmap, et les gènes organisés en fonction de leur appartenance à un des profils transcriptomiques suivants : Mesenchymateux (Mes), Classique (CL), Proneural (PL), et Neural (NL) (Figure 35 b). Bien que l'on ne puisse pas retrouver exactement parmi les lignées cellulaires établies à partir de tumeurs les sous-types identifiées dans les tumeurs, le profil transcriptomique d'une lignée peut être rapproché d'un sous type tumoral comme cela a été démontré (Balasubramaniyan *et al.*, 2015; Cusulin *et al.*, 2015). **Dans notre cas, nous pouvons établir que la lignée 4371, dont les cellules sont moins prolifératives, plus différenciées et expriment *PAK3* à un plus haut niveau, présentent un profil PN/NL en opposition avec les cellules 3731a et b que l'on peut qualifier de Mes/CL.**

4. Caractérisation de la tumorigénicité des lignées GBM *in vivo*

Afin de savoir si ces différences phénotypiques observées *in vitro* entre les lignées sont traduites par des variabilités dans la tumorigénicité, nous avons réalisé des xenogreffes chez la souris. Les sphères sont dissociées et les cellules injectées en sous cutané dans le flanc de souris nudes (1.10^6 cellules par souris). La croissance tumorale est suivie par mesure du volume de la tumeur. Les cellules U87, une lignée de cellules de GBM qui prolifère en présence de sérum et dont la croissance tumorale est très rapide, est utilisée comme contrôle d'expérimentation. Le volume tumoral est estimé par la formule $L*0.523*I^2$ (L = Longueur, I = Largeur), approximation de calcul du volume d'un ovoïde, et la vitesse de croissance de la tumeur a été estimée entre les volumes tumoraux 25 mm^3 et 1.5 cm^3 . Les tumeurs issues de cellules U87 sont celles dont la croissance est la plus rapide et les tumeurs issues des cellules 3731a ont une croissance plus rapide que les tumeurs issues des cellules 3731b (Figure 36 a). La médiane de survie des souris injectées avec les cellules de GBM 3731a et b est de 19 semaines, alors qu'aucune tumeur n'est détectée chez les souris injectées avec les cellules de GBM 4371 après 30 semaines (Figure 36 b). Ces résultats sont en accord avec le fait que dans les échantillons de tumeurs des cohortes de patients, l'expression de *PAK3* est associée aux marqueurs de bon pronostic et à une meilleure survie.

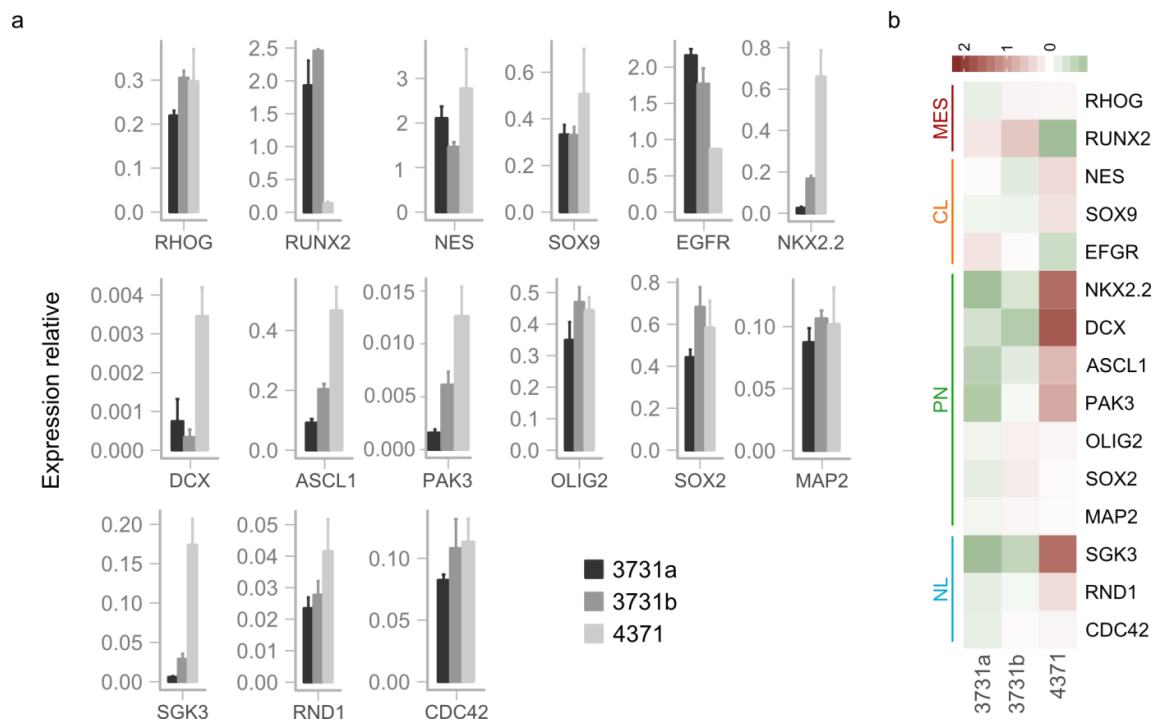


Figure 35. Les lignées de GBM appartiennent à des profils transcriptomiques différents. (a) Analyse qPCR de l'expression de gènes représentatifs des signatures moléculaires établies par Verhaak et al., (2010), n=3. (b) Représentation sous forme de Heatmap des différences d'expression de gène. Les gènes sont organisés en fonction de leur appartenance aux signatures moléculaires suivante: MES (Mesenchymateuse); CL (Classique), PN (Proneurale), NL (Neurale).

Nous disposons donc de trois lignées de GBM possédant des caractéristiques opposées :

- 3731 a et b, pouvant être catégorisées comme Progenitor-like et Mes/CL. Ces cellules ont une prolifération et une tumorigénicité importante, et sont peu différenciées en culture de gliomasphères.
- 4371, pouvant être catégorisée comme Stem-Cell like et PN/NL. Ces cellules sont moins prolifératives, non tumorigènes en greffe hétérotopique, et sont plus différenciées en culture de gliomasphères.

Dans ces lignées, l'expression de *PAK3* est plus importante dans les cellules 4371. Ces données confirment l'hypothèse qu'une expression plus élevée de *PAK3* serait de bon pronostic, et sont en accord avec une fonction possible de *PAK3* dans les mécanismes de sortie du cycle cellulaire et d'induction de la différenciation.

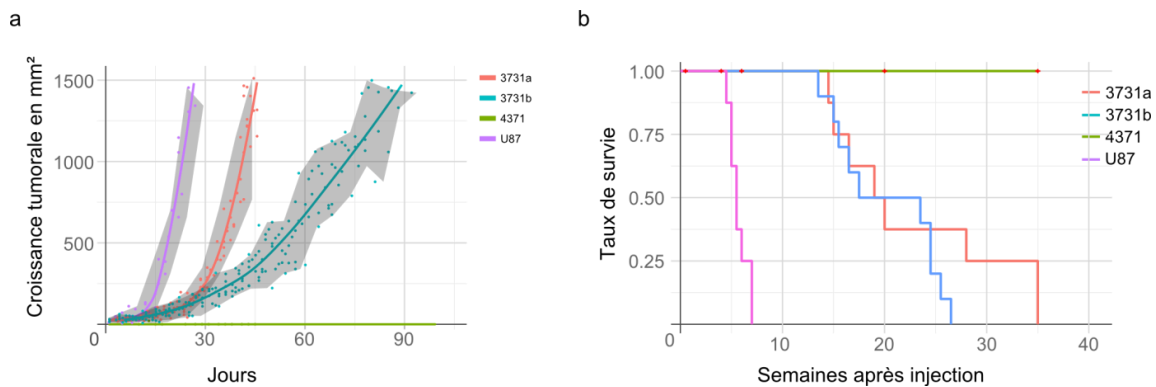


Figure 36. Tumorigénicité des cellules de GBM *in vivo*. Les cellules de 4371 ne sont pas tumorigène. (a) Représentation de la croissance tumorale mesurée entre 25mm³ et 1500mm³ (n = 9 pour chaque lignée). (b) Survie des souris après injection de cellules de GBM en hétérotopique représentées sous forme de courbes de Kaplan-Meier (n>9 pour chaque lignée).

III. Etude des variations d'expression de PAK1 et PAK3 au cours de la différenciation des cellules de GBM

1. Différenciation des cellules de GBM induite par le retrait des facteurs et l'ajout de sérum

L'expression de *PAK3* dans nos cellules étant associée à un phénotype plus différencié et moins prolifératif, nous avons étudié les variations de cette expression au cours de la différenciation des cellules de GBM, afin de déterminer si l'expression de *PAK3* est associée à un état différencié des cellules. La culture en sphère est largement utilisée pour établir et entretenir les lignées de GBM, mais il a été montré que ce type de culture avait certaines limites. Certaines équipes préfèrent utiliser des cultures en monocouche sur laminine. Pollard

et Coll. ont démontré que l'utilisation de laminine permettait d'établir des lignées de cellule à partir de tumeur de patients de manière plus efficace que la technique des neurosphères (Pollard *et al.*, 2009). Ils ont également montré que sur laminine la différenciation et l'apoptose était moindre que dans les cultures en sphère. Une étude a comparé la culture en sphère et la culture en monocouche sur laminine de lignées de GBM établies par la technique des neurosphères (Rahman *et al.*, 2015). Ils n'ont pu établir de différence de taux de prolifération, de capacité d'auto-renouvellement, d'expression de gènes (*NES*, *Ki67*), de différenciation, d'apoptose et de tumorigénicité chez l'animal entre les deux conditions de culture. Il est à noter que la taille des sphères au moment de l'analyse est importante, de trop grosses sphères entraînant la présence d'apoptose et de différenciation dans la culture, ce qui pourrait être la cause des différences observées dans d'autres études (Pollard *et al.*, 2009). Dans le cadre de mon travail, la condition de culture en monocouche m'a permis d'obtenir des cellules au phénotype plus homogène et moins différencié que la condition de culture en sphère non adhérente : dans les cellules de la lignée 3731a, le nombre de cellules *Dcx+* est bien moindre en condition monocouche par rapport à la condition de culture en sphère (Figure 34 a vs 38 a).

1.1 Analyse de la prolifération

Le retrait des facteurs et l'ajout de sérum est une technique classique d'induction de la différenciation des cellules de GBM (Campos *et al.*, 2010). Il s'agit de la première technique que nous avons utilisée pour obtenir la différenciation des cellules. Nous avons cultivé les cellules de GBM en condition prolifératives en monocouche en présence d'EGF et FGF. 72h après mise en culture en monocouche, le milieu est changé pour du milieu sans facteur de croissance contenant 0,5% de sérum (SVF). Le phénotype des cellules est analysé à trois temps différents : après trois jours de culture en condition de prolifération (t0) et après 3 et 8 jours de retrait des facteurs (respectivement t3 et t8).

La différenciation cellulaire est caractérisée par la sortie du cycle et l'expression de marqueurs de lignage. Tout d'abord nous avons analysé la prolifération cellulaire par immunofluorescence en réalisant un marquage *Ki67*, un marqueur des cellules prolifératives exprimé au cours de toutes les phases du cycle à l'exception de la phase G0. 3 jours et 8 jours après le retrait des facteurs, le marquage *Ki67* est diminué dans toutes les lignées. Toutefois si la proportion de cellules *Ki67+* diminue à 10% pour les cellules 3731a et 4371, les cellules 3731b restent très prolifératives (Figure 37 a et b). Ce marquage confirme également qu'en présence de facteurs de croissance, les cellules 3731b sont les plus prolifératives (90%), et les cellules 4371 les moins prolifératives (60%) (Figure 37 a et b). Nous avons également examiné l'expression de la cycline D1 (*CcnD1*) et de la CdkI *p27*. Les CdkI inhibent différents complexes cycline/Cdk durant la progression du cycle cellulaire (cf partie PAK I.4.2). L'expression de *p27* augmente, ou a une tendance à augmenter, après le retrait des facteurs pour les trois lignées. Ceci serait cohérent avec une inhibition de la progression du cycle cellulaire. L'expression de *Cycline D1* ne varie pas dans les différentes conditions pour les cellules 4371 et 3731b, et augmente dans le cas des cellules 3731a. Ceci pourrait indiquer

un arrêt en phase G1 avec accumulation de cycline, et/ou l'impossibilité de rentrer en phase S. L'allongement de la phase G1 peut être un signe de d'entrée en différenciation neuronale pour une cellule neurale (Salomoni et Calegari, 2010). Nous avons donc réalisé une analyse des phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux après incorporation de iodure de propidium (PI). Elle a été réalisée sur des cellules en condition proliférative en présence de facteurs, et des cellules 3 jours et 8 jours après le retrait des facteurs. Cette technique ne permet pas de distinguer entre les phases G0 et G1, au contraire du marquage Ki67, mais permet de différencier les phases G1/G0 des phases S et M. Nous n'avons pas obtenus les mêmes résultats pour les trois lignées (Figure 37 d et e).

- Les résultats de cytométrie obtenus pour les cellules 3731a montrent une petite diminution du taux de cellules en phase G0/G1 (10%), et ces cellules se répartissent entre les phases S et G2.
- Il y a une diminution du taux de cellules en phase M pour les cellules 3731b, qui sont retrouvées en phases G0/G1 et S. Ceci qui pourrait indiquer un allongement des phases G0/G1 et S, ou un blocage en phase S.
- Les résultats obtenus pour les cellules 4371 sont les plus clairs. Il y a une augmentation du taux de cellules 4371 en phase G0/G1, provenant majoritairement d'une baisse des cellules en phase S, ce qui correspond à une diminution des cellules en phase proliférative, et possiblement à l'allongement de la phase G1 ou l'augmentation de cellules en G0.

(Une différence de résultat entre cytométrie et analyse de la prolifération a déjà pu être observée, (Prudnikova *et al.*, 2015)). Ces résultats n'ont été obtenus qu'une seule fois et sont à reproduire. Ils ne permettent pour le moment pas de conclure sur les changements de longueur de phase. Pour obtenir une meilleure résolution sur les phases du cycle, il est possible d'utiliser de l'acridine orange, ou d'utiliser des marquages complémentaires comme le BrdU ou le Ki67, en plus du PI.

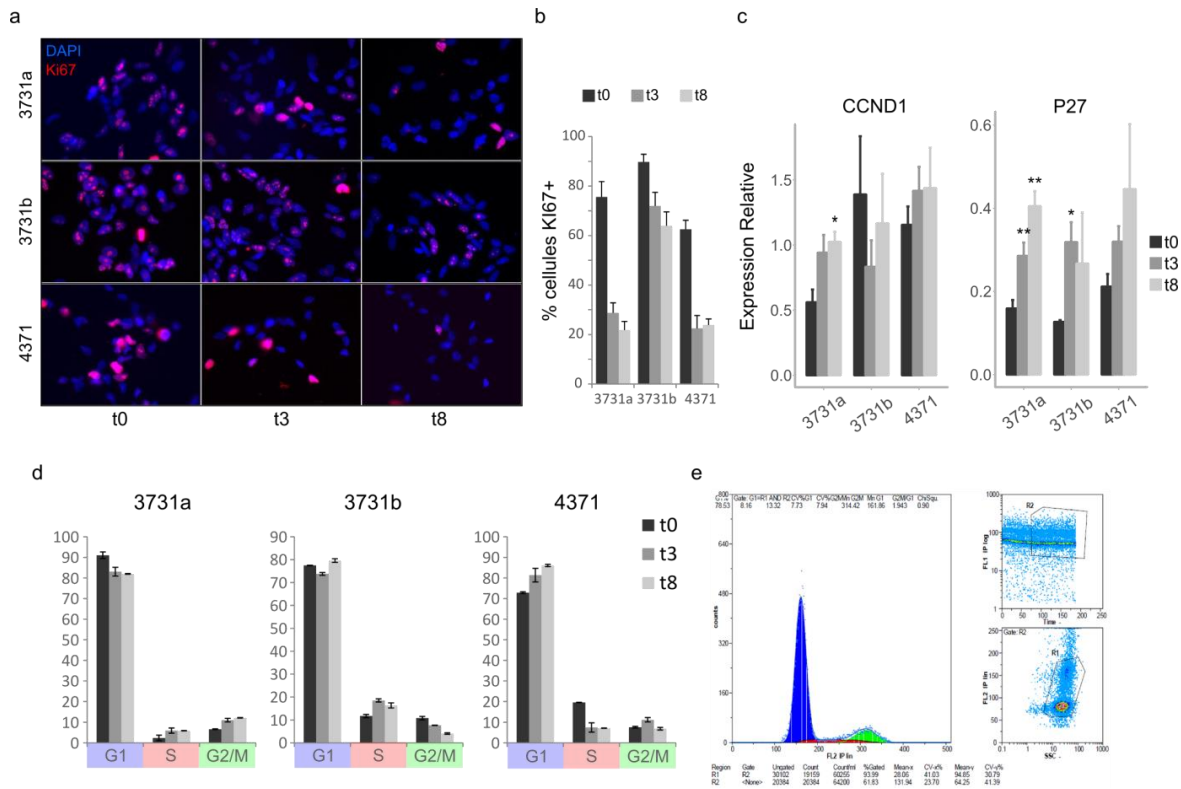


Figure 37. La prolifération des cellules de GBM diminue en présence de SVF 3 jours et 8 jours après le retrait des facteurs. La prolifération est analysée en condition proliférative en présence de facteurs (t0), trois jours après le retrait des facteurs (t3) et huit jours après le retrait des facteurs (t8). (a) Marquage des cellules Ki67+ en immunofluorescence, (b) quantification du marquage Ki67. (c) Analyse de l'expression de la Cycline D1 et de P27 par qPCR. (d) Analyse de la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle par cytométrie en flux. (e) Exemple d'image obtenue après mesure de la quantité d'ADN en cytométrie en flux, pic de cellules en G0/G1 (quantité d'ADN 2n) en bleu, pic de cellules en phase M en vert (quantité d'ADN 4n), les cellules en phase M sont entre les pics, en rouge.

1.2 Analyse de la différenciation

La variation de l'expression de gènes marqueurs de cellules différenciées a été utilisée pour évaluer l'état de différenciation des cellules. *Dcx* et *GFAP* ont été choisis pour évaluer l'état de différenciation vers les lignages neuronal et glial. Tout d'abord, nous avons observé *Dcx* et *GFAP* par immunofluorescence. A t0, en présence de facteurs, un plus grand nombre de cellules expriment *GFAP* et *Dcx* parmi les cellules 4371 comparé aux lignées 3731a et b. Certaines cellules sont donc Sox2+, NES+ et expriment la *GFAP* ou *Dcx*, ce qui pourrait correspondre à des cellules progénitrices (Figure 34 a et 38 a). Après le retrait des facteurs, le nombre de cellules *Dcx*+ et *GFAP*+ augmente. Cette augmentation est plus ou moins importante selon la lignée. Il est intéressant de noter que dans les cellules, il n'y a pas, ou très peu, de co-expression des marqueurs *Dcx* et *GFAP*. L'apparition de l'expression de *GFAP* et *Dcx* a été confirmée par qPCR et western blot. Nous avons ainsi pu confirmer le phénotype plus différencié des cellules 4371, même en condition proliférative en monocouche, où les cellules 4371 expriment *Dcx* et *GFAP* fortement par rapport aux cellules 3731a et b.

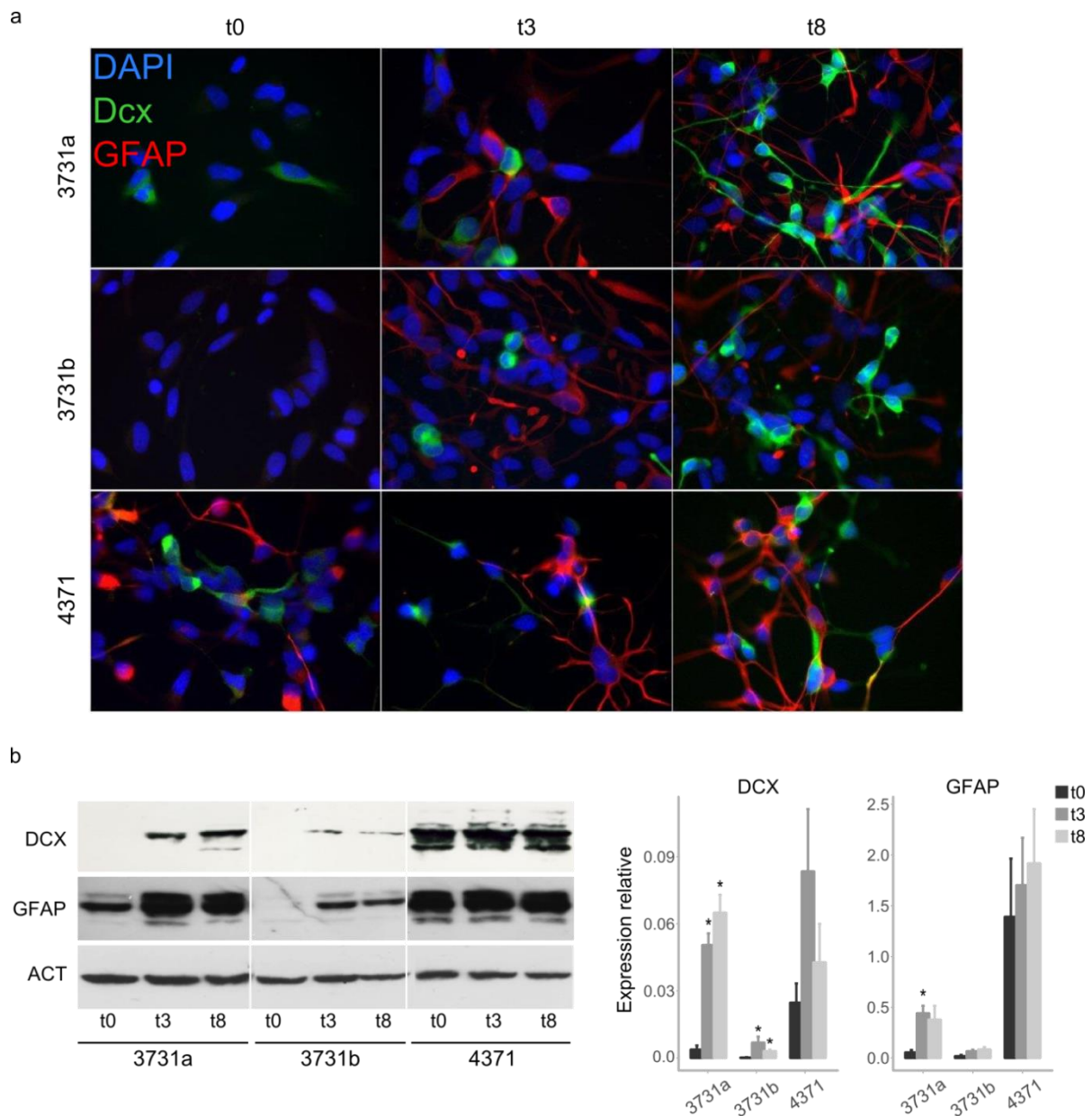


Figure 38. Augmentation de l'expression de *Dcx* et *GFAP* après le retrait des facteurs de croissance. Analyse de l'expression de marqueurs de différenciation. (a) Images représentatives de l'expression de DCX et GFAP visualisées par immunofluorescence. Analyse de l'expression de Dcx et GFAP par western blot (b) et qPCR (c), n=4.

Après le retrait des facteurs, les expressions de Dcx et GFAP augmentent fortement dans les cellules de la lignée 3731a, et plus faiblement dans les cellules de la lignée 3731b. Le cas des cellules 4371 est différent, ces deux marqueurs sont plus fortement exprimés à t0, et leur expression n'augmente pas à t3 et t8 (Figure 38 a et b). Nous avons également quantifié les messagers des gènes *Olig2*, marqueur de différenciation oligodendrocytaire, et β 3-tubuline,

marqueur de cellule différenciation neuronale, ce qui permet de déceler une augmentation significative d'*Olig2* dans les cellules 4371 (Figure 39). Les trois lignées de cellules de GBM présentent donc une réponse différente à l'induction de la différenciation par le SVF : les lignées PL expriment faiblement les marqueurs de différenciation, sont fortement prolifératives. En réponse au retrait des facteurs de croissance, ces lignées arrêtent de proliférer et commencent à se différencier. La lignée la plus mésenchymateuse, 3731b, reste assez proliférative et différencie peu. La lignée 4371 est plus fortement différenciée en condition proliférative. Après le retrait des facteurs, sa prolifération diminue drastiquement, et le marqueur de différenciation oligodendrogliale augmente. Cette hétérogénéité de réponse à la différenciation parmi les cellules de glioblastomes a déjà été observée (Balasubramaniyan *et al.*, 2015; Carén *et al.*, 2015).

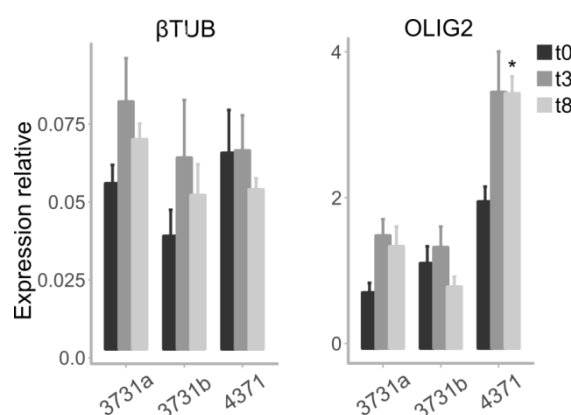


Figure 39. Analyse de l'expression des gènes marqueurs de différenciation β 3tubuline et OLIG2. Analyse de l'expression de β 3tubuline et *Olig2* par qPCR, relativement à du cerveau fœtal humain. L'expression est analysé en présence de facteurs (t0) et 3 (t3) et 8 (t8) jours après le retrait des facteurs, n=4.

1.3 Analyse des variations d'expression de PAK1 et PAK3 au cours de la différenciation induite par le retrait des facteurs en présence de SVF

L'expression de PAK1 et PAK3 a été suivie par analyses qPCR et western blot, dans les cellules en condition proliférative et après le retrait des facteurs (Figure 40). Cette analyse révèle une relative stabilité de l'expression de *PAK1*, qui augmente légèrement pour un seul type de cellules, 3731a (Figure 40 b). Nous avons pu établir grâce aux résultats déjà obtenus que nos trois lignées de cellules de GBM avaient des profils différents : deux lignées PL, fortement prolifératives et tumorigènes, et une lignée SL proneurale non tumorigène en hétérotopique. Leurs réponses au retrait des facteurs de croissances et à l'ajout de sérum sont également différentes : Les cellules 3731a sont très sensibles au retrait des facteurs, alors que les cellules 3731b et 4371 le sont moins, probablement pour des raisons différentes. Les cellules 4371 sont déjà assez différenciées et les conditions n'entraînent pas de différenciation

supplémentaire, alors que les cellules 3731b continuent à proliférer fortement après le retrait des facteurs et l'ajout de sérum.

		3731a	3731b	4371
Sphère	Profil	Mes	Mes	PN
	Tumorigénicité	++	++	-
EGF + FGF	Prolif	+++	+++	++
	Diff	+/-	-	++
0,5% SVF	Prolif	+	++	+/-
	Diff	++	+	+++

Tableau 6. Tableau récapitulatif des caractéristiques des lignées de cellules de GBM

L'expression de *PAK3* dans ces trois lignées varie en accord avec leur réponse au retrait des facteurs : L'expression de *PAK3* augmente fortement pour 3731a, les cellules qui répondent le plus au retrait des facteurs, c'est-à-dire celles pour lesquelles la prolifération diminue et l'augmentation de l'expression de *Dcx* et de *GFAP* est la plus visible après le retrait des facteurs. A l'inverse, *PAK3* augmente faiblement à t3 et t8 dans les cellules 3731b, or ces cellules continuent à proliférer fortement après le retrait des facteurs, et l'augmentation de *Dcx* et *GFAP* y est beaucoup plus faible (Figure 38). Enfin, *PAK3* est déjà assez fortement exprimé dans les cellules 4371 (son niveau d'expression en condition proliférative est égal ou supérieur au niveau d'expression mesuré dans les cellules 3731a en condition différenciée) et il en est de même pour tous les marqueurs de différenciation étudiés. Ces cellules étant déjà différenciées, il est possible que les conditions choisies, le retrait des facteurs et l'ajout de sérum, ne soit pas suffisant pour induire une différenciation accrue. Par contre, le retrait des facteurs induit un arrêt de la prolifération, ce qui pourrait indiquer que c'est surtout l'état de différenciation qui a un lien avec l'expression de *PAK3*.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'un rôle de *PAK3* au cours de la différenciation. De plus l'arrêt de la prolifération n'étant pas accompagnée d'une diminution de l'expression de *PAK1*, *PAK1* pourrait ne pas avoir de fonctions dans le contrôle de la prolifération dans ces lignées de cellules de GBM

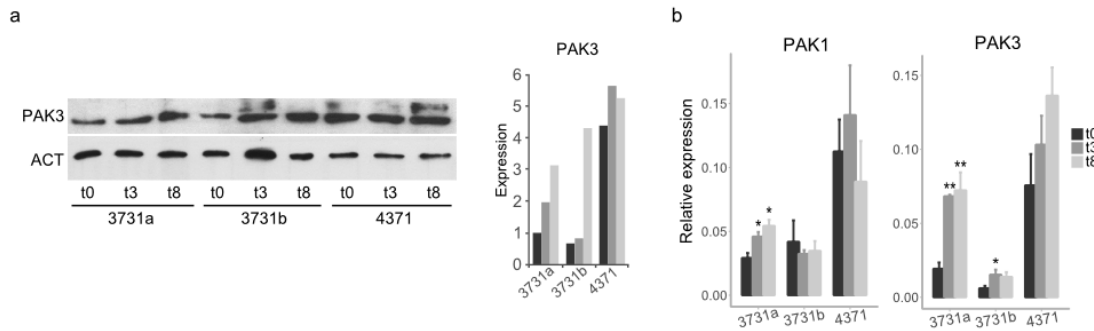


Figure 40. Analyse des variations de l'expression de *PAK1* et *PAK3* avant et après le retrait des facteurs de croissance. Analyse de l'expression de *PAK3* dans les lignées de GBM par (a) Western blot (gauche), quantification du western blot (droite), et (b) analyse qPCR de l'expression de *PAK1* et *PAK3*. Condition proliférative (t0), 3 jours après le retrait des facteurs (t3) et 8 jours après le retrait des facteurs (t8), n=4.

2. Différenciation des cellules de GBM induite par l'AR et le BMP4

La première partie de ce travail *in vitro* a donc démontré que l'expression de *PAK3* augmentait au cours de la différenciation, supportant l'idée d'un rôle de cette protéine dans l'induction et le maintien de la différenciation, et/ou la sortie du cycle cellulaire. L'ajout de sérum est une technique classique pour induire la différenciation des cellules, cependant, plusieurs équipes ont montré que le retrait des facteurs seuls ou l'utilisation de sérum ne permettait d'obtenir qu'une différenciation transitoire (Balasubramanian *et al.*, 2015; Carén *et al.*, 2015). Cette différenciation est non terminale et réversible une fois les cellules remises en présence de facteur de croissance. Elle ne permet pas toujours la diminution de l'expression des marqueurs 'souche' tels que la nestine. De plus l'exposition à long terme au sérum entraîne la dérive des cellules vers un phénotype plus mésenchymateux (Balasubramanian *et al.*, 2015). Cette observation est également étayée par le fait que les lignées de cellules de GBM établies depuis longtemps, fortement proliférantes et tumorigènes, peuvent être entretenues en sérum (U87, U251...). Afin d'explorer plus avant le lien entre les *PAK* et la différenciation, nous avons utilisé deux inducteurs de différenciation, l'acide rétinoïque (AR) et le bone morphogenetic protein 4 (BMP4), tous deux mentionnés pour comme capables d'entraîner une différenciation terminales des cellules (Piccirillo *et al.*, 2006; Ying *et al.*, 2011).

Dans les cellules neurales adultes, le BMP4 régule la différenciation neurale. Sur les cellules souches neurales, l'AR induit la différenciation neuronale, et inhibe la différenciation gliale après induction de la différenciation. Nous avons utilisé l'AR et le BMP4 en absence de facteurs pour orienter la différenciation de nos cellules, et observer leur effet sur l'expression des *PAK*. Les cellules sont ensemencées sur laminine en présence de EGF/FGF pendant trois jours (condition PM), avant le changement du milieu pour du milieu sans facteurs de croissance, sans ou avec agent de différenciation. Le BMP4 est utilisé à 10ng/mL et l'AR à

10 μ M dans du DMSO et les conditions AR et BMP4 sont comparées avec leurs contrôles, DMSO et 0%, respectivement.

2.1 Analyse de la prolifération par marquage Ki67

Nous avons d'abord analysé la prolifération cellulaire par marquage Ki67 pour déterminer si l'ajout de BMP4 ou AR améliore la diminution de la prolifération induite par le retrait des facteurs seul. Comme montré précédemment, en milieu PM les cellules 3731b sont les plus prolifératives, et les cellules 4371 les moins prolifératives. Après le retrait des facteurs et l'ajout ou non d'AR et de BMP4, la prolifération chute en moyenne à 20-30% pour la lignée 3731a, 30-40% pour la lignée 3731b et 10-20% pour la lignée 4371 (Figure 3.2.2 a et b). La baisse de prolifération après le retrait des facteurs est plus importante en absence de sérum qu'en présence de sérum, pour la lignée 4371 et en particulier, de manière flagrante, pour la lignée 3731b (Figure 37 b vs 41 a). Au temps t3 et t8, les taux de prolifération observés sont similaires entre toutes les conditions. L'ajout de BMP4 ou d'acide rétinoïque n'entraîne donc pas de diminution de prolifération supplémentaire par rapport au retrait de facteurs de croissance seul.

2.2 Analyse de la différenciation induite par l'AR et le BMP4

Afin d'explorer la relation entre l'expression de *PAK1* et *PAK3* et la différenciation des cellules, nous avons analysé l'expression des gènes marqueurs *Dcx* et *GFAP* en parallèle avec l'expression de *PAK1* et *PAK3*, dans les différentes conditions de différenciation. Nous pouvons analyser les résultats obtenus lignée par lignée :

- Sur les cellules de la lignée 3731a, l'AR entraîne une augmentation de la différenciation neuronale par rapport à la condition DMSO, comme le montre l'augmentation de l'expression de *Dcx*. Cette différenciation pourrait se faire au détriment de la différenciation gliale étant donné la légère diminution de l'expression de *GFAP* dans cette condition (Figure 42 a). De manière opposée, l'augmentation de l'expression de *GFAP* montre que le BMP4 entraîne en majorité une différenciation gliale des cellules par rapport au retrait des facteurs de croissance seul.
- Sur les cellules de la lignée 3731b, l'AR n'a pas d'effet visible sur l'expression des marqueurs *Dcx* et *GFAP* par rapport à la condition DMSO (Figure 42 b). Par contre le BMP4 favorise la différenciation gliale des cellules (x90 par rapport à la condition 0%).
- Sur les cellules 4371, l'expression de *Dcx* est augmentée par l'AR ainsi que par le BMP4 par rapport aux conditions DMSO et 0% respectivement. L'expression de la *GFAP* ne varie pas (Figure 42 c).

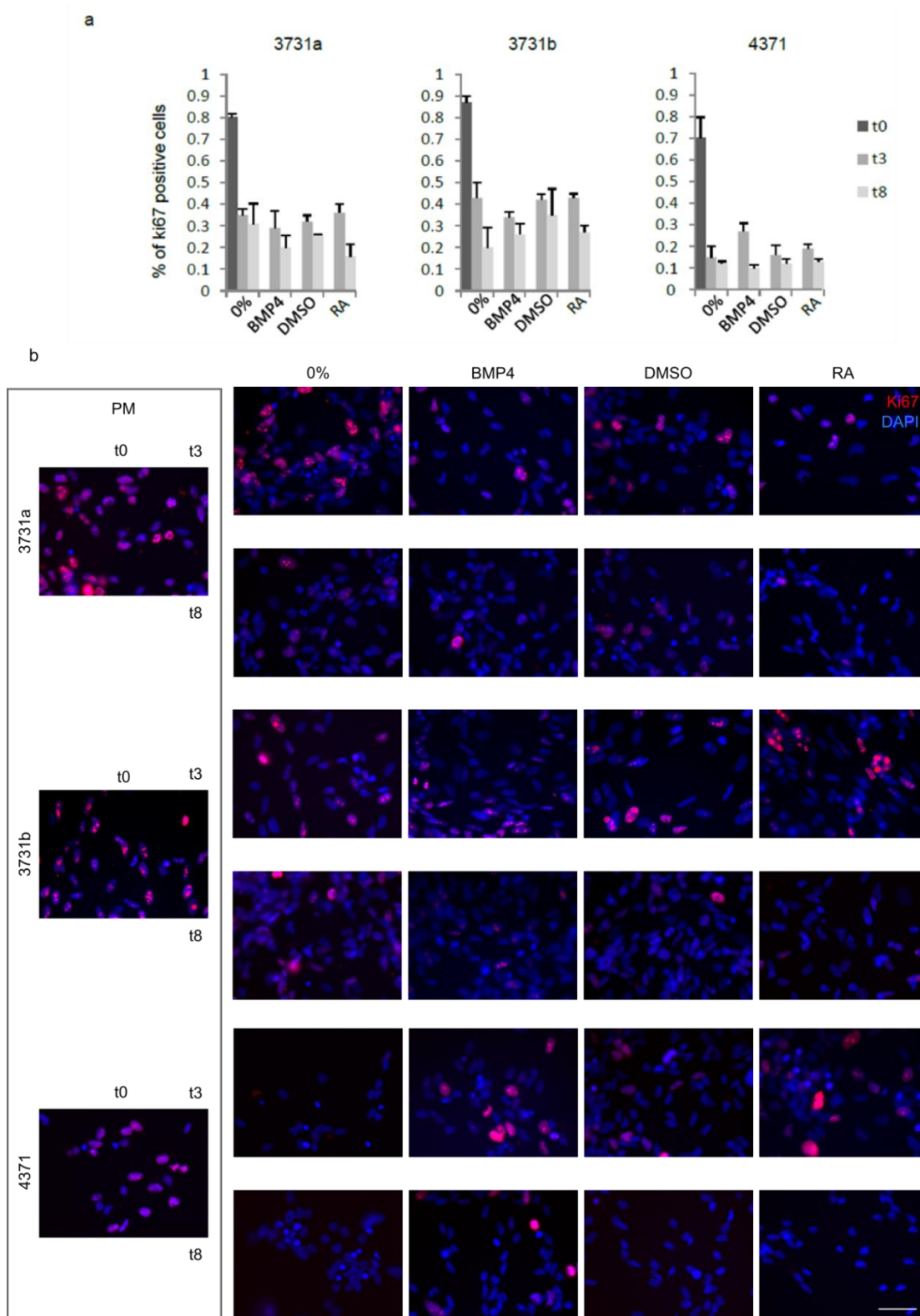


Figure 41. Prolifération des cellules de GBM en condition AR et BMP4. Analyse de la prolifération cellulaire par marquage Ki67. (a) Quantification des marquages Ki67 (Rouge) n=3. (b) Images représentatives des marquages sKi67 visualisés par immunofluorescence

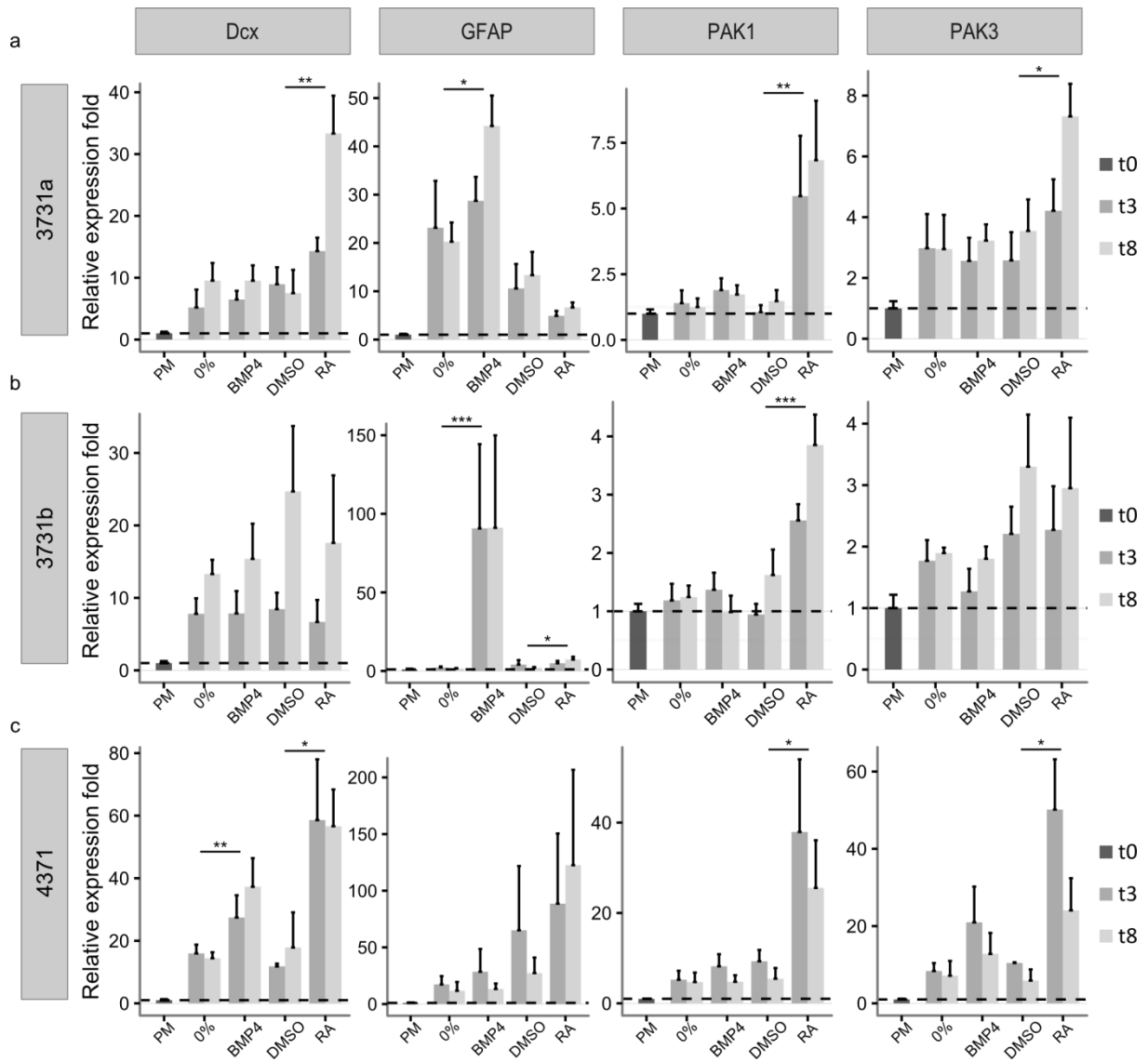


Figure 42. Analyse de l'expression des gènes *PAK*, ainsi que des gènes marqueurs de différenciation *DCX* et *GFAP*, après induction de la différenciation par l'AR et le BMP4. Analyse de l'expression de *Dcx*, *GFAP*, *PAK1* et *PAK3* par qPCR, relativement à la condition t0. L'expression est mesurée en présence de facteurs (t0) et 3 (t3) et 8 (t8) jours après le retrait des facteurs, n=4.

Pour aller plus loin, nous nous sommes également intéressés aux variations d'expression d'autres marqueurs, spécifiques des OPC (*PDGFRa*), des oligodendrocytes (*Olig2*) et des neurones matures (*β 3-tubuline*). De manière frappante, dans les cellules 4371, l'expression de la *β 3-tubuline* est augmentée en présence d'AR et de BMP4 par rapport aux conditions contrôles, et l'expression du *PDGFRa* est augmentée dans la condition BMP4 par rapport à la condition 0%, et diminuée en présence d'AR par rapport à la condition DMSO.

L'AR pourrait donc favoriser la différenciation neuronale au détriment de la différenciation oligodendrogliale. Ces résultats s'avèrent intéressants lorsque l'on considère le profil des lignées : le BMP4 entraîne la différenciation gliale des cellules des deux lignées Mes/PL, et la différenciation des cellules 4371 de type PN/SL vers un lignage neuronal et oligodendroglial. Les cellules de la lignée PN/SL peuvent atteindre des stades plus matures de différenciation. L'AR favorise la différenciation neuronale des cellules pour tous les types de lignées, mais une des lignées Mes/PL est résistante.

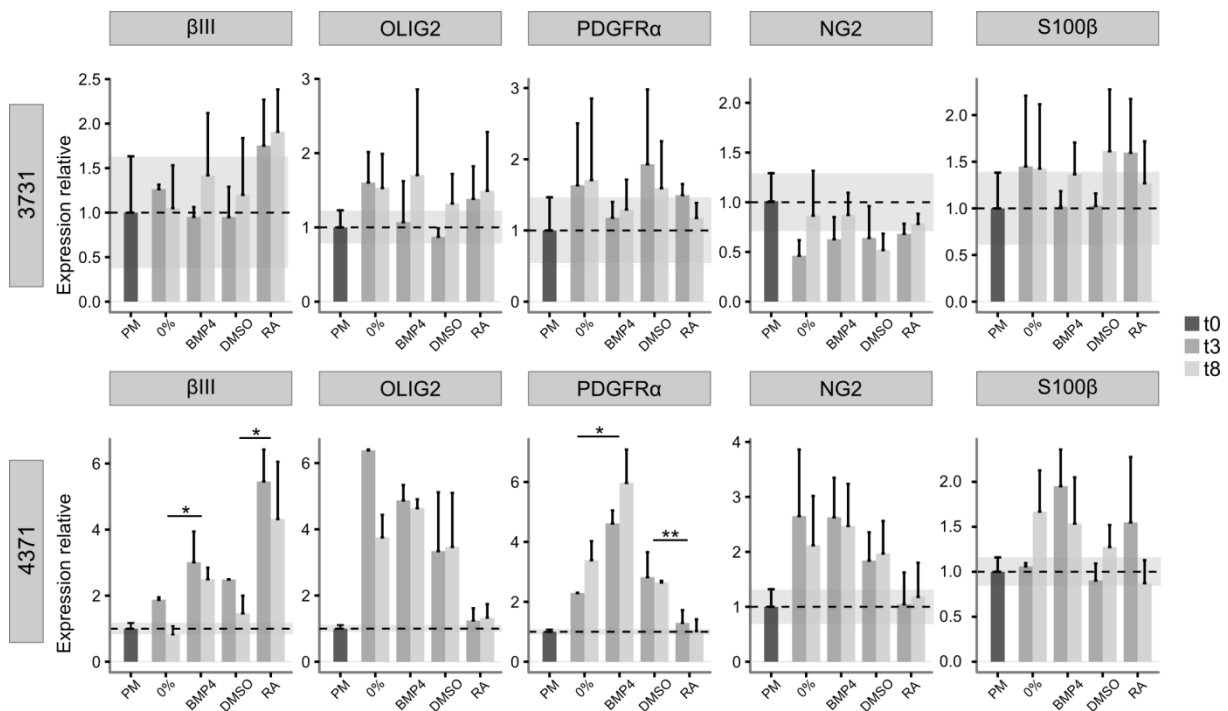


Figure 43. Analyse de l'expression de gènes marqueurs de différenciation astrocytaire, oligodendrogliale et neuronale après induction de la différenciation par l'AR et le BMP4. Analyse de l'expression de *β 3Tubuline*, *Olig2*, *PDGFRa*, *NG2* et *S100 β* par qPCR, relativement à la condition t0. L'expression est mesurée en présence de facteurs (t0) et 3 (t3) et 8 (t8) jours après le retrait des facteurs n=4.

2.3 Effet de la différenciation gliale ou neuronale sur l'expression de *PAK1* et *PAK3*

Grâce à l'utilisation de différentes conditions de cultures, nous avons donc réussi à obtenir des variations de la différenciation majoritaire observée après le retrait des facteurs. Nous avons analysé l'expression de *PAK1* et *PAK3* par qPCR au cours de ces différenciations. Dans toutes les lignées de cellules de GBM, le BMP4 n'induit pas de variations de l'expression de *PAK1* par rapport au retrait de facteurs de croissance seul, alors que l'AR augmente son expression dès trois jours, de manière significative (3731a, x5 ; 3731b, x3 ; 4371, x20 ; figure 42). L'expression de *PAK3* n'est que légèrement augmentée par le BMP4 dans les cellules 4371, par contre l'AR induit son augmentation par rapport au contrôle DMSO dans les cellules 3731a et les cellules 4371. Les variations de l'expression de *PAK3* ne semblent pas associées à l'ajout de l'AR ou du BMP4 en particulier. Dans les cellules 3731 a, l'expression de *PAK3* est augmentée en présence d'AR, mais ce n'est pas le cas pour la lignée 3731b.

L'expression de *PAK3* semble plutôt corrélée à l'augmentation de l'expression de marqueurs précis. Dans les cellules 3731a, l'expression de *PAK3* est augmentée dans la condition AR par rapport à la condition DMSO, or dans cette condition, l'expression de *Dcx* est augmentée et non celle de *GFAP* ou des autres marqueurs analysés. Dans les cellules 3731b, aucune condition de culture n'induit l'augmentation de l'expression de *PAK3* par rapport au contrôle, or, l'expression de la *GFAP* est fortement augmentée en présence de BMP4. Pour finir l'expression de *PAK3* augmente légèrement en présence de BMP4 et fortement en présence d'AR par rapport à leurs contrôles respectifs dans les cellules 4371. Pour cette lignée, dans ces conditions, l'expression des deux marqueurs neuronaux analysés, *Dcx* et *β 3-tubuline*, augmente, alors qu'il n'y a pas de variations d'expression de la *GFAP*. Il existe également des variations d'expression du *PDGFRa*.

Ces données indiquent que l'augmentation de l'expression de *PAK3* est corrélée à l'augmentation de la différenciation neuronale et n'est pas corrélée à l'augmentation de la différenciation gliale, dans les trois lignées. Elles suggèrent également que l'expression de *PAK3* pourrait être corrélée négativement à la différenciation oligodendrocytaire : l'augmentation la plus importante de l'expression de *PAK3* est observée dans la condition AR des cellules 4371, en association avec la diminution de l'expression de *PDGFRa* et *Olig2*. Ces données montrent également que contrairement à celle de *PAK3*, l'expression de *PAK1* n'est pas associée à l'expression de marqueurs en particulier, mais est induite par l'ajout d'acide rétinoïque, et ce quelle que soit la lignée considérée. Nous avons donc mis en évidence une possible régulation de l'expression de *PAK1* par l'acide rétinoïque, de manière directe ou indirecte. Concernant l'expression de *PAK3*, plusieurs hypothèses sont à considérer : 1) l'expression de *PAK3* est secondaire à l'engagement d'une cellule dans la voie neuronale, 2) le niveau d'expression de *PAK3* détermine la capacité d'une cellule à s'engager dans la voie neuronale, 3) *PAK3* est un effecteur des gènes proneuraux. Dans le deuxième cas, le niveau plus élevé de l'expression de *PAK3* est ce qui permet à la lignée 4371 d'être plus sensible à la différenciation neuronale, alors que l'absence de son expression empêche les cellules 3731b de s'engager vers le lignage neuronal. La manipulation de l'expression de *PAK3* pourrait

alors faire varier la sensibilité des cellules envers les agents de différenciation et l'engagement dans un lignage particulier.

IV. Inhibition de l'expression de PAK3 par shRNA dans les cellules de gliome

1. Sélection des shRNA

Une première approche pour être d'inhiber l'expression de la protéine grâce à des shRNA (short airpin RNA). Le premier test a été effectué dans des cellules COS co-transfectées avec des plasmides permettant l'expression de PAK1 ou PAK3 humain, et un plasmide permettant l'expression d'un sh (Figure 44 a). Nous avons ainsi pu tester l'efficacité et la spécificité des sh. Nous avons ensuite testé les virus GFP et shRNA dans les cellules de GBM (Figure 44b,c et 45).

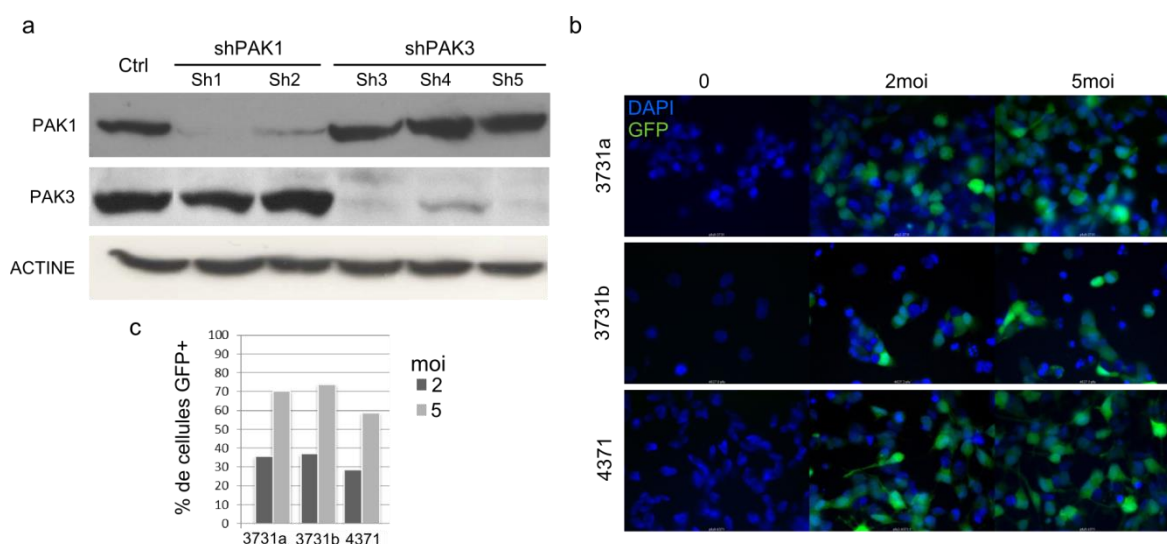


Figure 44. Inhibition de l'expression de PAK1 et de PAK3 dans des cellules COS et efficacité de l'infection des cellules de GBM par les lentivirus. (a) Deux plasmides Sh-RNA spécifiques de PAK1 (Sh1 et Sh2) et trois plasmides Sh-RNA spécifiques de PAK3 (Sh3, Sh4, Sh5) ont été co-transfectés dans des cellules COS, en présence du plasmide d'expression pcDNA3-HA-PAK1, ou du plasmide pcDNA3-HA-PAK3. L'analyse par western blot a permis de vérifier la diminution d'expression et la spécificité de chaque plasmide Sh-RNA vis-à-vis de sa cible. (b,c) Le vecteur permettant l'expression de la GFP a été utilisé pour estimer l'efficacité de l'infection sur les cellules de GBM. Les cellules sont fixées 72h après infection, sans sélection (a) Expression de la GFP visualisée par immunofluorescence. (b) Quantification des cellules GFP+.

Nous avons généré des cellules exprimant de manière stable des sh dirigés contre PAK3, dans l'objectif d'étudier la conséquence de l'inhibition de PAK3 sur les capacités de prolifération et de différenciation des cellules, ainsi que sur leur tumorigénicité. Les cellules ont été infectées par des vecteur lentiviraux permettant l'expression d'une résistance, ce qui permet l'expression des shRNA en continu ainsi que la sélection des cellules infectées. Un

shRNA scramble (non spécifique) est utilisé comme contrôle. L'infection peut être réalisée sur des cellules de sphères dissociées puis remise en culture en conditions non-adhérentes ou sur des cellules cultivée en monocouche. Avant l'établissement d'une pression de sélection, 60 à 70% des cellules sont infectées 75h après l'infection (Figure 44 c). Deux séquences de sh ont été sélectionnées sur la base de leur efficacité, les sh 03A et 04A. Le sh02A est écarté en raison de la forte mortalité des cellules exprimant ce sh (Figure 45 a).

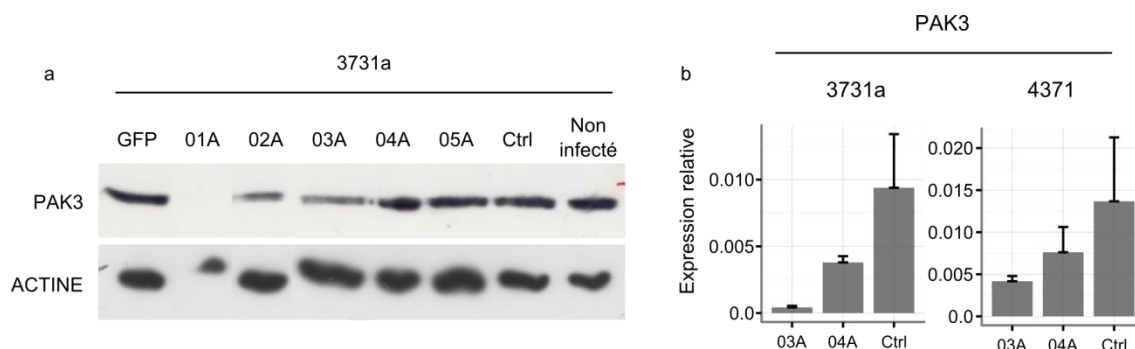


Figure 45. Extinction de l'expression de PAK3 par les shRNA en condition proliférative. (a) Analyse de l'extinction de l'expression de PAK3 par western blot dans les cellules 3731a cultivée en sphère. (b) Analyse qPCR de l'expression de PAK3 dans les cellules des lignées 3731a et 4371 en conditions prolifératives, n=3. 5 sh différents ont été testés sur 3731a. GFP, vecteur permettant d'exprimer la GFP à la place d'un sh ; Ctrl, cellules exprimant le vecteur contrôle ; Non infecté, cellules 3731a cultivées en sphères, non infectées.

2. Analyse de l'effet de l'expression des sh dirigés contre PAK3 sur les propriétés des cellules cultivées en sphère

Nous avons tout d'abord exploré l'effet de l'infection des cellules 4371 et 3731a par les vecteurs viraux permettant l'expression des sh03A, sh04A et shCtrl sur deux propriétés des cellules : la capacité à s'auto-renouveler, et vitesse de croissance. La capacité à s'auto-renouveler a été évaluée par un test de formation de sphère. Les cellules sontensemencées à raison de 1000 cellules par puit et le nombre de sphères formées est compté après 10 jours de cultures en présence de facteurs de croissance. Une caractéristique visible pour les cellules 4371 est la différence de taille entre les sphères obtenues pour les cellules exprimant les shPAK3 et les sphères exprimant le sh contrôle (Figure 46 a). Les cellules 4371 exprimant le shCtrl forment moins de sphères, que les cellules exprimant le sh03A (14.5% vs 6% pour les sh03A et Ctrl respectivement (Figure 46 b). Les sphères de taille plus importante obtenues pour les cellules exprimant les sh pourraient indiquer que ces cellules réalisent un plus grand nombre de cycle et/ou que leur cycle est plus court. Les résultats obtenus pour les cellules 3731a ne nous permettent pas de conclure en raison de la variabilité des résultats obtenus, notamment pour les cellules infectées par le vecteur contrôle. Il semble exister une tendance à l'augmentation du nombre de sphères. Pour évaluer la prolifération cellulaire, les cellules ont étéensemencées à faible densité et la taille des sphères est mesurée à plusieurs temps différents (Figure 46 c). Les cellules 3731a infectées prolifèrent mal à faible densité, la

mortalité étant assez élevée. L'analyse de la taille des sphères 4371 au cours du temps suggère que la prolifération des cellules exprimant les sh dirigés contre PAK3 est plus importante que celle des cellules exprimant le shCtrl. Les résultats obtenus pour les cellules 4371 sont plus clairs que ceux obtenus pour les cellules 3731a, ce qui pourrait venir du niveau d'expression initial faible de PAK3 dans ces cellules. Néanmoins, les cellules exprimant les sh03A et sh04A semblent former plus de sphères et proliférer légèrement plus que les cellules exprimant le shCtrl.

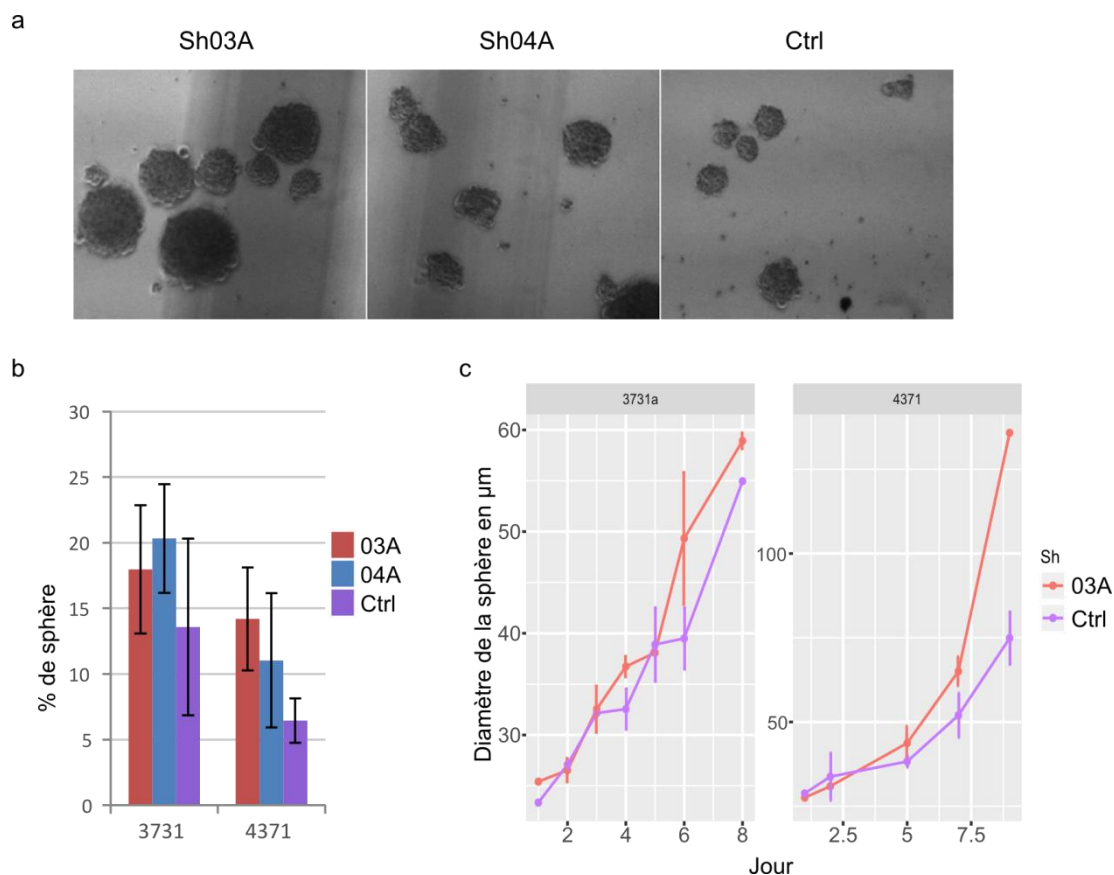


Figure 46. Effet de l'inhibition de l'expression de PAK3 sur les propriétés d'auto-renouvellement et de prolifération des cellules de GBM en culture en sphère. (a) Images représentatives des sphères obtenues après 10 jours de culture en présence de facteurs pour les cellules 4371. (b) Pourcentage de sphères obtenues après ensemencement de 1000 cellules par puit, n=3. (c) Suivi du diamètre des sphères pendant 8 jours de culture (min 100 sphères mesurées par point), n=3. Les cellules sont infectées avec des lentivirus permettant l'expression de shPAK3 (03A, 04A) ou d'un sh contrôle (Ctrl).

3. Efficacité de l'extinction de l'expression des gènes PAK1 et PAK3 par les sh RNA dans les cellules cultivées en monocouche

L'analyse de l'effet de l'extinction de l'expression de PAK3 par shRNA a été réalisée en condition proliférative en présence de facteurs, et au cours de la différenciation, après retrait des facteurs et ajout de sérum (SVF) pendant 72h. L'utilisation des cellules 4371 et 3731a permet d'observer les effets de cette extinction dans des cellules exprimant fortement PAK3

(4371) et dans des cellules peu différenciées, capables d'exprimer des marqueurs de différents lignages et présentant de fortes variations d'expression de *PAK3* au cours de la différenciation (3731b).

Dans les cellules 3731a, les sh dirigés contre *PAK3* diminuent l'expression de *PAK3* par rapport au vecteur contrôle en moyenne respectivement de 95% (03A) et 59% (04A) en condition proliférative (PM) et de 70% (03A) et 40% (04A) en condition différenciée (D) (Figure 47). La différence d'efficacité entre 04a et 03A permet d'obtenir deux conditions avec des niveaux d'extinction différents et d'observer s'il existe un 'effet dose' de l'extinction de *PAK3*. Sur les cellules 4371, plus différenciées et exprimant plus fortement *PAK3*, l'effet des sh est léger à inexistant selon les expériences. En condition PM, l'expression de *PAK3* a pu être diminuée de 70% (03A) et 45% (04A) en moyenne. En condition de différenciation, en absence de facteurs, les sh n'ont pas d'effet par rapport au contrôle ce qui pourrait indiquer un effet de saturation du mécanisme d'inhibition par les sh lorsque l'expression du gène est importante. Il est à noter que même si l'expression de *PAK3* est diminuée par rapport au contrôle, il existe toujours une augmentation de cette expression après le retrait des facteurs (Figure 47). Il n'est donc pas possible de détecter un effet de **l'absence de l'augmentation** de *PAK3* dans les cellules après retrait de facteurs.

En test sur des cellules transfectées par un vecteur permettant l'expression de *PAK1*, les sh*PAK3* n'éteignent pas son expression, analysée par western blot (Figure 44 a). Dans les cellules de GBM, l'effet des sh*PAK3* sur l'expression de *PAK1* est analysé par qPCR. Dans les cellules de la lignée 3731a, l'expression de *PAK1* est diminuée dans une condition, dans les cellules infectées par le sh03A en présence de facteurs. Ces résultats ne permettent pas de conclure si la diminution de l'expression de *PAK3* par les shRNA entraîne des variations de l'expression de *PAK1*, que ce soit par un effet direct ou indirect.

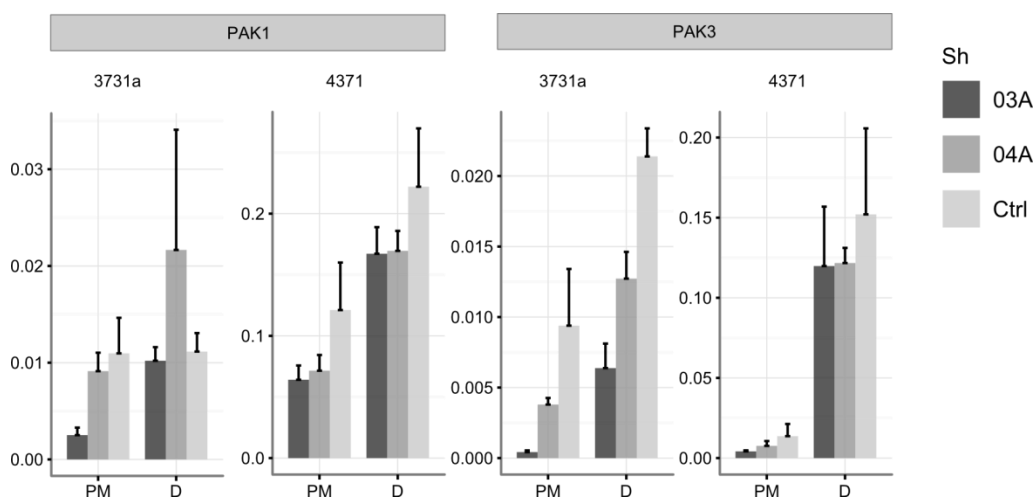


Figure 47. Inhibition de l'expression du gène *PAK3* dans les cellules de GBM infectées par des lentivirus permettant l'expression de shRNA. Expression analysée par qPCR des gènes *PAK1* et *PAK3* dans les cellules de gliomes. Les cellules sont cultivées en monocouche en présence de facteur (PM) ainsi qu'en condition de différenciation, 72h après le retrait des facteurs et en présence de sérum (D). Les cellules expriment soit un sh dirigé contre *PAK3* (03A, 04A), soit un sh scramble (Ctrl), n=3.

4. Effet de l'inhibition de l'expression de PAK3 par shRNA dans les cellules de GBM 3731a

4.1 Analyse de l'effet de l'inhibition de l'expression de PAK3 sur la prolifération et la différenciation des cellules 3731a

Les analyses suivantes ont été réalisées sur les cellules 3731a, sur lesquelles il existe un effet inhibiteur des shRNA sur l'expression de *PAK3*. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'inhibition de *PAK3* sur la prolifération et le cycle cellulaire. Nous avons mesuré les variations d'expression des gènes *P27*, *P53*, *CcnD1* et *CcnD2*. En présence de facteurs, les cellules 3731a exprimant les sh dirigés contre *PAK3* expriment moins *P27* que les cellules exprimant le vecteur contrôle, alors que cycline D1 (*CcnD1*) présente une tendance à la sur-expression. Ces résultats sont retrouvés en condition de différenciation sans facteurs de croissance. Nous avons également réalisé un marquage Ki67+ pour analyser la prolifération des cellules. Aucune différence de prolifération n'est détectable en condition PM entre les cellules exprimant le sh contrôle et les cellules exprimant les sh dirigés contre *PAK3*. Par contre, en condition différenciée (après le retrait des facteurs et en présence de sérum) les cellules exprimant le sh 03A prolifèrent plus que les cellules exprimant le sh contrôle. L'inhibition de l'expression de *PAK3* entraîne donc une augmentation de la prolifération.

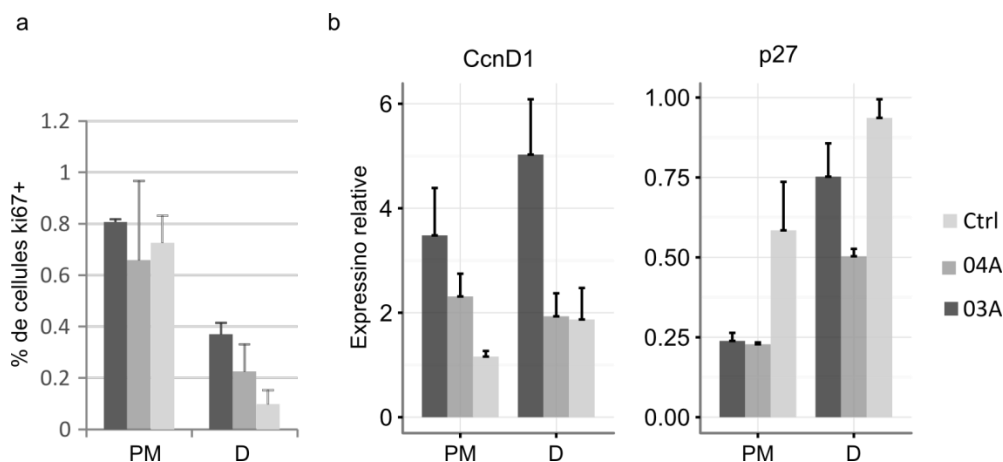


Figure 48. Effet de l'inhibition de l'expression du gène *PAK3* sur la prolifération des cellules de GBM. (a) Quantification de marquages Ki67. (b) Expression des gènes *cycline D1* (*CcnD1*) et *p27* analysée par qPCR dans les cellules de gliomes. Les cellules sont cultivées en monocouche en présence de facteur (PM) ainsi qu'en condition de différenciation, 72h après le retrait des facteurs et en présence de sérum (D). Les cellules expriment soit un sh dirigé contre *PAK3* (03A, 04A), soit un sh scramble (Ctrl), n=3.

L'expression de gènes marqueurs de différents lignages a ensuite été analysée dans les cellules infectées par les différents lentivirus. Sur les cellules 3731a aucun effet dû aux shPAK3 n'est détectable en condition PM. Bien que le sh03A diminue l'expression de *Dcx*, le

sh04A n'a pas le même effet, ce qui pourrait signifier que la baisse d'expression générée par le sh04A n'est pas assez importante pour que l'on observe un effet par rapport au contrôle. Par contre, après le retrait des facteurs les cellules exprimant les sh dirigés contre *PAK3* expriment plus fortement la *GFAP* que les cellules infectées par le vecteur contrôle. Cette augmentation semble en lien avec l'efficacité d'inhibition de la transcription de *PAK3* par le sh : les cellules infectées par le sh03A expriment plus la *GFAP* que les cellules infectées par le sh04a. L'expression des autres marqueurs de lignage ne semble pas être affectée par l'inhibition de *PAK3*, que ce soit en présence ou en absence de facteurs.

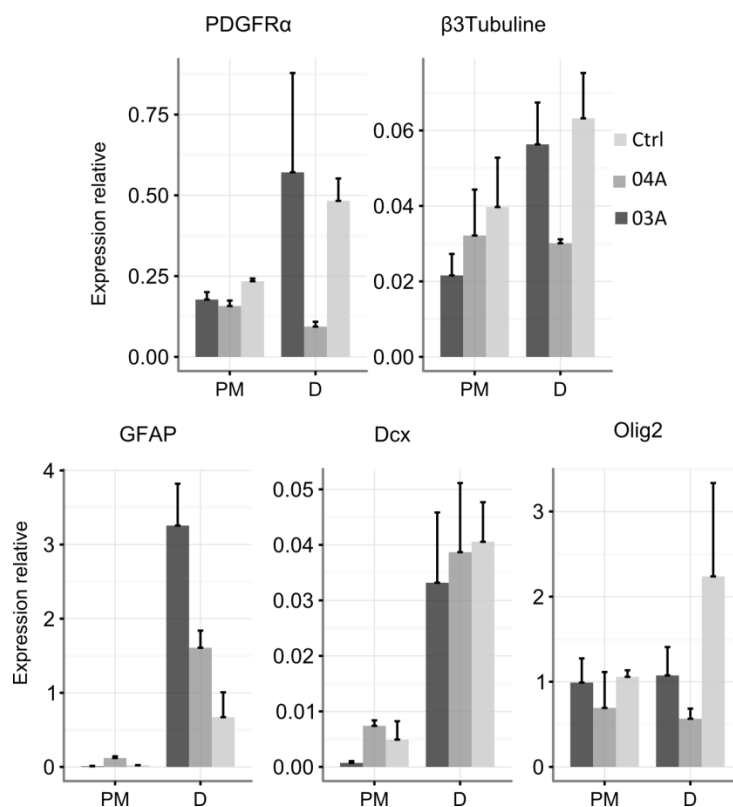


Figure 49. Effet de l'inhibition de l'expression du gène *PAK3* sur la différenciation des cellules de GBM. Analyse de la différenciation des cellules de gliomes après infection par les vecteurs lentiviraux. Les cellules sont cultivées en monocouche en présence de facteur (PM) ainsi qu'en condition de différenciation, après le retrait des facteurs en présence de sérum (D). Analyse qPCR de l'expression de gènes marqueurs de cellules différenciées. Les cellules ont été infectées avec des vecteurs lentiviraux permettant l'expression de sh dirigés contre *PAK3* (03A et 04A) ou d'un sh contrôle (Ctrl), n=3.

4.2 Analyse de l'inhibition de *PAK3* sur les propriétés d'invasion et de tumorigénicité des cellules 3731a *in vitro*

Les cellules de la lignée 3731a sont facilement dissociables et forment un tapis homogène en monocouche, ce qui permet de réaliser des tests de dilution limite et de 'scratch', et donc de détecter les effets de l'inhibition de l'expression de *PAK3* sur la migration cellulaire et la tumorigénicité. L'évaluation de la tumorigénicité des cellules a été réalisée par test de dilution

limite (Hu et Smyth, 2009). Ce type de test permet d'estimer la proportion de cellules souche dans une population cellulaire. Il a été utilisé lors des premières identifications de la présence de cellules initiatrices de cancer dans les tumeurs cérébrales (Singh *et al.*, 2003). Le nombre de cellules nécessaire à la formation d'au moins une sphère est plus faible dans les cellules infectées par le sh PAK3 03A (~21 cellules) par rapport aux cellules contrôles (~35), ce qui indique une augmentation du nombre de cellules capables de s'auto-renouveler à faible densité *in vitro* (Figure 50 a).

Une des fonctions principales des p21-activated kinase est le contrôle de la motilité cellulaire à travers la régulation du cytosquelette d'actine. Les cellules sont mises en culture en monocouche en présence de facteurs. Une fois le tapis cellulaire formé, le scratch est réalisé à l'aide de la pointe d'une pipette, et le tapis cellulaire est rincé avant d'être placé en milieu sans facteurs de croissance pour limiter la prolifération cellulaire. La migration des cellules est évaluée par mesure de l'aire de la rayure. Les cellules exprimant le shPAK03A migrent plus que les cellules exprimant le sh contrôle (Figure 50 c et d). **Les résultats obtenus semblent montrer que la diminution de l'expression de PAK3 par les sh augmente la tumorigénicité et la motilité cellulaire.**

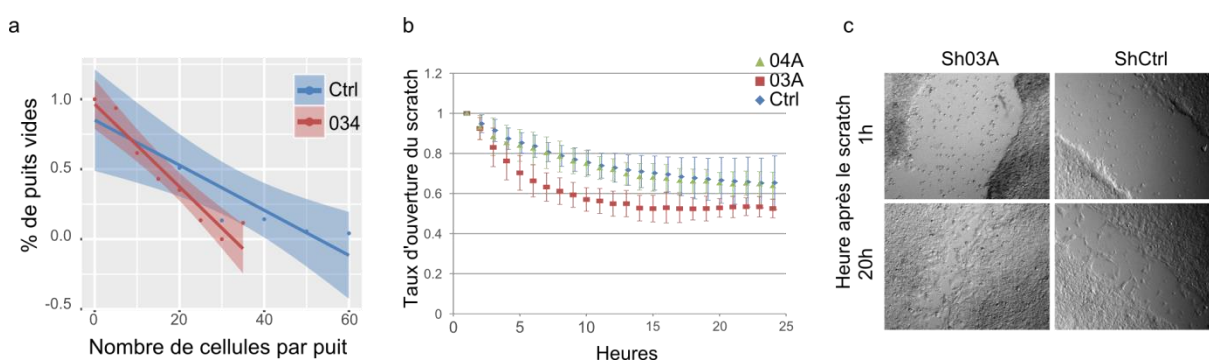


Figure 50. Effet de l'inhibition de l'expression de PAK3 par shRNA sur l'auto-renouvellement et la motilité des cellules de GBM. (a) Test de dilution limite réalisé sur les cellules 3731a. Le nombre de cellules nécessaires pour obtenir au moins une sphère est de 21 pour les cellules exprimant le sh, et 41 pour les cellules exprimant le vecteur contrôle. (b) Taux de fermeture du scratch au cours du temps. (c) Images du tapis de cellules 1h et 20h après le scratch. (d) n=3.

4.3 Analyse de l'inhibition de PAK3 sur la tumorigénicité et la croissance des cellules 3731a *in vivo*

Suite aux résultats obtenus *in vitro* montrant un effet possible de l'inhibition de PAK3 par les sh, nous avons analysé la tumorigénicité et la prolifération des cellules infectées par le vecteur permettant l'expression du sh03A *in vivo*. Ce sh est celui qui diminue le plus fortement l'expression de PAK3, et a le plus d'effet sur les propriétés des cellules de GBM 3731a *in vitro*. Nous avons réalisée des xenogreffes chez la souris. Les sphères sont dissociées et les cellules injectées en sous cutané dans le flanc de souris nudes (1.10^6 cellules par souris).

La croissance tumorale est suivie par mesure du volume de la tumeur, en suivant le même protocole que celui décrit en II.4. Les tumeurs issues de cellules 3731a exprimant le sh 03A sont celles dont la croissance est la plus rapide par rapport aux cellules exprimant le shCtrl (Figure 51 a). La médiane de survie des souris injectées avec les cellules exprimant le sh03A est de 20 semaines, et celles des souris injectées avec les cellules exprimant le shCtrl est de 30 semaines (Figure 51 b). **La diminution de l'expression de PAK3 dans les cellules de gliome 3731a entraîne une augmentation de la vitesse de croissance tumorale *in vivo*.**

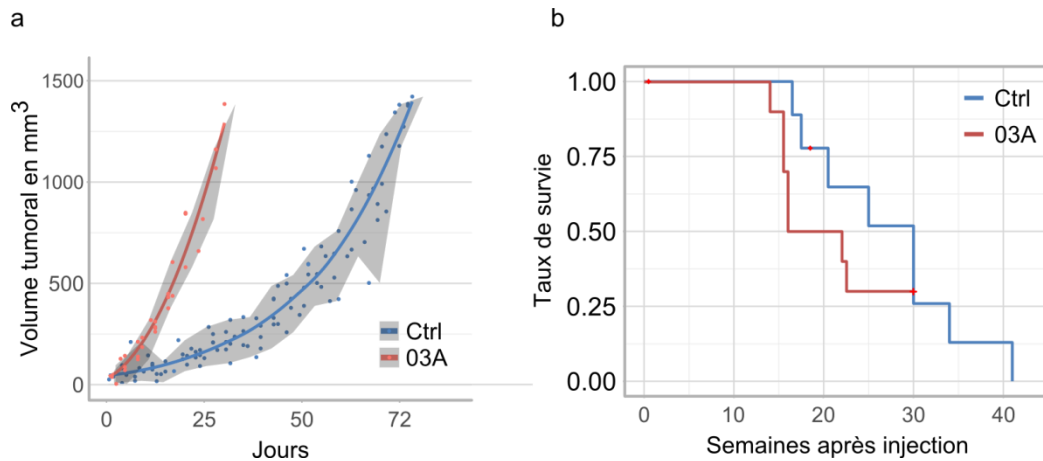


Figure 51. Effet de l'inhibition de l'expression de PAK3 par shRNA sur la tumorigénicité *in vivo*. (a) Suivi de la survie des souris injectées en sous cutané avec les cellules de GBM. (b) Suivi de la croissance tumorale par mesure externe au pied à coulisse. Souris, n=10. Les souris de la cohorte sh 03A n'ont été suivit que jusqu'à 30 semaines pour le moment.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. PAK3 à l'opposé de PAK1 et PAK2 dans les gliomes

A l'exception d'une étude sur PAK1, les kinases PAK du groupe I n'ont pas été étudiées dans les gliomes. La première analyse que nous avons réalisée est l'observation de la survie des patients en fonction de l'expression de *PAK1*, *PAK2* et *PAK3*. En accord avec son rôle d'oncogène dans d'autres cancers (Kumar et Li, 2016), une expression plus forte de *PAK1* est associée à une survie plus faible des patients. Cependant, lorsque nous avons quantifié l'expression de *PAK1* dans les gliomes en les regroupant selon leur grade, leur classification histologique, ou la présence de marqueurs moléculaires, nous n'avons pas identifié de groupe de tumeurs de plus mauvais pronostic exprimant plus fortement *PAK1*. Au contraire, son expression est légèrement plus élevée dans les tumeurs de plus bas grade, et est significativement plus élevée dans les tumeurs avec *EGFR* non amplifié, donc des tumeurs souvent de meilleur pronostic (Figure 32). *In vitro*, la différenciation et l'arrêt de la prolifération des cellules de gliomes ne sont pas accompagnées de la diminution de l'expression de *PAK1*. Nous avons réalisé les mêmes analyses pour PAK2 (Résultats non montrés). Au contraire des deux autres isoformes, *PAK2* est surexprimé dans tous les types de gliomes, ce qui pourrait être expliqué par le fait que les tumeurs sont très vascularisées, et que son expression ubiquitaire est relativement forte dans les cellules endothéliales, alors que *PAK1* et *PAK3* ont des expressions plus restreintes et très faibles dans les cellules endothéliales. Nous n'avons pas pu déterminer de groupe de patients présentant des survies significativement différentes en fonction de l'expression de *PAK2*, et n'avons pas pu non plus associer une augmentation de son expression avec la présence d'un marqueur moléculaire (codélétion 1p/19q, mutation *IDH*, Amplification de l'*EGFR*). Ainsi, les oncogènes *PAK1* et *PAK2* ne semblent pas être liés à un mécanisme de progression tumorale particulier dans les gliomes, au contraire d'autres cancers.

Les observations sont différentes pour PAK3. Tout d'abord, une expression plus forte de *PAK3* est associée à une meilleure survie des patients atteints de gliome, ce qui l'oppose aux autres PAK. Au niveau histologique, dans les deux cohortes analysées, *PAK3* est plus fortement exprimé dans les tumeurs avec une composante oligodendrocytaire. Après répartition des gliomes selon les marqueurs *IDH*, *EGFR* et 1p/19q, nous avons observé que *PAK3* est systématiquement plus fortement exprimé dans le groupe de tumeurs de meilleur pronostic. Plus précisément, dans les deux cohortes, les gliomes présentant la codélétion 1p/19q surexpriment *PAK3* par rapport aux autres types de gliomes, or la codélétion 1p/19q caractérise un sous ensemble de gliomes à caractère oligodendrogial de bon pronostic, des tumeurs majoritairement proneurales, plus différenciées et moins invasives (Reifenberger *et al.*, 1994). La corrélation d'une plus forte expression de *PAK3* avec un meilleur pronostic de survie des patients est donc due à l'association cette expression avec la présence de la codélétion 1p/19q et le phénotype oligodendrogial. Ces résultats sont en accord avec un rôle de suppresseur de tumeur de PAK3.

II. PAK3 et différenciation

Nous avons vu que l'expression de *PAK3* est plus importante dans les tumeurs 1p/19q. Ce sont des tumeurs de type majoritairement proneural, exprimant des gènes de la différenciation oligodendrocytaire, comme *PDGFRA*, *Olig2* et *NKX2.2*, et des gènes de développement proneuraux, comme *Dcx* et *ASCL1* (Phillips *et al.*, 2006; Verhaak *et al.*, 2010). Ces tumeurs sont majoritairement composées de cellules oligodendrocytaires et neuronales plus différenciées par rapport aux autres gliomes. Au cours de ma thèse, j'ai montré que *PAK3* était plus fortement exprimé dans les cellules de la lignée la plus proneurale, dont les cellules sont plus différenciées et moins prolifératives. J'ai également montré que l'expression de *PAK3* augmentait avec la différenciation des cellules, et plus particulièrement avec la différenciation neuronale. Ainsi l'expression de *PAK3* augmente en concomitance avec les gènes *Dcx* ou $\beta 3$ -tubuline. Il existe donc un lien clair entre *PAK3* et différenciation, que ce soit dans les lignées de cellules de gliome ou dans les tumeurs. Cependant, dans les tumeurs comme dans les cellules de gliome, nous ne pouvons pas déterminer si l'expression plus élevée de *PAK3* est la cause ou la conséquence de la présence de cellules plus différenciées.

Pour répondre à cette question, nous avons entrepris de supprimer l'expression de *PAK3* grâce à des shRNA, afin de déterminer si celle-ci est nécessaire à la différenciation, et plus précisément à la différenciation neuronale et oligodendrocytaire. Nous avons réussi à inhiber l'expression de *PAK3* dans les cellules de la lignée 3731a. Pour analyser les effets de cette inhibition sur la différenciation, ces cellules ont été placées en conditions de culture favorisant la différenciation des cellules. Nous avons observées que les cellules exprimant les shPAK3 expriment moins les marqueurs oligodendrocytaires, et expriment plus la GFAP que les cellules exprimant le shContrôle. En plus de ces données, nous avons pu observer parmi nos différentes lignées de cellules que la lignée de cellule de gliome exprimant le moins *PAK3* est réfractaire à la différenciation neuronale, mais est capable d'augmenter sa différenciation astrocytaire (expression de GFAP, Figure 49). A l'inverse, la lignée de cellule de gliome exprimant plus fortement *PAK3* favorise l'augmentation de marqueurs neuronaux (*Dcx*, $\beta 3$ tubuline). Ceci pourrait indiquer que l'expression de *PAK3* est nécessaire à l'induction et/ou au maintien de la différenciation neuronale et oligodendrogliale, et/ou qu'elle est nécessaire à l'inhibition de la différenciation astrocytaire. Il est important de noter que la GFAP est exprimée aussi bien par les astrocytes que par les progéniteurs. Nos résultats sont compatibles avec ceux d'études réalisées chez le Xénope et la souris : chez le Xénope, Souopgui et collègues ont décrit que XPAK3 était exprimé au cours de la neurogenèse embryonnaire de manière concomitante aux marqueurs de différenciation neuronale. Son expression est régulée positivement par les gènes proneuraux comme la neurogénine. L'activation de *PAK3* entraîne l'arrêt du cycle et une différenciation neuronale prématurée et augmentée de manière dose-dépendante. A l'inverse l'inhibition de l'expression de *PAK3* par morpholino augmente la prolifération des progéniteurs et diminue la différenciation neuronale (Souopgui, Sölter et Pieler, 2002). Chez la souris, *PAK3* est impliqué dans la différenciation neuronale et la différenciation oligodendrogliale (Cobos, Borello et Rubenstein, 2007; Dai *et al.*, 2014; Maglorius Renkilaraj *et al.*, 2017). Dans les cellules du pancréas, l'expression de *PAK3*

favorise la sortie du cycle cellulaire et la différenciation (Piccand *et al.*, 2014). De manière intéressante l'expression de PAK3 est régulée positivement par la neurogénine 3 dans ce type cellulaire (Piccand *et al.*, 2014).

Nous pourrions proposer un modèle dans lequel, dans les cellules neurales, l'expression de PAK3 détermine la spécification/destin cellulaire. Une absence d'expression de PAK3 favoriserait le destin astrocytaire, son expression transitoire le destin oligodendroglial, et son expression soutenue le destin neuronal. Afin de confirmer que l'expression de PAK3 est nécessaire à la différenciation, voire suffisante pour induire la différenciation, plusieurs approches sont en cours d'élaboration dans mon équipe pour surexprimer ou supprimer la protéine.

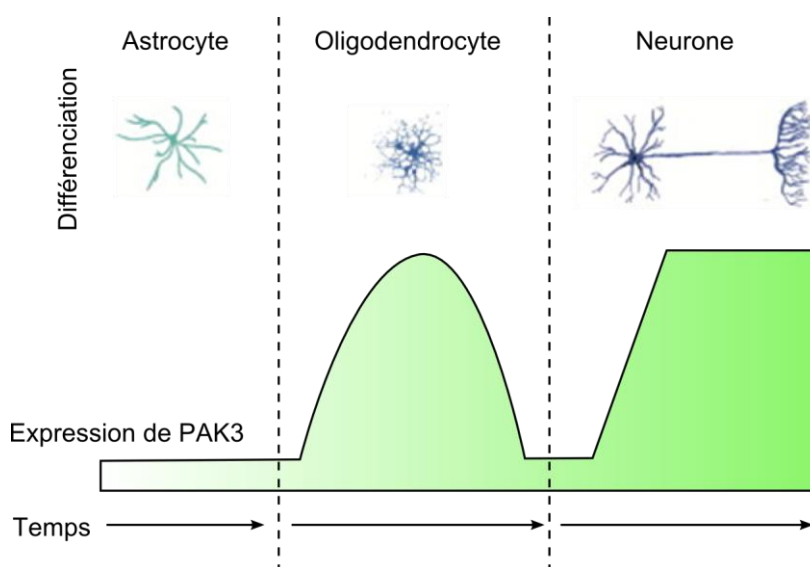


Figure 52. Modèle hypothétique 'Expression de PAK3 au cours de la différenciation neurale'

III. PAK3 et tumorigénicité

Plusieurs arguments soutiennent l'hypothèse qu'au moins une des fonctions de PAK3 est défavorable à la tumorigénèse. Tout d'abord PAK3 est exprimé dans les tumeurs de meilleur pronostic. *In vivo*, la lignée de cellule de type plus proneural exprimant le plus PAK3 n'est pas tumorigène après greffe hétérotopique chez la souris nude. Ce rôle anti-tumoral pourrait être dû à des fonctions spécifiques de PAK3 entraînant la sortie du cycle cellulaire. Dans les lignées de cellules de gliome étudiées, l'expression de *PAK3* est inversement corrélée avec la prolifération et la tumorigénicité. Les cellules dans lesquelles l'expression de *PAK3* a été diminuée par shRNA sont plus prolifératives et tumorigènes *in vivo* et *in vitro*.

Chez le Xénope, la sur-activation de PAK3 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire, et inversement l'inhibition de son expression par morpholino entraîne l'augmentation de la

prolifération des progéniteurs (Souopgui, Sölter et Pieler, 2002). Chez la souris, l'inhibition de PAK3 entraîne également un délai de différenciation et de sortie du cycle des OPC (Maglorius Renkilaraj *et al.*, 2017). PAK2 pourrait donc être l'une des kinases contrôlant la prolifération des OPC, or les OPC pourraient être la population de cellules responsable de l'apparition d'un gliome.

IV. Mécanismes possibles qui permettraient un rôle spécifique de PAK3

La kinase PAK3 posséderait donc des fonctions uniques non compensées par les autres isoformes ce qui est soutenu par le fait que les mutations de PAK3 chez l'homme sont responsables de retard mental. Ceci implique des fonctions de PAK3 non redondantes avec les autres isoformes au cours du développement. Plusieurs mécanismes pourraient permettre des fonctions spécifiques de PAK3 :

1. PAK3 aurait des substrats spécifiques

La plupart des substrats identifiés pour PAK1 n'ont pas été analysés pour les autres isoformes (Kumar et Li, 2016). A l'heure actuelle, il n'existe qu'un substrat identifié spécifique de PAK3, une sous-unité du récepteur au glutamate (Hussain *et al.*, 2015). Cependant il pourrait exister d'autres substrats spécifiques. Une des hypothèses serait donc que PAK3 possède un ou plusieurs substrats propres impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et/ou la différenciation neurale.

2. Voies de régulations différentes

Une autre hypothèse, complémentaire de celle des substrats spécifiques, est que PAK3 fait partie d'une voie de signalisation différente de celle des autres isoformes. Mon équipe a montré que les voies de signalisation diffèrent entre PAK1 et PAK3 sur plusieurs points. PAK3 est activée préférentiellement par Cdc42, et se lie préférentiellement aux adaptateurs Nck2/Grb4 (Kreis *et al.*, 2007; Thévenot *et al.*, 2011).

L'association entre l'expression de PAK3 et la codélétion 1p/19q pourrait indiquer que des gènes régulateurs négatifs de PAK3 se situeraient dans les zones chromosomiques délétées. Dans ces tumeurs proneurales, il y a souvent des amplifications du PDGFR, des mutations inactivatrices de NOTCH1 et une activation de la voie PI3K (TCGA Network, 2015). Sachant que l'expression de *PAK1* n'est pas différente entre les tumeurs codélétés ou non, ces voies de signalisations représentent un champ d'investigation pour trouver des régulateurs potentiels spécifiques de PAK3. Un autre mécanisme moléculaire pouvant donc être impliqué est la régulation de PAK3 par Notch. Chez le Xénope, l'expression du domaine intracellulaire de NOTCH diminue l'expression de XPAK3 à travers l'inhibition de la *Ngn1*. NOTCH1 est un régulateur négatif de PAK3 (dans le développement embryonnaire) (Souopgui, Sölter et Pieler, 2002). Il est possible que NOTCH1 régule négativement PAK3 également dans les cellules de gliomes, étant donné que les mutations inactivatrices de NOTCH sont fréquentes dans les tumeurs 1p19q qui surexpriment PAK3 (Verhaak *et al.*, 2010; TCGA Network, 2015). Dans ces gliomes, les mutations inactivatrices de FUBP1, CIC et NOTCH1 sont

fréquentes. Etant donné que le lien Notch/PAK3 existe, il est possible que CIC et FUBP1 soient également des régulateurs négatifs de PAK3 :

- CIC est un répresseur transcriptionnel impliqué dans la transduction du signal RTK. En absence du signal, CIC réprime la transcription de gènes en se liant à leur promoteur. Les dysfonctionnements de CIC sont liés à des maladies neurodégénératives, CIC est donc probablement impliqué dans le développement neuronal et dans la régulation du cycle cellulaire. Cependant, dans les gliomes l'inactivation de CIC est de mauvais pronostic (Gleize *et al.*, 2015). Nous avons analysé l'expression de PAK3 en fonction des mutations de CIC, et n'avons pas observé de différence. CIC ne semble donc pas impliqué directement dans la régulation de l'expression de PAK3.
- FUBP1 est un régulateur transcriptionnel de c-Myc qui favorise la prolifération, la résistance à l'apoptose et la migration. Il peut également se lier à l'ARN. Il s'agit d'un proto-oncogène surexprimé dans de très nombreux cancers. Dans les gliomes, l'expression de FUBP1 est de mauvais pronostic, et *in vitro*, elle favorise la croissance tumorale et la migration, en corrélation avec une inhibition de la différenciation (Z. Ding *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2016). FUBP1 entraîne la surexpression de la stathmine dans les cancers. Ces fonctions sont opposées aux fonctions potentielles de PAK3. C-Myc et la stathmine sont des cibles de PAK1, donc potentielles de PAK3. Les mutations inactivatrices de FUBP1 sont associées à la différenciation oligodendrogliale (Baumgarten *et al.*, 2014). Ces données seraient en accord avec un rôle de régulateur négatif indirect ou direct de FUBP1 sur PAK3.

3. Localisations différentes

PAK1, PAK2 et PAK3 ne sont pas exprimés de la même manière dans les types cellulaires. La localisation de PAK3 par rapport à celle de PAK1 pourrait également jouer sur les voies de signalisations qui l'active et celles qu'elle active. En effet PAK3 pourrait se retrouver en contact ou non avec des partenaires différents selon où elle se trouve dans la cellule. Or, dans les cellules, PAK1, PAK2 et PAK3 ont des localisations différentes une fois activés. Contrairement à PAK3 et PAK2, PAK1 possède plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS), ce qui suggère que PAK1 aurait des substrats et activités dans le noyau que n'auraient pas les autres isoformes.

4. Les hétérodimères PAK1/PAK3

PAK3 pourrait agir sur la prolifération en inhibant PAK1. Les PAK forment des homodimères inhibiteurs (Lei *et al.*, 2000; Parrini *et al.*, 2002), mais nous avons montré que PAK3 préfère former des hétérodimères avec PAK1 plutôt que des homodimères, ce qui inhibe l'activité de PAK1 (Dubos *et al.*, 2012) L'augmentation de PAK3 pourrait donc mener à l'inhibition de l'activité de PAK1.

5. Régulation de l'activité de PAK3 et variants d'épissage

Notre équipe a identifié et caractérisé les variants d'épissage de PAK3. Les variants d'épissages sont capables de former des complexes inhibiteurs avec PAK1, mais les variants ont des activités biochimiques différentes de celles de PAK3a PAK1 et PAK2. Entre autre, leur activité kinase est constitutive (Kreis *et al.*, 2008). Les variants pourraient posséder des voies de signalisations qui leur sont propre, et leur quantité pourrait alors être un système de régulation de la signalisation. La possibilité que les différents variants d'épissages aient des fonctions non redondantes est étayée par le fait qu'ils sont conservés au cours de l'évolution.

V. Implication thérapeutiques et perspectives

L'hypothèse que les cellules d'origine des tumeurs seraient des cellules souches neurales ou des cellules post-mitotique dé-différenciées, et la similarité entre les voies de signalisations impliquées dans la prolifération et la différenciation des GIC et le développement du système nerveux a incité les équipes à élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques et ciblées. Ces stratégies utilisent les voies de régulation impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales (Stiles et Rowitch, 2008). L'utilisation d'agents permettant la différenciation, comme l'AR ou les BMP, paraissait prometteuse, mais la réponse à ces agents semble très variable selon la tumeur. L'utilisation de gènes permettant l'activation de voies pro-apoptotiques ou pro-différenciation pourrait être une thérapie prometteuse. Les p21-activated kinases sont des protéines clés au cœur de nombreuses voies de signalisation oncogéniques. Ce sont déjà des cibles intéressantes pour plusieurs cancers et notamment le cancer du sein, dans lesquels elles régulent des mécanismes de prolifération et de survie.

1. Hétérogénéité de la réponse à la différenciation des cellules de GBM

Durant mes travaux de thèse j'ai caractérisé trois lignées de cellules de glioblastome différentes, tant au niveau de leur état souche que de leur prolifération et de leur différenciation. Cette caractérisation a été réalisée à l'aide de tests fonctionnels et d'analyses d'expressions de gènes. Ces lignées de cellules peuvent être classées en deux groupes, proneural et mésenchymateux, correspondant respectivement à un phénotype différencié peu prolifératif et tumorigène, et à un phénotype peu différencié, fortement prolifératif et tumorigène. Comme d'autres équipes, j'ai observé une variété de réponse des lignées de cellules à l'induction de la différenciation. De plus, parmi les trois lignées de cellules de GBM étudiées, deux proviennent de la même tumeur initiale, pourtant, leurs caractéristiques sont différentes, ainsi que leur réponse à l'induction de la différenciation : les cellules de la lignée 3731a sont sensibles à l'AR et au BMP4, et capables de se différencier dans les lignages gliaux et neuronaux, tandis que les cellules 3731b sont insensibles à l'AR et ne se différencient que peu ou pas dans le lignage neuronal. Ces données reflètent la dérive vers le phénotype mésenchymateux observée pour les tumeurs récurrentes. Elles mettent aussi en évidence une difficulté possible dans le traitement des gliomes : si un traitement précis, ou le

changement d'environnement causé par un traitement, sélectionne une population cellulaire, celle-ci pourra ne plus répondre, ou répondre différemment aux traitements.

2. L'acide rétinoïque et PAK

Nous avons montré que l'expression de *PAK1* est augmentée par l'AR, dans toutes nos lignées de cellules, ce qui n'est pas le cas pour celle de *PAK3*, et que PAK1 et PAK3 pourraient avoir des fonctions opposées. En fonction du contexte cellulaire et de la balance PAK1/PAK2, les voies de signalisations activées par l'AR pourraient être différentes. L'AR active plusieurs types de récepteurs dont les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïques (RAR) et les peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). Les effets de l'AR sur les gliomes et les lignées de cellules de gliomes sont variables selon les études. Certains travaux ont démontré un effet bénéfique de l'AR et d'autres n'ont pas décelé d'effet, ou un effet négatif (Schug *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2015). Il a même été montré que l'AR pouvait entraîner la transcription de gènes pro-cancéreux dans les cellules de GBM (Schug *et al.*, 2008; Janesick, Wu et Blumberg, 2015).

Initialement, les rôles opposés de l'AR semblaient être dus à l'activation de deux voies différentes. Une voie médiée par CRABP2, qui délivre l'AR aux RAR et entraîne la différenciation, l'arrêt du cycle et l'apoptose, et une autre voie médiée par FABP5 qui délivre l'AR aux PPAR et favorise la prolifération et la survie (Campos *et al.*, 2011). Schug et collègues ont montré que l'activation de PPAR par l'AR induit l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la survie cellulaire (Schug *et al.*, 2007, 2008; Janesick, Wu et Blumberg, 2015). Or la répartition de l'AR entre les RAR et les PPAR peut être régulée par les protéines de liaison aux lipides CRABP2 et FABP5. Le ratio CRABP/FABP5 pouvait ainsi déterminer la fonction de l'AR, selon l'activation principale obtenue entre RAR et PPAR. Les résultats obtenus par la suite ont contredit cette hypothèse (Campos *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2015). Il existe donc au moins une autre voie de signalisation contrôlant la réponse d'une cellule à l'AR, et PAK1, voir le ratio PAK1/PAK3, pourrait en être un élément déterminant.

L'AR active des récepteurs nucléaires, qui activent des co-répresseurs-et co activateurs pour réguler la transcription de gènes. L'AR réprime le complexe AP1 à travers une voie non identifiée (Benkoussa *et al.*, 2002). Or il a été montré que AP1 était potentiellement un régulateur positif de l'expression de *PAK3* dans des fibroblastes (Holderness Parker *et al.*, 2013). Nous n'avons pas détecté d'inhibition de l'expression de *PAK3* dans nos cellules cultivées en présence d'acide rétinoïque, mais il est possible que l'inhibition de AP1 par l'AR entraîne la diminution partielle de l'expression de *PAK3* et donc l'augmentation du ratio PAK1/PAK3. Eventuellement, cette signalisation pourrait mener à une augmentation de la prolifération et de la survie liée à PAK1. Ces résultats sont à prendre avec précaution étant donné que la régulation AP1/PAK3 a été mise en évidence dans des fibroblastes de rat et non dans un contexte cérébral. L'AR induit de la mort cellulaire dans les cellules de GBM. L'augmentation de *PAK1*, impliquée dans les mécanismes de survie cellulaire, pourrait être une réponse de lutte de la cellule pour lutter contre l'apoptose.

De manière très intéressante, une hypothèse serait que l'AR ait des effets différents sur les cellules souches et les cellules progénitrices et en cours de différenciation. Sur une minorité de cellules au sein de la tumeur, les cellules initiatrices de gliome, l'AR favorise la prolifération et la survie (Niu *et al.*, 2010). Or, nos données montrent que l'expression de PAK3 augmente au cours de la différenciation des cellules, et que les cellules exprimant peu PAK3 ne différencient pas en réponse à la présence d'AR en culture *in vitro*. La présence de PAK3 pourrait donc favoriser la réponse des cellules à l'AR. Surexprimer PAK3 dans les cellules de gliomes pourrait permettre de les sensibiliser à l'AR.

3. PAK3 et différenciation neuronale

Au vu des résultats obtenus par nous et par d'autres, PAK3 serait impliqué préférentiellement dans la différenciation neuronale et oligodendrogliale. Or, ces deux voies de différenciation pourraient être à privilégier par rapport à la différenciation astrocytaire dans le traitement des cellules de gliomes. Les BMP, et en particulier le BMP4, entraînent une différenciation principalement gliale des cellules, et ont été initialement envisagés comme agents thérapeutiques pour les gliomes. Il a été montré que le BMP4 permet la différenciation et l'arrêt de la prolifération *in vivo* et *in vitro*, et diminue la tumorigénicité des cellules (Piccirillo *et al.*, 2006). Cependant, dans une étude réalisée par Carèn et collègues en 2015, parmi plusieurs lignées de cellules de GBM établies à partir de patients, seules certaines répondent aux BMP par la différenciation. Cette différenciation est majoritairement astrocytaire et n'est pas terminale. En effet les cellules recommencent à proliférer une fois remises en présence de facteurs, et restent capables de donner des tumeurs une fois injectées dans le cerveau de souris. Dans le cerveau normal, les astrocytes et les oligodendrocytes restent capables de retourner dans le cycle et de proliférer sous certaines conditions. Reste la possibilité que le lignage neuronal soit moins sujet à la prolifération. Dans ce contexte, l'utilisation d'un gène comme PAK3 qui entraîne majoritairement la différenciation dans le lignage neuronal pourrait être intéressante.

Nos résultats suggèrent que les thérapies par différenciation pourraient être développées en fonction du niveau d'expression de gènes comme *PAK3*, qui pourraient être prédictifs de la réponse d'une tumeur à une thérapie. Les thérapies par différenciation forcées sont déjà considérées pour les GBM (Guichet *et al.*, 2013; Balasubramaniyan *et al.*, 2015). *PAK3* pourrait être une cible utile pour les tumeurs peu différenciées, car l'expression de ce gène est régulée positivement par les gènes proneuraux comme les neurogénines (Souopgui, Sölter et Pieler, 2002; Piccand *et al.*, 2014). Un autre aspect impacté par la présence de fonctions opposées de PAK3 et PAK1 est l'utilisation des inhibiteurs des PAK. Pour le moment aucun inhibiteur spécifique d'isoforme n'existe (Crawford, Hoeflich et Rudolph, 2012). Ces inhibiteurs non spécifiques pourraient donc avoir des effets non désirés en inhibant PAK3, un gène probablement suppresseur de tumeurs, sur deux aspects : en altérant ses fonctions dans la prolifération et la différenciation des cellules de gliomes, et en l'empêchant de réguler l'activité de PAK1.

VI. CONCLUSION

En conclusion, mes travaux mettent en évidence pour la première fois l'importance d'un gène codant pour une kinase de la famille des p21-Activated Kinases dans la physiopathologie des gliomes de haut grade. Nous montrons que l'expression élevée de ce gène est associée à certaines caractéristiques cliniques, et des marqueurs cellulaires *in vitro* : elle est corrélée à une meilleure survie des patients, une sous-classe de tumeurs co-délétées 1p/19q, des caractéristiques histologiques oligodendrocytaires dans les tumeurs, et à une signature neurale/proneurale dans les lignées cellulaires issues de tumeur. L'augmentation de son expression accompagne la diminution de la prolifération cellulaire et une différenciation de type neuronale dans ces lignées. Dans une lignée de cellules de GBM dans laquelle nous avons réussi à diminuer l'expression de *PAK3*, nous observons une augmentation de la tumorigénicité et de la croissance tumorale associée à une diminution des traits neuronaux au profit de ceux astrocytaires. L'ensemble de ces données, ajoutées aux données bibliographiques sur son rôle dans les différenciations neuronale et oligodendrocytaire, suggère fortement que ce gène joue un rôle inhibiteur de la croissance tumorale dans la physiopathologie des gliomes de haut grade. Il pourrait constituer de ce fait une nouvelle cible thérapeutique pour ces cancers, et remettre en question l'utilisation d'inhibiteurs non spécifiques des PAK. Mes travaux apportent les premiers éléments montrant que ce gène n'est pas un oncogène comme les autres membres des kinases PAK, mais plutôt un gène suppresseur de tumeur.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Ables, J. L., Breunig, J. J., Eisch, A. J. et Rakic, P. (2011) « Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain », *Nature Reviews Neuroscience*, 12(5), p. 269-283. doi: 10.1038/nrn3024.

Alahari, S. K., Reddig, P. J. et Juliano, R. L. (2004) « The integrin-binding protein Nischarin regulates cell migration by inhibiting PAK. », *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 23(14), p. 2777-88. doi: 10.1038/sj.emboj.7600291.

Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., Alvarez-Buylla, A. et Parada, L. F. (2009) « Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. », *Cancer cell*. NIH Public Access, 15(1), p. 45-56. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.006.

Alcantara Llaguno, S. R., Wang, Z., Sun, D., Chen, J., Xu, J., Kim, E., Hatanpaa, K. J., Raisanen, J. M., Burns, D. K., Johnson, J. E. et Parada, L. F. (2015) « Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. », *Cancer cell*. NIH Public Access, 28(4), p. 429-40. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.007.

Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G. et von Deimling, A. (2015) « Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers », *Acta Neuropathologica*, 129(6), p. 829-848. doi: 10.1007/s00401-015-1432-1.

Allen, K. M., Gleeson, J. G., Bagrodia, S., Partington, M. W., MacMillan, J. C., Cerione, R. A., Mulley, J. C. et Walsh, C. A. (1998) « PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. », *Nature Genetics*, 20(1), p. 25-30. doi: 10.1038/1675.

de Almeida Sassi, F., Lunardi Brunetto, A., Schwartzmann, G., Roesler, R. et Abujamra, A. L. (2012) « Glioma revisited: from neurogenesis and cancer stem cells to the epigenetic regulation of the niche. », *Journal of oncology*, 2012, p. 537861. doi: 10.1155/2012/537861.

Aoki, H., Yokoyama, T., Fujiwara, K., Tari, A. M., Sawaya, R., Suki, D., Hess, K. R., Aldape, K. D., Kondo, S., Kumar, R. et Kondo, Y. (2007) « Phosphorylated Pak1 level in the cytoplasm correlates with shorter survival time in patients with glioblastoma. », *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(22 Pt 1), p. 6603-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0145.

Arias-Romero, L. E. et Chernoff, J. (2008) « A tale of two Paks. », *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 100(2), p. 97-108. doi: 10.1042/BC20070109.

Arias-Romero, L. E., Villamar-Cruz, O., Pacheco, A., Kosoff, R., Huang, M., Muthuswamy, S. K. et Chernoff, J. (2010) « A Rac-Pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells Luis », *Oncogene*, 29(43), p. 5839-5849. doi: 10.1038/onc.2010.318.A.

Arko, L., Katsyv, I., Park, G. E., Luan, W. P. et Park, J. K. (2010) « Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. », *Pharmacology & therapeutics*. NIH Public Access, 128(1), p. 1-36. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.04.015.

Asrar, S., Meng, Y., Zhou, Z., Todorovski, Z., Huang, W. W. et Jia, Z. (2009) « Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1) », *Neuropharmacology*,

56(1), p. 73-80. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.055.

Assanah, M., Lochhead, R., Ogden, A., Bruce, J., Goldman, J. et Canoll, P. (2006) « Glial Progenitors in Adult White Matter Are Driven to Form Malignant Gliomas by Platelet-Derived Growth Factor-Expressing Retroviruses », *Journal of Neuroscience*, 26(25). Disponible à: <http://www.jneurosci.org/content/26/25/6781.long> (Consulté le: 2 mai 2017).

Bachoo, R. M., Maher, E. A., Ligon, K. L., Sharpless, N. E., Chan, S. S., You, M. J., Tang, Y., DeFrances, J., Stover, E., Weissleder, R., Rowitch, D. H., Louis, D. N. et DePinho, R. A. (2002) « Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. », *Cancer cell*, 1(3), p. 269-77. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086863> (Consulté le: 2 mai 2017).

Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J. L., Premont, R. T., Taylor, S. J. et Cerione, R. A. (1999) « A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. », *The Journal of biological chemistry*, 274(32), p. 22393-400. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428811> (Consulté le: 11 mai 2017).

Bagrodia, S., Taylor, S. J., Jordon, K. A., Van Aelst, L. et Cerione, R. A. (1998) « A novel regulator of p21-activated kinases. », *The Journal of biological chemistry*, 273(37), p. 23633-6. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9726964> (Consulté le: 11 mai 2017).

Balasantil, S., Sahin, A. A., Barnes, C. J., Wang, R.-A., Pestell, R. G., Vadlamudi, R. K. et Kumar, R. (2004) « p21-activated Kinase-1 Signaling Mediates Cyclin D1 Expression in Mammary Epithelial and Cancer Cells », *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), p. 1422-1428. doi: 10.1074/jbc.M309937200.

Balasubramaniyan, V., Vaillant, B., Wang, S., Gumin, J., Butalid, M. E., Sai, K., Mukheef, F., Kim, S. H., Boddeke, H. W., Lang, F., Aldape, K., Sulman, E. P., Bhat, K. P. et Colman, H. (2015) « Aberrant mesenchymal differentiation of glioma stem-like cells: implications for therapeutic targeting », *Oncotarget*, 6(31), p. 31007-31017. doi: 10.18632/oncotarget.5219.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D. et Rich, J. N. (2006) « Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response », *Nature*, 444(7120), p. 756-760. doi: 10.1038/nature05236.

Baumgarten, P., Harter, P. N., Tönjes, M., Capper, D., Blank, A.-E., Sahm, F., von Deimling, A., Kolluru, V., Schwamb, B., Rabenhorst, U., Starzetz, T., Kögel, D., Rieker, R. J., Plate, K. H., Ohgaki, H., Radlwimmer, B., Zörnig, M. et Mittelbronn, M. (2014) « Loss of FUBP1 expression in gliomas predicts *FUBP1* mutation and is associated with oligodendroglial differentiation, *IDH1* mutation and 1p/19q loss of heterozygosity », *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(2), p. 205-216. doi: 10.1111/nan.12088.

Beeser, A., Jaffer, Z. M., Hofmann, C. et Chernoff, J. (2005) « Role of Group A p21-activated Kinases in Activation of Extracellular-regulated Kinase by Growth Factors », *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), p. 36609-36615. doi: 10.1074/jbc.M502306200.

Benkoussa, M., Brand, C., Delmotte, M.-H., Formstecher, P. et Lefebvre, P. (2002) « Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. », *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 22(13), p. 4522-34. doi: 10.1128/mcb.22.13.4522-4534.2002.

Bienvenu, T., des Portes, V., McDonnell, N., Carrié, A., Zemni, R., Couvert, P., Ropers, H. H., Moraine, C., van Bokhoven, H., Fryns, J. P., Allen, K., Walsh, C. A., Boué, J., Kahn, A., Chelly, J. et Beldjord, C. (2000) « Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. », *American journal of medical genetics*, 93(4), p. 294-8. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946356> (Consulté le: 12 mai 2017).

Bikeye, S.-N. N., Colin, C., Marie, Y., Vampouille, R., Ravassard, P., Rousseau, A., Boisselier, B., Idbah, A., Calvo, C. F., Leuraud, P., Lassalle, M., El Hallani, S., Delattre, J.-Y. et Sanson, M. (2010) « ASPM-associated stem cell proliferation is involved in malignant progression of gliomas and constitutes an attractive therapeutic target. », *Cancer cell international*, 10, p. 1. doi: 10.1186/1475-2867-10-1.

Bleeker, F. E., Lamba, S., Leenstra, S., Troost, D., Hulsebos, T., Vandertop, W. P., Frattini, M., Molinari, F., Knowles, M., Cerrato, A., Rodolfo, M., Scarpa, A., Felicioni, L., Buttitta, F., Malatesta, S., Marchetti, A. et Bardelli, A. (2009) « *IDH1* mutations at residue p.R132 (*IDH1*^{R132}) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors », *Human Mutation*, 30(1), p. 7-11. doi: 10.1002/humu.20937.

Boda, B., Alberi, S., Nikonenko, I., Node-Langlois, R., Jourdain, P., Moosmayer, M., Parisi-Jourdain, L. et Muller, D. (2004) « The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. », *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(48), p. 10816-25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2931-04.2004.

Bokoch, G. M. (2003) « Biology of the p21-Activated Kinases », *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), p. 743-781. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161742.

Bokoch, G. M., Reilly, A. M., Daniels, R. H., King, C. C., Olivera, A., Spiegel, S. et Knaus, U. G. (1998) « A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids », *Journal of Biological Chemistry*, 273(14), p. 8137-8144. doi: 10.1074/jbc.273.14.8137.

Borghese, L., Dolezalova, D., Opitz, T., Haupt, S., Leinhaas, A., Steinfarz, B., Koch, P., Edenhofer, F., Hampl, A. et Brüstle, O. (2010) « Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. », *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(5), p. 955-64. doi: 10.1002/stem.408.

Boulay, J.-L., Miserez, A. R., Zweifel, C., Sivasankaran, B., Kana, V., Ghaffari, A., Luyken, C., Sabel, M., Zerrouqi, A., Wasner, M., Van Meir, E., Tolnay, M., Reifenberger, G. et Merlo, A. (2007) « Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. », *PloS one*. Public Library of Science, 2(6), p. e576. doi: 10.1371/journal.pone.0000576.

Bozdag, S., Li, A., Baysan, M. et Fine, H. A. (2014) « Master regulators, regulatory networks, and pathways of glioblastoma subtypes. », *Cancer informatics*. Libertas Academica, 13(Suppl 3), p. 33-44. doi: 10.4137/CIN.S14027.

Brennan, D., Chen, X., Cheng, L., Mahoney, M. et Riobo, N. A. (2012) « Noncanonical Hedgehog signaling. », *Vitamins and hormones*. NIH Public Access, 88, p. 55-72. doi: 10.1016/B978-0-12-394622-5.00003-1.

Buchner, D. A., Su, F., Yamaoka, J. S., Kamei, M., Shavit, J. A., Barthel, L. K., McGee, B., Amigo, J. D., Kim, S., Hanosh, A. W., Jagadeeswaran, P., Goldman, D., Lawson, N. D., Raymond, P.

A., Weinstein, B. M., Ginsburg, D. et Lyons, S. E. (2007) « pak2a mutations cause cerebral hemorrhage in redhead zebrafish », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(35), p. 13996-14001. doi: 10.1073/pnas.0700947104.

Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. a, Krupenko, S. a, Thompson, W. J. et Barres, B. a (2008) « A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. », *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(1), p. 264-78. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.

Cairncross, J. G., Ueki, K., Zlatescu, M. C., Lisle, D. K., Finkelstein, D. M., Hammond, R. R., Silver, J. S., Stark, P. C., Macdonald, D. R., Ino, Y., Ramsay, D. A. et Louis, D. N. (1998) « Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. », *Journal of the National Cancer Institute*, 90(19), p. 1473-9. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9776413> (Consulté le: 25 avril 2017).

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T., Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A. et Gilbertson, R. J. (2007) « A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells », *Cancer Cell*. Elsevier, 11(1), p. 69-82. doi: 10.1016/j.ccr.2006.11.020.

Campos, B., Centner, F.-S., Bermejo, J. L., Ali, R., Dorsch, K., Wan, F., Felsberg, J., Ahmadi, R., Grabe, N., Reifenberger, G., Unterberg, A., Burhenne, J. et Herold-Mende, C. (2011) « Aberrant expression of retinoic acid signaling molecules influences patient survival in astrocytic gliomas. », *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 178(5), p. 1953-64. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.051.

Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K. E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., Combs, S. E., Goidts, V., Helmke, B. M., Eckstein, V., Roth, W., Beckhove, P., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. et Herold-Mende, C. (2010) « Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells », *Clinical Cancer Research*, 16(10), p. 2715-2728. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1800.

Campos, B., Weisang, S., Osswald, F., Ali, R., Sedlmeier, G., Bageritz, J., Mallm, J.-P., Hartmann, C., von Deimling, A., Popanda, O., Goidts, V., Plass, C., Unterberg, A., Schmezer, P., Burhenne, J. et Herold-Mende, C. (2015) « Retinoid resistance and multifaceted impairment of retinoic acid synthesis in glioblastoma », *Glia*, 63(10), p. 1850-1859. doi: 10.1002/glia.22849.

Cancer Genome Atlas Research Network, T. C. G. A. (TCGA) R. (2008) « Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. », *Nature*. NIH Public Access, 455(7216), p. 1061-8. doi: 10.1038/nature07385.

Carén, H., Stricker, S. H., Bulstrode, H., Gargica, S., Johnstone, E., Bartlett, T. E., Feber, A., Wilson, G., Teschendorff, A. E., Bertone, P., Beck, S. et Pollard, S. M. (2015) « Glioblastoma stem cells respond to differentiation cues but fail to undergo commitment and terminal cell-cycle arrest », *Stem Cell Reports*, 5(5), p. 829-842. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.09.014.

Cau, J., Faure, S., Vigneron, S., Labbé, J. C., Delsert, C. et Morin, N. (2000) « Regulation of Xenopus p21-activated Kinase (X-PAK2) by Cdc42 and Maturation-promoting Factor Controls Xenopus Oocyte Maturation* », *Journal of Biological Chemistry*, 275, No.4(January 28), p. 2367-2375. Disponible à: <http://www.jbc.org/content/275/4/2367.full.pdf> (Consulté le: 12 mai 2017).

Ceccarelli, M., Barthel, F. P., Malta, T. M., Sabedot, T. S., Salama, S. R., Murray, B. A.,

Morozova, O., Newton, Y., Radenbaugh, A., Pagnotta, S. M., Anjum, S., Wang, J., Manyam, G., Zoppoli, P., Ling, S., Rao, A. A., Grifford, M., Cherniack, A. D., Zhang, H., Poisson, L., Carlotti, C. G., Tirapelli, D. P. da C., Rao, A., Mikkelsen, T., Lau, C. C., Yung, W. K. A., Rabadan, R., Huse, J., Brat, D. J., Lehman, N. L., Barnholtz-Sloan, J. S., Zheng, S., Hess, K., Rao, G., Meyerson, M., Beroukhi, R., Cooper, L., Akbani, R., Wensch, M., Haussler, D., Aldape, K. D., Laird, P. W., Gutmann, D. H., TCGA Research Network, D. H., Noushmehr, H., Iavarone, A., Verhaak, R. G. W. et Verhaak, R. G. W. (2016) « Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. », *Cell*. NIH Public Access, 164(3), p. 550-63. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.028.

Cenciarelli, C., Marei, H. E., Zonfrillo, M., Pierimarchi, P., Paldino, E., Casalbore, P., Felsani, A., Vescovi, A. L., Maira, G. et Mangiola, A. (2014) « PDGF receptor alpha inhibition induces apoptosis in glioblastoma cancer stem cells refractory to anti-Notch and anti-EGFR treatment », *Mol Cancer*, 13, p. 247. doi: 10.1186/1476-4598-13-247.

Černohorská, M., Sulimenko, V., Hájková, Z., Sulimenko, T., Sládková, V., Vinopal, S., Dráberová, E. et Dráber, P. (2016) « GIT1/ β PIX signaling proteins and PAK1 kinase regulate microtubule nucleation », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), p. 1282-1297. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.016.

Chandra, V., Das, T., Gulati, P., Biswas, N. K., Rote, S., Chatterjee, U., Ghosh, S. N., Deb, S., Saha, S. K., Chowdhury, A. K., Ghosh, S., Rudin, C. M., Mukherjee, A., Basu, A. et Dhara, S. (2015) « Hedgehog signaling pathway is active in GBM with GLI1 mRNA expression showing a single continuous distribution rather than discrete high/low clusters. », *PloS one*. Public Library of Science, 10(3), p. e0116390. doi: 10.1371/journal.pone.0116390.

Chang, L., Zhao, D., Liu, H.-B., Wang, Q.-S., Zhang, P., Li, C.-L., Du, W.-Z., Wang, H.-J., Liu, X., Zhang, Z.-R. et Jiang, C.-L. (2015) « Activation of sonic hedgehog signaling enhances cell migration and invasion by induction of matrix metalloproteinase-2 and -9 via the phosphoinositide-3 kinase/AKT signaling pathway in glioblastoma. », *Molecular medicine reports*. Spandidos Publications, 12(5), p. 6702-10. doi: 10.3892/mmr.2015.4229.

Chen, J., Kesari, S., Rooney, C., Strack, P. R., Chen, J., Shen, H., Wu, L. et Griffin, J. D. (2010) « Inhibition of notch signaling blocks growth of glioblastoma cell lines and tumor neurospheres. », *Genes & cancer*, 1(8), p. 822-35. doi: 10.1177/1947601910383564.

Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G. et Parada, L. F. (2012) « A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. », *Nature*, 488(7412), p. 522-6. doi: 10.1038/nature11287.

Chow, H. Y., Jubb, A. M., Koch, J. N., Jaffer, Z. M., Stepanova, D., Campbell, D. A., Duron, S. G., O'Farrell, M., Cai, K. Q., Klein-Szanto, A. J. P., Gutkind, J. S., Hoeflich, K. P. et Chernoff, J. (2012) « p21-Activated Kinase 1 Is Required for Efficient Tumor Formation and Progression in a Ras-Mediated Skin Cancer Model », *Cancer Research*, 72(22), p. 5966-5975. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2246.

Chow, L. M. L., Endersby, R., Zhu, X., Rankin, S., Qu, C., Zhang, J., Broniscer, A., Ellison, D. W. et Baker, S. J. (2011) « Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. », *Cancer cell*. NIH Public Access, 19(3), p. 305-16. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.039.

Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I. et Ruiz i Altaba, A. (2007)

« HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. », *Current biology: CB*. NIH Public Access, 17(2), p. 165-72. doi: 10.1016/j.cub.2006.11.033.

Cobos, I., Borello, U. et Rubenstein, J. L. R. (2007) « Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. », *Neuron*, 54(6), p. 873-88. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.024.

Cole, A. E., Murray, S. S. et Xiao, J. (2016) « Bone Morphogenetic Protein 4 Signalling in Neural Stem and Progenitor Cells during Development and after Injury. », *Stem cells international*. Hindawi Publishing Corporation, 2016, p. 9260592. doi: 10.1155/2016/9260592.

Coleman, N. et Kissil, J. (2012) « Recent advances in the development of p21-activated kinase inhibitors. », *Cellular logistics*, 2(2), p. 132-135. doi: 10.4161/cl.21667.

Combeau, G., Kreis, P., Domenichini, F., Amar, M., Fossier, P., Rousseau, V. et Barnier, J.-V. (2012) « The p21-activated kinase PAK3 forms heterodimers with PAK1 in brain implementing trans-regulation of PAK3 activity. », *The Journal of biological chemistry*, 287(36), p. 30084-96. doi: 10.1074/jbc.M112.355073.

Crawford, J. J., Hoeflich, K. P. et Rudolph, J. (2012) « p21-Activated kinase inhibitors: a patent review », *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(3), p. 293-310.

Cusulin, C., Chesnelong, C., Bose, P., Bilenky, M., Kopciuk, K., Chan, J. A., Cairncross, J. G., Jones, S. J., Marra, M. A., Luchman, H. A. et Weiss, S. (2015) « Precursor States of Brain Tumor Initiating Cell Lines Are Predictive of Survival in Xenografts and Associated with Glioblastoma Subtypes », *Stem Cell Reports*. The Authors, 5(1), p. 1-9. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.05.010.

Dahmane, N., Sánchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H. et Ruiz i Altaba, A. (2001) « The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. », *Development (Cambridge, England)*, 128(24), p. 5201-12. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748155> (Consulté le: 25 avril 2017).

Dai, C., Celestino, J. C., Okada, Y., Louis, D. N., Fuller, G. N. et Holland, E. C. (2001) « PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. », *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(15), p. 1913-25. doi: 10.1101/gad.903001.

Dai, X., Iwasaki, H., Watanabe, M. et Okabe, S. (2014) « Dlx1 transcription factor regulates dendritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression. », *The European journal of neuroscience*, 39(4), p. 531-47. doi: 10.1111/ejn.12413.

Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. et Minden, A. (2001) « Cytoskeletal Changes Regulated by the PAK4 Serine/Threonine Kinase Are Mediated by LIM Kinase 1 and Cofilin », *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), p. 32115-32121. doi: 10.1074/jbc.M100871200.

Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liao, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., Vander Heiden, M. G. et Su, S. M. (2009) « Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. », *Nature*. NIH Public Access, 462(7274), p. 739-44. doi: 10.1038/nature08617.

Deacon, S. W., Beeser, A., Fukui, J. a, Rennefahrt, U. E. E., Myers, C., Chernoff, J. et Peterson, J.

R. (2008) « An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. », *Chemistry & biology*, 15(4), p. 322-31. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.03.005.

Demyanenko, G. P., Halberstadt, A. I., Rao, R. S. et Maness, P. F. (2010) « CHL1 cooperates with PAK1-3 to regulate morphological differentiation of embryonic cortical neurons. », *Neuroscience*. NIH Public Access, 165(1), p. 107-15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.077.

Ding, Y., Li, Y., Lu, L., Zhang, R., Zeng, L., Wang, L. et Zhang, X. (2015) « Inhibition of Nischarin Expression Promotes Neurite Outgrowth through Regulation of PAK Activity. », *PloS one*. Public Library of Science, 10(12), p. e0144948. doi: 10.1371/journal.pone.0144948.

Ding, Z., Liu, X., Liu, Y., Zhang, J., Huang, X., Yang, X., Yao, L., Cui, G. et Wang, D. (2015) « Expression of far upstream element (FUSE) binding protein 1 in human glioma is correlated with c-Myc and cell proliferation », *Molecular Carcinogenesis*, 54(5), p. 405-415. doi: 10.1002/mc.22114.

Dubos, A., Combeau, G., Bernardinelli, Y., Barnier, J.-V., Hartley, O., Gaertner, H., Boda, B. et Muller, D. (2012) « Alteration of synaptic network dynamics by the intellectual disability protein PAK3. », *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(2), p. 519-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3252-11.2012.

Duggal, R., Geissinger, U., Zhang, Q., Aguilar, J., Chen, N. G., Binda, E., Vescovi, A. L. et Szalay, A. A. (2013) « Vaccinia virus expressing bone morphogenetic protein-4 in novel glioblastoma orthotopic models facilitates enhanced tumor regression and long-term survival », *Journal of Translational Medicine*, 11(1), p. 155. doi: 10.1186/1479-5876-11-155.

Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M. L., Smirnov, I. V., Sarkar, G., Caron, A. A., Kollmeyer, T. M., Praska, C. E., Chada, A. R., Halder, C., Hansen, H. M., McCoy, L. S., Bracci, P. M., Marshall, R., Zheng, S., Reis, G. F., Pico, A. R., O'Neill, B. P., Buckner, J. C., Giannini, C., Huse, J. T., Perry, A., Tihan, T., Berger, M. S., Chang, S. M., Prados, M. D., Wiemels, J., Wiencke, J. K., Wrensch, M. R. et Jenkins, R. B. (2015) « Glioma Groups Based on 1p/19q, *IDH*, and *TERT* Promoter Mutations in Tumors », *New England Journal of Medicine*, 372(26), p. 2499-2508. doi: 10.1056/NEJMoa1407279.

Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. et Gill, G. N. (1999) « Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. », *Nature Cell Biology*, 1(5), p. 253-259. doi: 10.1038/12963.

Elloul, S., Vaksman, O., Stavnes, H. T., Trope, C. G., Davidson, B. et Reich, R. (2010) « Mesenchymal-to-epithelial transition determinants as characteristics of ovarian carcinoma effusions », *Clinical & Experimental Metastasis*, 27(3), p. 161-172. doi: 10.1007/s10585-010-9315-2.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A. et Gage, F. H. (1998) « Neurogenesis in the adult human hippocampus », *Nature Medicine*, 4(11), p. 1313-1317. doi: 10.1038/3305.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., Baylin, S. B. et Herman, J. G. (2000) « Inactivation of the DNA-Repair Gene *MGMT* and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents », *New England Journal of Medicine*, 343(19), p. 1350-1354. doi: 10.1056/NEJM200011093431901.

Fan, X., Khaki, L., Zhu, T. S., Soules, M. E., Talsma, C. E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y.-M., Maciaczyk, J., Nikkhah, G., Dimeco, F., Piccirillo, S., Vescovi, A. L. et Eberhart, C. G. (2010)

« NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. », *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(1), p. 5-16. doi: 10.1002/stem.254.

Faure, S., Vigneron, S., Galas, S., Brassac, T., Delsert, C. et Morin, N. (1999) « Control of G2/M transition in *Xenopus* by a member of the p21-activated kinase (PAK) family: a link between protein kinase A and PAK signaling pathways? », *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 274(6), p. 3573-9. doi: 10.1074/JBC.274.6.3573.

Ferent, J., Cochard, L., Faure, H., Taddei, M., Hahn, H., Ruat, M. et Traiffort, E. (2014) « Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. », *Stem cell reports*. Elsevier, 3(2), p. 312-23. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.05.016.

Foltz, G., Yoon, J.-G., Lee, H., Ryken, T. C., Sibenaller, Z., Ehrich, M., Hood, L. et Madan, A. (2009) « DNA methyltransferase-mediated transcriptional silencing in malignant glioma: a combined whole-genome microarray and promoter array analysis », *Oncogene*, 28(29), p. 2667-2677. doi: 10.1038/onc.2009.122.

Franovic, A., Elliott, K. C., Seguin, L., Camargo, M. F., Weis, S. M. et Cheresch, D. A. (2015) « Glioblastomas require integrin $\alpha\beta3$ /PAK4 signaling to escape senescence. », *Cancer research*. NIH Public Access, 75(21), p. 4466-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0988.

Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E. A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., Ellisman, M. H. et Verma, I. M. (2012) « Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. », *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 338(6110), p. 1080-4. doi: 10.1126/science.1226929.

Frost, J. A., Swantek, J. L., Stippec, S., Yin, M. J., Gaynor, R. et Cobb, M. H. (2000) « Stimulation of NFkappa B Activity by Multiple Signaling Pathways Requires PAK1 », *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), p. 19693-19699. doi: 10.1074/jbc.M909860199.

Fuchsova, B., Alvarez Juliá, A., Rizavi, H. S., Frasnich, A. C. et Pandey, G. N. (2016) « Expression of p21-activated kinases 1 and 3 is altered in the brain of subjects with depression », *Neuroscience*, 333, p. 331-344. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.07.037.

Gaiano, N. et Fishell, G. (2002) « The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. », *Annual review of neuroscience*, 25(1), p. 471-90. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.030702.130823.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Feroni, C., Dimeco, F. et Vescovi, A. (2004) « Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma », *Cancer Research*, 64(19), p. 7011-7021. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1364.

Galvao, R. P., Kasina, A., McNeill, R. S., Harbin, J. E., Foreman, O., Verhaak, R. G. W., Nishiyama, A., Miller, C. R. et Zong, H. (2014) « Transformation of quiescent adult oligodendrocyte precursor cells into malignant glioma through a multistep reactivation process. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(40), p. E4214-23. doi: 10.1073/pnas.1414389111.

Gedeon, A. K., Nelson, J., Géczy, J. et Mulley, J. C. (2003) « X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3 », *American Journal of Medical Genetics Part A*, 120A(4), p. 509-517. doi: 10.1002/ajmg.a.20131.

Gleize, V., Alentorn, A., Connen de Kérillis, L., Labussière, M., Nadaradjane, A. A., Mundwiler, E., Ottolenghi, C., Mangesius, S., Rahimian, A., Ducray, F., Mokhtari, K., Villa, C., Sanson, M. et Sanson, M. (2015) « CIC inactivating mutations identify aggressive subset of 1p19q codeleted gliomas », *Annals of Neurology*, 78(3), p. 355-374. doi: 10.1002/ana.24443.

Goc, A., Al-Azayzih, A., Abdalla, M., Al-Husein, B., Kavuri, S., Lee, J., Moses, K. et Somanath, P. R. (2013) « P21 activated kinase-1 (Pak1) promotes prostate tumor growth and microinvasion via inhibition of transforming growth factor β expression and enhanced matrix metalloproteinase 9 secretion. », *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 288(5), p. 3025-35. doi: 10.1074/jbc.M112.424770.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D. P., Louis, D. N., Goldstraw, P., Nicholson, A. G., Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B. L., Chiew, Y.-E., DeFazio, A., Greaves, M. F., Green, A. R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D. F., Chenevix-Trench, G., Tan, M.-H., Khoo, S. K., Teh, B. T., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Wooster, R., Futreal, P. A. et Stratton, M. R. (2007) « Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. », *Nature*, 446(7132), p. 153-8. doi: 10.1038/nature05610.

Gu, X., Wang, C., Wang, X., Ma, G., Li, Y., Cui, L., Chen, Y., Zhao, B. et Li, K. (2015) « Efficient inhibition of human glioma development by RNA interference-mediated silencing of PAK5 », *International Journal of Biological Sciences*, 11(2), p. 230-237. doi: 10.7150/ijbs.9193.

Guichet, P.-O., Bieche, I., Teigell, M., Serguera, C., Rothhut, B., Rigau, V., Scamps, F., Ripoll, C., Vacher, S., Taviaux, S., Chevassus, H., Duffau, H., Mallet, J., Susini, A., Joubert, D., Bauchet, L. et Hugnot, J.-P. (2013) « Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. », *Glia*, 61(2), p. 225-39. doi: 10.1002/glia.22429.

Guo, D., Tan, Y., Wang, D., Madhusoodanan, K. S., Zheng, Y., Maack, T., Zhang, J. J. et Huang, X.-Y. (2007) « A Rac-cGMP signaling pathway. », *Cell*. NIH Public Access, 128(2), p. 341-55. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.048.

Hanahan, D. et Weinberg, R. a (2011) « Hallmarks of cancer: the next generation. », *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), p. 646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hashimoto, H., Sudo, T., Maruta, H. et Nishimura, R. (2010) « The direct PAK1 inhibitor, TAT-PAK18, blocks preferentially the growth of human ovarian cancer cell lines in which PAK1 is abnormally activated by autophosphorylation at Thr 423. », *Drug discoveries & therapeutics*, 4(1), p. 1-4. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491145> (Consulté le: 14 mai 2017).

Hashimoto, S., Tsubouchi, A., Mazaki, Y. et Sabe, H. (2001) « Interaction of Paxillin with p21-activated Kinase (PAK): ASSOCIATION OF PAXILLIN WITH THE KINASE-INACTIVE AND THE Cdc42-ACTIVATED FORMS OF PAK3 », *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), p. 6037-6045. doi: 10.1074/jbc.M005854200.

Hayashi, M. L., Choi, S.-Y., Rao, B. S. S., Jung, H.-Y., Lee, H.-K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A. et Tonegawa, S. (2004) « Altered Cortical Synaptic Morphology and Impaired Memory Consolidation in Forebrain-Specific Dominant-Negative PAK Transgenic Mice », *Neuron*, 42(5), p. 773-787. doi: 10.1016/j.neuron.2004.05.003.

He, H., Shulkes, A. et Baldwin, G. S. (2008) « PAK1 interacts with β -catenin and is required for the regulation of the β -catenin signalling pathway by gastrins », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(10), p. 1943-1954. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.04.016.

Heaphy, C. M., de Wilde, R. F., Jiao, Y., Klein, A. P., Edil, B. H., Shi, C., Bettgowda, C., Rodriguez, F. J., Eberhart, C. G., Hebbar, S., Offerhaus, G. J., McLendon, R., Rasheed, B. A., He, Y., Yan, H., Bigner, D. D., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K. N., Riggins, G. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Hruban, R. H., Maitra, A., Papadopoulos, N. et Meeker, A. K. (2011) « Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. », *Science (New York, N.Y.)*, 333(6041), p. 425. doi: 10.1126/science.1207313.

Hernández-Monge, J., Rousset-Roman, A. B., Medina-Medina, I. et Olivares-Illana, V. (2016) « Dual function of MDM2 and MDMX toward the tumor suppressors p53 and RB. », *Genes & cancer. Impact Journals, LLC*, 7(9-10), p. 278-287. doi: 10.18632/genesandcancer.120.

Higuchi, M., Onishi, K., Kikuchi, C. et Gotoh, Y. (2008) « Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway », *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 10(11), p. 1356-1364. doi: 10.1038/ncb1795.

Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L. et Zipursky, S. L. (1999) « Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. », *Cell*, 97(7), p. 853-63. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399914> (Consulté le: 12 mai 2017).

Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A. J., Nye, J. S., Conlon, R. A., Mak, T. W., Bernstein, A. et van der Kooy, D. (2002) « Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. », *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16(7), p. 846-58. doi: 10.1101/gad.975202.

Hoefen, R. J. et Berk, B. C. (2006) « The multifunctional GIT family of proteins. », *Journal of cell science*, 119(Pt 8), p. 1469-75. doi: 10.1242/jcs.02925.

Hofmann, C., Shepelev, M. et Chernoff, J. (2004) « The genetics of Pak. », *Journal of cell science*, 117(Pt 19), p. 4343-4354. doi: 10.1242/jcs.01392.

Holderness Parker, N., Donniger, H., Birrer, M. J. et Leaner, V. D. (2013) « p21-activated kinase 3 (PAK3) is an AP-1 regulated gene contributing to actin organisation and migration of transformed fibroblasts. », *PloS one*, 8(6), p. e66892. doi: 10.1371/journal.pone.0066892.

Holland, E. C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R. E. et Fuller, G. N. (2000) « Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice », *Nature Genetics*, 25(1), p. 55-57. doi: 10.1038/75596.

Hong, Y., Shi, Y., Shang, C., Xue, Y. et Liu, Y. (2016) « Influence of far upstream element binding protein 1 gene on chemotherapy sensitivity in human U251 glioblastoma cells. », *Archives of medical science : AMS*. Termedia Publishing, 12(1), p. 156-62. doi: 10.5114/aoms.2016.57592.

Howe, A. K. et Juliano, R. L. (2000) « Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase », *Nature cell biology*, 2(9), p. 593-600. doi: 10.1038/35023536.

Hu, Y.-Y., Zheng, M.-H., Cheng, G., Li, L., Liang, L., Gao, F., Wei, Y.-N., Fu, L.-A. et Han, H. (2011) « Notch signaling contributes to the maintenance of both normal neural stem cells and patient-derived glioma stem cells. », *BMC cancer*. BioMed Central, 11, p. 82. doi: 10.1186/1471-2407-11-82.

Hu, Y. et Smyth, G. K. (2009) « ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays », *Journal of Immunological Methods*, 347(1-2), p. 70-78. doi: 10.1016/j.jim.2009.06.008.

Hussain, N. K., Thomas, G. M., Luo, J. et Haganir, R. L. (2015) « Regulation of AMPA receptor subunit GluA1 surface expression by PAK3 phosphorylation », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201518382. doi: 10.1073/pnas.1518382112.

Huynh, N., Liu, K. H., Baldwin, G. S. et He, H. (2010) « P21-activated kinase 1 stimulates colon cancer cell growth and migration/invasion via ERK- and AKT-dependent pathways », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(9), p. 1106-1113. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.05.007.

Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D. et Steindler, D. A. (2002) « Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro », *Glia*, 39(3), p. 193-206. doi: 10.1002/glia.10094.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K. et Kageyama, R. (2010) « Essential Roles of Notch Signaling in Maintenance of Neural Stem Cells in Developing and Adult Brains », *Journal of Neuroscience*, 30(9). Disponible à: <http://www.jneurosci.org/content/30/9/3489.long> (Consulté le: 26 avril 2017).

Jacobs, T., Causeret, F., Nishimura, Y. V., Terao, M., Norman, A., Hoshino, M. et Nikolić, M. (2007) « Localized activation of p21-activated kinase controls neuronal polarity and morphology. », *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. Europe PMC Funders, 27(32), p. 8604-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0765-07.2007.

Jacques, T. S., Swales, A., Brzozowski, M. J., Henriquez, N. V., Linehan, J. M., Mirzadeh, Z., O' Malley, C., Naumann, H., Alvarez-Buylla, A. et Brandner, S. (2010) « Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. », *The EMBO journal*, 29(1), p. 222-35. doi: 10.1038/emboj.2009.327.

Janesick, A., Wu, S. C. et Blumberg, B. (2015) « Retinoic acid signaling and neuronal differentiation », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(8), p. 1559-1576. doi: 10.1007/s00018-014-1815-9.

Jenkins, R. B., Blair, H., Ballman, K. V., Giannini, C., Arusell, R. M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P. D., Shaw, E. G. et Buckner, J. C. (2006) « A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma », *Cancer Research*, 66(20), p. 9852-9861. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1796.

Jiao, Y., Killela, P. J., Reitman, Z. J., Rasheed, A. B., Heaphy, C. M., de Wilde, R. F., Rodriguez, F. J., Rosenberg, S., Oba-Shinjo, S. M., Nagahashi Marie, S. K., Bettegowda, C., Agrawal, N., Lipp, E., Pirozzi, C., Lopez, G., He, Y., Friedman, H., Friedman, A. H., Riggins, G. J., Holdhoff, M., Burger, P., McLendon, R., Bigner, D. D., Vogelstein, B., Meeker, A. K., Kinzler, K. W., Papadopoulos, N., Diaz, L. A., Yan, H. et Yan, H. (2012) « Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. », *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 3(7), p. 709-22. doi: 10.18632/oncotarget.588.

Jin, S., Zhuo, Y., Guo, W. et Field, J. (2005) « p21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent Phosphorylation of Raf-1 Regulates Its Mitochondrial Localization, Phosphorylation of BAD, and

Bcl-2 Association », *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), p. 24698-24705. doi: 10.1074/jbc.M413374200.

Joo, K. M., Kim, S. Y., Jin, X., Song, S. Y., Kong, D.-S., Lee, J.-I., Jeon, J. W., Kim, M. H., Kang, B. G., Jung, Y., Jin, J., Hong, S.-C., Park, W.-Y., Lee, D.-S., Kim, H. et Nam, D.-H. (2008) « Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas », *Laboratory Investigation*, 88(8), p. 808-815. doi: 10.1038/labinvest.2008.57.

Kalani, M. Y. S., Cheshier, S. H., Cord, B. J., Bababeygy, S. R., Vogel, H., Weissman, I. L., Palmer, T. D. et Nusse, R. (2008) « Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 105(44), p. 16970-5. doi: 10.1073/pnas.0808616105.

Kameritsch, P., Kiemer, F., Beck, H., Pohl, U. et Pogoda, K. (2015) « Cx43 increases serum induced filopodia formation via activation of p21-activated protein kinase 1 », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(11), p. 2907-2917. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.08.004.

Kesanakurti, D., Chetty, C., Rajasekhar Maddirela, D., Gujrati, M. et Rao, J. S. (2012) « Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma. », *Cell death & disease*. Nature Publishing Group, 3(12), p. e445. doi: 10.1038/cddis.2012.182.

Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L. A., Friedman, A. H., Friedman, H., Gallia, G. L., Giovanella, B. C., Grollman, A. P., He, T.-C., He, Y., Hruban, R. H., Jallo, G. I., Mandahl, N., Meeker, A. K., Mertens, F., Netto, G. J., Rasheed, B. A., Riggins, G. J., Rosenquist, T. A., Schiffman, M., Shih, I.-M., Theodorescu, D., Torbenson, M. S., Velculescu, V. E., Wang, T.-L., Wentzensen, N., Wood, L. D., Zhang, M., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N. et Yan, H. (2013) « TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), p. 6021-6026. doi: 10.1073/pnas.1303607110.

Kim, M. J., Biag, J., Fass, D. M., Lewis, M. C., Zhang, Q., Fleishman, M., Gangwar, S. P., Machius, M., Fromer, M., Purcell, S. M., McCarroll, S. A., Rudenko, G., Premont, R. T., Scolnick, E. M. et Haggarty, S. J. (2017) « Functional analysis of rare variants found in schizophrenia implicates a critical role for GIT1-PAK3 signaling in neuroplasticity », *Molecular Psychiatry*, 22(3), p. 417-429. doi: 10.1038/mp.2016.98.

King, A. J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S. et Marshall, M. S. (1998) « The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338 », *Nature*. Nature Publishing Group, 396(6707), p. 180-183. doi: 10.1038/24184.

King, A. J., Wireman, R. S., Hamilton, M. et Marshall, M. S. (2001) « Phosphorylation site specificity of the Pak-mediated regulation of Raf-1 and cooperativity with Src », *FEBS Letters*, 497(1), p. 6-14. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02425-5.

King, C. C., Gardiner, E. M., Zenke, F. T., Bohl, B. P., Newton, A. C., Hemmings, B. A. et Bokoch, G. M. (2000) « p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). », *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 275(52), p. 41201-9. doi: 10.1074/jbc.M006553200.

King, H., Nicholas, N. S. et Wells, C. M. (2014) *Role of p-21-Activated Kinases in Cancer Progression*. 1^{re} éd, *International Review of Cell and Molecular Biology*. 1^{re} éd. Elsevier Inc. doi:

10.1016/B978-0-12-800255-1.00007-7.

Kinzler, K. W., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Trent, J. M., Law, M. L., O'Brien, S. J., Wong, A. J. et Vogelstein, B. (1987) « Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. », *Science (New York, N.Y.)*, 236(4797), p. 70-3. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3563490> (Consulté le: 25 avril 2017).

Kiosses, W. B., Daniels, R. H., Otey, C., Bokoch, G. M. et Schwartz, M. A. (1999) « A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. », *The Journal of cell biology*, 147(4), p. 831-44. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562284> (Consulté le: 13 mai 2017).

Kiosses, W. B., Hood, J., Yang, S., Gerritsen, M. E., Cheresch, D. A., Alderson, N. et Schwartz, M. A. (2002) « A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis », *Circulation Research*, 90(6), p. 697-702. doi: 10.1161/01.RES.0000014227.76102.5D.

Kissil, J. L., Johnson, K. C., Eckman, M. S. et Jacks, T. (2002) « Merlin Phosphorylation by p21-activated Kinase 2 and Effects of Phosphorylation on Merlin Localization », *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), p. 10394-10399. doi: 10.1074/jbc.M200083200.

Kleihues, P., Burger, P. C. et Scheithauer, B. W. (1993) « The new WHO classification of brain tumours. », *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 3(3), p. 255-68. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8293185> (Consulté le: 25 avril 2017).

Kleihues, P. et Sobin, L. H. (2000) « World Health Organization classification of tumors », *Cancer*. John Wiley & Sons, Inc., 88(12), p. 2887-2887. doi: 10.1002/1097-0142(20000615)88:12<2887::AID-CNCR32>3.0.CO;2-F.

Korur, S., Huber, R. M., Sivasankaran, B., Petrich, M., Morin, P., Hemmings, B. A., Merlo, A. et Lino, M. M. (2009) « GSK3 β Regulates Differentiation and Growth Arrest in Glioblastoma », *PLoS ONE*. Édité par N. Cordes. Public Library of Science, 4(10), p. e7443. doi: 10.1371/journal.pone.0007443.

Kosoff, R. E., Aslan, J. E., Kostyak, J. C., Dulaimi, E., Chow, H. Y., Prudnikova, T. Y., Radu, M., Kunapuli, S. P., McCarty, O. J. T. et Chernoff, J. (2015) « Pak2 restrains endomitosis during megakaryopoiesis and alters cytoskeleton organization. », *Blood*. American Society of Hematology, 125(19), p. 2995-3005. doi: 10.1182/blood-2014-10-604504.

Kotliarova, S., Pastorino, S., Kovell, L. C., Kotliarov, Y., Song, H., Zhang, W., Bailey, R., Maric, D., Zenklusen, J. C., Lee, J. et Fine, H. A. (2008) « Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition Induces Glioma Cell Death through c-MYC, Nuclear Factor- κ B, and Glucose Regulation », *Cancer Research*, 68(16), p. 6643-6651. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0850.

Kreis, P. et Barnier, J.-V. (2009) « PAK signalling in neuronal physiology. », *Cellular signalling*. Elsevier Inc., 21(3), p. 384-93. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.11.001.

Kreis, P., Rousseau, V., Thévenot, E., Combeau, G. et Barnier, J.-V. (2008) « The four mammalian splice variants encoded by the p21-activated kinase 3 gene have different biological properties. », *Journal of neurochemistry*, 106(3), p. 1184-97. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05474.x.

Kreis, P., Thévenot, E., Rousseau, V., Boda, B., Muller, D. et Barnier, J. V. (2007) « The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway », *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), p. 21497-21506. doi:

10.1074/jbc.M703298200.

Kumar, R. et Li, D. Q. (2016) « PAKs in Human Cancer Progression. From Inception to Cancer Therapeutic to Future Oncobiology. », *Advances in Cancer Research*, 130(4), p. 137-209. doi: 10.1016/bs.acr.2016.01.002.

Lee, J. C., Vivanco, I., Beroukhi, R., Huang, J. H. Y., Feng, W. L., DeBiasi, R. M., Yoshimoto, K., King, J. C., Nghiemphu, P., Yuza, Y., Xu, Q., Greulich, H., Thomas, R. K., Paez, J. G., Peck, T. C., Linhart, D. J., Glatt, K. A., Getz, G., Onofrio, R., Ziaugra, L., Levine, R. L., Gabriel, S., Kawaguchi, T., O'Neill, K., Khan, H., Liao, L. M., Nelson, S. F., Rao, P. N., Mischel, P., Pieper, R. O., Cloughesy, T., Leahy, D. J., Sellers, W. R., Sawyers, C. L., Meyerson, M. et Mellinghoff, I. K. (2006) « Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. », *PLoS medicine*. Public Library of Science, 3(12), p. e485. doi: 10.1371/journal.pmed.0030485.

Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., Pastorino, S., Purow, B. W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J. K. et Fine, H. A. (2006) « Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines », *Cancer Cell*, 9(5), p. 391-403. doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.030.

Lee, J., Son, M. J., Woolard, K., Donin, N. M., Li, A., Cheng, C. H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Walling, J., Ahn, S., Kim, M., Totonchy, M., Cusack, T., Ene, C., Ma, H., Su, Q., Zenklusen, J. C., Zhang, W., Maric, D. et Fine, H. A. (2008) « Epigenetic-Mediated Dysfunction of the Bone Morphogenetic Protein Pathway Inhibits Differentiation of Glioblastoma-Initiating Cells », *Cancer Cell*, 13(1), p. 69-80. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.005.

Lee, Y., Kim, K. H., Kim, D. G., Cho, H. J., Kim, Y., Rhee, J., Shin, K., Seo, Y. J., Choi, Y.-S., Lee, J.-I., Lee, J., Joo, K. M. et Nam, D.-H. (2015) « FoxM1 Promotes Stemness and Radio-Resistance of Glioblastoma by Regulating the Master Stem Cell Regulator Sox2. », *PloS one*. Public Library of Science, 10(10), p. e0137703. doi: 10.1371/journal.pone.0137703.

Lee, Y., Lee, J.-K., Ahn, S. H., Lee, J. et Nam, D.-H. (2016) « WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities », *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 96(2), p. 137-150. doi: 10.1038/labinvest.2015.140.

Lei, L., Sonabend, A. M., Guarnieri, P., Soderquist, C., Ludwig, T., Rosenfeld, S., Bruce, J. N. et Canoll, P. (2011) « Glioblastoma models reveal the connection between adult glial progenitors and the proneural phenotype. », *PloS one*. Public Library of Science, 6(5), p. e20041. doi: 10.1371/journal.pone.0020041.

Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M. C., Eck, M. J., Mayer, B. J. et Harrison, S. C. (2000) « Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. », *Cell*, 102(3), p. 387-97. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975528> (Consulté le: 11 mai 2017).

Lei, X., Chang, L., Ye, W., Jiang, C. et Zhang, Z. (2015) « Raf kinase inhibitor protein (RKIP) inhibits the cell migration and invasion in human glioma cell lines in vitro. », *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(11), p. 14214-20. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26823735> (Consulté le: 28 avril 2017).

Leiserson, M. D. M., Blokh, D., Sharan, R. et Raphael, B. J. (2013) « Simultaneous identification of multiple driver pathways in cancer. », *PLoS computational biology*, 9(5), p. e1003054. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003054.

Lemmon, M. A. et Schlessinger, J. (2010) « Cell signaling by receptor tyrosine kinases. », *Cell*. NIH Public Access, 141(7), p. 1117-34. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.

Leung, C. et Jia, Z. (2016) « Mouse Genetic Models of Human Brain Disorders. », *Frontiers in genetics*. Frontiers Media SA, 7, p. 40. doi: 10.3389/fgene.2016.00040.

Li, F., Adam, L., Vadlamudi, R. K., Zhou, H., Sen, S., Chernoff, J., Mandal, M. et Kumar, R. (2002) « p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. », *EMBO reports*. European Molecular Biology Organization, 3(8), p. 767-73. doi: 10.1093/embo-reports/kvf157.

Li, J., Cui, Y., Gao, G., Zhao, Z., Zhang, H. et Wang, X. (2011) « Notch1 is an independent prognostic factor for patients with glioma », *Journal of Surgical Oncology*, 103(8), p. 813-817. doi: 10.1002/jso.21851.

Li, X., Wen, W., Liu, K., Zhu, F., Malakhova, M., Peng, C., Li, T., Kim, H.-G., Ma, W., Cho, Y. Y., Bode, A. M., Dong, Z. et Dong, Z. (2011) « Phosphorylation of caspase-7 by p21-activated protein kinase (PAK) 2 inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis of breast cancer cell lines. », *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(25), p. 22291-9. doi: 10.1074/jbc.M111.236596.

Libermann, T. A., Nusbaum, H. R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M. D., Ullrich, A. et Schlessinger, J. (1985) « Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. », *Nature*, 313(5998), p. 144-7. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2981413> (Consulté le: 27 avril 2017).

Licciulli, S., Maksimoska, J., Zhou, C., Troutman, S., Kota, S., Liu, Q., Duron, S., Campbell, D., Chernoff, J., Field, J., Marmorstein, R. et Kissil, J. L. (2013) « FRAX597, a small molecule inhibitor of the p21-activated kinases, inhibits tumorigenesis of neurofibromatosis type 2 (NF2)-associated Schwannomas. », *The Journal of biological chemistry*, 288(40), p. 29105-14. doi: 10.1074/jbc.M113.510933.

Lightcap, C. M., Kari, G., Arias-Romero, L. E., Chernoff, J., Rodeck, U. et Williams, J. C. (2009) « Interaction with LC8 is required for Pak1 nuclear import and is indispensable for zebrafish development. », *PloS one*. Public Library of Science, 4(6), p. e6025. doi: 10.1371/journal.pone.0006025.

Lindberg, N., Kastemar, M., Olofsson, T., Smits, A. et Uhrbom, L. (2009) « Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma », *Oncogene*. Nature Publishing Group, 28(23), p. 2266-2275. doi: 10.1038/onc.2009.76.

Liu, B., Tian, D., Yi, W., Wu, L., Cai, Q., Dong, H., Shen, H., Ji, B., Wang, L., Zhang, S., Ruan, D. et Chen, Q. (2010) « Effect of Bone Morphogenetic Protein 4 in the Human Brain Glioma Cell Line U251 », *Cell Biochemistry and Biophysics*, 58(2), p. 91-96. doi: 10.1007/s12013-010-9095-y.

Liu, C., Sage, J. et Miller, M. (2011) « Mosaic Analysis with Double Markers (MADM) Reveals Tumor Cell-of-Origin in Glioma », *Cell*, 146(2), p. 209-221. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.014.Mosaic.

Liu, R., Wang, W., Ye, L., Bi, Y., Fang, H., Cui, B., Zhou, W., Dai, M., Zhang, J., Li, X. et Ning, G. (2010) « p21-Activated kinase 3 is overexpressed in thymic neuroendocrine tumors (carcinoids) with ectopic ACTH syndrome and participates in cell migration », *Endocrine*. Springer US, 38(1), p.

38-47. doi: 10.1007/s12020-010-9324-6.

Liu, S., Yin, F., Zhao, M., Zhou, C., Ren, J., Huang, Q., Zhao, Z., Mitra, R., Fan, W. et Fan, M. (2016) « The homing and inhibiting effects of hNSCs-BMP4 on human glioma stem cells. », *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 7(14), p. 17920-31. doi: 10.18632/oncotarget.7472.

Liu, W., Lv, G., Li, Y., Li, L. et Wang, B. (2011) « Downregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in malignant gliomas. », *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. BioMed Central, 30(1), p. 76. doi: 10.1186/1756-9966-30-76.

Liu, X., Wang, L., Zhao, S., Ji, X., Luo, Y. et Ling, F. (2011) « β -Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells », *Medical Oncology*, 28(2), p. 608-614. doi: 10.1007/s12032-010-9476-5.

Lo, H.-W., Zhu, H., Cao, X., Aldrich, A. et Ali-Osman, F. (2009) « A novel splice variant of GLI1 that promotes glioblastoma cell migration and invasion. », *Cancer research*. NIH Public Access, 69(17), p. 6790-8. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-0886.

Long, P. M., Moffett, J. R., Namboodiri, A. M. A., Viapiano, M. S., Lawler, S. E. et Jaworski, D. M. (2013) « N-Acetylaspartate (NAA) and N-Acetylaspartylglutamate (NAAG) Promote Growth and Inhibit Differentiation of Glioma Stem-like Cells », *Journal of Biological Chemistry*, 288(36), p. 26188-26200. doi: 10.1074/jbc.M113.487553.

Loo, T.-H., Ng, Y.-W., Lim, L. et Manser, E. (2004) « GIT1 activates p21-activated kinase through a mechanism independent of p21 binding. », *Molecular and cellular biology*, 24(9), p. 3849-59. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15082779> (Consulté le: 11 mai 2017).

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W. et Kleihues, P. (2007) « The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. », *Acta neuropathologica*, 114(2), p. 97-109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. et Ellison, D. W. (2016) « The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary », *Acta Neuropathologica*, 131(6), p. 803-820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.

Lu, W., Katz, S., Gupta, R. et Mayer, B. J. (1997) « Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck », *Curr Biol*, 7(2), p. 85-94. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00052-2.

Lu, W. et Mayer, B. J. (1999) « Mechanism of activation of Pak1 kinase by membrane localization », *Oncogene*, 18(3), p. 797-806. doi: 10.1038/sj.onc.1202361.

Magini, P., Pippucci, T., Tsai, I. C., Coppola, S., Stellacci, E., Bartoletti-Stella, A., Turchetti, D., Graziano, C., Cenacchi, G., Neri, I., Cordelli, D. M., Marchiani, V., Bergamaschi, R., Gasparre, G., Neri, G., Mazzanti, L., Patrizi, A., Franzoni, E., Romeo, G., Bordo, D., Tartaglia, M., Katsanis, N. et Seri, M. (2014) « A mutation in PAK3 with a dual molecular effect deregulates the RAS/MAPK pathway and drives an X-linked syndromic phenotype », *Human Molecular Genetics*, 23(13), p. 3607-3617. doi: 10.1093/hmg/ddu070.

Maglorius Renkilaraj, M. R. L., Baudouin, L., Wells, C. M., Doulazmi, M., Wehrlé, R., Cannaya, V., Bachelin, C., Barnier, J.-V., Jia, Z., Nait Oumesmar, B., Dusart, I. et Bouslama-Oueghlani, L. (2017) « The intellectual disability protein PAK3 regulates oligodendrocyte precursor cell

differentiation », *Neurobiology of Disease*, 98, p. 137-148. doi: 10.1016/j.nbd.2016.12.004.

Maksimaska, J., Feng, L., Harms, K., Yi, C., Kissil, J., Marmorstein, R. et Meggers, E. (2008) « Targeting large kinase active site with rigid, bulky octahedral ruthenium complexes », *Journal of the American Chemical Society*, 130(47), p. 15764-15765. doi: 10.1021/ja805555a.

Mangraviti, A., Tzeng, S. Y., Gullotti, D., Kozielski, K. L., Kim, J. E., Seng, M., Abbadi, S., Schiapparelli, P., Sarabia-Estrada, R., Vescovi, A., Brem, H., Olivi, A., Tyler, B., Green, J. J. et Quinones-Hinojosa, A. (2016) « Non-virally engineered human adipose mesenchymal stem cells produce BMP4, target brain tumors, and extend survival », *Biomaterials*, 100, p. 53-66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.05.025.

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. et Lim, L. (1994) « A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1 », *Nature*, 367(6458), p. 40-46. doi: 10.1038/367040a0.

Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. et Lim, L. (1998) « PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. », *Molecular cell*, 1(2), p. 183-92. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659915> (Consulté le: 11 mai 2017).

Maroto, B., Ye, M. B., von Lohneysen, K., Schnellzer, A. et Knaus, U. G. (2008) « P21-activated kinase is required for mitotic progression and regulates Plk1 », *Oncogene*. Nature Publishing Group, 27(36), p. 4900-4908. doi: 10.1038/onc.2008.131.

Martinez-De Luna, R. I., Ku, R. Y., Lyou, Y. et Zuber, M. E. (2013) « Maturin is a novel protein required for differentiation during primary neurogenesis. », *Developmental biology*. NIH Public Access, 384(1), p. 26-40. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.09.028.

McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. a et Neve, R. L. (2003) « DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. », *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(17), p. 6914-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0028-05.2005.

Van Meir, E. G., Hadjipanayis, C. G., Norden, A. D., Shu, H.-K., Wen, P. Y. et Olson, J. J. (2010) « Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. », *CA: a cancer journal for clinicians*. NIH Public Access, 60(3), p. 166-93. doi: 10.3322/caac.20069.

Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C. et Jia, Z. (2005) « Abnormal Long-Lasting Synaptic Plasticity and Cognition in Mice Lacking the Mental Retardation Gene Pak3 », *Journal of Neuroscience*, 25(28), p. 6641-6650. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0028-05.2005.

Meyer, M., Reimand, J., Lan, X., Head, R., Zhu, X., Kushida, M., Bayani, J., Pressey, J. C., Lionel, A. C., Clarke, I. D., Cusimano, M., Squire, J. A., Scherer, S. W., Bernstein, M., Woodin, M. A., Bader, G. D. et Dirks, P. B. (2015) « Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(3), p. 851-6. doi: 10.1073/pnas.1320611111.

Mohammed, M. K., Shao, C., Wang, J., Wei, Q., Wang, X., Collier, Z., Tang, S., Liu, H., Zhang, F., Huang, J., Guo, D., Lu, M., Liu, F., Liu, J., Ma, C., Shi, L. L., Athiviraham, A., He, T.-C. et Lee, M. J. (2016) « Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal,

tumorigenesis and cancer chemoresistance. », *Genes & diseases*. NIH Public Access, 3(1), p. 11-40. doi: 10.1016/j.gendis.2015.12.004.

Morris, S.-A. L. et Huang, S. (2016) « Crosstalk of the Wnt/ β -catenin pathway with other pathways in cancer cells. », *Genes & diseases*. NIH Public Access, 3(1), p. 41-47. doi: 10.1016/j.gendis.2015.12.003.

Munji, R. N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J. A. et Pleasure, S. J. (2011) « Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. », *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. NIH Public Access, 31(5), p. 1676-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5404-10.2011.

Murakoshi, H., Wang, H. et Yasuda, R. (2011) « Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. », *Nature*. NIH Public Access, 472(7341), p. 100-4. doi: 10.1038/nature09823.

Murray, B. W., Guo, C., Piraino, J., Westwick, J. K., Zhang, C., Lamerdin, J., Dagostino, E., Knighton, D., Loi, C.-M., Zager, M., Kraynov, E., Popoff, I., Christensen, J. G., Martinez, R., Kephart, S. E., Marakovits, J., Karlicek, S., Bergqvist, S. et Smeal, T. (2010) « Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), p. 9446-51. doi: 10.1073/pnas.0911863107.

Nayal, A., Webb, D. J., Brown, C. M., Schaefer, E. M., Vicente-Manzanares, M. et Horwitz, A. R. (2006) « Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics », *The Journal of Cell Biology*, 173(4). Disponible à : <http://jcb.rupress.org/content/173/4/587> (Consulté le: 12 mai 2017).

Nikolic, M., Chou, M. M., Lu, W., Mayer, B. J. et Tsai, L.-H. (1998) « The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. », *Nature*, 395(6698), p. 194-198. doi: 10.1038/26034.

Nisimoto, Y. et Ogawa, H. (2002) « Interaction between p21-activated protein kinase and Rac during differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cell induced by all-trans-retinoic acid. », *European journal of biochemistry*, 269(10), p. 2622-9. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12027902> (Consulté le: 12 mai 2017).

Niu, C. S., Li, M. W., Ni, Y. F., Chen, J. M., Mei, J. M., Li, J. et Fu, X. M. (2010) « Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells », *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1), p. 113. doi: 10.1186/1756-9966-29-113.

Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P. et Ohgaki, H. (2009) « IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas », *Clinical Cancer Research*, 15(19), p. 6002-6007. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715.

Noushmehr, H., Weisenberger, D. J., Diefes, K., Phillips, H. S., Pujara, K., Berman, B. P., Pan, F., Pelloski, C. E., Sulman, E. P., Bhat, K. P., Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Hayes, D. N., Perou, C. M., Schmidt, H. K., Ding, L., Wilson, R. K., Van Den Berg, D., Shen, H., Bengtsson, H., Neuvial, P., Cope, L. M., Buckley, J., Herman, J. G., Baylin, S. B., Laird, P. W., Aldape, K. et Cancer Genome Atlas Research Network (2010) « Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma », *Cancer Cell*, 17(5), p. 510-522. doi: 10.1016/j.ccr.2010.03.017.

Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S. C., Hall, C. et Lim, L. (1998) « PAK promotes

morphological changes by acting upstream of Rac. », *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 17(15), p. 4328-39. doi: 10.1093/emboj/17.15.4328.

Ohgaki, H. et Kleihues, P. (2013) « The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma », *Clinical Cancer Research*, 19(4), p. 764-772. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.

Park, E. R., Eblen, S. T. et Catling, A. D. (2007) « MEK1 activation by PAK: A novel mechanism », *Cellular Signalling*, 19(7), p. 1488-1496. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.01.018.

Parrini, M. C., Lei, M., Harrison, S. C. et Mayer, B. J. (2002) « Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. », *Molecular cell*, 9(1), p. 73-83. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804587> (Consulté le: 11 mai 2017).

Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Dana, A., Tekleab, H., Jr, L. A. D., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, K. N., Mieko, S., Shinjo, O., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Paulo, S. et Paulo, S. (2008) « An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme », (September).

Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., Louis, D. N., Rozenblatt-Rosen, O., Suvà, M. L., Regev, A. et Bernstein, B. E. (2014) « Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. », *Science (New York, N.Y.)*, 344(6190), p. 1396-401. doi: 10.1126/science.1254257.

Paul, I., Bhattacharya, S., Chatterjee, A. et Ghosh, M. K. (2013) « Current Understanding on EGFR and Wnt/ β -Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk. », *Genes & cancer*, 4(11-12), p. 427-46. doi: 10.1177/1947601913503341.

Peippo, M., Koivisto, A. M., Särkämö, T., Sipponen, M., von Koskull, H., Ylisaukko-oja, T., Rehnström, K., Froyen, G., Ignatius, J. et Järvelä, I. (2007) « PAK3 related mental disability: Further characterization of the phenotype », *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A(20), p. 2406-2416. doi: 10.1002/ajmg.a.31956.

Persson, A. I., Petritsch, C., Swartling, F. J., Itsara, M., Sim, F. J., Auvergne, R., Goldenberg, D. D., Vandenberg, S. R., Nguyen, K. N., Yakovenko, S., Ayers-Ringler, J., Nishiyama, A., Stallcup, W. B., Berger, M. S., Bergers, G., McKnight, T. R., Goldman, S. A. et Weiss, W. A. (2010) « Non-stem cell origin for oligodendroglioma. », *Cancer cell*. NIH Public Access, 18(6), p. 669-82. doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.033.

Petrova, R. et Joyner, A. L. (2014) « Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. », *Development (Cambridge, England)*. Company of Biologists, 141(18), p. 3445-57. doi: 10.1242/dev.083691.

Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrester, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., Misra, A., Nigro, J. M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P. M., Modrusan, Z., Feuerstein, B. G. et Aldape, K. (2006) « Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. », *Cancer cell*, 9(3), p. 157-73. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.

Piccand, J., Meunier, A., Merle, C., Jia, Z., Barnier, J.-V. et Gradwohl, G. (2014) « Pak3 promotes

cell cycle exit and differentiation of β -cells in the embryonic pancreas and is necessary to maintain glucose homeostasis in adult mice. », *Diabetes*. American Diabetes Association, 63(1), p. 203-15. doi: 10.2337/db13-0384.

Piccirillo, S. G. M., Reynolds, B. a, Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, a, Dimeco, F. et Vescovi, a L. (2006) « Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. », *Nature*, 444(7120), p. 761-5. doi: 10.1038/nature05349.

Pollard, S. M., Yoshikawa, K., Clarke, I. D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., Squire, J. a, Smith, A. et Dirks, P. (2009) « Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. », *Cell stem cell*. Elsevier Ltd, 4(6), p. 568-80. doi: 10.1016/j.stem.2009.03.014.

Prudnikova, T. Y., Villamar-Cruz, O., Rawat, S. J., Cai, K. Q. et Chernoff, J. (2015) « Effects of p21-activated kinase 1 inhibition on 11q13-amplified ovarian cancer cells. », *Oncogene*. Nature Publishing Group, 35(February), p. 1-8. doi: 10.1038/onc.2015.278.

Pu, P., Zhang, Z., Kang, C., Jiang, R., Jia, Z., Wang, G. et Jiang, H. (2009) « Downregulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth », *Cancer Gene Therapy*, 16(4), p. 351-361. doi: 10.1038/cgt.2008.78.

Pulvirenti, T., Van Der Heijden, M., Droms, L. A., Huse, J. T., Tabar, V. et Hall, A. (2011) « Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. », *Cancer research*. NIH Public Access, 71(23), p. 7280-90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1531.

Purow, B. W., Haque, R. M., Noel, M. W., Su, Q., Burdick, M. J., Lee, J., Sundaresan, T., Pastorino, S., Park, J. K., Mikolaenko, I., Maric, D., Eberhart, C. G. et Fine, H. A. (2005) « Expression of Notch-1 and Its Ligands, Delta-Like-1 and Jagged-1, Is Critical for Glioma Cell Survival and Proliferation », *Cancer Research*, 65(6), p. 2353-2363. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1890.

Puto, L. A., Pestonjamas, K., King, C. C. et Bokoch, G. M. (2003) « p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. », *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(11), p. 9388-93. doi: 10.1074/jbc.M208414200.

Radu, M., Lyle, K., Hoeflich, K. P., Villamar-Cruz, O., Koeppen, H. et Chernoff, J. (2015) « p21-Activated Kinase 2 Regulates Endothelial Development and Function through the Bmk1/Erk5 Pathway. », *Molecular and Cellular Biology*, 35(23), p. 3990-4005. doi: 10.1128/MCB.00630-15.

Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R. et Chernoff, J. (2014) « PAK signalling during the development and progression of cancer », *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 14(1), p. 13-25. doi: 10.1038/nrc3645.

Rahman, M., Reyner, K., Deleyrolle, L., Millette, S., Azari, H., Day, B. W., Stringer, B. W., Boyd, A. W., Johns, T. G., Blot, V., Duggal, R. et Reynolds, B. A. (2015) « Neurosphere and adherent culture conditions are equivalent for malignant glioma stem cell lines. », *Anatomy & cell biology*. Korean Association of Anatomists, 48(1), p. 25-35. doi: 10.5115/acb.2015.48.1.25.

Rampazzo, E., Persano, L., Pistollato, F., Moro, E., Frasson, C., Porazzi, P., Della Puppa, A., Bresolin, S., Battilana, G., Indraccolo, S., Te Kronnie, G., Argenton, F., Tiso, N. et Basso, G. (2013) « Wnt activation promotes neuronal differentiation of Glioblastoma », *Cell Death & Disease*. Nature Publishing Group, 4(2), p. e500. doi: 10.1038/cddis.2013.32.

Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C. D., Wechsler, W. et Collins, V. P. (1994) « Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. », *The American journal of pathology*, 145(5), p. 1175-90. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7977648> (Consulté le: 25 avril 2017).

Rejeb, I., Saillour, Y., Castelnau, L., Julien, C., Bienvenu, T., Taga, P., Chaabouni, H., Chelly, J., Jemaa, L. Ben et Bahi-Buisson, N. (2008) « A novel splice mutation in PAK3 gene underlying mental retardation with neuropsychiatric features », *European Journal of Human Genetics*, 16(11), p. 1358-1363. doi: 10.1038/ejhg.2008.103.

Rettig, M., Trinidad, K., Pezeshkpour, G., Frost, P., Sharma, S., Moatamed, F., Tamanoi, F. et Mortazavi, F. (2012) « PAK1 Kinase Promotes Cell Motility and Invasiveness through CRK-II Serine Phosphorylation in Non-Small Cell Lung Cancer Cells », *PLoS ONE*. Édité par F. Andre. Public Library of Science, 7(7), p. e42012. doi: 10.1371/journal.pone.0042012.

Rider, L., Oladimeji, P. et Diakonova, M. (2013) « PAK1 regulates breast cancer cell invasion through secretion of matrix metalloproteinases in response to prolactin and three-dimensional collagen IV. », *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. The Endocrine Society, 27(7), p. 1048-64. doi: 10.1210/me.2012-1322.

Rider, L., Shatrova, A., Feener, E. P., Webb, L. et Diakonova, M. (2007) « JAK2 Tyrosine Kinase Phosphorylates PAK1 and Regulates PAK1 Activity and Functions », *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), p. 30985-30996. doi: 10.1074/jbc.M701794200.

Roig, J., Tuazon, P. T., Zipfel, P. A., Pendergast, A. M. et Traugh, J. A. (2000) « Functional interaction between c-Abl and the p21-activated protein kinase gamma-PAK », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), p. 14346-14351. doi: 10.1073/pnas.97.26.14346.

Rousseau, V., Goupille, O., Morin, N. et Barnier, J. V. (2003) « A new constitutively active brain PAK3 isoform displays modified specificities toward Rac and Cdc42 GTPases », *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), p. 3912-3920. doi: 10.1074/jbc.M207251200.

Saito, N., Fu, J., Zheng, S., Yao, J., Wang, S., Liu, D. D., Yuan, Y., Sulman, E. P., Lang, F. F., Colman, H., Verhaak, R. G., Yung, W. K. A. et Koul, D. (2014) « A high Notch pathway activation predicts response to γ secretase inhibitors in proneural subtype of glioma tumor-initiating cells. », *Stem cells (Dayton, Ohio)*. NIH Public Access, 32(1), p. 301-12. doi: 10.1002/stem.1528.

Salomoni, P. et Calegari, F. (2010) « Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1 », *Trends in Cell Biology*, 20(5), p. 233-243. doi: 10.1016/j.tcb.2010.01.006.

Sanalkumar, R., Dhanesh, S. B. et James, J. (2010) « Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(17), p. 2957-2968. doi: 10.1007/s00018-010-0391-x.

Sanders, L. C., Matsumura, F., Bokoch, G. M. et de Lanerolle, P. (1999) « Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. », *Science (New York, N.Y.)*, 283(5410), p. 2083-5. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092231> (Consulté le: 12 mai 2017).

Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K. et Delattre, J.-Y. (2009) « Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas », *Journal of Clinical Oncology*, 27(25), p. 4150-4154. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832.

Santra, M., Zheng, X., Roberts, C., Santra, S., Lu, M., Panda, S., Jiang, F. et Chopp, M. (2010) « Single doublecortin gene therapy significantly reduces glioma tumor volume. », *Journal of neuroscience research*. NIH Public Access, 88(2), p. 304-14. doi: 10.1002/jnr.22207.

Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Watanabe, E., Seino, S., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T. et Kitanaka, C. (2014) « Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. », *Stem cell research*. Elsevier B.V., 12(1), p. 119-31. doi: 10.1016/j.scr.2013.09.012.

Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Watanabe, E., Seino, S., Suzuki, K., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T. et Kitanaka, C. (2013) « Resveratrol promotes proteasome-dependent degradation of Nanog via p53 activation and induces differentiation of glioma stem cells. », *Stem cell research*. Elsevier B.V., 11(1), p. 601-10. doi: 10.1016/j.scr.2013.04.004.

Sato, M., Matsuda, Y., Wakai, T., Kubota, M., Osawa, M., Fujimaki, S., Sanpei, A., Takamura, M., Yamagiwa, S. et Aoyagi, Y. (2013) « p21-activated kinase-2 is a critical mediator of transforming growth factor- β -induced hepatoma cell migration », *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28(6), p. 1047-1055. doi: 10.1111/jgh.12150.

Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N. et Noy, N. (2007) « Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. », *Cell*. NIH Public Access, 129(4), p. 723-33. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.050.

Schug, T. T., Berry, D. C., Toshkov, I. A., Cheng, L., Nikitin, A. Y. et Noy, N. (2008) « Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARbeta/delta to RAR. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 105(21), p. 7546-51. doi: 10.1073/pnas.0709981105.

Schüle, R., Dictus, C., Campos, B., Wan, F., Felsberg, J., Ahmadi, R., Centner, F.-S., Grabe, N., Reifenberger, G., Bermejo, J. L., Unterberg, A. et Herold-Mende, C. (2012) « Potential canonical wnt pathway activation in high-grade astrocytomas. », *TheScientificWorldJournal*. Hindawi Publishing Corporation, 2012, p. 697313. doi: 10.1100/2012/697313.

Schürmann, A., Mooney, A. F., Sanders, L. C., Sells, M. A., Wang, H. G., Reed, J. C. et Bokoch, G. M. (2000) « p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. », *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 20(2), p. 453-61. doi: 10.1128/MCB.20.2.453-461.2000.

See, S.-J., Levin, V. A., Yung, W.-K. A., Hess, K. R. et Groves, M. D. (2004) « 13-cis-retinoic acid in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. », *Neuro-oncology*. Oxford University Press, 6(3), p. 253-8. doi: 10.1215/S1152851703000607.

Seidel, S., Garvalov, B. K., Wirta, V., von Stechow, L., Schanzer, A., Meletis, K., Wolter, M., Sommerlad, D., Henze, A. T., Nister, M., Reifenberger, G., Lundeberg, J., Frisen, J. et Acker, T. (2010) « A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 », *Brain*, 133(4), p. 983-995. doi: 10.1093/brain/awq042.

Sells, M. A., Boyd, J. T. et Chernoff, J. (1999) « p21-Activated Kinase 1 (Pak1) Regulates Cell Motility in Mammalian Fibroblasts », *The Journal of Cell Biology*, 145(4), p. 837-849. Disponible à: <http://www.jcb.org> (Consulté le: 12 mai 2017).

Sells, M. A., Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M. et Chernoff, J. (1997) « Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells », *Current*

Biology, p. 202-210. doi: 10.1016/S0960-9822(97)70091-5.

Senger, D. L., Tudan, C., Guiot, M.-C., Mazzoni, I. E., Molenkamp, G., LeBlanc, R., Antel, J., Olivier, A., Snipes, G. J. et Kaplan, D. R. (2002) « Suppression of Rac activity induces apoptosis of human glioma cells but not normal human astrocytes. », *Cancer research*, 62(7), p. 2131-40. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929835> (Consulté le: 13 mai 2017).

Sharim, J., Tashjian, R., Golzy, N. et Pouratian, N. (2016) « Glioblastoma following treatment with fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis », *Journal of Clinical Neuroscience*, 30, p. 166-168. doi: 10.1016/j.jocn.2016.02.003.

Singec, I., Knoth, R., Meyer, R. P., Maciaczyk, J., Volk, B., Nikkhah, G., Frotscher, M. et Snyder, E. Y. (2006) « Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology », *Nature Methods*, 3(10), p. 801-806. doi: 10.1038/nmeth926.

Singh, A. et Morris, R. J. (2010) « The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer. », *Cytokine & growth factor reviews*. NIH Public Access, 21(4), p. 299-313. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.06.003.

Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J. et Dirks, P. B. (2003) « Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. », *Cancer research*, 63(18), p. 5821-8. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522905> (Consulté le: 25 avril 2017).

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. et Dirks, P. B. (2004) « Identification of human brain tumour initiating cells », *Nature*, 432(7015), p. 396-401. doi: 10.1038/nature03128.

Sivasankaran, B., Degen, M., Ghaffari, A., Hegi, M. E., Hamou, M.-F., Ionescu, M.-C. S., Zweifel, C., Tolnay, M., Wasner, M., Mergenthaler, S., Miserez, A. R., Kiss, R., Lino, M. M., Merlo, A., Chiquet-Ehrismann, R. et Boulay, J.-L. (2009) « Tenascin-C Is a Novel RBPJ-Induced Target Gene for Notch Signaling in Gliomas », *Cancer Research*, 69(2), p. 458-465. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2610.

Snuderl, M., Fazlollahi, L., Le, L. P., Nitta, M., Zhelyazkova, B. H., Davidson, C. J., Akhavanfard, S., Cahill, D. P., Aldape, K. D., Betensky, R. A., Louis, D. N. et Iafrate, A. J. (2011) « Mosaic Amplification of Multiple Receptor Tyrosine Kinase Genes in Glioblastoma », *Cancer Cell*. IARC Press, Lyon, 20(6), p. 810-817. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.005.

Somanath, P. R., Vijai, J., Kichina, J. V., Byzova, T. et Kandel, E. S. (2009) « The role of PAK-1 in activation of MAP kinase cascade and oncogenic transformation by Akt. », *Oncogene*. NIH Public Access, 28(25), p. 2365-9. doi: 10.1038/onc.2009.114.

Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G. M., Touloumis, A., Collins, V. P., Marioni, J. C., Curtis, C., Watts, C. et Tavaré, S. (2013) « Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(10), p. 4009-14. doi: 10.1073/pnas.1219747110.

Souopgui, J., Sölter, M. et Pieler, T. (2002) « XPak3 promotes cell cycle withdrawal during primary neurogenesis in *Xenopus laevis* », *EMBO Journal*, 21(23), p. 6429-6439. doi: 10.1093/emboj/cdf644.

Stiles, C. D. et Rowitch, D. H. (2008) « Glioma Stem Cells: A Midterm Exam », *Neuron*, 58(6), p.

832-846. doi: 10.1016/j.neuron.2008.05.031.

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Mirimanoff, R.-O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups et National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2009) « Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial », *The Lancet Oncology*, 10(5), p. 459-466. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups et National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) « Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma », *New England Journal of Medicine*, 352(10), p. 987-996. doi: 10.1056/NEJMoa043330.

Su, Z., Zang, T., Liu, M.-L., Wang, L.-L., Niu, W. et Zhang, C.-L. (2014) « Reprogramming the fate of human glioma cells to impede brain tumor development. », *Cell death & disease*. Nature Publishing Group, 5(10), p. e1463. doi: 10.1038/cddis.2014.425.

Sunayama, J., Matsuda, K. I., Sato, A., Tachibana, K., Suzuki, K., Narita, Y., Shibui, S., Sakurada, K., Kayama, T., Tomiyama, A. et Kitanaka, C. (2010) « Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells », *Stem Cells*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 28(11), p. 1930-1939. doi: 10.1002/stem.521.

Sunayama, J., Sato, A., Matsuda, K., Tachibana, K., Suzuki, K., Narita, Y., Shibui, S., Sakurada, K., Kayama, T., Tomiyama, A. et Kitanaka, C. (2010) « Dual blocking of mTOR and PI3K elicits a prodifferentiation effect on glioblastoma stem-like cells. », *Neuro-oncology*. Oxford University Press, 12(12), p. 1205-19. doi: 10.1093/neuonc/noon103.

Szerlip, N. J., Pedraza, A., Chakravarty, D., Azim, M., McGuire, J., Fang, Y., Ozawa, T., Holland, E. C., Huse, J. T., Jhanwar, S., Leversha, M. A., Mikkelsen, T. et Brennan, C. W. (2012) « Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 109(8), p. 3041-6. doi: 10.1073/pnas.1114033109.

Tabusa, H., Brooks, T. et Massey, A. J. (2013) « Knockdown of PAK4 or PAK1 Inhibits the Proliferation of Mutant KRAS Colon Cancer Cells Independently of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT Signaling », *Molecular Cancer Research*, 11(2). Disponible à: <http://mcr.aacrjournals.org/content/11/2/109> (Consulté le: 12 mai 2017).

Takezaki, T., Hide, T., Takanaga, H., Nakamura, H., Kuratsu, J. et Kondo, T. (2011) « Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells », *Cancer Science*. Blackwell Publishing Ltd, 102(7), p. 1306-1312. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01943.x.

Tang, Y., Chen, Z., Ambrose, D., Liu, J., Gibbs, J. B., Chernoff, J. et Field, J. (1997) « Kinase-deficient Pak1 mutants inhibit Ras transformation of Rat-1 fibroblasts. », *Molecular and cellular*

biology, 17(8), p. 4454-64. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234703> (Consulté le: 1 mai 2017).

Tao, J., Oladimeji, P., Rider, L. et Diakonova, M. (2011) « PAK1-Nck Regulates Cyclin D1 Promoter Activity in Response to Prolactin », *Molecular Endocrinology*. Oxford University Press, 25(9), p. 1565-1578. doi: 10.1210/me.2011-0062.

TCGA Network, T. C. G. A. R. (2015) « Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas », *The new england journal of medicine*, p. 1-18. doi: 10.1056/NEJMoa1402121.

Tchorz, J. S., Tome, M., Cloëtta, D., Sivasankaran, B., Grzmil, M., Huber, R. M., Rutz-Schatzmann, F., Kirchhoff, F., Schaeren-Wiemers, N., Gassmann, M., Hemmings, B. A., Merlo, A. et Bettler, B. (2012) « Constitutive Notch2 signaling in neural stem cells promotes tumorigenic features and astroglial lineage entry. », *Cell death & disease*. Nature Publishing Group, 3(6), p. e325. doi: 10.1038/cddis.2012.65.

Teodorczyk, M. et Schmidt, M. H. H. (2015) « Notching on Cancer's Door: Notch Signaling in Brain Tumors », *Frontiers in Oncology*, 4, p. 341. doi: 10.3389/fonc.2014.00341.

Thévenot, E., Moreau, A. W., Rousseau, V., Combeau, G., Domenichini, F., Jacquet, C., Goupille, O., Amar, M., Kreis, P., Fossier, P. et Barnier, J.-V. (2011) « p21-Activated kinase 3 (PAK3) protein regulates synaptic transmission through its interaction with the Nck2/Grb4 protein adaptor. », *The Journal of biological chemistry*, 286(46), p. 40044-59. doi: 10.1074/jbc.M111.262246.

Thiel, D. A., Reeder, M. K., Pfaff, A., Coleman, T. R., Sells, M. A. et Chernoff, J. (2002) « Cell cycle-regulated phosphorylation of p21-activated kinase 1 », *Curr Biol*, 12(14), p. 1227-1232. doi: S0960982202009314 [pii].

Thullberg, M., Gad, A., Beeser, A., Chernoff, J. et Strömblad, S. (2007) « The kinase-inhibitory domain of p21-activated kinase 1 (PAK1) inhibits cell cycle progression independent of PAK1 kinase activity », *Oncogene*, 26(12), p. 1820-1828. doi: 10.1038/sj.onc.1209983.

Vadlamudi, R. K., Adam, L., Wang, R. A., Mandal, M., Nguyen, D., Sahin, A., Chernoff, J., Hung, M. C. et Kumar, R. (2000) « Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells. », *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 275(46), p. 36238-44. doi: 10.1074/jbc.M002138200.

Vadlamudi, R. K., Bagheri-Yarmand, R., Yang, Z., Balasenthil, S., Nguyen, D., Sahin, A. A., den Hollander, P., Kumar, R., Kumar, R., Moch, H. et al., et (2004) « Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes. », *Cancer cell*. Elsevier, 5(6), p. 575-85. doi: 10.1016/j.ccr.2004.05.022.

Vadlamudi, R. K., Barnes, C. J., Rayala, S., Li, F., Balasenthil, S., Marcus, S., Goodson, H. V., Sahin, A. A. et Kumar, R. (2005) « p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B. », *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 25(9), p. 3726-36. doi: 10.1128/MCB.25.9.3726-3736.2005.

Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P. et Kumar, R. (2002) « Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1 », *Nature Cell Biology*, 4(9), p. 681-690. doi: 10.1038/ncb838.

Vadlamudi, R. K., Li, F., Barnes, C. J., Bagheri-Yarmand, R. et Kumar, R. (2004) « p42-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate », *EMBO reports*, 5, p. 154-160. doi: 10.1038/sj.embor.7400079.

Vadlamudi, R. K., Manavathi, B., Singh, R. R., Nguyen, D., Li, F. et Kumar, R. (2005) « An essential role of Pak1 phosphorylation of SHARP in Notch signaling », *Oncogene*, 24(28), p. 4591-4596. doi: 10.1038/sj.onc.1208672.

Varela-Nallar, L. et Inestrosa, N. C. (2013) « Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. », *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media SA, 7, p. 100. doi: 10.3389/fncel.2013.00100.

Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. a, Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. a, Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H. S., Hodgson, J. G., James, C. D., Sarkaria, J. N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P. T., Wilson, R. K., Speed, T. P., Gray, J. W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C. M. et Hayes, D. N. (2010) « Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. », *Cancer cell*. Elsevier Ltd, 17(1), p. 98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.

Viaud, J. et Peterson, J. R. (2009) « An allosteric kinase inhibitor binds the p21-activated kinase autoregulatory domain covalently. », *Molecular cancer therapeutics*, 8(9), p. 2559-65. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0102.

Wang, J., Sakariassen, P. Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S. O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røslund, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R. et Enger, P. Ø. (2008) « CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells », *International Journal of Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 122(4), p. 761-768. doi: 10.1002/ijc.23130.

Wang, J., Wakeman, T. P., Lathia, J. D., Hjelmeland, A. B., Wang, X.-F., White, R. R., Rich, J. N. et Sullenger, B. A. (2010) « Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. », *Stem cells (Dayton, Ohio)*. NIH Public Access, 28(1), p. 17-28. doi: 10.1002/stem.261.

Wang, S., Sdrulla, A. D., DiSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G. et Barres, B. A. (1998) « Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation », *Neuron*, 21(1), p. 63-75. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80515-2.

Wang, Y., Yang, J., Zheng, H., Tomasek, G. J., Zhang, P., McKeever, P. E., Lee, E. Y.-H. P. et Zhu, Y. (2009) « Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. », *Cancer cell*. NIH Public Access, 15(6), p. 514-26. doi: 10.1016/j.ccr.2009.04.001.

Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P. et Ohgaki, H. (1996) « Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. », *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 6(3), p. 217-23-4. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8864278> (Consulté le: 26 avril 2017).

Watanabe, T., Yokoo, H., Yokoo, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. et Ohgaki, H. (2001) « Concurrent Inactivation of RB1 and TP53 Pathways in Anaplastic Oligodendrogliomas », *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. Oxford University Press, 60(12), p. 1181-1189. doi: 10.1093/jnen/60.12.1181.

- Wexler, E. M., Paucer, A., Kornblum, H. I., Palmer, T. D., Plamer, T. D. et Geschwind, D. H. (2009) « Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. », *Stem cells (Dayton, Ohio)*. NIH Public Access, 27(5), p. 1130-41. doi: 10.1002/stem.36.
- Wong, L. H., McGhie, J. D., Sim, M., Anderson, M. A., Ahn, S., Hannan, R. D., George, A. J., Morgan, K. A., Mann, J. R. et Choo, K. H. A. (2010) « ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. », *Genome research*, 20(3), p. 351-60. doi: 10.1101/gr.101477.109.
- Woodhead, G. J., Mutch, C. A., Olson, E. C. et Chenn, A. (2006) « Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. », *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. NIH Public Access, 26(48), p. 12620-30. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3180-06.2006.
- Wu, C.-F., Delsert, C., Faure, S., Traverso, E. E., Kloc, M., Kuang, J., Etkin, L. D. et Morin, N. (2007) « Tumorhead distribution to cytoplasmic membrane of neural plate cells is positively regulated by Xenopus p21-activated kinase 1 (X-PAK1) », *Developmental Biology*, 308(1), p. 169-186. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.05.015.
- Xia, C., Ma, W., Stafford, L. J., Marcus, S., Xiong, W. C. et Liu, M. (2001) « Regulation of the p21-activated kinase (PAK) by a human Gbeta-like WD-repeat protein, hPIP1. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 98(11), p. 6174-9. doi: 10.1073/pnas.101137298.
- Xia, S.-L., Wu, M.-L., Li, H., Wang, J.-H., Chen, N.-N., Chen, X.-Y., Kong, Q.-Y., Sun, Z. et Liu, J. (2015) « CRABP-II- and FABP5-independent responsiveness of human glioblastoma cells to all-trans retinoic acid. », *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 6(8), p. 5889-902. doi: 10.18632/oncotarget.3334.
- Yang, M.-S., Hong, J.-S., Kim, S.-T., Lee, K.-Y., Park, K. W., Kwon, S.-T., Kweon, D.-H., Koh, Y. H., Gaiano, N. et Yoon, K. (2011) « Among γ -secretase substrates Notch1 alone is sufficient to block neurogenesis but does not confer self-renewal properties to neural stem cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1), p. 133-138. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.080.
- Ye, D. Z. et Field, J. (2012) « PAK signaling in cancer », (June), p. 105-116.
- Ye, D. Z., Jin, S., Zhuo, Y., Field, J. et Niculescu-Duvas, I. (2011) « p21-Activated Kinase 1 (Pak1) Phosphorylates BAD Directly at Serine 111 In Vitro and Indirectly through Raf-1 at Serine 112 », *PLoS ONE*. Édité par J. A. Bauer. Public Library of Science, 6(11), p. e27637. doi: 10.1371/journal.pone.0027637.
- Yin, D., Ogawa, S., Kawamata, N., Tunici, P., Finocchiaro, G., Eoli, M., Ruckert, C., Huynh, T., Liu, G., Kato, M., Sanada, M., Jauch, A., Dugas, M., Black, K. L. et Koeffler, H. P. (2009) « High-Resolution Genomic Copy Number Profiling of Glioblastoma Multiforme by Single Nucleotide Polymorphism DNA Microarray », *Molecular Cancer Research*, 7(5), p. 665-677. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0270.
- Ying, M., Wang, S., Sang, Y., Sun, P., Lal, B., Goodwin, C. R., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, a, Lathera, J. et Xia, S. (2011) « Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. », *Oncogene*. Nature Publishing Group, 30(31), p. 3454-67. doi: 10.1038/onc.2011.58.

Yong, R. L. et Tsankova, N. M. (2015) « Emerging interplay of genetics and epigenetics in gliomas: a new hope for targeted therapy. », *Seminars in pediatric neurology*, 22(1), p. 14-22. doi: 10.1016/j.spen.2014.12.004.

Yoon, C.-H., Hyun, K.-H., Kim, R.-K., Lee, H., Lim, E.-J., Chung, H.-Y., An, S., Park, M.-J., Suh, Y., Kim, M.-J. et Lee, S.-J. (2011) « The small GTPase Rac1 is involved in the maintenance of stemness and malignancies in glioma stem-like cells. », *FEBS letters*. Federation of European Biochemical Societies, 585(14), p. 2331-8. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.070.

Yung, W. K., Kyritsis, A. P., Gleason, M. J. et Levin, V. A. (1996) « Treatment of recurrent malignant gliomas with high-dose 13-cis-retinoic acid. », *Clinical Cancer Research*, 2(12). Disponible à: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/2/12/1931.long> (Consulté le: 5 mai 2017).

Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S. et Horwitz, A. F. (2005) « A GIT1/PIX/Rac/PAK Signaling Module Regulates Spine Morphogenesis and Synapse Formation through MLC », *Journal of Neuroscience*, 25(13), p. 3379-3388. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3553-04.2005.

Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W.-T., Lee, H.-T., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., Wang, Y., Sawaya, R., Xie, K., Yung, W. K. A., Medema, R. H., He, X. et Huang, S. (2011) « FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. », *Cancer cell*. NIH Public Access, 20(4), p. 427-42. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.016.

Zhang, N., Wu, X., Yang, L., Xiao, F., Zhang, H., Zhou, A., Huang, Z. et Huang, S. (2012) « FoxM1 inhibition sensitizes resistant glioblastoma cells to temozolomide by downregulating the expression of DNA-repair gene Rad51. », *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. NIH Public Access, 18(21), p. 5961-71. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0039.

Zhang, X.-P., Zheng, G., Zou, L., Liu, H.-L., Hou, L.-H., Zhou, P., Yin, D.-D., Zheng, Q.-J., Liang, L., Zhang, S.-Z., Feng, L., Yao, L.-B., Yang, A.-G., Han, H. et Chen, J.-Y. (2008) « Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. », *Molecular and cellular biochemistry*, 307(1-2), p. 101-8. doi: 10.1007/s11010-007-9589-0.

Zhao, L., Ma, Q.-L., Calon, F., Harris-White, M. E., Yang, F., Lim, G. P., Morihara, T., Ubeda, O. J., Ambegaokar, S., Hansen, J. E., Weisbart, R. H., Teter, B., Frautschy, S. A. et Cole, G. M. (2006) « Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease », *Nature Neuroscience*, 9(2), p. 234-242. doi: 10.1038/nn1630.

Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., Wang, P., Yu, W., Li, Z., Gong, L., Peng, Y., Ding, J., Lei, Q., Guan, K.-L. et Xiong, Y. (2009) « Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . », *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 324(5924), p. 261-5. doi: 10.1126/science.1170944.

Zhao, Z., Lim, J. P., Ng, Y.-W., Lim, L. et Manser, E. (2005) « The GIT-Associated Kinase PAK Targets to the Centrosome and Regulates Aurora-A », *Molecular Cell*, 20(2), p. 237-249. doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.035.

Zhao, Z. S., Manser, E. et Lim, L. (2000) « Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation. », *Molecular and cellular biology*, 20(11), p. 3906-17. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805734> (Consulté le: 13 juin 2017).

Zheng, H., Ying, H., Wiedemeyer, R., Yan, H., Quayle, S. N., Ivanova, E. V., Paik, J.-H., Zhang, H., Xiao, Y., Perry, S. R., Hu, J., Vinjamoori, A., Gan, B., Sahin, E., Chheda, M. G., Brennan, C.,

Wang, Y. A., Hahn, W. C., Chin, L. et DePinho, R. A. (2010) « PLAGL2 Regulates Wnt Signaling to Impede Differentiation in Neural Stem Cells and Gliomas », *Cancer Cell*, 17(5), p. 497-509. doi: 10.1016/j.ccr.2010.03.020.

Zhou, G.-L., Zhuo, Y., King, C. C., Fryer, B. H., Bokoch, G. M. et Field, J. (2003) « Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. », *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 23(22), p. 8058-69. doi: 10.1128/mcb.23.22.8058-8069.2003.

ANNEXE I : Article

The p21-activated kinase 3 gene is highly expressed in 1p/19q oligodendrogliomas and associated with a differentiated proneural/stem cell like phenotype in glioblastoma cells

Running title: PAK3 in pathophysiology of high grade gliomas

Authors

Nathalie Magne¹, Véronique Rousseau¹, Vincent Gleize^{2,3}, Charlotte Schmitt^{2,3}, Ahmed Idbah^{2,3}, Emmanuelle Huillard^{2,3}, Marc Sanson^{2,3}, Jean-Vianney Barnier¹

Addresses

1 Institute of Neuroscience Paris-Saclay, CNRS-Université Paris-Sud, UMR9197, F-91405 Orsay, France

2 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de Biologie Paris Seine, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

3 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U 1127, CNRS UMR 7225, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, F-75013, Paris

Corresponding author: jean-vianney.barnier@u-psud.fr

Abstract 262 words

Introduction 681 words

Resultats 2238 words

Discussion 1428 words

5 figures

Supplementary information

6 supplementary figures

2 supplementary materials

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments:

This work was supported by the CNRS, GEFLUC (Paris, Ile de France), and the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comités d'Ile de France). We thank S. Guyon for helpful comments on the manuscript. We are also grateful to C. Levasseur for assistance with mice injection and to A. Bonilla, C. Dubois and C. Rousseau for animal care.

Abstract

The three p21-activated kinases of group I (PAK) play a key role in cell division and movement and two of them, *PAK1* and *PAK2* are oncogenes involved in cell transformation and tumor growth. *PAK1* and *PAK3* are highly expressed in brain and control neuronal and oligodendroglial differentiation whereas *PAK3* participates to the proneural developmental pathway. The roles of these two kinases in brain tumor pathophysiology are unknown. High grade gliomas are the most frequent adult brain tumor with bad prognosis. Recent advances in molecular characterization of gliomas have contributed to a better understanding, and have identified several sets of genes whose high expression is correlated with clinical outcomes, genetic characteristics and histology. However the role of genes of the proneural signature, such as *PAK3*, in the biology of these tumors is still poorly understood and may concern control of cell cycle, survival and apoptosis, and/or neural specification and differentiation. We report here that *PAK3* expression is positively correlated to a longer survival in gliomas and is high in 1p/19q oligodendrogliomas. In glioblastoma cell lines, *PAK3* is highly expressed in a glioma cell line with a stem-like signature that does not induce tumor after xenograft. Its increasing expression upon a set of differentiation paradigms is correlated with those of neural markers in a glioma stem-like cell line and with those of neuronal markers in a progenitor-like cell line. Altogether, our results show that *PAK3* has opposite functions than the *PAK1* oncogene in high grade gliomas, suggesting tumor suppressor functions, and that *PAK3* may be a therapeutic target to induce glioma cell post-mitotic differentiation.

Introduction

Three PAKs of group I form a small family of kinases that are the main effectors of the Rac and Cdc42 GTPases which play a crucial role in cell movement and proliferation (Bokoch, 2003; Kumar & Li, 2016). The two neuronal PAK1 and PAK3 kinases play an important role in neuronal signaling and synaptic plasticity (Kreis & Barnier, 2009). *PAK1* is involved in neuronal polarity whereas *PAK3* is involved in the developmental proneural pathway, regulating cell cycle exit of neuroblast precursors during primary neurogenesis (Souopgui et al., 2002) and is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation during telencephalon ontogenesis (Cobos et al., 2007, Dai et al., 2014). *PAK1* is an oncogene, whose overexpression and activation play a key role in several cancers such as breast, colon, and some other cancers (Radu et al., 2014; Kumar & Li, 2016). In contrast, the functions of *PAK3* in cancer are poorly documented, while it belongs to the group of the genes of the proneural signature in glioblastomas (Verhaak et al., 2010). However, the roles of *PAK1* and *PAK3* in glioma pathophysiology are unknown.

Gliomas account for 80% of malignant brain tumors, and raised many problems and challenges to biologists and clinicians, due to their heterogeneous cell composition and the presence of cells with neural stem cell properties (Westphal & Lamszus, 2011, Bayin et al., 2014). The cancer stem-like cells form a quiescent pool of cells resistant to anti-mitotic treatments and thought to be responsible for tumor recurrence after resection (Chen et al., 2012). The new WHO classification of gliomas integrates histological and molecular biomarkers and identifies clinically relevant subtypes of gliomas with prognostic and/or predictive value linked to chromosomal, genetic, transcriptomic and epigenetic hallmarks (Phillips et al., 2006; Gravendeel et al., 2009, Louis et al., 2016; Verhaak et al., 2016). Thus the proneural subtypes characterized by high expression of proneural development genes is observed in different glioma grades, mainly associated with IDH mutations in glioblastomas and with 1p/19q codeletion in oligodendrogliomas (Phillips et al., 2006; Parsons et al., 2008; Ducray et al., 2008; Verhaak et al., 2010; TCGA et al., 2015). Whereas patients having tumors with proneural signature may have a longer survival than other tumor subtypes, aggressive therapies fail to improve live span. The roles of genes associated with the proneural signature in the biology of these tumors are still poorly understood. They may control transitions between quiescent and activated states for the cancer stem cells, cell cycle exit, cell fate decision, and differentiation for the proliferative undifferentiated cells, by regulating a complex set of transcription factors, signaling pathways and epigenetic regulations. One promising therapeutic strategy in high grade glioma treatment to inhibit tumor growth or recurrence is the induction of glioma cell cycle exit and differentiation. Several approaches have been described using cytokines or overexpression of transcription factors, using the developmental schema of neural differentiation as a paradigm (Piccirillo et al. 2006; Hide et al., 2009; Guichet et al., 2013). Molecular actors of this cellular switch between mitotic and post-mitotic states are relatively unknown but may constitute potential therapeutic targets.

Thus we explored the hypothesis that *PAK3* may be involved in the inhibition of brain tumor growth by inducing glioma cell differentiation. For this, we analyzed *PAK3* expression and correlation with patient survival in cancer databases and in characterized patient cohorts according to histological and molecular subtypes. We observed that *PAK3* has a higher expression in oligodendrogliomas carrying 1p/19q codeletion and that its expression is positively correlated with a longer survival of patients, in contrast to that of the *PAK1* gene. In GBM cell lines, *PAK3* expression is higher in a non-tumorigenic cell line displaying a stem cell like/proneural signature than in a tumorigenic cell line with a progenitor/mesenchymal/classical phenotype. Thanks to the adherent culture model, we induced GBM cell differentiation by protocols favoring either neuronal or glial phenotypes. Interestingly, we observed that increased *PAK3* expression is correlated to cell cycle exit and immature neuronal differentiation. Together, these data strongly suggest that *PAK3* plays an inhibitory role in brain tumor growth and may be a potential target for glioma therapy.

Results

PAK3 is highly expressed in gliomas and is associated with longer patient survival.

We first examined the expression level of *PAK* genes in a database from The Cancer Genome Atlas (TCGA) databases (Figure 1a,b) (Gravendeel et al., 2009). Both *PAK1* and *PAK3* genes are relatively highly expressed in normal brain compared to other non-neuronal tissues, as previously reported (Arias-Romero & Chernoff, 2008). Whereas *PAK1* is almost equally expressed in all tumor types, high *PAK3* expression is found mostly in nervous system tumors, glioma and neuroblastoma, and is much more heterogeneous in gliomas compared to any other tumor. While *GFAP*, *OLIG2*, *S100β* and *DCX* are highly expressed in gliomas compared to other tumors, two neuronal markers CamKII and Calbindin were weakly expressed in all tumor types, reflecting the glial and immature neuronal cellular phenotypes of gliomas (Supplementary Figure S1).

We then investigated the correlation between the *PAK* expression levels and patient survival, and found *PAK1* expression associated with shorter survival whereas *PAK3* expression was associated with a longer survival (Figure 1c,d). Similar data were obtained from the AMC-TGCA (data not shown). *PAK1* and *PAK3* were not correlated each other ($r = x$, $p = y$) supporting independent roles for each gene in cancer progression (data not shown). Altogether, these data suggests opposite roles for *PAK1* and *PAK3* in glioma, and the hypothesis that *PAK3* may inhibit glioma tumor growth.

High expression of *PAK3* is associated with 1p/19q co-deleted glioma subtypes and longer survival

In order to investigate precisely the expression level of the *PAK* genes in glioma subtypes, we analyzed *PAK1* and *PAK3* mRNA expression by quantitative RT-PCR in 135 tumor samples from glioma patients, from the Pitié-Salpêtrière Hospital's cohort, according to grade (Supplementary Figure S2) and histological classification (Figure 2a,b). Tumors were compared to Epileptic brain biopsies as references. Both *PAK1* and *PAK3* were less expressed in gliomas than in control brains, in agreement with their lower expression in glial cells compared to neurons (Kreis et al., 2008). *PAK1* and *PAK3* expressions were not associated with grading (Supplementary Figure S2). *PAK1* expression was independent from glioma subtype, while *PAK3* expression was associated with grade II/III oligodendrogliomas. Since oligodendrogliomas are often associated with some genomic hallmarks such as the 1p/19q codeletion and *IDH* mutations we therefore examined a possible relationship between 1p/19q codeletion which is the hallmark of oligodendroglioma (Ducray et al., 2008) and *PAK* expressions, in 259 grade II/III glioma samples by quantitative RT-PCR assay. In II and III glioma grades, *PAK1* was equally expressed in noncodeleted and codeleted gliomas, whereas *PAK3* displays a higher expression in codeleted gliomas (Figure 2c, d). None were associated with *IDH* mutation *per se* (Figure 2e, f). The prognostic impact of both *PAK3* and *PAK1* was found in each molecular subgroup, ie IDHwt, IDHmut, IDHmut/codeleted (Supplementary Figure S3). As an example, the median survivals in 1p/19 codeleted patients with high or low *PAK3* expression level were 74 months and 24 months, respectively.

High *PAK3* expression is correlated with low proliferating GBM spheroids

A more in depth analysis was performed with GBM cell lines established from patient tumors. These cell lines can be established from high grade gliomas and represent valuable models for basic research and drug discovery (Lee et al., 2006; Pollard et al., 2009; Cusulin et al., 2015; Binder et al., 2016). They display transcriptomic patterns similar to that of the original tumor (Lee et al., 2006; Pollard et al., 2009; Hong et al., 2012; Cusulin et al., 2015). These stem and progenitor transcriptomic signatures match those of neural/proneural and classical/mesenchymal glioblastoma subtypes, respectively (Verhaak et al., 2010; Cusulin et al., 2015). These cells recapitulate hallmarks of the

original tumor when injected intracranially, self-renew *in vitro* in suspension cultures or in monolayer cultures, in EGF/FGF containing medium, and may be induced to differentiate by growth factor withdrawal or by activation of differentiating pathways. Two cell lines derived from the same initial 3731 tumor acquired small phenotypic differences along the culture passages: 3731a and 3731b, and a third cell line, named 4371, has been previously described (Lamour et al., 2015). A common genetic feature of the three cell lines is the EGFR amplification (data not shown). However, the two 3731 cell lines express also the mutated EGFRvIII form (Bikeye et al., 2010). The three GBM cell lines grew as spheroids in EGF-FGF defined medium, here named proliferative medium (PM) (Figure 3a). The level of *PAK1* and *PAK3* expression differs in these cell lines, as measured by qPCR on suspension PM-cultured cells (Figure 3b). *PAK1* was weakly expressed in the GBM3731a compared to others, and *PAK3* expression was significantly higher in GBM4371 than in the two other cell lines. We then examined whether *PAK3* expression could be linked with phenotypic GBM cell traits, by analyzing stemness, proliferative ability, differentiation status and molecular signature of the three GBM cell lines. Self-renewal capacity was assessed by calculating the percentage of cells forming new spheres at low density after dissociation (Figure 3c). As shown, GBM4371 presents a high percentage of sphere forming cells (22%) compared to the two other cell lines GBM3731a (10%) and GBM3731b (16%). However, similar expression levels of Nestin (*NES*) and *SOX2* were detected in these cell lines (Figure 3f). These results were confirmed by immunofluorescence analysis, showing that most of the cells in spheres of the three cell lines are *NES* positive and a large proportion are *SOX2* positive (Supplementary Figure S4).

Cell growth was investigated in two ways: by counting the number of living cells in sphere cultures, at day 4 and 7 after dissociation (Figure 3d), and by measuring the diameter of each sphere formed after 7 days (Figure 3e). As shown, while GBM3731a and GBM3731b form larger spheres and exhibit the highest proliferation rate with a 16-17 fold amplification on day 7, the GBM4371 has an average sphere size smaller and the lowest growth rate of 12 fold. Accordingly, the expression of the cyclin D1 (*CCND1*) was lower in this slow proliferative cell line GBM4371 than in the GBM3731 cell lines, and conversely, the level of Cyclin kinase inhibitor p27-KIP1 (*p27*) was higher (Figure 3f).

Another feature of GBM is the presence of differentiated cells engaged in the three neural commitments that was evaluated by measuring by qPCR the expression of differentiation markers: *GFAP* for astrocytes, *OLIG2* and *PDGFR α* for the oligodendroglial lineage, and *DCX*, *MAP2*, and beta-III-tubulin (*β TUB*) for the neuronal lineage (Figure 3f). Thus, with respect to *GFAP*, *DCX*, and *PDGFR α* , it can be noted that the 4371 cell line expresses at a high level differentiation marker genes, in contrast to the two 3731 cell lines. Thus the 4371 cell line which expresses the highest level of *PAK3* is also the most differentiated cell line. This was confirmed by immunolabelling and imaging of spheres (Supplementary Figure 4). This result also suggests that *PAK3* expression is not associated with a unique neural lineage.

Expression levels of genes representative of the four transcriptomic signatures, were analyzed by qPCR (Figure 3f,g). According to their common origin, the two 3731 cell lines have similar expression patterns and expressed relatively high levels of *EFGR* and *RUNX2*, and low level of neural/proneural genes, that allow us to classify them into the mesenchymal/classical subtype having a progenitor-like phenotype (Verhaak et al., 2010; Cusulin et al., 2015). Conversely, the 4371 cells expressed relatively high levels of *ASCL1*, *DCX*, *NKX2.2* and *SGK3*, which are markers from the proneural and neural signatures, respectively, both associated with a stem-like phenotype.

We extended our study to correlate the *PAK3* expression level to tumor formation and tumor growth by engrafting 10^6 cells in the flank of Nude mice (Figure 3 h,i). For this experiment, in addition to the three GBM lines used so far, the well-defined U87 glioma cell line was used as control. All the mice injected with the U87 and 3731b cell lines developed tumors whereas 80% of mice injected with the 3731a cells developed tumors. However tumors grew faster for the U87 and the mice

died more rapidly compared to the two GBM3731 cell lines (Figure 3h,i). Interestingly, and in strong contrast, none of the mice injected with the GBM4371 cells developed tumor, even after 8 months. Altogether, these results show that a high level of *PAK3* expression in GBM cell lines is associated with a low proliferation rate, a high differentiated phenotype, a stem-like phenotype with a transcriptomic pattern of neural/proneural signature, and the absence of tumorigenicity, and conversely a low *PAK3* expression level is linked to a high proliferative index, a low differentiated status, a progenitor-like phenotype associated with a mesenchymal/classical transcriptomic signature, a high tumorigenicity and a rapid tumor growth.

Correlation of increased *PAK3* expression with cell cycle exit and cell differentiation upon growth factor withdrawal

In order to explore the relationship between *PAK3* expression and cell phenotype, and to more precisely analyze cell-cycle exit and differentiation, we used a previously described culture model, based on glioma cells grown in adherent monolayer conditions (Pollard 2009). Consistent with the expression pattern in spheres, the various cell lines display distinct basal *PAK3* expression level in monolayer culture in PM culture conditions: this level is higher in 4371 than in the 3731a and 3731b GBM cells, as assessed by western blot and qPCR analysis (Figure 4a,b, t0). GBM cell differentiation was triggered by growth factor (EGF/FGF) withdrawal in the presence of 0.5% FCS, as described by Pollard and colleagues (Pollard et al., 2009) and was monitored by quantifying markers expression after 3 days (t3) and 8 days (t8), compared to PM conditions (t0). Growth factor withdrawal did not induce cell death in the three cell lines, as previously reported for GBM cell lines (Pollard et al., 2009) (data not shown). Interestingly, growth factor withdrawal induced a significant increase of *PAK3* expression in the two 3731 cell lines and a small increase for the 4371 cell line. In contrast, *PAK1* expression is moderately increased in the 3731a cell line and not in the two other cell lines (Figure 4b). However *PAK3* expression level is weakly increased in 4371 cells but is largely increased in the 3731a cells after growth factor withdrawal, as quantified by qPCR and western blot analysis (Figure 4a,b). Proportion of proliferative cells in PM conditions in monolayer cultures, measured by Ki67 immunostaining, varies between the three GBM lines, from 90 % (3731b) to 60 % (4371) of Ki67-positive cells, with a similar rank to proliferation observed in sphere cultures (Figure 4c). After growth factor withdrawal, the percent of Ki67-positive cells is largely reduced for the 3731a and 4371 GBM cells, and in a lesser extent for the 3731b subclone (Figure 4c, right histogram). As previously reported, the GBM cell lines heterogeneously respond to growth factor withdrawal (Pollard et al., 2009). There is no correlation between proliferation arrest and increase in *PAK3* expression or in *p27* and *CCND1* expressions, both significantly increased in two out of the three cell lines (Figure 4d). The differentiation phenotype of the three GBM cell lines was analyzed by immunological labeling. As shown figure 4e, DCX and GFAP staining are more pronounced in 4371 GBM cells in the presence of growth factors, compared to the 3731a/b cells. After growth factor withdrawal, proportions of DCX and GFAP-positive cells are increased for 3731a and 4371 cells, and to a lesser extent, for 3731b cells. These results were confirmed using qPCR (Figure 4f) and western blot (Figure 4g). Thus, growth factor withdrawal induces an increase of *PAK3* expression associated with neuronal differentiation in the progenitor-like cell lines whereas it induces an abnormal neuroglial differentiation in the stem-like cell line.

Retinoic acid-increased *PAK3* expression is associated with neuronal differentiation

Among therapeutic agents affecting cell differentiation, retinoic acid (RA) and bone morphogenetic proteins (BMP) are frequently used (Choschzick et al., 2014; Dougherty et al., 2012; Piccirillo et al., 2006). RA and BMP4 can induce neuronal and astroglial differentiation of various cell types including glioma cells (Ying et al., 2011, Piccirillo et al., 2006). To analyze their effects on PAK

expression, proliferation, and lineage differentiation, we compared BMP4-treated cells to cells cultured without growth factor, and RA-treated cells with DMSO-treated cells for RA. BMP4 or RA did not change cell proliferation as revealed by Ki67 staining (Figure 5a, and Supplementary Figure 5). BMP4 promoted *GFAP* expression (twofold for the 3731a cells to 100 for the 3731b cells) suggesting an astroglial differentiation, but not *PAK3* expression. However, BMP4 does not activate the transcription of some other glial markers such as *OLIG2*, *PDGFR α* , *NG2*, and *S100 β* in these two cell lines (Supplementary Figure S5). BMP4 treatment has only small effects on the 4371 stem-like cell line, modifying no significantly the expressions of *PAKs*, *GFAP*, *OLIG2*, *NG2*, and *S100 β* (Figure 5b, and Supplementary Figure 6). However BMP4 treatment induces a significant increase of *DCX* and β III-tubulin and *PDGFR α* expression, suggesting an atypical oligo-neuronal differentiation in these cells. In contrast, RA induces a neuronal differentiation as quantified by *DCX* expression, at least in the 3731a and 4173 cell lines. Moreover, RA slightly decreases oligodendroglial differentiation as shown by *OLIG2* and *PDGFR α* expression in the 4371 cells (Supplementary Figure S6). Surprisingly, RA induced a strong increase of *PAK1* expression in the three cell lines and a moderate or high increase of *PAK3* expression in the 3731a and 4371 cell lines, respectively. Thus, BMP4 induced an astroglial differentiation mainly in the progenitor-like cell lines independently of *PAK3* expression whereas RA induces a neuronal differentiation correlated with an increase of *PAK3* expression, mostly in the stem-like 4371 cell line.

DISCUSSION

The initial goal of this study was to clarify the role of a gene that possesses several key hallmarks that may play a role in cancer stem cell proliferation and differentiation and in normal neural stem cell biology, as often highlighting parallel between developmental program of NSC and cancer stem cell pathophysiology, and which was previously associated with the proneural signature in the GBM. We report here that the level of expression of the *PAK3* gene in tumors is positively correlated with better survival of the patients. The analysis of the databases of gliomas shows that this is also verified in the various subclasses of gliomas analyzed. Interestingly, the expression of *PAK1* is inversely correlated with patient survival. The expression of *PAK1* would favor the tumor growth of the gliomas, in accordance with its characterization as an oncogene (Kumar & Li, 2016). Indeed, *PAK1* is hyper-activated and / or over-expressed in several tumor types such as breast cancer, rectum and other tumor types (Wang et al., 2006, Arias-Romero et al., 2013; Shrestha et al., 2012). More generally, PAK kinases and especially *PAK1* are considered to play a pro-cancerous role in many cancers, by being over-expressed and over-activated in these tumors, and by activating directly or transcriptionally a lot of substrates involved in functions facilitating tumor progression (Kumar & Li, 2016). Our results strongly suggest that *PAK3* may inhibit tumor progression. Thus *PAK3* has a similar role in tumor progression than during embryonic development since its inactivation by morpholinos causes glial cell proliferation (Souopgui et al., 2002). Thus *PAK1* and *PAK3* have opposite roles in cancer progression.

Knowing that *PAK1* is an oncogene, can it be deduced that *PAK3* is a tumor suppressor gene? Tumor suppressor genes are genes whose loss-of-function mutations (deletion or point mutation) are responsible for tumor progression, in contrast to oncogenes whose activating mutations promote cancers. The analysis of the mutation databases shows some differences in mutation rates and variations in the number of gene copies between *PAK1* and *PAK3* in different types of cancer (CBioPortal) (Cerami et al., 2012) but does not allow to contrast them. However, *PAK1* is mainly involved in cancers by functional activations that may be due to transcriptional or post-translational processes, mechanisms not detected by genomic analysis. The transcriptomic analyzes we carried out

unequivocally highlight a strong correlation between *PAK3* and patient survival, suggesting that *PAK3* can function as a tumor suppressor gene, and thus should be considered as such.

Interestingly, high expression of *PAK3* is associated with the 1p/19q co-deletion in oligodendrogliomas. This brings several remarks. One of the molecular mechanisms that can explain this association is the fact that *NOTCH1* is often mutated in 1p/19q oligodendrogliomas and that *NOTCH1* is one of the negative regulators of *PAK3*, at least during embryonic development (Appin & Brat, 2015, Souopgui et al., 2002). Secondly, very recent data show that *PAK3* is one of the key genes for oligodendrocyte differentiation (Renkilaraj et al., 2017) and thus could play a role in the oligodendroglial differentiation of 1p/19q glioma cells.

PAK3 has been shown to be one of the proneural signature genes in glioblastomas (Verhaak 2010). We observed that the level of *PAK3* expression in tumors is correlated with that of other genes identified in the proneural signature such as *NKX2.2*, *DCX*, *ASCL1*, *OLIG2* and *SOX2*, confirming that the expression of genes of the proneural signature are of good prognosis for glioma, as it was shown for glioblastomas (Verhaak et al., 2010). In contrast, all genes of mesenchymal and classical signatures show a positive correlation between higher expression and lower survival. Analyzes of the Kaplan-Meier curves showed that the expression level of *PAK3* is positively correlated with survival and suggest that the analysis of *PAK3* expression could refine current histoprognostic classification of gliomas.

In this study, we compared several cell lines from GBM, capable of forming spheres. The cell lines are opposed by many characteristics and in particular the level of expression of *PAK3*. The 3731a line which expresses the least *PAK3*, grows fast, possesses the classical/mesenchymal transcriptomic signature also characterized as a stem-cell phenotype, and form tumors after subcutaneous grafts of the cells. Following the withdrawal of growth factors or after treatment with RA, this line is oriented towards an immature neuronal differentiation associated with an increase in *PAK3* expression, whereas BMP4 induces glial differentiation. The derived 3731b cell clone has more proliferative rate, and forms tumor more efficiently, having acquired more mesenchymal phenotype during cell culture passages. This cell line is very sensitive to an astroglial differentiation upon BMP4 treatment. Conversely, the other line (4371) relatively expresses a higher level of *PAK3*, grows more slowly, expresses more neuroglial differentiation markers, expresses a transcriptomic profile characteristic of the proneural subtype and does not form xenografted tumors. Moreover, the withdrawal of growth factors induces only a small increase in neuroglial differentiation whereas treatment with RA induces a strong increase in the expression of glial markers such as *GFAP* and of neuronal markers such as *DCX* as well as of *PAK3* gene. These results are in agreement with the phenotypic characterization of GBM cells into two classes of stem cells and progenitor cells (Cusulin et al., 2015) and their pseudo-aberrant differentiations upon differentiating procedures (Balasubramanian et al., 2015). Nevertheless, increasing expression of *PAK3* accompanies differentiation in all these cell lines. This strongly suggests that *PAK3* is an effector of the neuronal and oligodendroglial differentiation of GBM cells as it does during embryonic development and during brain ontogenesis (Souopgui et al., 2002; Dai et al., 2014 Renkilaraj et al., 2017). However, demonstration of this function in glioma cells remains to be done.

The next question is how *PAK3* could have opposite roles to those of *PAK1* in the biology of gliomas. A first possibility would be that *PAK3* has its own substrates. Currently, most identified substrates involved in cancer have been identified for *PAK1* kinase but not validated for other kinases of group I (Kumar et al., 2006, Kumar & Li, 2016). In fact, no specific substrate of *PAK3* is known, except for a subunit of the glutamate receptor (Hussain et al., 2015). One of the hypotheses would be that *PAK3* possesses one or more substrates that are not phosphorylated by *PAK1* and that are involved in the regulation of cell division or neuronal differentiation. Another hypothesis would be that *PAK3*

belongs to a signaling pathway that would be involved in such a negative regulation of tumor growth. We have previously shown that the *PAK3* signaling differs from that of *PAK1* at several points, *PAK3* being preferentially activated by the Rho GTPase Cdc42 and preferentially binding to the Nck2/Grb4 adapter (Kreis et al., 2007, Thévenot et al. 2011). These pathways, however, have many functions in the differentiation and cancerization processes, but their roles in the biology of gliomas are still poorly understood. *PAK3* could also act on cell proliferation by inhibiting *PAK1*. Indeed, the PAK kinases form dimers that allow their trans-inhibition (Lei et al., 2000; Parrini et al., 2002). However, we have previously shown that *PAK3* prefers to form heterodimers with *PAK1* rather than homodimers, leading to the inhibition of the activity of the *PAK1* kinase (Combeau et al., 2012). Thus, a transcriptional increase of *PAK3* in gliomas could lead to a decrease in *PAK1* activity.

One of the consequences of our results concerns therapeutic approaches. They stress the need to analyze in the different tumor types the expressions and activations of oncogenic PAK kinases such as *PAK1* or *PAK2*, but also to analyze that of *PAK3*. Indeed, the use of non-selective inhibitors of oncogenic kinases could have deleterious effects by inhibiting a tumor suppressor gene. And to date, there are no specific inhibitors of oncogenic PAK that do not inhibit *PAK3* (Crawford et al., 2012). However, our data suggest that differential therapies can be developed depending on the levels of *PAK3* expression, tumors with low *PAK3* levels may be the focus of a forced differentiation strategy, whereas therapeutic targets in those with high level of expression of *PAK3* should be, on the contrary, proteins involved in cell proliferation. Differentiation strategies have already been considered for glioblastomas (Guichet et al., 2013, Balasubramaniyan et al., 2015). The increase in *PAK3* expression may be a target in poorly differentiated tumors since the expression of this gene is positively regulated by neurogenin (Piccand et al., 2013). To conclude, our results strongly suggest that *PAK3* may be considered as a tumor suppressor gene in high grade gliomas and probably in other neural tumors and may be also a new therapeutic target to force cells to differentiate in post-mitotic cells.

Materials and methods

GBM cell culture

Primary sphere cultures were initially derived from patient tumors as described (Bikeye SN et al., 2010). Glioblastoma-derived spheres were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with penicillin/streptomycin and B27 (Life Technologies), named basal medium (BM), supplemented with EGF (20 ng/ml; Peprotech) and FGF (20 ng/ml; Miltenyi), referred to as proliferation medium (PM). Spheres were dissociated using StemPro Accutase (Life technologies) when they reached a size of 100-200 μm . For cell growth analysis, dissociated cells were seeded at 5×10^4 cells/ml in triplicates, and on day 1, 4, and 7, lived cells from dissociated spheres were counted. Viability was tested by Trypan blue exclusion. For sphere size analysis, cells were seeded at 1.25×10^5 cells/ml in triplicates. On day 7, micrographs were taken and the diameter of each sphere larger than 30 μm was measured using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). For the sphere forming assay, 2×10^3 cells/ml were plated in triplicates and the number of spheres larger than 40 μm was determined after 7 days of culture using computer-assisted image analysis. For differentiation experiments, single-cell suspensions were plated on laminin substrate (10 $\mu\text{g/ml}$; Life technologies) in the PM, as described previously (Pollard 2009). Twenty-four hours later, the medium was replaced with BM containing 0.5% fetal calf serum. Bone Morphological Protein-4 (BMP-4, 10 ng/ml, Peprotech) or all-*trans*-retinoic acid (RA, 10 μM , Sigma) was added to BM in order to induce differentiation.

Quantitative real-time-PCR analysis

Total RNA was isolated from cells using the TRIzol Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol RNA analysis was performed using the Bio-Rad's Experion system, and cDNA was generated from 0.5 μg mRNA using the iScript Reverse Transcription Supermix (Biorad). Using the SsoAdvanced Universal SYBRGreen Supermix (Biorad), real-time PCR was performed on the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad). Primers were designed by retrieving nucleotide sequences from

NCBI gene database and using the Primer3Plus program (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Gene-specific primers were synthesized by Eurofins Genomics and their sequences are listed in Supplementary Materials. Samples were amplified in triplicates and relative copy number was determined using the comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method, with *PPIA* and *GAPDH* as normalization genes, and a human embryonic brain mRNA sample as exogenous reference (Clinisciences).

Western blotting

For Western blot analysis, protein samples (10 μg) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore), as previously described (Combeau et al., 2012). Immunoblot analyses were performed using antibodies described in Supplementary Materials. Immunodetection was performed using the Luminata Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore). Quantification of chemiluminescence signals was performed using the NIH ImageJ software.

Immunocytochemistry

GBM cells were PFA-fixed and immunolabeled for native proteins using antibodies described in Supplementary Materials. Images were acquired in a sequential mode, using suitable filter cubes on the Leica DMI6000 microscope controlled by the SimplePCI Software (Compix-Hamamatsu).

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicates and repeated independently at least three times in each cellular and molecular assays. Whenever relevant, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney Wilcoxon tests were performed using the R software. Differences were considered significant at values of $*p<0.05$; $**p<0.01$, and $***p<0.001$.

Overall survival was defined as the time between histological diagnosis and death or the last follow-up. Patients who were still alive at the last follow-up were considered as a censored event in the analysis. Survival curves were obtained according to the Kaplan-Meier method and differences between curves were assessed using the log-rank test. For continuous variables, the groups were defined as $>$ or $<$ to the median value. Cox model was used to assess the effect of continuous variable on overall survival and to perform multivariate analysis. All the tests were performed with the R software using survival package.

Animal experimentation

All experiments were conducted under appropriate biological containment in accordance with European Communities Council Directive for animal care and experimentation (Directive 2010/63/UE), and were conducted following the guidelines of the animal facility in Orsay (France) approved by the Ethical Committee (France, CEEA 59) and the Direction of veterinary services (France, agreement D91-471-104). 1×10^6 dissociated GBM cells were injected into the subcutaneous tissue of the left flank of 8-weeks-old Nude female mice. The tumor growth was monitored regularly and measured twice a week using a caliper as soon as tumors reach 25 mm^3 .

Tumor database analysis

Gene expression analyses from tumors were performed from the Academic Medical Center (AMC) database, using the R2: Genomics analysis and visualization platform (<http://r2.amc.nl> <http://r2platform.com>, <http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) and across different tumor datasets for each analyzed gene. The Kaplan-Meier survival curves of gliomas patients were derived from the following dataset: Tumor Glioma - French - 284 - MAS5.0 - u133p2, composed of 276 glioma samples of all histologies and 8 control samples (Gravendeed et al., 2009). Samples were sorted according to the expression of *PAK* and divided into two groups on the basis of a cutoff expression value giving the higher probability of confidence.

References

- Appin CL, Brat DJ. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. *Mol Aspects Med* 2015; **45**: 87–96.
- Arias-Romero LE, Villamar-Cruz O, Huang M, Hoeflich KP, Chernoff J. Pak1 kinase links ErbB2 to β -catenin in transformation of breast epithelial cells. *Cancer Res* 2013; **73**: 3671–82.
- Balasubramaniyan V, Vaillant B, Wang S, Butalid ME, Sai K, Mukheef F et al. Aberrant mesenchymal differentiation of glioma stem-like cells : implications for therapeutic targeting. 2015; 1–11.
- Bayin NS, Modrek AS, Placantonakis DG. Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 230–238.
- Bikeye S-NN, Colin C, Marie Y, Vampouille R, Ravassard P, Rousseau A *et al.* ASPM-associated stem cell proliferation is involved in malignant progression of gliomas and constitutes an attractive therapeutic target. *Cancer Cell Int* 2010; **10**: 1.
- Binder ZA, Wilson KM, Salmasi V, Orr BA, Eberhart CG, Siu IM *et al.* Establishment and biological characterization of a panel of glioblastoma multiforme (GBM) and GBM variant oncosphere cell lines. *PLoS One* 2016; **11**: 1–18.
- Bokoch GM. Biology of the p21-Activated Kinases. *Annu Rev Biochem.* 2003; **27**: 27.
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012; **2**: 401–404.
- Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* 2012; **149**: 36–47.
- Choschzick I, Hirsland E, Cramer H, Schultz S, Leppert J, Tronnier V *et al.* Responsiveness of stem-like human glioma cells to all-trans retinoic acid and requirement of retinoic acid receptor isotypes α , β and γ . *Neuroscience* 2014; **279**: 44–64.
- Cobos I, Borello U, Rubenstein JLR. Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 2007; **54**: 873–88.
- Combeau G, Kreis P, Domenichini F, Amar M, Fossier P, Rousseau V et al. The p21-activated kinase PAK3 forms heterodimers with PAK1 in brain implementing trans-regulation of PAK3 activity. *J Biol Chem* 2012; **287**: 30084–96.
- Crawford JJ, Hoeflich KP, Rudolph J. A patent review. 2012; 293–310
- 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.
- Dai X, Iwasaki H, Watanabe M, Okabe S. Dlx1 transcription factor regulates dendritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression. *Eur J Neurosci* 2014; **39**: 531–47.
- Dougherty JD, Fomchenko EI, Akuffo A a, Schmidt E, Helmy KY, Bazzoli E *et al.* Candidate pathways for promoting differentiation or quiescence of oligodendrocyte progenitor-like cells in glioma. *Cancer Res* 2012; **72**: 4856–68.
- Ducray F, Idbaih A, de Reyniès A, Bièche I, Thillet J, Mokhtari K *et al.* Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer* 2008; **7**: 41.
- Gravendeel LAM, Kouwenhoven MCM, Gevaert O, De Rooi JJ, Stubbs AP, Duijm JE *et al.* Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res* 2009; **69**: 9065–9072.
- Guichet P-O, Bieche I, Teigell M, Serguera C, Rothhut B, Rigau V *et al.* Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia* 2013; **61**: 225–39.
- Hide T, Takezaki T, Nakatani Y, Nakamura H, Kuratsu J, Kondo T. Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. *Cancer Res.* 2009; **69**:7953–7959.
- Hong X, Chedid K, Kalkanis SN. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. *Int J Oncol* 2012; **41**: 1693–700.
- Hussain NK, Thomas GM, Luo J, Haganir RL. Regulation of AMPA receptor subunit GluA1 surface expression by PAK3 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* 2015; 2015, **43**: E5883.
- Kreis P, Thévenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, Barnier J.-V. The p21-Activated Kinase 3 Implicated in Mental Retardation Regulates Spine Morphogenesis through a Cdc42-Dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 2007; **282**, 21497-21506.

- Kreis P, Rousseau V, Thévenot E, Combeau G, Barnier J.-V. The mammalian PAK3 gene encodes four splice variants with distinct biological properties. *J. Neurochem.* 2008; **106** :1184-1197.
- Kreis P, Barnier J.-V. PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal* 2009; **21**: 384–93.
- Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ. p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 459–471.
- Kumar R, Li DQ. PAKs in Human Cancer Progression. From Inception to Cancer Therapeutic to Future Oncobiology. *Adv Cancer Res* 2016; **130**: 137–209.
- Lamour V, Henry A, Kroonen J, Nokin MJ, Von Marschall Z, Fisher LW *et al.* Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo. *Int J Cancer* 2015; **137**: 1047–1057.
- 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.
- Lei M, Lu W, Meng W, Parrini MC, Eck MJ, Mayer BJ *et al.* Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 2000; **102**: 387–97.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A Von, Figarella D, Webster B *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. *Acta Neuropathol* 2016; **131**: 803–820.
- Parrini MC, Lei M, Harrison SC, Mayer BJ. Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* 2002; **9**: 73–83.
- 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.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; **9**: 157–73.
- Piccand J, Meunier A, Merle C, Jia Z, Barnier JV, Gradwohl G. Pak3 prevents proliferation and promotes differentiation of endocrine cells in the embryonic pancreas and is necessary to maintain glucose homeostasis in adult mice. *Diabetes*, 2014, **63**:203-15.
- Piccirillo SGM, Reynolds B a, 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.
- Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R *et al.* Resource Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Stem Cell* 2009; **4**: 568–580.
- Radu M, Semenova G, Kosoff R, Chernoff J. PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 13–25.
- Renkilaraj MRLM, Baudouin L, Wells C, Doulazmi M, Wehrlé R, Cannaya V *et al.* The intellectual disability protein PAK3 regulates oligodendrocyte precursor cell differentiation. *Neurobiol Dis* 2017; **98**: 137–148.
- Shrestha Y, Schafer EJ, Boehm JS, Thomas SR, He F, Du J *et al.* PAK1 is a breast cancer oncogene that coordinately activates MAPK and MET signaling. *Oncogene* 2012; **31**: 3397–408.
- Souopgui J, Sölter M, Pieler T. XPak3 promotes cell cycle withdrawal during primary neurogenesis in *Xenopus laevis*. *EMBO J* 2002; **21**: 6429–39.
- TCGA. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015; **372**: 2481–2498.
- Thévenot E, Moreau AW, Rousseau V, Combeau G, Domenichini F, Jacquet C *et al.* p21-Activated kinase 3 (PAK3) protein regulates synaptic transmission through its interaction with the Nck2/Grb4 protein adaptor. *J Biol Chem* 2011; **286**: 40044–59.
- Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized. *Cancer Cell* 2010; **17**: 98–110.
- Verhaak RGW. Moving the needle : Optimizing classification for glioma. 2016; **8**: 8–11.
- Wang R, Zhang H, Balasenthil S, Medina D, Kumar R. PAK1 hyperactivation is sufficient for mammary gland tumor formation. *Oncogene* 2006; **25**: 2931–2936.
- Westphal M, Lamszus K. The neurobiology of gliomas : from cell biology to the development of therapeutic approaches. 2011; **12**: 495–508.
- Ying M, Wang S, Sang Y, Sun P, Lal B, Goodwin CR *et al.* Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. *Oncogene* 2011; **30**: 3454–67.

Figure legends

Figure 1. *PAKs* expression and patient survival in gliomas.

(a-b) *PAK1* is expressed in all types of tumors whereas *PAK3* is highly expressed in gliomas and neuroblastomas. Box plots show log₂ gene expression in tumors by Affymetrix microarray (with u133p2 probes), Academic Medical Center database (AMC). The data are from the following cohorts: normal brain (NB, Berchtold, n = 172) ; glioma (Gl, French, n = 284) ; neuroblastoma (Ne, Versteeg, n = 88) ; bladder (Bl, Riester, n = 93) ; colon (Co, Sieber Smith, n = 355) ; lung (Lu, Expo, n = 114); breast (Br, Bos, n = 204); kidney (Ki, Expo, n = 261).

(c-d) Contrary to *PAK1*, high *PAK3* expression in gliomas is correlated with longer patient survival. Kaplan-Meier survival plot splitted according to *PAK1* **(c)** or *PAK3* **(d)** expression (blue line: high expression; red line: low expression), AMC French database. For *PAK1*, high expression n = 185, low expression n = 88, p = 2.1 e⁻⁰⁷; for *PAK3*, high expression n = 186, low expression n = 87, p = 5.7e⁻¹⁰.

Figure 2. Expression of *PAK3* is high in grade II/III oligodendrogliomas, and in the 1p/19q codeleted gliomas.

(a,b) *PAK1* and *PAK3* gene expression were analyzed by quantitative RT-PCR in gliomas. *PAK1* and *PAK3* mRNA expressions are presented as $\Delta\Delta Cq$, related to the epileptic samples as control (Ct), in the various histological classes (A: astrocytoma; O: oligodendroglioma; OA: oligoastrocytoma; GB: glioblastoma; GBO: glioblastoma-oligodendroglioma) and according to the tumor grade; n = 135 samples.

(c,d) *PAK1* and *PAK3* mRNA expressions are presented according to 1p/19q co-deletion and to the grade.

(e,f) *PAK1* and *PAK3* mRNA expressions are presented according to 1p/19q co-deletion and IDH mutations; n = 259 samples.

Figure 3. *PAK3* is highly expressed in a non-tumorigenic GBM cell line with a low proliferating rate and a proneural transcriptomic signature.

Cellular and molecular description of three GBM cell lines growing in suspension.

(a) Representative images showing GBM spheres grown for 7 days.

(b) qPCR analysis of *PAK* genes, expressed relatively to human fetal brain.

(c) Percentage of sphere-forming cells.

(d) Growth rate of the three cell lines

(e) Sphere diameter of the three GBM were analyzed.

(f) qPCR analysis of representative genes of each signature, expressed relatively to human fetal brain.

(g) Heatmap representation of expression differences between GBM cells relative to the mean. Genes are organized according to gene expression signatures: Mesenchymal (MES), Classical (CL), Proneural (PN) and Neural (NL). Data representative of three independent experiments, for experiments presented in Figures a to g.

(h) Tumor growth of mice subcutaneously injected with the three GBM cell line. Mean curves by LOESS method, n>9.

(i) Survival curves of injected mice. n= 10 for the 3731a cell line and n=9 for the three other cell lines.

Figure 4. Growth factor withdrawal increased *PAK3* expression, cell cycle exit and cell differentiation.

Cells were grown as monolayer in proliferative medium (PM) (t0) or without growth factor in 0.5% FCS for 3 (t3) or 8 (t8) days.

(a) Western blot analysis of *PAK3* protein on cell lysates and quantification of expression level normalized to actin and relative to 3731a cells.

(b) qPCR analysis of *PAK* genes during the differentiation time course, expressed relatively to normal human fetal brain (4 independent experiments).

(c) Representative images of Ki67 immunostaining of GBM cells (scale bar = 100 μ m), and quantification of Ki67⁺ cells relative to DAPI staining (n=3).

(d) qPCR analysis of cell cycle genes relative to normal human fetal brain (d). (4 independent experiments).

(e) Expression of differentiation markers was assessed by immunostaining (scale bar = 100 μ m)

(f) Gene expression analyzed by qPCR (4 independent experiments).

(g) Protein expression analyzed by western blot.

Figure 5. Differentiation induced by retinoic acid and BMP4.

(a) Cells were grown in monolayer culture in the presence of EGF + FGF (t0) or without growth factor, in the absence of serum (0%), with BMP4, DMSO or retinoic acid (RA) for 3 (t3) or 8 (t8) days. Cell proliferation was assessed by Ki67 immunostaining (n=3)

(b) qPCR analysis of gene expression, expressed relative to t0 value of each cell line (n=3).

Supplemental Information

Supplementary Material

*Antibodies:

Primary antibodies:				
			IF	WB
ACTIN	sc-69879	Santa Cruz		1/1000
DCX	AB2253	Millipore	1/4000	1/4000
GFAP	Z0334	Dako	1/2000	1/2500
Ki-67	Ab16667	Abcam	1/200	
NESTIN	MAB5326	Millipore	1/200	
OLIG2	AB9610	Millipore	1/500	
PAK3	sc-1871	Santa Cruz		1/1000
SOX2	sc-17320	Santa Cruz	1/200	
Secondary antibodies:				
Goat anti-mouse-A1488	A21121	MolProbe	1/1000	
Rabbit anti-goat-A1568	A11079	MolProbe	1/500	
Goat anti-rabbit-FITC	F2765	MolProbe	1/1000	
Goat anti-guinea pig-A1488	A11073	MolProbe	1/500	
Goat anti-lapin-A1568	A11036	MolProbe	1/1000	
Anti-goat-HRP	A5420	Sigma		1/10000
Anti-guinea pig-HRP	A5545	Sigma		1/5000
Anti-lapin-HRP	75011	Biorad		1/10000
Anti-mouse-HRP	1721011	Biorad		1/5000

* qPCR primers :

	Forward	Reverse
ACTIN	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
ASCL1	CCCAACTACTCCAACGACTTG	TTGGTGAAGTCGAGAAGCTC
CCND1	CGTGGCCTCTAAGATGAAGG	AGCTTGTTCCACCAGGAGCAG
CDC42	TTGATACTGCAGGGCAAGAG	CAGGCACCCACTTTTCTTTC
DCX	GCAGTCTCCCATCTCTACGC	ATGGAATCACCAAGCGAGTC
EGFR	TAACAAGCTCACGCAGTTGG	AAATTCCTCAAGGACCACCTC
GAPDH	ATCCCATCACCATCTTCCAG	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC
GFAP	GCTTCCTGGAACAGCAAAAC	CATCCTGGAGCTTCTGCCTCA
MAP2	CCAATGGATTCCCATAACAGG	CTGCTACAGCCTCAGCAGTG
NES	TCCAGGAACGGAAAATCAAG	GCCTCCTCATCCCCTACTTC
NG2	CTGTCTTCCCAGTGACCAT	GGAGCCTGAACCACCTCATA
NKX2.2	TCGCTGACCAACACAAAGAC	TTCTCTTCCCTCCGGACCTTC
OCT4	GAAGGATGTGGTCCGAGTGT	GTGAAGTGAGGGCTCCCATA
OLIG2	TGCGTCTCAAGATCAACAGC	CACCAGTCGCTTCATCTCCT
P27	CCGGCTAACTCTGAGGACAC	TGCAGGTCGCTTCCTTATTC
PAK1	CAACTCCTGATGCCCTCTTC	TTGAGGAGTGCTAGATCAGGAA
PAK3	TGGTGGCTCTCTGACTGATG	GAGTGCAGGAAATCCAAAGC
PDGFRA	GAAGCTGTCAACCTGCATGA	CTTCCTTAGCACGGATCAGC

PPIA	GGACCCAACACAAATGGTTC	GGCCTCCACAATATTCATGC
RHOG	CCGTGTTTCGACAATTACAGC	ACGAAAACGTTGGTCTGAGG
RND1	TCATTGGCTGCAAGACAGAC	TTGCACAACCCTGCTCATAG
RUNX2	CTTCACAAATCCTCCCAAG	ATGCGCCCTAAATCACTGAG
SGK3	GGAAATCCTCATGCCAAACC	GAAGAACCTTGCCAAAGCTG
SOX2	AACCAGCGCATGGACAGTTA	CGAGCTGGTCATGGAGTTGT
SOX9	TTCTGAACGAGAGCGAGAAG	GCGGCTGGTACTTGTAAATCC
S100beta	ATTCTGGAAGGGAGGGAGAC	CGTGGCAGGCAGTAGTAACC
β TUB	AGTGTGAAAACCTGCGACTGC	ATACTCCTCACGCACCTTGC

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure S1. Gene expression in tumors analyzed by Affymetrix microarray, Academic Medical Center database (AMC). The data are from the following cohorts: normal brain (NB, Berchtold, n = 172); normal muscle (Mu, Skov, n = 29); glioma (Gl, French, n = 284); neuroblastoma (Ne, Versteeg, n = 88); bladder (Bl, Riester, n = 93); colon (Co, Sieber Smith, n = 355); lung (Lu, Expo, n = 114); breast (Br, Bos, n = 204); kidney (Ki, Expo, n=261). The following genes were analyzed: *GFAP*, *OLIG2*, *S100 β* , *DCX*, *CAMKII*, and *Calbindin (CALB)*.

Supplementary Figure S2. *PAK1* and *PAK3* gene expression were analyzed by quantitative RT-PCR from RNA purified from primary tumors of patient's cohort Pitié-Salpêtrière Hospital. *PAK1* (a) and *PAK3* (b) mRNA expressions are presented as $\Delta\Delta Cq$ relative to the epileptic samples, and according to the tumor grade (n = 135).

Supplementary Figure S3. Kaplan-Meier survival plot splitted according to *PAK1* (left panels) or *PAK3* (right panels) expression, according to genomic criterias (blue line: high expression; red line: low expression). Glioma, AMC French database, n = 284.

Supplementary Figure S4. Tumor cells within spheres expressed markers of stemness and markers of all the three neural lineages. Immunostaining of GBM spheres. Upper panels show staining for NESTIN and SOX2, lower panels show staining for DCX, GFAP, and OLIG2 (scale bar = 50 μ m).

Supplementary Figure S5. Cell cycle exit upon BMP4 and RA treatment. Cell cycle exit was analyzed by Ki67 immunolabeling, after 0 (t0), 3 days (t3) or 8 days (t8) of treatment with 0% SVF as control or BMP4; and with DMSO as control or RA.

Supplementary Figure S6. Gene expression upon BMP4 and RA treatment. Gene expression measured by Q-PCR to analyze neural differentiation.

Figure 1

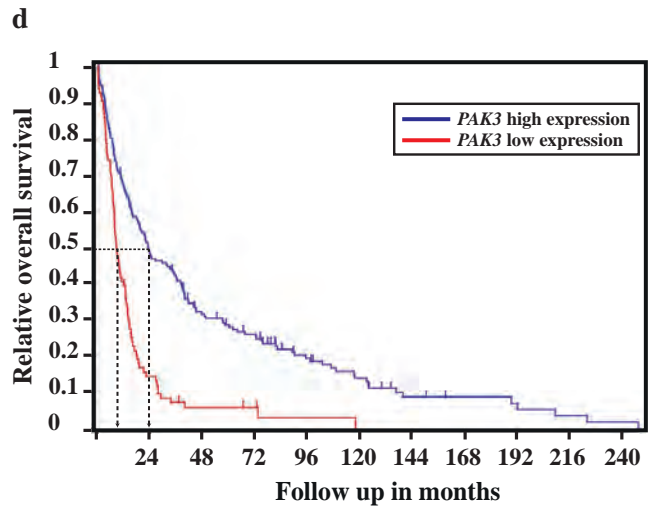
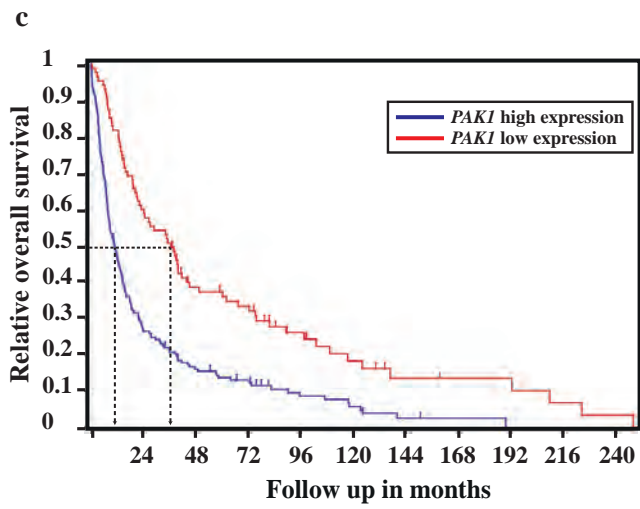
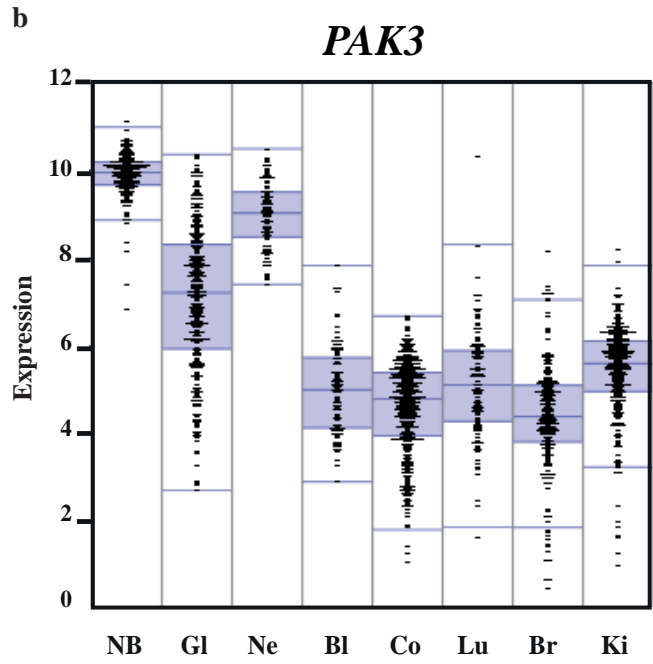
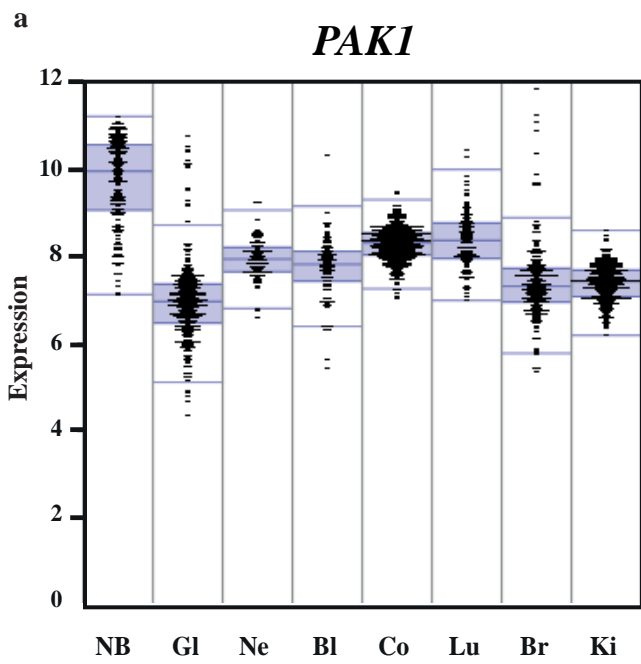


Figure 2

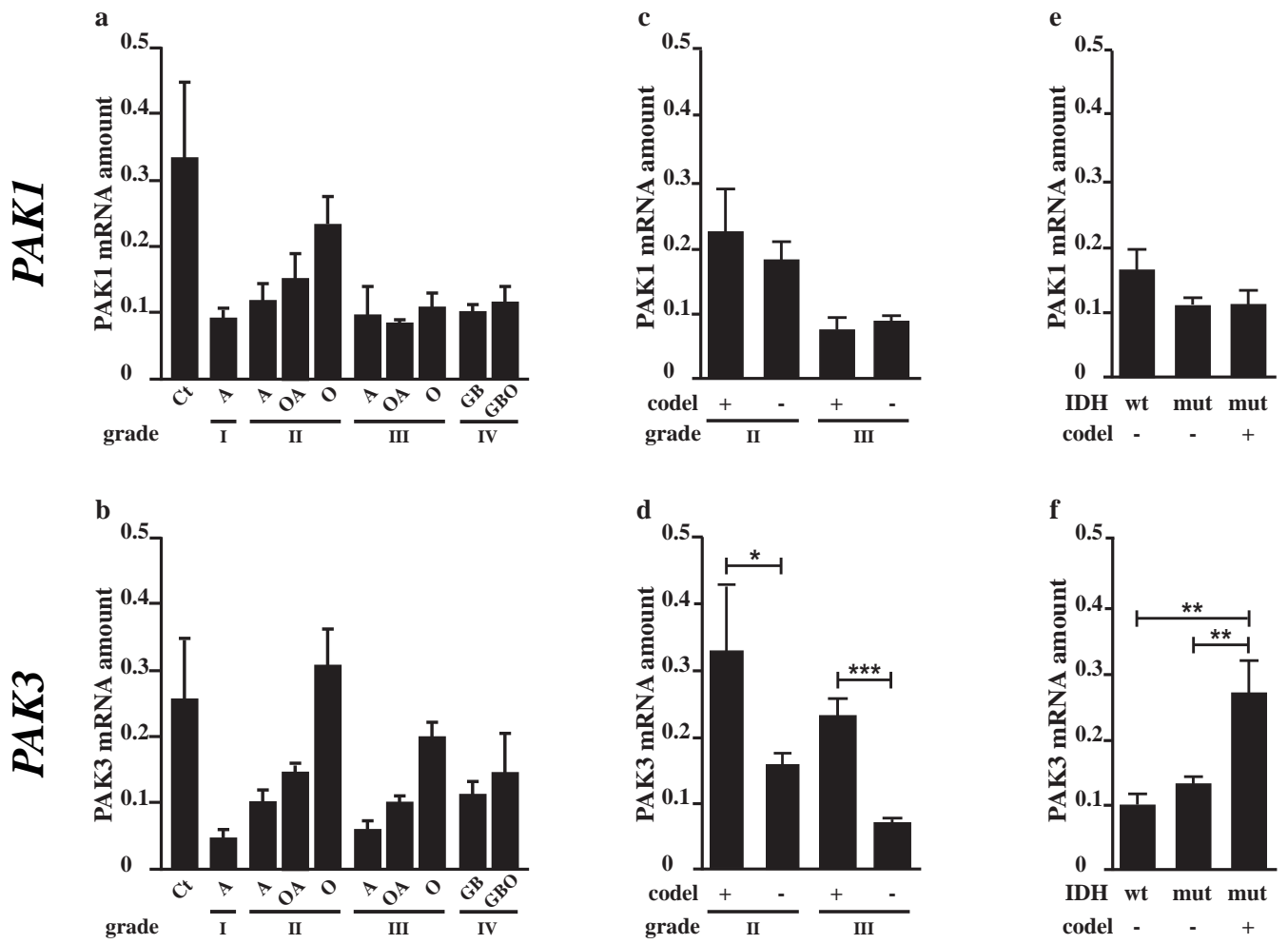


Figure 3

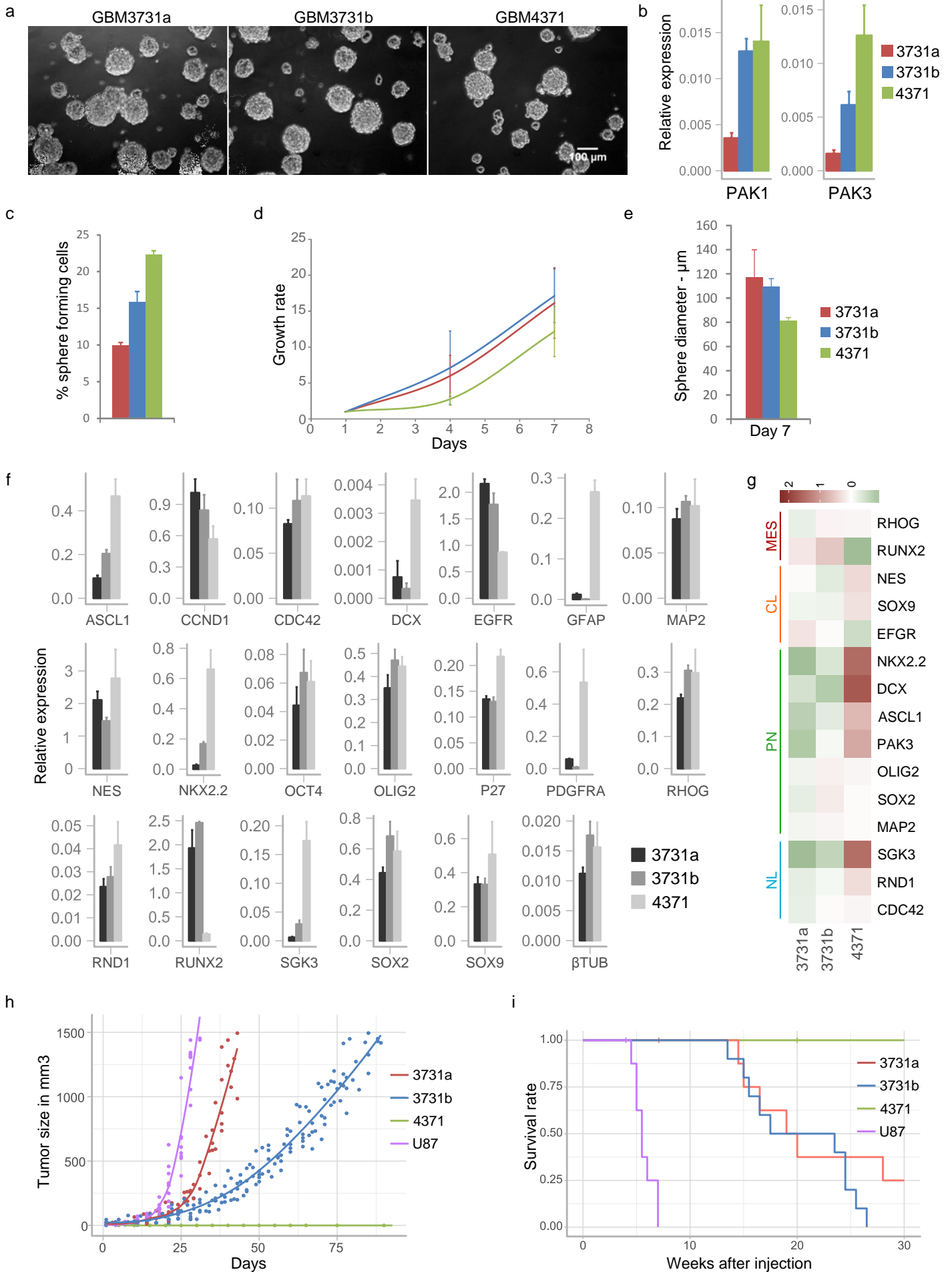
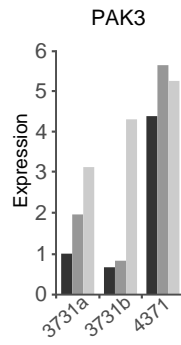
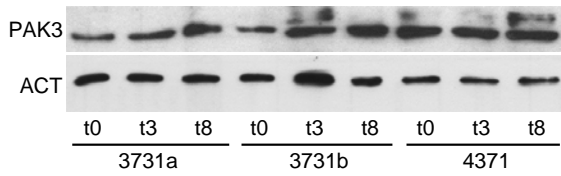
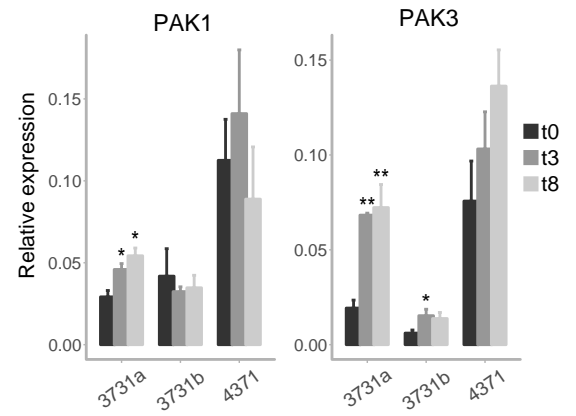


Figure 4

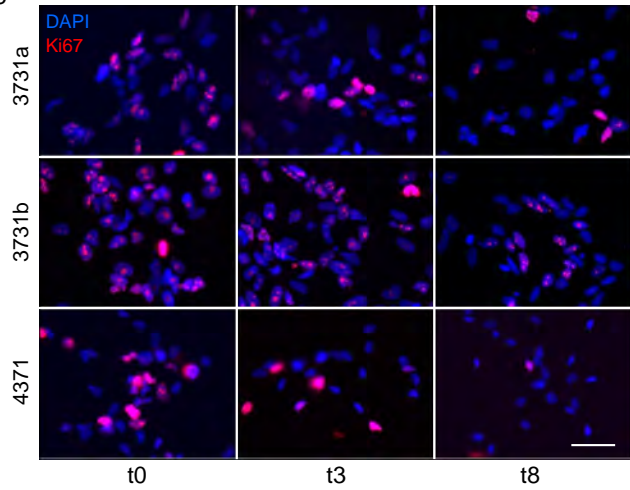
a



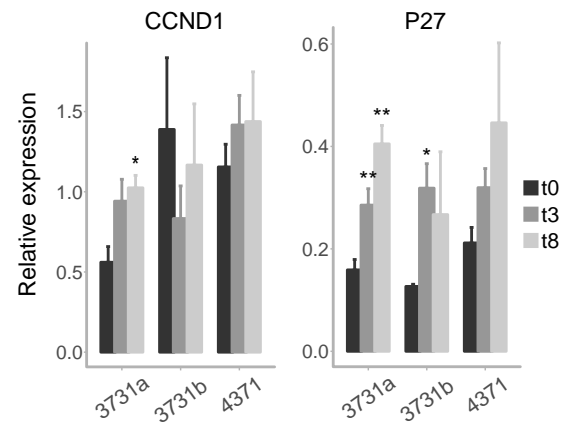
b



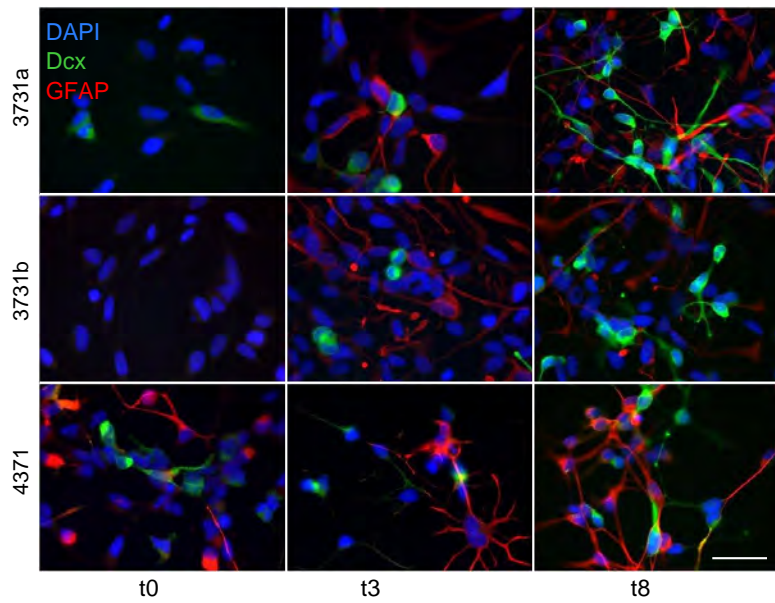
c



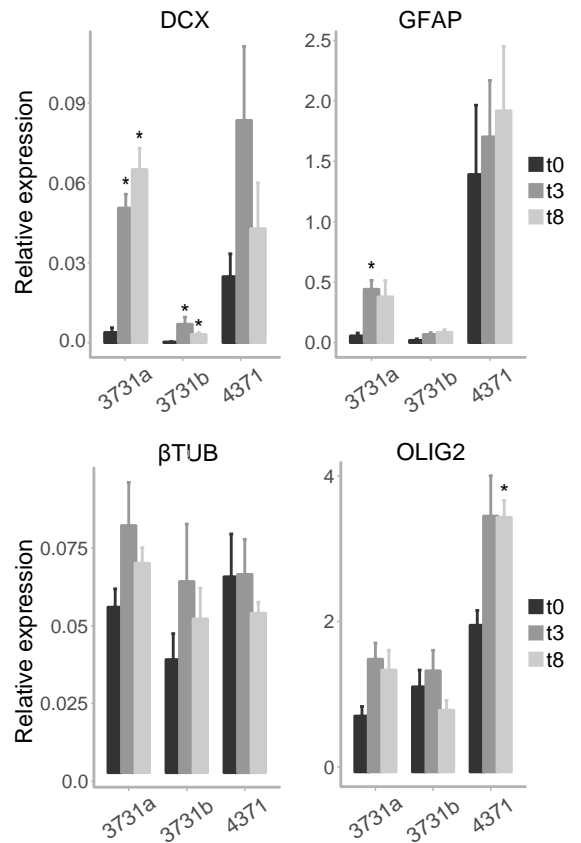
d



e



f



g

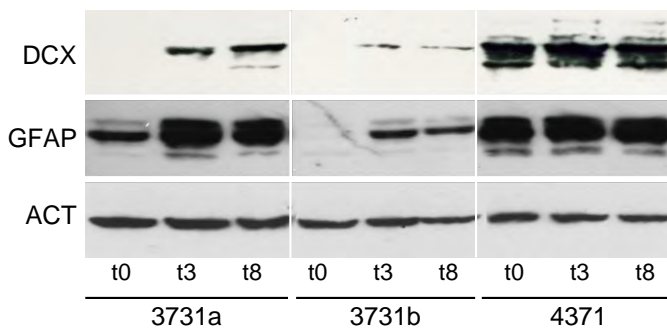
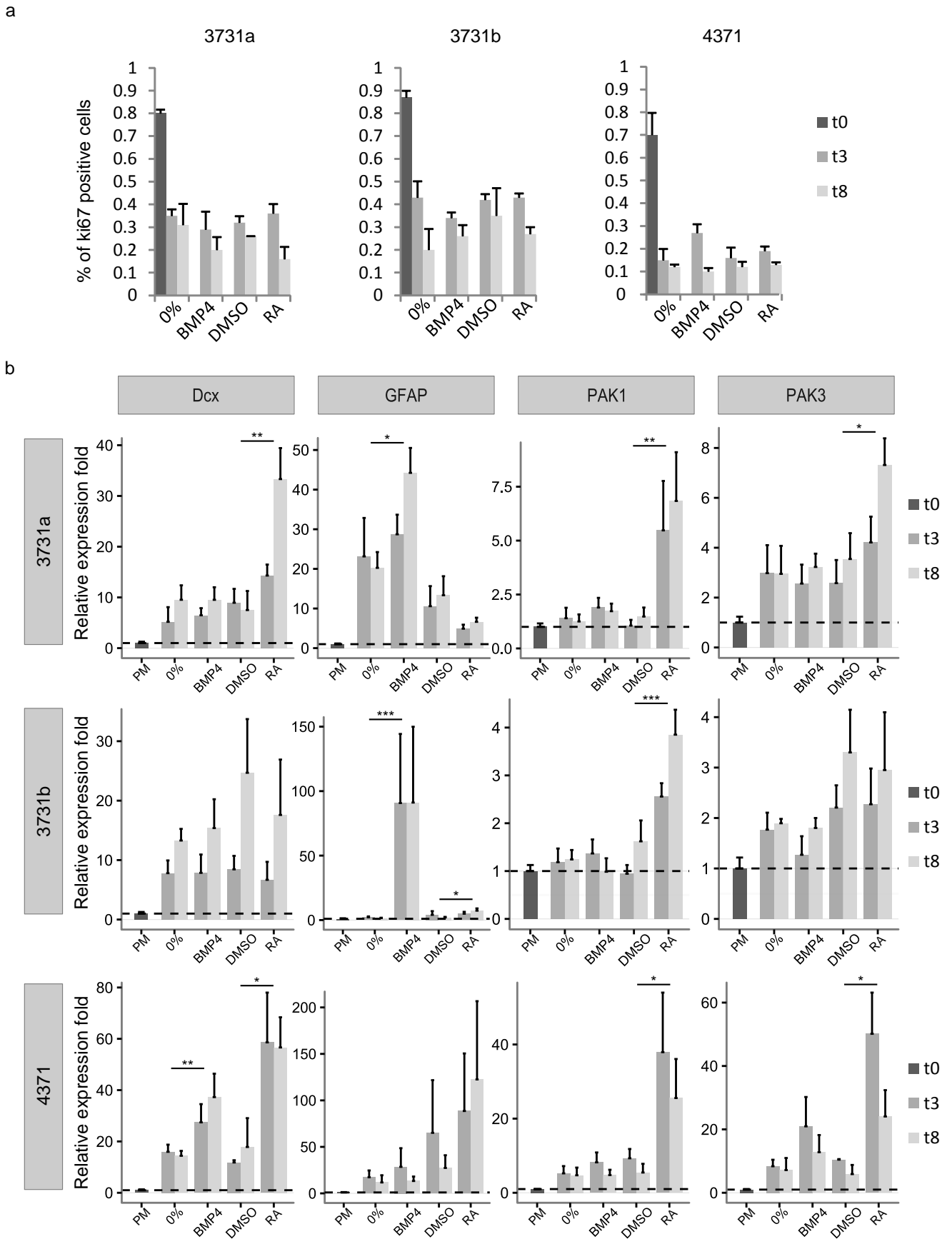
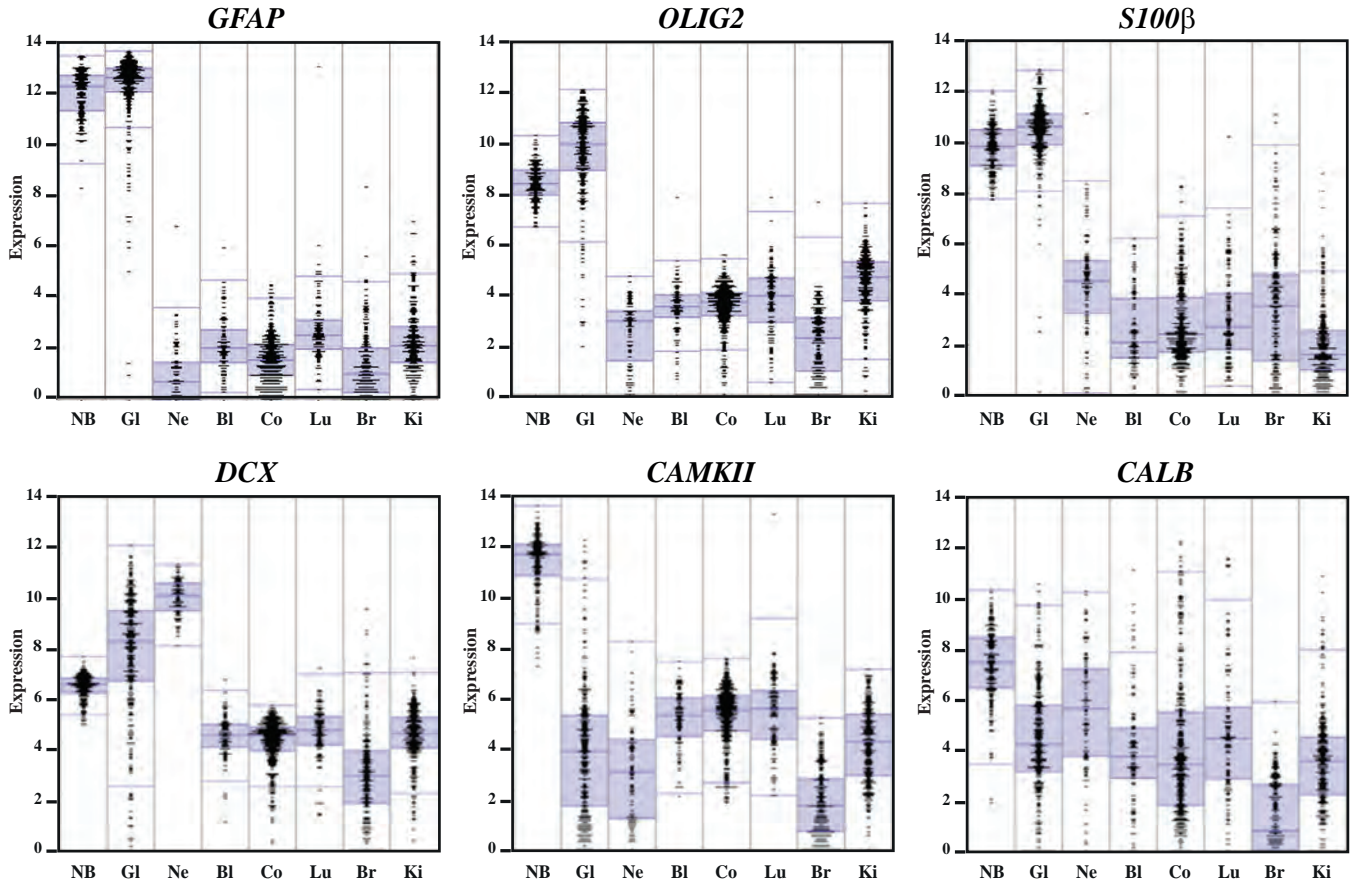


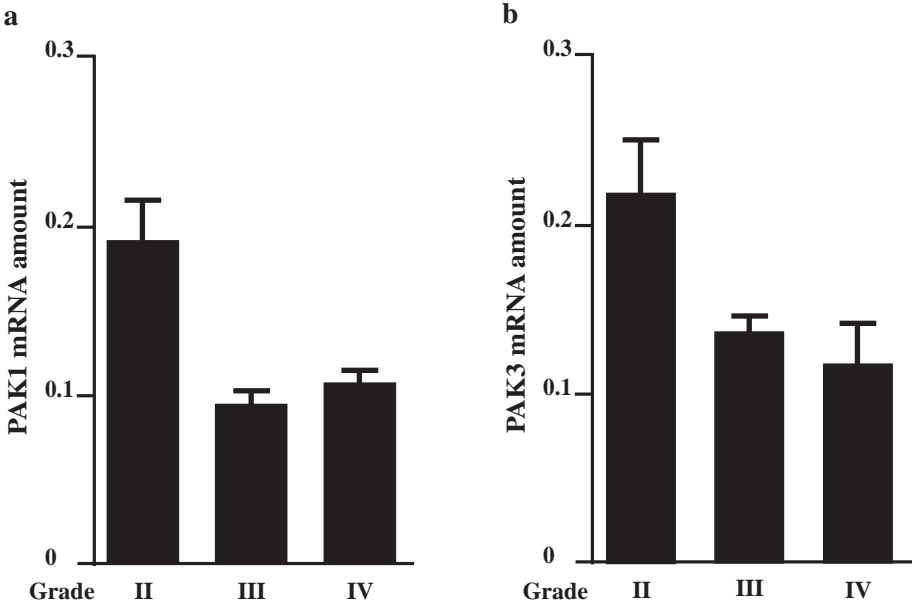
Figure 5



Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



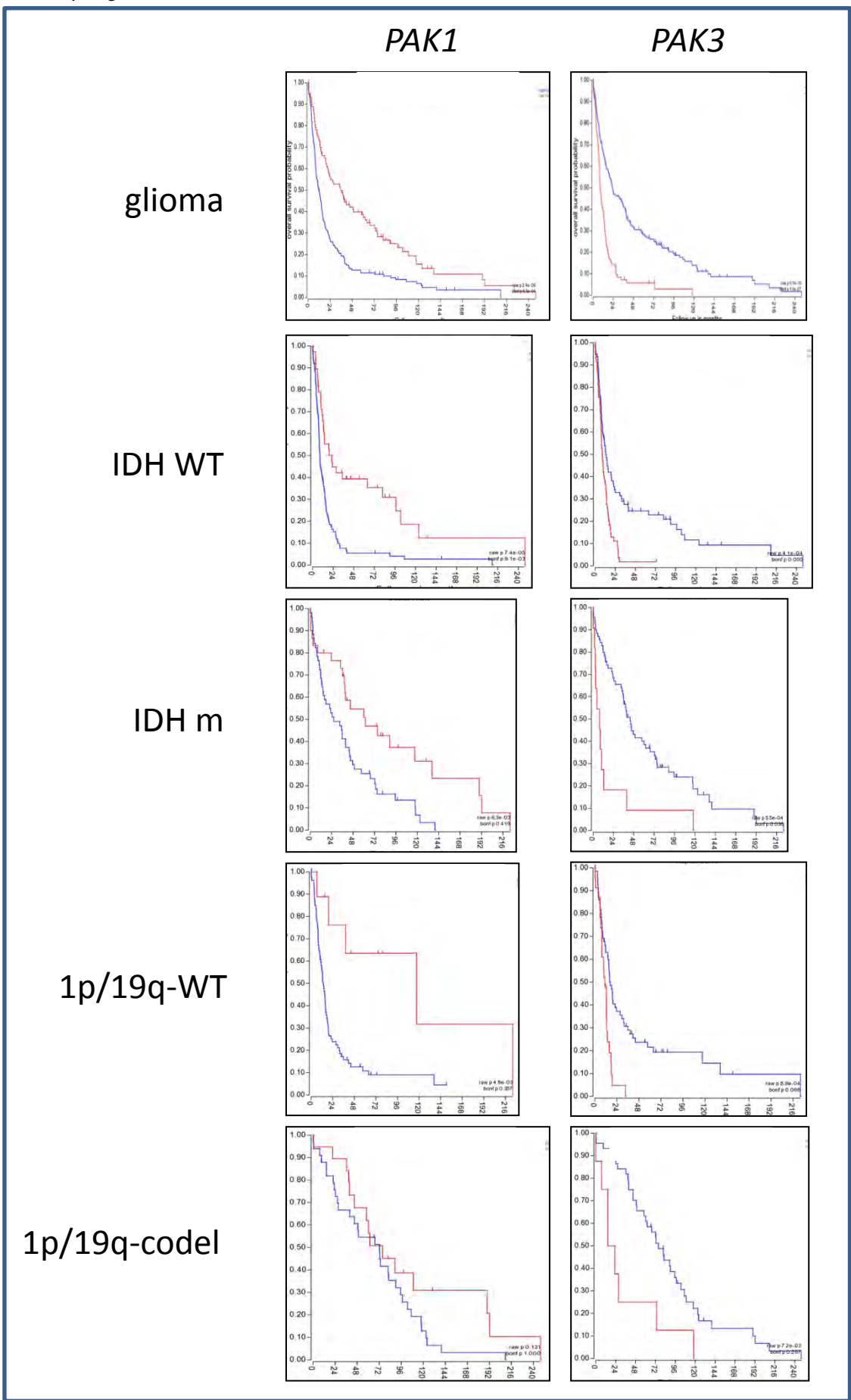
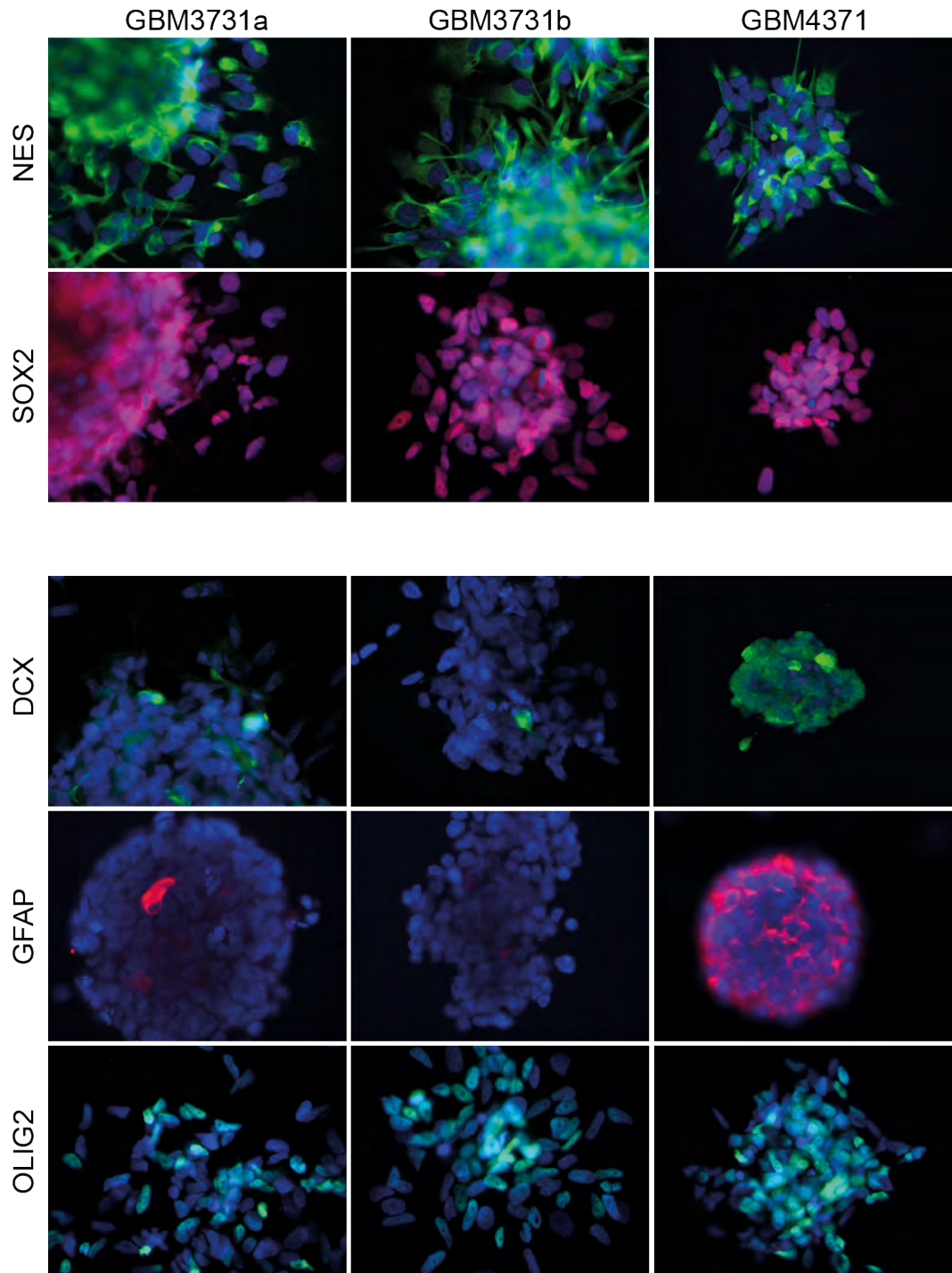
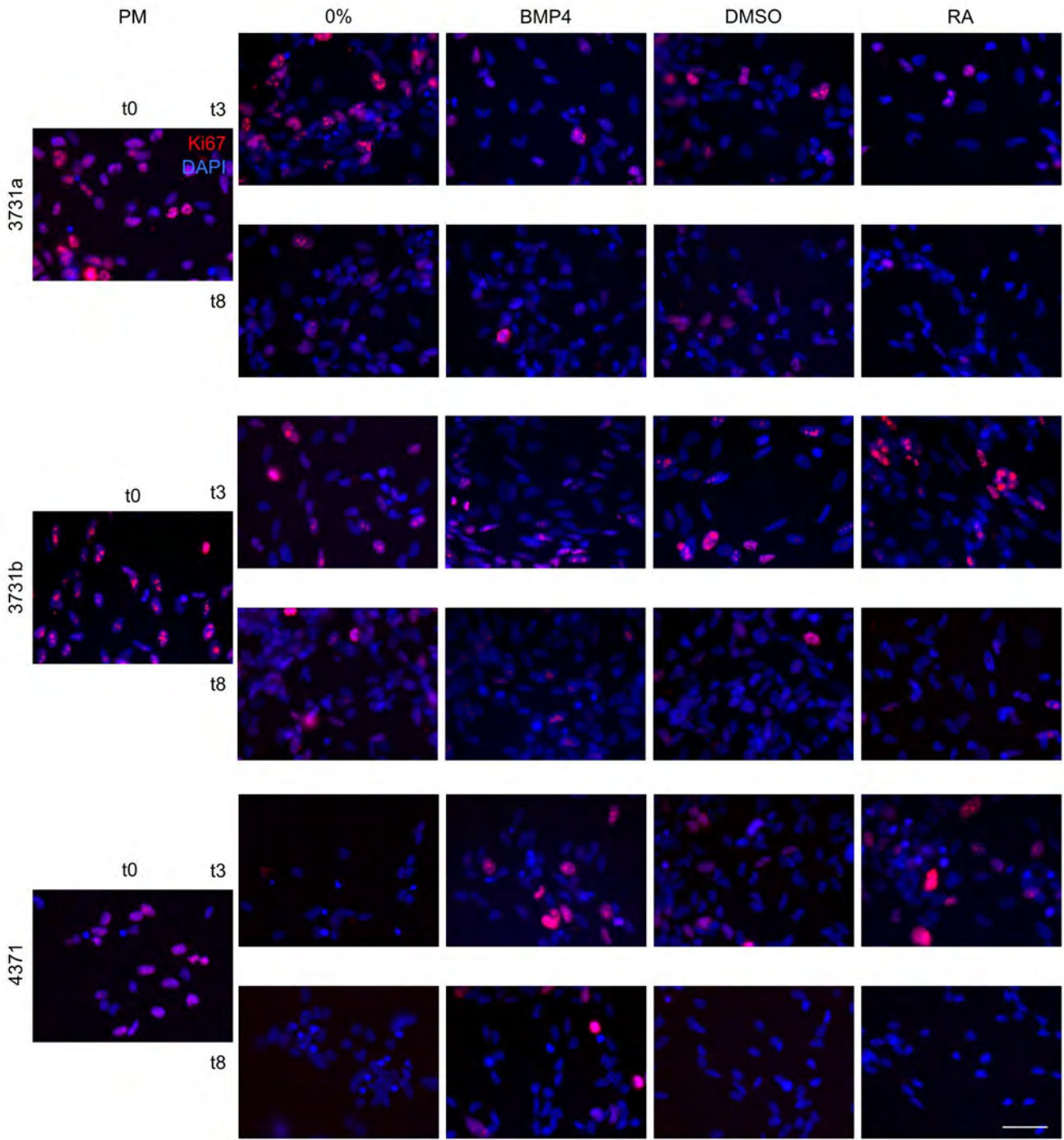


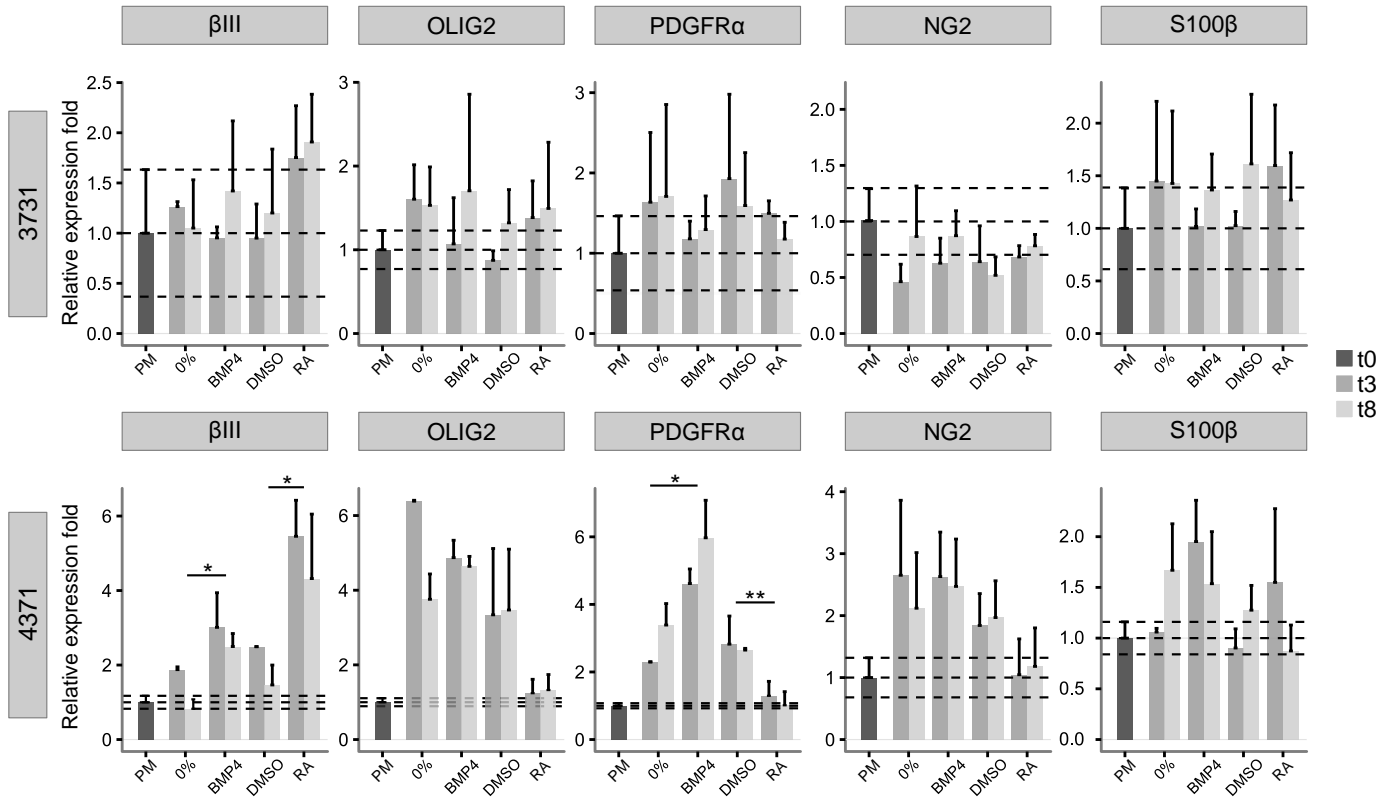
Figure S4



SD5



Supplementary Figure S6



Titre : Caractérisation du rôle des p21-activated kinases dans la physiopathologie des gliomes

Mots clés : p21-activated kinase, gliome, différenciation cellulaire

Résumé : Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte. Il s'agit d'un groupe de tumeurs hétérogène pouvant être classées dans différents sous-groupes selon des critères moléculaires et histopathologiques, donnant une indication sur leur agressivité. Les p21-activated kinase (PAK) sont des sérine-thréonine kinases effectrices des GTPases Rac et Cdc42 et font ainsi partie de nombreuses voies de signalisation. Elles régulent de nombreuses voies d'intérêt dans la biologie des cancers, comme les voies Mek/Erk, PI3K/Akt et Wnt/ β -caténine. PAK1 est fréquemment surexprimé et/ou suractivé dans plusieurs cancers, notamment du sein, des ovaires de la prostate et du cerveau, alors que PAK3 induit la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des cellules au cours de la neurogenèse dans plusieurs modèles animaux. Durant ma thèse, j'ai pu observer que l'expression de *PAK3* est de bon pronostic pour les patients atteints de gliomes, et est plus élevée dans un sous types de tumeurs caractérisé par la codélétion 1p/19q. *In vitro*, l'expression de PAK3 est plus élevée dans une lignée de cellules de gliome de signature proneurale, non tumorigène après xenogreffe chez la souris. Au cours de la différenciation des cellules de gliome, l'augmentation de l'expression de *PAK3* est associée avec des marqueurs de lignage neural et neuronal. L'inhibition de l'expression de *PAK3* entraîne l'augmentation de la capacité d'auto-renouvellement et de la tumorigénicité d'une lignée de cellules de gliome, et favorise la différenciation gliale des cellules.

Title : p21-activated kinases characterization in glioma pathophysiology

Keywords : p21-activated kinase, glioma, cell differentiation

Abstract : Gliomas are the most common and lethal adult primary brain tumors. Their complex heterogeneity is evidenced by numerous genomic studies showing distinct molecular entities in glioma. P21-activated-kinases (PAK) are serine threonine kinases involved in multiple signal transduction pathways as downstream effectors of Rac and Cdc42. They regulate several key cancer-relevant pathways like cell division and movement. *PAK1* and *PAK3* are highly expressed in the brain; *PAK1* is frequently overexpressed and/or over-activated in several human cancers whereas *PAK3* is involved in neural differentiation and the developmental proneural pathway. The role of these two kinases in brain tumor pathophysiology is unknown. During my thesis, I have observed that *PAK3* expression was associated with a longer survival for patients with glioma and was higher in 1p/19q gliomas. *In vitro*, *PAK3* was highly expressed in a glioma cell line with a proneural signature that did not induce tumor after xenograft. Its increasing expression upon a set of differentiation paradigms was correlated with those of neural and/or neuronal markers in glioma cell lines. Inhibition of *PAK3* expression increased cell renewal and tumorigenicity. It impaired cell differentiation, promoting the glial lineage.