



**HAL**  
open science

# Fonction du facteur de transcription CIC dans le développement des oligodendrocytes et des oligodendrogliomes

Yanis Khenniche

► **To cite this version:**

Yanis Khenniche. Fonction du facteur de transcription CIC dans le développement des oligodendrocytes et des oligodendrogliomes. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS230 . tel-03850740

**HAL Id: tel-03850740**

**<https://theses.hal.science/tel-03850740>**

Submitted on 14 Nov 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.

# Fonction du facteur de transcription CIC dans le développement des oligodendrocytes et des oligodendrogliomes

**Thèse de doctorat de Sorbonne Université**  
Spécialité : **Neurosciences**

*Pour obtenir le grade de*  
**Docteur de Sorbonne Université**

*Présentée par*  
**Yanis KHENNICHE**

Soutenue publiquement le 20 juin 2022 à l'Institut du Cerveau

Devant un jury composé de :

**Mme Emeline Tabouret**  
MCU-PH, Aix-Marseille Université

Examinatrice

**Mme Julie Gavard**  
DR2, Université de Nantes

Examinatrice

**M. David Ohayon**  
CRCN, Université de Toulouse III

Examineur

**M. Jean-Philippe Hugnot**  
PU, Université de Montpellier

Rapporteur

**Mme Elisabeth Traiffort**  
DR2, Université Paris-Saclay

Rapporteure

**Mme Emmanuelle HUIILLARD**  
CRCN, Sorbonne Université

Directrice de thèse

# Fonction du facteur de transcription CIC dans le développement des oligodendrocytes et des oligodendrogliomes

**Thèse de doctorat de Sorbonne Université**

Spécialité : **Neurosciences**

Ecole doctorale Cerveau Cognition Comportement (ED n°158) : ED3C

Unité de recherche : Institut du Cerveau (ICM)

CNRS UMR 7225, Inserm U 1127, Sorbonne Université UM 75

*Pour obtenir le grade de*  
**Docteur de Sorbonne Université**

*Présentée par*

**Yanis KHENNICHE**

Soutenue publiquement le 20 juin 2022 à l'Institut du Cerveau

Devant un jury composé de :

**Mme Emeline Tabouret**

MCU-PH, Aix-Marseille Université

Examinatrice

**Mme Julie Gavard**

DR2, Université de Nantes

Examinatrice

**M. David Ohayon**

CRCN, Université de Toulouse III

Examinateur

**M. Jean-Philippe Hugnot**

PU, Université de Montpellier

Rapporteur

**Mme Elisabeth Traiffort**

DR2, Université Paris-Saclay

Rapporteuse

**Mme Emmanuelle HUILLARD**

CRCN, Sorbonne Université

Directrice de thèse



*A la mémoire d'Hervé Daniel, mon mentor et ami*

# Remerciements

---

Tout manuscrit de thèse ne serait pas complet sans remerciements. Une expression de gratitude qui fait le bilan de ces longues années parsemées de moments d'euphorie et d'épreuves desquels nous ressortons grandis.

*Un immense merci à l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie particulièrement la Dr. **Elisabeth Traiffort** et le Pr. **Jean-Philippe Hugnot** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. J'espère que la correction de ce manuscrit aura été une tâche plaisante. Un grand merci également aux Dr. **David Ohayon**, **Emeline Tabouret** et **Julie Gavard** d'avoir accepté d'être mes examinateurs. J'espère que ces travaux auront su éveiller votre curiosité.*

*Ensuite je tiens à remercier mon laboratoire d'accueil et particulièrement ma directrice de thèse, **Emmanuelle**, pour m'avoir fait confiance pour porter ce beau projet de thèse. Mon chemin dans ce laboratoire n'a pas toujours été un long fleuve tranquille, mais j'ai souvent pu trouver en ta personne une alliée dans l'adversité. Je te remercie également pour la grande autonomie que tu m'as permise d'exercer au cours de ces années de thèse. Ton exigence et ta rigueur m'ont permis de toujours repousser mes limites et de prendre conscience que le chemin vers l'excellence est long et sinueux, mais gratifiant. Enfin je souhaitais te remercier pour ton aide pour la correction de ce manuscrit. Il ne serait pas ce manuscrit dont je suis fier sans ta précieuse collaboration et tes judicieux conseils. Je suis sûr qu'il plairait à Hervé.*

*Un grand merci à **Julie**. Si Emmanuelle était mon mentor en théorie, on peut considérer que Julie a été mon mentor sur le plan expérimental. Merci de m'avoir tout appris des nombreuses techniques du laboratoire. Ta pédagogie et ta patience font de toi une personne rare et appréciée. J'espère avoir été digne de ta succession sur le projet et suis fier de partager avec toi la place de premier auteur.*

***Sophie**, la figure maternelle du laboratoire, merci pour ton aide, ton soutien, tes précieux conseils tant professionnels que personnels mais surtout pour tous ces fou rires... Ton énergie est un bien précieux que je te souhaite de cultiver, autant que ta sagesse. Deux qualités qui sauront me manquer.*

***Sofia** et **Rana**, merci de votre accueil au laboratoire. Votre soutien aura été d'une grande aide. Sofia, merci pour tes nombreux conseils sur nos projets parallèles et pour ta joie de vivre qui auront su éclairer le ciel du laboratoire de ces arc-en-ciel qui te plaisent tant.*

*Je tiens également à te remercier **Sylvie**. Même si tout n'a pas toujours été facile entre nous, j'ai énormément appris, auprès de toi, sur les relations humaines. Le heurt face aux difficultés est le propre de l'évolution. Je suis fier du chemin parcouru à tes côtés et je recommencerai sans hésiter.*

*Enfin, merci également à **Sandra** et **Nathalie**, pour nos échanges et votre expertise qui m'ont été profitables pour la réalisation de mon projet. Merci à toi Nathalie pour tes conseils notamment en vue des présentations de résultats scientifiques (dont tu rafles les prix) et merci à toi Sandra pour ton aide opérationnelle et technique sur la gestion des lignées de souris (là c'est toi qui es inégalée).*

Au-delà des membres de la petite équipe Huillard, je tiens à remercier mes collègues de la grande équipe des tumeurs cérébrales.

*En premier lieu, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à **mes amis doctorants** (et il y en a un paquet) sans qui cette thèse aurait été absolument différente. Merci d'avoir été présents pour embellir cette expérience de vos rires, de vos histoires et de nos beaux souvenirs.*

*First of all, a huge thanks to you King **Mohammed** Ahmed, my beloved office neighbor. Your presence has been of great value and a real turning point in my thesis. Our discussions and moments shared together will never be forgotten, thanks for having been my first friend in this thesis. Share my greetings with your beloved wife, Sara. Hope to see you soon my brother in sha Allah.*

*Mi querido hermanote y favorito sonso **Isaias**, fue un gran placer conocerte. No pensé que fuera posible formar amistades tan rápido. Espero que la manteneremos por mucho tiempo mi demonio amigo. Sabes que puedes contar conmigo. Gracias por todos nuestros momentos y discusiones sulfurosas ! Felicidades de nuevo doctor Hernandez !*

*Que serait cette thèse sans mon ami le roi des chats ? Merci **Quentin** pour ces échanges où nous refaisons le monde à travers nos doléances et plaintes autour d'un café (et d'un chocolat chaud pour ma part). Notre amitié et soutien mutuels m'ont beaucoup aidé pour traverser les moments difficiles de cette thèse et pour en fêter les moments de félicité. Je te souhaite le meilleur pour ta dernière ligne droite et je viendrai célébrer cela dignement avec toi le jour convenu !*

***Alexa** et **Irma**, las chicas de los chismes, reines de l'information en tous genres tout à fait complémentaires avec l'une rapportant des faits réels et l'autre des faits plus fictifs... je vous laisse deviner qui est qui ! Un grand merci à vous deux pour tous ces moments partagés. Une mention spéciale pour les gâteaux anniversaires de la cheffe pâtissière, et une mention spéciale pour las telenovelas dramáticas de la vida de mi chica maliciosa.*

*Merci également à toi **Nina** et bon courage pour la suite de ton projet. Prends bien soin de CIC et essaye de lui trouver un rôle avec son copain IDH1. Hâte de voir ce que donnera le projet. J'ai apprécié pouvoir te connaître un peu plus pendant le stage de neuropathologie. Merci également à nos doctorantes et médecins **Cristina** et **Alice** que j'ai aimé passer mon temps à embêter dès que je le pouvais. Je finirai par arriver à prononcer ton nom de famille parfaitement Cristina.*

*Enfin, une mention spéciale aux petites dernières **Noémie** et **Eva** (aka la Agusteam), pour votre bonne humeur et votre énergie. Noémie j'ai particulièrement apprécié nos échanges et ta curiosité sur la religion, ce fut un plaisir d'échanger avec toi autour de la spiritualité. Eva, de la maison du serpent, un plaisir également d'avoir pu discuter avec toi de geekerie en tout genre. Courage à vous deux pour vos projets, je vous souhaite le meilleur pour la suite.*

*J'ai une pensée toute particulière pour les stagiaires que j'ai pu encadrer pendant cette thèse. Des étudiants formidables qui ont tous été à la hauteur de mes attentes et plus encore. Merci à toi **Houcine**, dernier étudiant en date, pour ton incroyable joie de vivre communicatrice, ta vivacité d'esprit et ta sociabilité qui ont fait l'unanimité. Je suis fier d'avoir pu encadrer un étudiant comme toi, devenu un ami. Ne perds jamais de vue cette force vitale qui t'anime. Merci à toi **Imen**, étudiante remarquable en tout point, je n'ai aucun doute que tu sauras mener tous tes projets à bien comme tu as su le faire avec le nôtre. Merci également à mes chercheurs en herbe, **Ruben**, **Gabrielle** et **Mehdi**, trois bourgeons brillants et curieux dont l'éclosion révélera de grands scientifiques.*

*Je souhaite également remercier tous les autres membres de notre grande équipe, passés comme **Yseult**, **Marion**, **Bertille**, **Nolwenn**, **Tuan**, **Rémi** et **Laurane** et présents comme **Catherine**, **Marine**, **Amel**, **Julie**, **Emie**, **Thomas** et **Mohamed**.*

*Un grand merci aux chercheurs et médecins de l'équipe pour nos échanges et votre expertise sur mon projet. Merci à vous **Michel**, **Maité**, **Luis**, et **Marc**. Je tiens à remercier particulièrement **Franck** et **Karima** pour cette belle opportunité que vous m'avez offerte avec ce stage de neuropathologie très enrichissant.*

Au-delà de l'équipe je tiens à exprimer ma gratitude envers nos collaborateurs et collègues de l'ICM et d'ailleurs.

*Merci à vous **Corentine** et **Carlos** pour les ChIP-Seq et leur analyse, ainsi que pour vos retours toujours pertinents sur notre projet que vous suivez depuis un moment maintenant.*

*Je souhaite adresser de chaleureux remerciements **aux plateformes de l'ICM** sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Merci à vous **Annick** et **Célia** pour l'histologie. Merci à tout le personnel de Charles River (et maintenant Janvier) pour la gestion des souris et toutes les activités associées, je remercie notamment **Alexandre** et **Cindy** pour votre disponibilité et collaboration toute particulière pour les fameux marquages paumes-pattes, vous m'avez été d'une grande assistance. Un grand merci à **Bruno** également pour ces génotypages intempestifs, ton soutien et ton aide m'auront été d'un grand secours. Merci à mes collègues de la plateforme d'imagerie où j'ai passé le plus clair de mon temps, merci **Aymeric**, **Claire**, **Dominique** et **Basile** pour tous nos échanges, mes sollicitations, et nos discussions passionnantes tant sur l'imagerie que sur des sujets d'actualité divers et variés. Merci également à nos collaborateurs de **Genosplice** et de **Scipio** pour les analyses transcriptomiques.*

*Merci à vous **Ariane** et **Piotr** pour avoir accepté par deux fois d'être les bienveillants membres de mes comités de suivi de thèse. Nos échanges ont été particulièrement appréciables au même titre que vos encouragements et votre soutien. J'espère que la finalité de ce projet saura éveiller votre curiosité.*

*Merci à toi **Lamia** d'avoir été une oreille attentive, je n'oublierai pas nos discussions et souhaite qu'elles nous soient profitables à tous deux. Ne perdons jamais de vue ce qui compte véritablement.*

*Une immense pensée aux **souris**, sans qui ce projet n'aurait jamais pu voir le jour. Elles restent et demeurent le cœur de nos projets et j'espère sincèrement que leur sacrifice permettra d'améliorer la compréhension et la prise en charge des tumeurs cérébrales.*

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur ma famille et mes amis.

*Tout d'abord, mes pensées vont à mon mentor, **Hervé Daniel**, à qui je dédie ce manuscrit. Hervé, vous m'avez tout appris de l'amour des sciences à la pédagogie. Vous avez su démontrer avec force et douceur le chemin vers l'excellence, sans jamais frôler le blâmable élitisme. Vous n'avez jamais renié vos origines modestes et représentez le parfait exemple de la réussite par-delà le rang social. Peu sont ceux qui remarquent la grandeur d'âme derrière cet esprit, mais ce peu s'en souvient assurément. Puissiez-vous reposer en paix.*

*Merci à mes collègues thésards **Augustin** et **Laurine** dont nos échanges auront été libérateurs et nous aurons permis de relativiser ce long labeur qu'est l'exercice de thèse. Nous pouvons être fier du chemin parcouru. Bravo les amis.*

***Mehdi** et **Khalid**, merci d'avoir été ces parenthèses sereines me permettant de voir autre chose que le travail. Merci pour votre écoute et votre soutien sans faille. Khalid, mon frère depuis tant d'années, merci d'être toujours le meilleur des compagnons de route que la vie m'a permis d'avoir. Puisse Allah nous permettre de poursuivre cette route encore longtemps.*

***Nassik**, mon cher ami et professeur, je suis heureux d'avoir pu te rencontrer. L'amitié n'attend pas le nombre d'années et nos échanges ont déjà pu le prouver. Un universitaire amoureux de la langue arabe qui a l'étoffe d'un Hervé Daniel. Puisse Allah te faciliter mon ami et te permettre de libérer ton plein potentiel.*

*Mon petit **Rayan**, mon frère et fils, cette année aura été difficile pour toi aussi. J'espère avoir été à la hauteur et t'avoir donné les clés permettant de réussir par la suite par toi-même. Face à la difficulté, il faut toujours donner le meilleur de soi, quand bien même les obstacles paraissent insurmontables. Ne vit pas une vie de regrets, vit les choses à fond et soit heureux dans la voie qui t'épanouira mon frère. Je serai toujours là pour toi, même plus loin.*

*Ma sœur **Lisa**, félicitations pour ton mémoire et ton travail universitaire remarquables qui s'achèvent enfin. Cette année sera une conclusion pour nous deux vers de nouveaux horizons. Je nous souhaite le meilleur pour la suite et espère de tout mon cœur que la famille s'agrandira bientôt.*

*Enfin, merci à celle sans qui je ne serai rien, celle qui m'a élevée et permis d'être l'homme que je suis aujourd'hui, celle qui a tout donné pour nous permettre aujourd'hui de briller, merci **maman**. Si je suis si fier du chemin parcouru aujourd'hui c'est pour toi. Tu es une personne d'exception qui mérite tout ce que cette Terre a de plus beau à offrir, et je souhaite te l'offrir. Puisse Allah te récompenser pour tout ce que tu as fait pour nous toutes ces années et te garder auprès de nous le plus longtemps possible.*

*En dernier lieu, je tiens à remercier mon Seigneur pour toute chose. Lui sans qui rien ne serait, Lui sans qui rien n'a de sens. Merci Allah pour ce chemin que Tu m'as accordé, un chemin dans lequel j'espère toujours pouvoir accomplir mon essence, venir en aide à mon prochain avec cet optimisme et cette force vitale que Tu m'as confié.*

*« L'héroïsme est peu de chose, le bonheur est bien plus difficile »*

- Camus

*« Aux âmes bien nées, la valeur n'attend pas le nombre d'années »*

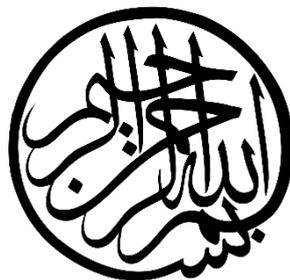
- Corneille

*« Il existe des conceptions vulgaires tout à fait suffisantes pour la vie pratique ; elles doivent même être la nourriture des hommes. Elles ne suffisent cependant pas à l'intelligence. »*

- Averroès

*« Dieu n'impose à aucune âme une charge supérieure à sa capacité. »*

*Al-Baqarah, verset 286*





# Résumé

---

Les gliomes constituent le groupe de tumeurs cérébrales malignes le plus fréquent. À ce jour, les possibilités thérapeutiques sont très minces et le pronostic de ces tumeurs est particulièrement sombre. La principale problématique est que le diagnostic est le plus souvent effectué à un stade de progression trop important de la lésion tumorale. Bien que les altérations génétiques de ces tumeurs aient été particulièrement caractérisées ces dernières années, nous ne connaissons que trop partiellement les mécanismes à l'origine de leur développement. Face à un arsenal thérapeutique restreint à des protocoles classiques de chimioradiothérapies et d'exérèse quand la localisation de la tumeur le permet, la nécessité de développer des alternatives thérapeutiques spécifiques devient urgente et nécessite une meilleure compréhension des mécanismes de développement de ces tumeurs.

Parmi ces tumeurs, les oligodendrogliomes (ODGs) partagent des caractéristiques histologiques et transcriptomiques proches des progéniteurs d'oligodendrocytes (OPCs) ; des cellules décrites comme une origine cellulaire de ces tumeurs. Ces cellules constituent la plus grande population de cellules en prolifération chez l'adulte. Au laboratoire, notre objectif est de comprendre le développement des gliomes depuis leur cellule d'origine afin d'endiguer ce développement. Les oligodendrogliomes présentent de nombreuses altérations génétiques dont des mutations inactivatrices du gène codant le facteur de transcription CIC. Le laboratoire a notamment décrit la croissance des oligodendrogliomes mutés pour *CIC* comme plus agressive et associée au niveau transcriptomique à un enrichissement en OPC et en prolifération.

Ce répresseur transcriptionnel ubiquitaire est décrit dans la littérature pour moduler le développement de nombreux organes en tant qu'effecteur important de la voie des MAP kinases. Il réprime la prolifération cellulaire et induit la différenciation des cellules dans lesquelles il est exprimé. Son inactivation dans de nombreux cancers entraîne une prolifération incontrôlée, une migration et invasion importante et un état plus immature des cellules tumorales. Toutefois, les fonctions de ce gène répresseur de tumeurs dans les cellules d'origine des oligodendrogliomes sont encore méconnues. Pour répondre à cette question, le laboratoire a développé un modèle murin unique permettant l'inactivation spécifique du gène *Cic* dans les progéniteurs d'oligodendrocytes, le modèle *Cic<sup>CKO</sup>*, et de suivre grâce à un rapporteur fluorescent, le destin cellulaire des cellules recombinées. Le but de ma thèse est de caractériser ce modèle afin de mieux comprendre le rôle de CIC dans le développement des oligodendrogliomes.

Au cours de ces dernières années, j'ai pu caractériser l'expression de CIC dans le lignage oligodendrocytaire et décrire une augmentation de cette expression corrélée à une différenciation et une maturation dans le lignage. Nous avons pu également valider l'efficacité et la spécificité de l'inactivation de *Cic* dans les OPCs de notre modèle murin et caractériser la fonction de CIC. L'inactivation postnatale de *Cic* dans les OPCs induit une altération transitoire de la différenciation des OPCs entraînant l'augmentation de leur proportion. Elle induit également un défaut de maturation des oligodendrocytes. Au niveau transcriptomique, les cellules inactivées pour *Cic* présentent une activation notable de la voie Wnt, de gènes associés à la migration ainsi qu'au développement de la vascularisation. Ce dernier phénotype intrigant est également retrouvé dans une analyse des gènes cibles de CIC dans les OPCs, dans lesquels nous avons pu mettre en évidence une liaison de CIC à des gènes associés au développement vasculaire en plus de gènes associés à la différenciation oligodendrocytaire. Devant l'hypothèse d'un phénotype vasculaire induit par l'inactivation de *Cic*, j'ai pu décrire la présence de cellules recombinaison exprimant le marqueur endothélial GLUT1 dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Ce phénotype pouvant être expliqué par plusieurs hypothèses : (i) une conséquence de l'inactivation non spécifique de l'inactivation de *Cic* dans des cellules vasculaires (ii), l'inactivation de *Cic* dans les OPCs entraînant l'acquisition d'un phénotype vasculaire par l'expression de marqueurs péricytaire et endothéliaux dans ces cellules, enfin (iii), les OPCs inactivés pour *Cic* interagissant de manière étroite avec les vaisseaux pour promouvoir l'angiogenèse. J'ai réalisé une analyse transcriptomique à l'échelle de la cellule unique afin d'identifier la population cellulaire responsable de ce phénotype. Cette analyse nous a révélé que les cellules vasculaires étaient à l'origine de l'expression des marqueurs vasculaires, ainsi que, de manière surprenante, les OPCs engagés dans la différenciation ainsi que les oligodendrocytes immatures. Intégrés, ces résultats sont en faveur des deux dernières hypothèses suggérant un rôle de CIC dans l'induction de marqueurs vasculaires dans ces lignages. Afin d'évaluer la pertinence de ces phénotypes observés dans le modèle *Cic<sup>CKO</sup>*, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement de signatures associées dans les transcriptomes d'oligodendrogliomes du TCGA. Cette analyse nous révèle un enrichissement de signatures OPC, vasculaires et de la voie Wnt dans les oligodendrogliomes mutés pour *CIC*, confirmant nos résultats *in vivo*. Pour décrire les conséquences de tels enrichissements sur la survie des patients, j'ai réalisé une analyse pour évaluer la valeur des mutations du gène *CIC* en tant que facteur pronostic indépendant dans trois cohortes indépendantes de patients. Cette analyse a révélé que les mutations du gène *CIC* ne sont pas associées à un mauvais pronostic. Cependant, la présence de ces mécanismes de développement, spécifiques aux oligodendrogliomes mutés pour *CIC*, pourrait représenter des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement de ces tumeurs.

Les données générées au cours de cette thèse m'auront permis de décrire les fonctions de CIC dans les cellules d'origine des oligodendrogliomes, apportant des éléments de réponses aux mécanismes de développement de ces tumeurs. Toutefois, la seule inactivation de *Cic* dans les OPCs n'induit pas le développement de tumeurs. Des perspectives intéressantes pour caractériser pleinement ce développement seraient de combiner les altérations génétiques décrites de ces tumeurs pour décrire fidèlement la biologie des oligodendrogliomes.

**Mots-clés :** gliome, oligodendrogliome, CIC, facteur de transcription, OPC, oligodendrocyte, développement, différenciation, prolifération, migration, MAP kinases, vascularisation, péricyte, Wnt.



# Glossaire

---

**2HG** : R-2-hydroxyglutarate

**AA** : Acide Aminé

**ABD** : *Ataxin Binding Domain*, domaine de liaison à ATXN1/L

**AC** : Astrocyte

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ATXN1** : *Ataxin 1*

**ATXN1L** : *Ataxin 1-like* ou protéine BOAT1

**BHE** : Barrière Hémato-Encéphalique

**CAR T-cell** : *Chimeric Antigen Receptor T Lymphocyte*, récepteur chimérique des lymphocytes T

**CBTRUS** : *Central Brain Tumors Registry of United States*

**ChIP-Seq** : *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*, Séquençage de chromatine par immunoprécipitation

**CIC** : *Capicua (cap i cua)*

**CIC-L** : Isoforme longue de CIC

**CIC-S** : Isoforme courte de CIC

**COP** (*Marques et al., 2016*) : *Differentiation-Committed Oligodendrocyte Precursor*, progéniteur d'oligodendrocytes engagé dans la différenciation

**CSC** : *Cancer Stem Cells*, cellule souche cancéreuse

**EANO** : *European Association for Neuro-Oncology*, Association européenne de neuro-oncologie

**EBD** : *ERK Binding Domain*, domaine de liaison à ERK

**EGFR** : *Epithelial Growth Factor Receptor*, récepteur au facteur de croissance épithélial

**ERK** : *Extracellular signal-Regulated Kinase*, MAP kinase humaine

**ETS** : *E26 transcription factor*

**FUBP1** : *Far Upstream element Binding Protein 1*

**GBM** : Glioblastome

**GFP** : *Green Fluorescent Protein*

**GM** : *Grey Matter*, matière grise

**gmOPC** : OPC de la matière grise

**GRO** : protéine GROUCHO (Drosophile)

**GSEA** : *Gene Set Enrichment Analysis*, analyse d'enrichissement de signatures de gènes

**HAS** : Haute Autorité de Santé

**HMG** : *High Mobility Group*

**IARC** : *International Agency of Research on Cancer*

**INCa** : Institut National contre le Cancer

**iOL** : Oligodendrocyte immature

**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique

**MAP kinase (MAPK)** : *Mitogene-Activated Protein Kinase*, protéine kinase activée par la voie des RTK

**MFOL** (*Marques et al., 2016*) : *Myelin Forming Oligodendrocyte*, oligodendrocyte myélinisant

**MMP** : métalloprotéase

**MOL** (*Marques et al., 2016*) : *Mature Oligodendrocyte*, oligodendrocyte mature (terme spécifique à la publication, ≠ de l'abréviation mOL utilisée dans le manuscrit).

**mOL** : Oligodendrocyte mature  
**NFOL** (*Marques et al., 2016*) : *Newly Formed Oligodendrocyte*, oligodendrocyte immature  
**NG2** : *Neural/Glial Antigen 2*, antigène neural/glial 2  
**NLGN3** : *Neuroigin 3*  
**NLS** : *Nuclear Localization Signal*, signal de localisation nucléaire  
**NPC** : *Neuronal progenitor cell*, progéniteurs neuraux  
**NSC** : *Neural Stem Cell*, cellule souche neurale  
**ODG** : Oligodendrogliome  
**OL** : Oligodendrocyte  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**OPC** : *Oligodendrocyte Precursor Cell*, progéniteur d'oligodendrocytes  
**PCR** : *Polymerase Chain Réaction*, réaction en chaîne par polymérase  
**PDGF** : *Platelet-Derived Growth Factor*, Facteur de croissance dérivé des plaquettes (érythrocytes)  
**PDX** : *Patient Derived Xenograft*, xénogreffe dérivée de patients  
**pMN** : Progéniteur de motoneurones  
**POLA** : Réseau national français pour la prise en charge des oligodendrogliomes anaplasiques  
**pTERT** : promoteur du gène *TERT*  
**qRT-PCR** : *Quantitative Reverse Transcription PCR*,  
**RG** : Cellules de la glie radiaire  
**RNA-Seq** : Séquençage transcriptomique  
**RTK** : Récepteur à Tyrosine Kinase

**SCA1** : *SpinoCerebellar Ataxia Type 1*, ataxie spinocérébelleuse de type 1  
**SHH** : voie Sonic-Hedgehog  
**Single-cell RNA-Seq** : Séquençage transcriptomique à l'échelle de la cellule unique  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**SNP** : *Single Nucleotide Polymorphism*, polymorphisme d'un seul nucléotide  
**SVZ** : *SubVentricular Zone*, zone sous-ventriculaire  
**TAA** : Tumor-Associated Antigen, antigène associé à la tumeur  
**TAM** : *Tumor-Associated Macrophages*, macrophages associés à la tumeur  
**TCR** : *T-cell receptor*, récepteur des lymphocytes T  
**TGCA** : *The Genome Cancer Atlas*  
**TGF- $\beta$**  : *Transforming Growth Factor  $\beta$* , facteur de croissance tumoral  $\beta$   
**TME** : *Tumor MicroEnvironment*, microenvironnement tumoral  
**TMZ** : Témazolomide  
**TSA** : Tumor-Specific Antigen, antigène spécifique de la tumeur  
**VEGF** : *Vascular Epithelial Growth Factor*, facteur de croissance vasculaire et épithélial  
**VGF** : *VGF nerve growth factor*, facteur de croissance nerveux  
**VLMC** : *Vascular and LeptoMeningeal Cells*, cellules vasculaires leptoméningées/péricytes  
**WM** : *White Matter*, matière blanche  
**wmOPC** : OPC de la matière blanche  
**Wnt** : *Wingless-related integration site*, voie Wnt



# Table des matières

---

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>5</b>
<b>RESUME</b>	<b>11</b>
<b>GLOSSAIRE</b>	<b>15</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>18</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>24</b>
<b>1. LES TUMEURS CEREBRALES : UN CONTEXTE TUMORAL PARTICULIER</b>	<b>24</b>
1.1. GENERALITES SUR LES GLIOMES	25
1.1.1 Caractéristiques des gliomes : étiologie et épidémiologie .....	27
1.1.2 Spécificités histologiques des gliomes diffus de l'adulte .....	29
1.1.3 Altérations génétiques des oligodendrogliomes .....	30
1.2. HETEROGENEITE DES GLIOMES ET DE LEURS MECANISMES DE DEVELOPPEMENT	34
1.2.1 L'hétérogénéité moléculaire des gliomes .....	35
1.2.2 Interaction des cellules tumorales avec le micro-environnement.....	37
1.3. TRAITEMENTS ACTUELS DES GLIOMES : LA NECESSITE DE THERAPIES CIBLEES	44
<b>2. DES CELLULES D'ORIGINE DES GLIOMES : LES PROGENITEURS D'OLIGODENDROCYTES</b>	<b>49</b>
2.1. DEUX CANDIDATS A L'ORIGINE DES OLIGODENDROGLIOMES : OPCs ET NPCs	50
2.1.1 Les OPCs comme cellules constitutives de la masse tumorale.....	51
2.1.2 Les OPCs et les NPCs comme cellules à l'origine des mutations.....	54
2.2. PHYSIOLOGIE DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE	59
2.2.1 Origines embryonnaires du lignage oligodendrocytaire.....	62
2.2.2 Différenciation et maturation du lignage oligodendrocytaire .....	64
2.2.3 Propriétés électrophysiologiques des OPCs.....	66
2.3. HETEROGENEITE DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE	67
2.3.1 Hétérogénéité régionale des progéniteurs d'oligodendrocytes.....	67
2.3.2 Hétérogénéité transcriptomique et temporelle des OPCs.....	70
2.3.3 Hétérogénéité électrophysiologique des OPCs.....	72
<b>3. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION CIC : UN IMPORTANT REGULATEUR DE LA VOIE DES MAP KINASES</b>	<b>74</b>
3.1. CIC, UN REGULATEUR CENTRAL DE LA VOIE DES MAP KINASES	74
3.1.1 CIC, un répresseur transcriptionnel .....	74
3.1.2 Gènes cibles de CIC .....	77
3.1.3 Régulation de CIC par la voie des MAP kinases.....	78
3.2. CIC, UN REPRESSEUR INACTIVE DANS LES OLIGODENDROGLIOMES	80
3.2.1 Fonctions physiologiques de la protéine CIC .....	80
3.2.2 Fonctions cérébrales de CIC .....	83
3.2.3 Rôles de CIC dans le développement tumoral .....	86
<b>4. OBJECTIFS DE THESE</b>	<b>91</b>

<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>94</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>99</b>
<b>1. L'EXPRESSION DE CIC AUGMENTE AVEC LA MATURATION DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE</b>	<b>100</b>
1.1. CIC EST FAIBLEMENT EXPRIME DANS LES OPCs	101
1.2. L'EXPRESSION DE CIC AUGMENTE DANS LES OLIGODENDROCYTES	102
<b>2. CARACTERISATION D'UN MODELE MURIN D'INACTIVATION DE CIC DANS LES CELLULES D'ORIGINE DES GLIOMES</b>	<b>104</b>
2.1. DESCRIPTION DU MODELE : PGDFRA::CREERT <sup>+</sup> ; Cic <sup>F</sup> ; ROSA26 <sup>LSL-YFP</sup>	104
2.2. L'EXCISION DU DOMAINE HMG EST EFFICACE DANS LE MODELE Cic <sup>CKO</sup>	105
2.2.1 La recombinaison au locus Cic induit une instabilité de la protéine.....	107
2.2.2 La recombinaison est spécifique du lignage oligodendrocytaire.....	109
<b>3. CONSEQUENCES DE L'INACTIVATION DE CIC DANS LA PHYSIOLOGIE DES OPCs</b>	<b>110</b>
3.1. ÉTUDE DE L'INACTIVATION DE CIC DANS LES OPCs POSTNATAUX : IN VIVO	110
3.1.1 L'inactivation de Cic n'induit pas la prolifération des OPCs.....	110
3.1.2 L'inactivation de Cic induit un délai de différenciation des oligodendrocytes.....	113
3.1.3 L'inactivation de Cic induit une altération de la maturation des oligodendrocytes.....	115
3.2. L'INACTIVATION DE CIC N'INDUIT PAS D'EFFETS DANS LES OPCs ADULTES	119
3.3. ÉTUDE DE L'INACTIVATION DE CIC DANS LES CULTURES O4 <sup>+</sup> : IN VITRO	121
<b>4. MECANISMES MOLECULAIRES DE CIC DANS LES OPCs POSTNATAUX : UNE ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE ET DES GENES CIBLES DE CIC</b>	<b>125</b>
4.1. VOIES ALTEREES DANS LES OPCs INACTIVES POUR CIC	125
4.1.1 Une diminution de l'expression des gènes du cycle cellulaire.....	127
4.1.2 Un enrichissement de voies de signalisation associées au cancer.....	127
4.1.3 Un enrichissement de l'angiogenèse et de la migration.....	128
4.2. CIC SE LIE A DE GENES VASCULAIRES DANS LES OPCs	129
<b>5. L'HYPOTHESE D'UN PHENOTYPE VASCULAIRE INDUIT PAR L'INACTIVATION DE CIC DANS LES OPCs</b>	<b>132</b>
5.1. PRESENCE D'UN PHENOTYPE VASCULAIRE DES CELLULES RECOMBINEES DANS LES SOURIS Cic <sup>CKO</sup>	132
5.2. IDENTIFICATION DES POPULATIONS D'ORIGINE DU PHENOTYPE VASCULAIRE	135
<b>6. VERS UNE COMPREHENSION DU DEVELOPPEMENT DES OLIGODENDROGLIOMES : UNE ANALYSE DE L'IMPACT DES MUTATIONS CIC</b>	<b>138</b>
6.1. ENRICHISSEMENT D'UNE SIGNATURE VASCULAIRE, D'OPC ET DE LA VOIE WNT DANS LES OLIGODENDROGLIOMES MUTES POUR CIC	138
6.2. LES MUTATIONS DU GENE CIC NE SONT PAS UN FACTEUR INDEPENDANT ASSOCIE A LA SURVIE DES PATIENTS	140
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES</b>	<b>143</b>
<b>1. CIC REGULE LA DIFFERENCIATION ET LA MATURATION DES OLIGODENDROCYTES</b>	<b>145</b>
1.1. UN DELAI DE DIFFERENCIATION INDUIT PAR L'INACTIVATION DE CIC	145
1.2. LA VOIE WNT, POTENTIEL CANDIDAT DE LA REGULATION PAR CIC DE LA DIFFERENCIATION	147
1.3. CIC NE REGULE PAS LA PROLIFERATION DANS LES OPCs	148

<b>2. L'INACTIVATION DE CIC INDUIT L'EXPRESSION DE MARQUEURS VASCULAIRES</b>	<b>150</b>
2.1. RATIONNEL DES HYPOTHESES D'UN PHENOTYPE VASCULAIRE	150
2.2. PREUVES D'UNE INDUCTION DE MARQUEURS VASCULAIRES DANS LES OPCs ET LES CELLULES VASCULAIRES	150
2.3. LA REGULATION PAR CIC DES GENES ETV DANS LE LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE	153
<b>3. IMPACT DES MUTATIONS CIC DANS LES OLIGODENDROGLIOMES</b>	<b>155</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>158</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>161</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>164</b>

# Table des figures

<b>INTRODUCTION</b>	<b>24</b>
<b>1. LES TUMEURS CEREBRALES : UN CONTEXTE TUMORAL PARTICULIER</b>	<b>24</b>
FIGURE 1 – DIVERSITE ET LOCALISATION DES TUMEURS PRIMITIVES DU SNC CHEZ L’ADULTE ( <i>OSTROM ET AL., 2021</i> )	26
TABLE 1 – CLASSIFICATION DE L’OMS 2021 DES GLIOMES DIFFUS DE L’ADULTE ( <i>LOUIS ET AL., 2021</i> )	28
FIGURE 2 – CARACTERISTIQUES HISTOLOGIQUES DES GLIOMES DIFFUS DE L’ADULTE ( <i>DR. KARIMA MOKHTARI, AP-HP</i> )	29
FIGURE 3 – FONCTIONS DU R-2-HYDROXYGLUTARATE DANS LE METABOLISME, L’HOMEOSTASIE REDOX ET LA REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE ( <i>HAN ET AL., 2020</i> )	31
FIGURE 4 – ALTERATIONS GENETIQUES LES PLUS FREQUENTES RETROUVEES DANS LES OLIGODENDROGLIOMES	33
FIGURE 5 – CONCEPTS DE NICHE TUMORALES DANS LE DEVELOPPEMENT DES GLIOMES ( <i>HAMBARDZUMYAN ET BERGERS, 2015</i> )	38
FIGURE 6 – LES GLIOMES INTERAGISSENT AVEC LE SYSTEME IMMUNITAIRE POUR PROMOUVOIR LEUR PROGRESSION, LEUR INVASION ET L’ANGIOGENESE ( <i>ADAPTE DE HAMBARDZUMYAN ET AL., 2016</i> )	40
FIGURE 7 – INTERACTIONS ENTRE LES NEURONES ET LES CELLULES DE GLIOMES : DES MECANISMES SECRETOIRES ET ELECTRIQUES	42
FIGURE 8 – LIGNES DIRECTRICES POUR LE TRAITEMENT DES GLIOMES DIFFUS DE L’ADULTE DE L’EANO (D’APRES <i>WELLER ET AL., 2021</i> )	45
TABLE 2 – DESCRIPTION DES STRATEGIES D’IMMUNOTHERAPIES UTILISEES POUR LE TRAITEMENT DES GLIOMES DIFFUS DE L’ADULTE (D’APRES <i>HAN ET AL., 2022</i> )	47
<b>2. DES CELLULES D’ORIGINE DES GLIOMES : LES PROGENITEURS D’OLIGODENDROCYTES</b>	<b>49</b>
FIGURE 9 – DIVERSITE ET FONCTION DES TYPES CELLULAIRES DU PARENCHYME CEREBRAL ADULTE	50
FIGURE 10 – MODELE CELLULAIRE DES GLIOMES DIFFUS DE L’ADULTE (D’APRES <i>TIROSH ET AL., 2016, VENTEICHER ET AL., 2017, NEFTEL ET AL., 2019</i> )	52
TABLE 3 – TABLEAU DES PRINCIPAUX MODELES MURINS GENETIQUEMENT MODIFIES PERMETTANT L’ETUDE DES CELLULES D’ORIGINE DES GLIOMES DIFFUS DE L’ADULTE	55
FIGURE 11 – DEVELOPPEMENT MORPHOLOGIQUE DU FEUILLET DE MYELINE DU SNC (D’APRES <i>SNAIDERO ET SIMONS</i> )	60
FIGURE 12 – DES ORIGINES VARIEES ET SEQUENTIELLES DE LA PRODUCTION DE CELLULES GLIALES (D’APRES <i>KRIEGSTEIN ET ALVAREZ-BUYLLA, 2009 ET TILBORG ET AL., 2018</i> )	62
FIGURE 13 – SPECIFICATION ET DIFFERENCIATION DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE ET SES MARQUEURS (D’APRES <i>NISHIYAMA ET AL., 2021</i> )	65
FIGURE 14 – HETEROGENEITE REGIONALE DE OPCs DE LA MATIERE GRISE ET DE LA MATIERE BLANCHE	68
FIGURE 15 – HETEROGENEITE TRANSCRIPTOMIQUE DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE DU CERVEAU ET DE LA MOELLE EPINIERE AU COURS DU TEMPS (D’APRES <i>MARQUES ET AL., 2016 ET 2018</i> )	71
<b>3. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION CIC : UN IMPORTANT REGULATEUR DE LA VOIE DES MAP KINASES</b>	<b>74</b>
FIGURE 16 – STRUCTURE ET FONCTION DES DOMAINES DU GENE <i>CIC</i> ET DE CES ISOFORMES PROTEIQUES (D’APRES <i>SIMON CARRASCO ET AL., 2018, WONG ET YIP, 2020 ET FORES ET AL., 2017</i> )	75
FIGURE 17 – <i>CIC</i> , UNE PROTEINE REPRIMEE PAR LA VOIE DES MAP KINASES (D’APRES <i>SIMON CARRASCO ET AL., 2018 ET WONG ET YIP, 2020</i> )	79
TABLE 4 – <i>CIC</i> , UNE PROTEINE IMPLIQUEE DANS LA DIFFERENCIATION DE DIVERS ORGANES CHEZ LES MAMMIFERES	81
TABLE 5 – FONCTIONS CEREBRALES DE <i>CIC</i> : DE LA MATURATION DES LIGNAGES NEURAXES A LA COGNITION	84
FIGURE 18 – ALTERATIONS GENETIQUES ET FONCTIONNELLES DE <i>CIC</i> DANS LE CANCER	86

**RESULTATS** **99**

**1. L’EXPRESSION DE *CIC* AUGMENTE AVEC LA MATURATION DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE** **100**

FIGURE 20 – L’EXPRESSION DE *CIC* DANS LES OPCs AUGMENTE DE MANIERE DISCRETE AVEC LE TEMPS..... 101

FIGURE 21 – L’EXPRESSION DE *CIC* EST ASSOCIEE A LA MATURATION DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE..... 102

**2. CARACTERISATION D’UN MODELE MURIN D’INACTIVATION DE *CIC* DANS LES CELLULES D’ORIGINE DES GLIOMES**  
**104**

FIGURE 22 – UN MODELE D’INACTIVATION CONDITIONNELLE ET INDUCTIBLE DE *Cic* DANS LES OPCs : LE MODELE *PDGFRA::CREER<sup>T</sup>; Cic<sup>F</sup>; ROSA26<sup>LSL-YFP</sup>* ..... 105

FIGURE 23 – INSTABILITE DE L’EXPRESSION DE *CIC* CHEZ LES SOURIS *Cic<sup>CKO</sup>* CAUSEE PAR L’INACTIVATION DU DOMAINE HMG ..... 106

FIGURE 24 – LA RECOMBINAISON AU LOCUS *ROSA26YFP* EST SPECIFIQUE DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE. .... 109

**3. CONSEQUENCES DE L’INACTIVATION DE *Cic* DANS LA PHYSIOLOGIE DES OPCs** **110**

FIGURE 25 – L’INACTIVATION DE *Cic* DANS LES OPCs INDUIT UNE ACCUMULATION TRANSITOIRE D’OPCs. .... 111

FIGURE 26 – L’INACTIVATION DE *Cic* DANS LES OPCs ALTERE LA DIFFERENCIATION DES OLIGODENDROCYTES. .... 114

FIGURE 27 – L’INACTIVATION DE *Cic* DANS LES OPCs ALTERE LA MATURATION DES OLIGODENDROCYTES..... 116

FIGURE 28 – CONFIRMATION DE L’ALTERATION DE LA MATURATION PAR LE MARQUEUR OLIG1. .... 118

FIGURE 29 – L’INACTIVATION DE *Cic* DANS LES OPCs ADULTES NE PRESENTE PAS D’EFFET SUR LES POPULATIONS OLIGODENDROCYTAIRES. .... 121

FIGURE 30 – L’INACTIVATION DE *Cic* IN VITRO RECAPITULE LE PHENOTYPE DECRIT IN VIVO. .... 123

**4. MECANISMES MOLECULAIRES DE *CIC* DANS LES OPCs POSTNATAUX : UNE ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE ET DES GENES CIBLES DE *CIC*** **125**

FIGURE 31 – L’INACTIVATION DE *Cic* INDUIT L’EXPRESSION DE LA VOIE WNT, LA MIGRATION CELLULAIRE ET LE DEVELOPPEMENT VASCULAIRE. .... 127

FIGURE 32 – *CIC* SE LIE A DES GENES IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT NEURAL ET VASCULAIRE DANS LES OPCs 131

**5. L’HYPOTHESE D’UN PHENOTYPE VASCULAIRE INDUIT PAR L’INACTIVATION DE *Cic* DANS LES OPCs** **132**

FIGURE 33 – DETECTION DE CELLULES RECOMBINEES PRESENTANT UN PHENOTYPE VASCULAIRE DANS LES SOURIS *Cic<sup>CKO</sup>*. .... 134

FIGURE 34 – L’INACTIVATION DE *Cic* INDUIT L’EXPRESSION DE CES GENES CIBLES DANS LES OLIGODENDROCYTES IMMATURES ET L’INDUCTION DE MARQUEURS VASCULAIRES DANS LES PERICYTES. .... 136

**6. VERS UNE COMPREHENSION DU DEVELOPPEMENT DES OLIGODENDROGLIOMES : UNE ANALYSE DE L’IMPACT DES MUTATIONS *CIC*** **138**

FIGURE 35 – LES ALTERATIONS ASSOCIEES PAR L’INACTIVATION DE *Cic* CHEZ LA SOURIS SONT RETROUVEES DANS LES OLIGODENDROGLIOMES MUTES POUR *CIC*..... 139

TABLE 6 – LES MUTATIONS DU GENE *CIC* NE SONT QUE FAIBLEMENT ASSOCIEES A LA SURVIE GLOBALE. .... 141



# Introduction

---

## 1. *Les tumeurs cérébrales : un contexte tumoral particulier*

---

Affection de longue date de l'homme, le cancer est une maladie causée par le dysfonctionnement de l'homéostasie cellulaire, entraînant une prolifération incontrôlée des cellules. C'est en Afrique du Sud que des chercheurs de l'Université de Witwatersrand découvrent la plus ancienne trace d'une tumeur, sous la forme d'un ostéosarcome fossilisé, chez un hominidé ayant vécu il y a presque deux millions d'années [1]. Le cancer est une maladie ancienne qui doit son nom à Hippocrate (460-370 avant J.C.), célèbre médecin grec qui la nomma d'après la ressemblance macroscopique des tumeurs du sein à la forme du crabe (*carcinos* en grec et *cancer* en latin) [2]. Galien (130-200 après J.C.) confirmera et approfondira près de cinq siècles plus tard cette observation en décrivant une masse centrale prolongée de segments parallèles rappelant le crustacé. Il pensait notamment que la survenue de cancer était due à une accumulation de bile noire provoquant les gonflements, *oncos* en grec, dont la racine désignera plus tard le domaine d'étude de ces maladies [2].

Sur leur site web, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le cancer comme suit : « Cancer est un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. On parle aussi de tumeurs [masse] malignes ou de néoplasmes. L'un des traits caractéristiques du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales qui, au-delà de leur délimitation normale, peuvent envahir des parties du corps adjacentes et essaimer dans d'autres organes formant ce qu'on appelle des métastases. Ces métastases sont la principale cause de décès par cancer. ».

Selon l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC), l'agence de l'OMS spécialisée dans le cancer, ce dernier est la deuxième cause de mortalité mondiale (17%) après les maladies cardiovasculaires [3] ; cependant, les prédictions indiquent que le cancer deviendra la première cause de mortalité à la fin de ce siècle. En 2020, l'incidence<sup>1</sup> mondiale est d'environ 19,3 millions pour 10 millions de morts [3]. Toujours selon l'IARC, cette incidence doublera d'ici 2040, faisant du cancer une préoccupation plus qu'urgente pour les années à venir. Bien que l'incidence ait tendance à augmenter chaque année, force est de constater que le nombre de morts diminue quant à lui notamment grâce à des politiques de dépistages internationales et

---

<sup>1</sup> Incidence : nombre de nouveaux cas d'une maladie par unité de temps (souvent en année).

européennes des agences sanitaires ainsi qu'au développement de thérapies plus ciblées. Parmi les plus fréquents, on retrouve les cancers du sein (2,26M), les cancers du poumon (2,21M) et les cancers colorectaux (1,93M) ; les plus mortels étant de loin les cancers du poumon avec une survie à 5 ans de 13% contre 49% pour les cancers colorectaux [3]. Les cancers représentent une population très hétérogène de maladies dont le pronostic dépend du type de tumeurs. De plus, leur distribution dépend également de l'âge et du sexe de l'individu : on distingue ainsi les tumeurs pédiatriques des tumeurs de l'adulte ainsi que les tumeurs hormonales-dépendantes et non-hormonales-dépendantes. Afin de faciliter leur classification et diagnostic dans un but de traitement, l'OMS, de concert avec des experts académiques et hospitaliers, publie une série de classification par groupe d'organes.

Pour le Système Nerveux Central (SNC), la cinquième édition de la classification des tumeurs vient d'être publiée en juin 2021, précisant et simplifiant la classification précédente en développant une approche intégrative. Depuis la quatrième édition de 2016, le diagnostic des tumeurs et leur classification s'effectuent sur la base de l'histologie des biopsies ainsi que leur profil génétique par la recherche de biomarqueurs. La nouvelle édition précise certains de ces marqueurs et y ajoute des critères dits « désirables » pour le diagnostic comme la présence de certains biomarqueurs ou certains critères histologiques [4]. Elle intègre également l'apport de nouvelles technologies comme le méthylome permettant le diagnostic notamment de gliomes de l'enfant ou encore d'épendymomes chez l'adulte. Nous détaillerons dans cette première partie les caractéristiques épidémiologiques, histologiques et moléculaires des gliomes. Dans un second temps, nous décrirons la vaste hétérogénéité de ces tumeurs et de leurs mécanismes de développement et des possibilités thérapeutiques associées.

## 1.1. Généralités sur les gliomes

Les tumeurs cérébrales représentent un vaste groupe de tumeurs, dont les caractéristiques histologiques, localisation et degré d'agressivité dépendent notamment de leurs cellules d'origine. On distingue ainsi les tumeurs « primitives » dont l'origine est cérébrale, des tumeurs « secondaires ou métastatiques » dont l'origine est périphérique (ex : notamment des métastases des cancers du sein). La diversité et la localisation des tumeurs cérébrales du SNC chez l'adulte sont décrites en **Figure 1**.

Entre 2014 et 2018, le *Central Brain Tumors Registry of United States* (CBTRUS), le registre national américain des tumeurs primitives du SNC, nous indique une incidence de 24,25 cas pour 100 000 individus [5]. Ceci fait de ces tumeurs, une maladie rare chez l'adulte en les plaçant à huitième place des cancers en termes de fréquence (40 ans et plus). D'ailleurs, même si 70% des cas sont bénins chez l'adulte

(les méningiomes représentant 39% des tumeurs), le pronostic est sombre pour les 30% restants, avec une survie après 5 ans de 35,6% [5]. Parmi elles, les gliomes diffus qui représentent 23,5% des tumeurs cérébrales comptent pour 80% des tumeurs malignes [5] (les glioblastomes comptant pour 50% d'entre elles) et ce sont celles qui nous intéresseront dans ce manuscrit.

Les tumeurs pédiatriques du SNC constituent environ 6% du total des tumeurs [5]. Chez l'enfant de 0 à 14 ans, les tumeurs cérébrales représentent la première cause de mortalité par cancer avant la leucémie [5]. Les tumeurs les plus fréquentes sont les gliomes pontiques intrinsèques diffus (21,6%), les astrocytomes pilocytiques (15,2%) et les tumeurs pituitaires (14,3%) [5]. Chez l'adulte, les méningiomes représentent la majorité écrasante des tumeurs du SNC (39%), suivis des tumeurs pituitaires (17,1%) et des glioblastomes (14,3%) (**Figure 1**) [5].

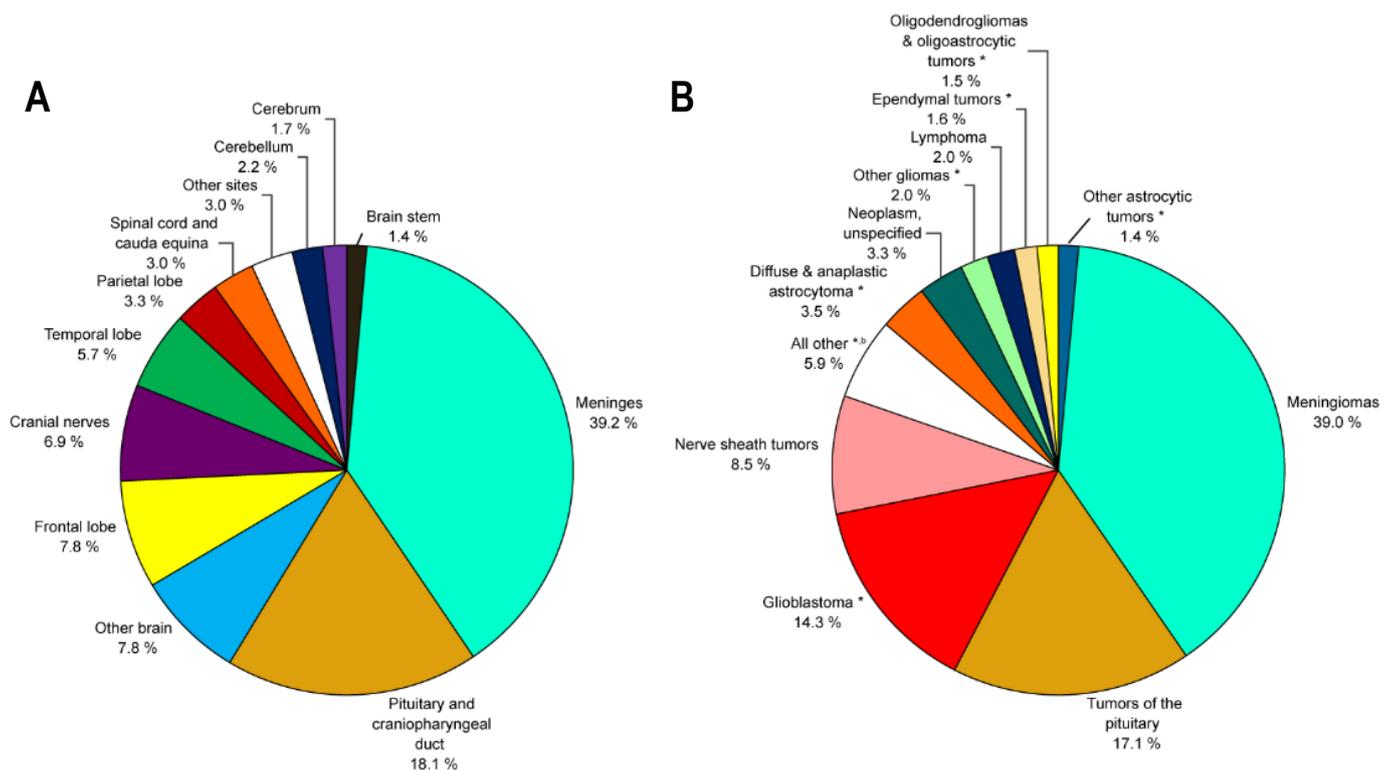


Figure 1 – Diversité et localisation des tumeurs primitives du SNC chez l'adulte (*Ostrom et al., 2021*)

**A.** Localisation des tumeurs cérébrales primitives. **B.** Diversité des tumeurs cérébrales primitives. Parmi les tumeurs cérébrales primitives, qui ont pour origine le parenchyme cérébral, on retrouve majoritairement : (i) les méningiomes qui constituent pour la plupart des tumeurs bénignes, dérivées des cellules méningées. (ii) les gliomes dérivant des cellules gliales, qui constituent le groupe le plus fréquent de tumeurs malignes, lui-même divisé en trois sous-groupes, les oligodendrogliomes, les astrocytomes et les glioblastomes. (iii) enfin on retrouve également des lymphomes, des épendymomes, les gliomes chordoïdes, les tumeurs de la glande pituitaire ainsi que les tumeurs dérivées des nerfs (schwannomes/neurinomes, neurofibromes etc.).

Les tumeurs primitives sont classées en grade permettant de juger la progression de son développement. Dans la classification de 2016, un système

homogène de grade permettait de comparer la progression des différents types de tumeurs cérébrales entre elles notamment d'après leur histologie. Cependant, l'hétérogénéité de ces tumeurs ne permettait pas de corrélérer correctement les comportements cliniques d'un groupe à l'autre. Par exemple, le grade III (2016) associait à la tumeur une caractéristique d'anaplasie, cependant, le méningiome anaplasique était bien moins prolifératif que l'astrocytome anaplasique, rendant difficile la comparaison intergroupe [4]. Le grade I correspondait alors à des tumeurs bénignes et le grade IV à des stades malins au pronostic sombre. La classification de 2021 introduit un système de grade relatif à chaque type tumoral comme il est pratiqué pour les tumeurs périphériques. Le grade 1 correspond aux tumeurs bénignes comme les neurinomes tandis que les grades 2, 3 et 4 sont réservés à des tumeurs malignes comme le glioblastome (grade 4). Les tumeurs de bas grade peuvent cependant évoluer vers des tumeurs dites de haut grade.

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons en particulier aux gliomes de l'adulte (excluant les gliomes circonscrits, les tumeurs neuronales et épendymaires). Les gliomes de l'adulte correspondent selon la classification OMS 2021 aux astrocytomes, aux glioblastomes (GBMs) et enfin aux oligodendrogliomes (ODGs) qui nous intéresseront particulièrement. On qualifie ces gliomes de l'adulte de diffus, car ils progressent de manière régulière en envahissant le parenchyme cérébral en opposition aux gliomes circonscrits bien définis.

### 1.1.1 *Caractéristiques des gliomes : étiologie et épidémiologie*

Comme pour toutes les tumeurs cérébrales, ces tumeurs tirent leur nom de leurs cellules d'origines bien qu'elles ne soient pas entièrement constituées de ces populations cellulaires. Les gliomes sont des tumeurs cérébrales dérivant des cellules gliales qui constituent avec les neurones le parenchyme cérébral. La glie exerce divers rôles de soutien pour les neurones que nous détaillerons dans la partie suivante.

L'Institut National contre le Cancer (INCa) nous indique que les symptômes liés à la présence d'une tumeur cérébrale sont très variés. Ils dépendent de la taille et de la localisation de la tumeur et ne sont pas forcément visibles. C'est notamment ce développement insidieux et diffus qui rend le pronostic de ces tumeurs tardif. En effet, lors de l'examen d'imagerie médicale, on remarque que la tumeur a souvent une taille déjà très importante. On note tout de même trois types de symptômes : des céphalées (liées à la pression exercée par la tumeur), des crises d'épilepsie et parfois des troubles cognitifs en fonction de la localisation. On effectue alors une IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) qui permet de confirmer le diagnostic qui sera précisé, le cas échéant, par une biopsie. Pour la prise en charge, la Haute Autorité de Santé (HAS) nous précise le protocole : après examen IRM, la tumeur est réséquée au maximum par intervention chirurgicale à condition qu'elle soit

opérable. Si elle ne l'est pas, on réalise une biopsie stéréotaxique<sup>2</sup> afin d'obtenir un échantillon pour le diagnostic définitif. Les examens histologiques et moléculaires permettant de préciser le diagnostic détermineront les détails de la marche à suivre.

Comme nous l'avons décrit plus haut, les gliomes regroupent les astrocytomes, les oligodendrogliomes ainsi que les glioblastomes. Chacun de ces sous-types présente des caractéristiques moléculaires, une incidence et un pronostic propres illustrés dans la **Table 1**. permettant au praticien de réaliser le diagnostic.

	Oligodendrogliome	Astrocytome	Glioblastome
	IDH1/2 muté		IDH1/2 wildtype
	1p/19q co-délétés	1p/19q intact	
Grades	2, 3	2, 3, 4	4
Critères désirables	CIC pTERT FUBP1 NOTCH1	ATRX TP53 CDKN2A/B	pTERT Amplification EGFR/PDGFR NF1 TP53 +7/-10 PTEN
Âge médian	45 ans	38 ans	65 ans
Survie globale	8-16 ans	6,3 ans	8-15 mois
Occurrence (/gliomes malins)	5,2%	11,9%	49,1%

Table 1 – Classification de l'OMS 2021 des gliomes diffus de l'adulte (Louis et al., 2021)

Les gliomes de l'adulte se distinguent sur le plan génétique et clinique. On peut distinguer les gliomes de *bas grade* (2, 3 : oligodendrogliomes et astrocytomes) des gliomes de *haut grade* (4 : glioblastomes et les astrocytomes de grade 4). Les gliomes de bas grade sont diagnostiqués par la présence de mutations mutuellement exclusives dans les gènes codant l'isocitrate déshydrogénase *IDH1* ou *IDH2*. De plus, les oligodendrogliomes doivent présenter une co-délétion hétérozygote des bras chromosomiques 1p et 19q. Les critères désirables consistent en la présence de mutations ou d'altérations génétiques permettant d'affiner le diagnostic des gliomes. L'âge médian au diagnostic est inversement proportionnel au pronostic de survie : plus le gliome apparaît tardivement et plus son pronostic associé est sombre allant de quelques mois pour le glioblastome à plusieurs années plus les bas grades.

Comme nous pouvons le constater, le pronostic des ODGs est le meilleur des trois groupes, mais également le plus variable. Cette variabilité est due à l'hétérogénéité de diagnostic causée par les précédentes classifications distinguant les ODGs de bas grade (II) et de haut grade (III) pour lesquels la survie globale est respectivement de 16 et 8 ans [5]. De plus, on constate également que les ODGs sont les tumeurs les moins agressives et les moins fréquentes, représentant environ 5% des gliomes malins contre 49,1% pour les GBMs qui constituent le groupe le plus agressif ; les astrocytomes représentent un groupe intermédiaire en termes

<sup>2</sup> Stéréotaxie : technique de neurochirurgie permettant la localisation précise d'une zone à l'aide d'un cadran tridimensionnel.

d'occurrence et d'agressivité [5]. Des caractéristiques spécifiques découlant des caractéristiques histologiques et moléculaires de ces tumeurs que nous allons détailler à présent.

### 1.1.2 Spécificités histologiques des gliomes diffus de l'adulte

Pour les tumeurs du SNC, l'examen histologique constitue une étape importante du diagnostic. L'histologie des gliomes diffus est assez bien définie avec des caractéristiques spécifiques pour les différents types. Cependant, l'hétérogénéité histologique de ces tumeurs ne rend pas toujours le diagnostic tissulaire évident.

Au niveau histologique, les ODGs présentent une caractéristique particulière par la présence d'un espace lacunaire<sup>3</sup> blanchâtre au niveau périnucléaire (**Figure 2**). Les noyaux des cellules tumorales sont très arrondis, ce qui est caractéristique des oligodendrocytes. Les vaisseaux sanguins des ODGs sont arciformes<sup>4</sup>. Comme pour tous les gliomes, la densité cellulaire augmente avec le grade de la tumeur ainsi que la présence de nécrose et le développement de la vascularisation. De leur côté, les astrocytomes constituent un ensemble de tumeurs très fibreuses avec une densité cellulaire variable présentant une anisocaryose<sup>5</sup> des noyaux aux contours irréguliers. On observe également des anomalies mitotiques, des vaisseaux fusiformes et parfois la présence de cellules géantes. Quant aux GBMs, ils présentent les caractéristiques histologiques les plus hétérogènes. On retrouve parfois

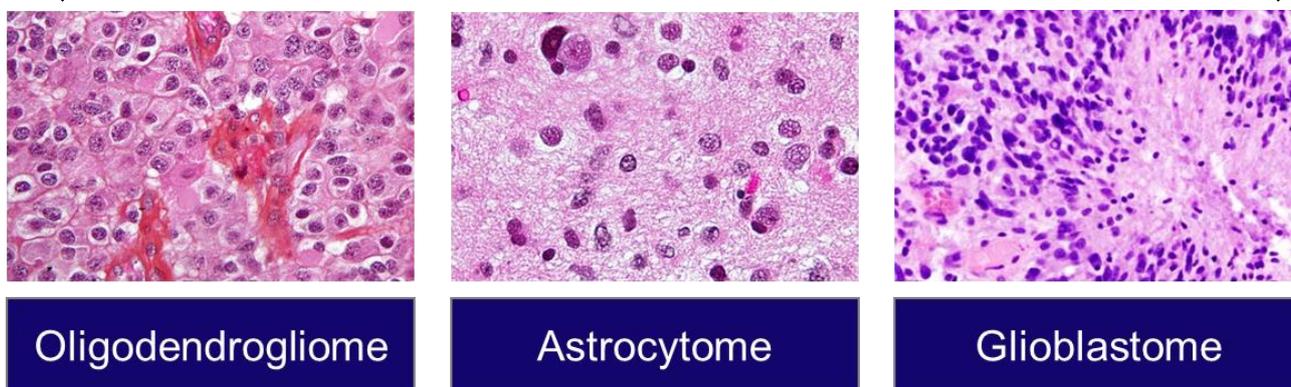


Figure 2 – Caractéristiques histologiques des gliomes diffus de l'adulte (Dr. Karima Mokhtari, AP-HP)

Les gliomes de l'adulte se distinguent également sur le plan histologique. Ils présentent des caractéristiques prolifératives mesurées par des index de mitoses, mais également des nécroses, des altérations vasculaires et des changements cytomorphologiques propres. Jusqu'à l'avènement des méthodes de diagnostic moléculaires, l'histologie représentait le standard de diagnostic. Cependant, l'hétérogénéité des caractéristiques histologiques de ces tumeurs rendait difficile le diagnostic.

des cellules géantes, des renforcements palissadiques tubulaires (**Figure 2**), une

<sup>3</sup> Lacunaire : espace présentant une lacune, un vide

<sup>4</sup> Arciforme : en forme d'arc

<sup>5</sup> Anisocaryose : variété et inégalité de la taille des noyaux au sein d'un échantillon

hypercellularité, des prolongements fibrillaires, des zones de nécroses (**Figure 2**) et une prolifération endo-capillaire importante constituant parfois une masse tumorale aussi importante que le reste de la tumeur.

Couplée à l'examen histologique, l'analyse des altérations génétiques des gliomes permet de réaliser un diagnostic intégré. Nous détaillerons dans la partie suivante les altérations génétiques retrouvées en particulier dans les oligodendrogliomes.

### 1.1.3 *Altérations génétiques des oligodendrogliomes*

Les altérations génétiques des ODGs sont particulièrement bien décrites depuis l'avènement des techniques de séquençage à haut débit :

Les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* : on retrouve de manière systématique une mutation hétérozygote mutuellement exclusive des gènes *IDH1* et *IDH2* [6]. Les données du réseau POLA, un réseau national français pour la prise en charge des ODGs, auquel le laboratoire est intégré, nous indiquent que 93% des mutations *IDH* correspondent au gène *IDH1* dont 97% correspondent en particulier à la substitution R132H (données du laboratoire). Cette mutation entraîne un changement d'activité catalytique de l'isocitrate déshydrogénase. En effet, cette dernière permet la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate. La mutation R132H entraîne un changement de conformation du site catalytique convertissant le produit de la réaction précédente, l' $\alpha$ -cétoglutarate en R-2-hydroxyglutarate (2HG) [6], [7]. Cet oncométabolite induit des changements majeurs dans la cellule tumorale et notamment des altérations épigénétiques et un déséquilibre de l'état redox [8] décrits dans la **Figure 3** ci-dessous.

La co-délétion 1p/19q : ce qui distingue notamment les astrocytomes et ODGs, tous deux *IDH*-mutés, est la co-délétion hétérozygote des bras chromosomiques 1p et 19q des ODGs [9]. Avec les mutations des gènes *IDH*, ces deux altérations génétiques définissent le diagnostic moléculaire de ces tumeurs [4]. Alors qu'elle a été découverte il y a plus de vingt ans, les conséquences de cette altération restent méconnues, notamment de par la difficulté de modéliser une telle altération chez la souris. Néanmoins, il est connu que cette altération est de bon pronostic, car associée à la sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie, expliquant ainsi l'issue plus favorable pour les patients atteints d'ODGs [10].

Les mutations dans le promoteur du gène *TERT* : des mutations dans le promoteur du gène *TERT* (*pTERT*) codant la télomérase, C228T (75%) et C250T (25%) mutuellement exclusives, ont été également décrites dans 98% des ODGs (ainsi que dans 70% des GBMs) [11]. Ces mutations entraînent une surexpression du gène *TERT* [11]. Étant donné que le rôle de la télomérase est de permettre la réplication

des télomères afin d'assurer l'immortalisation des cellules, on comprend aisément le rôle d'une telle surexpression dans le développement des ODGs.

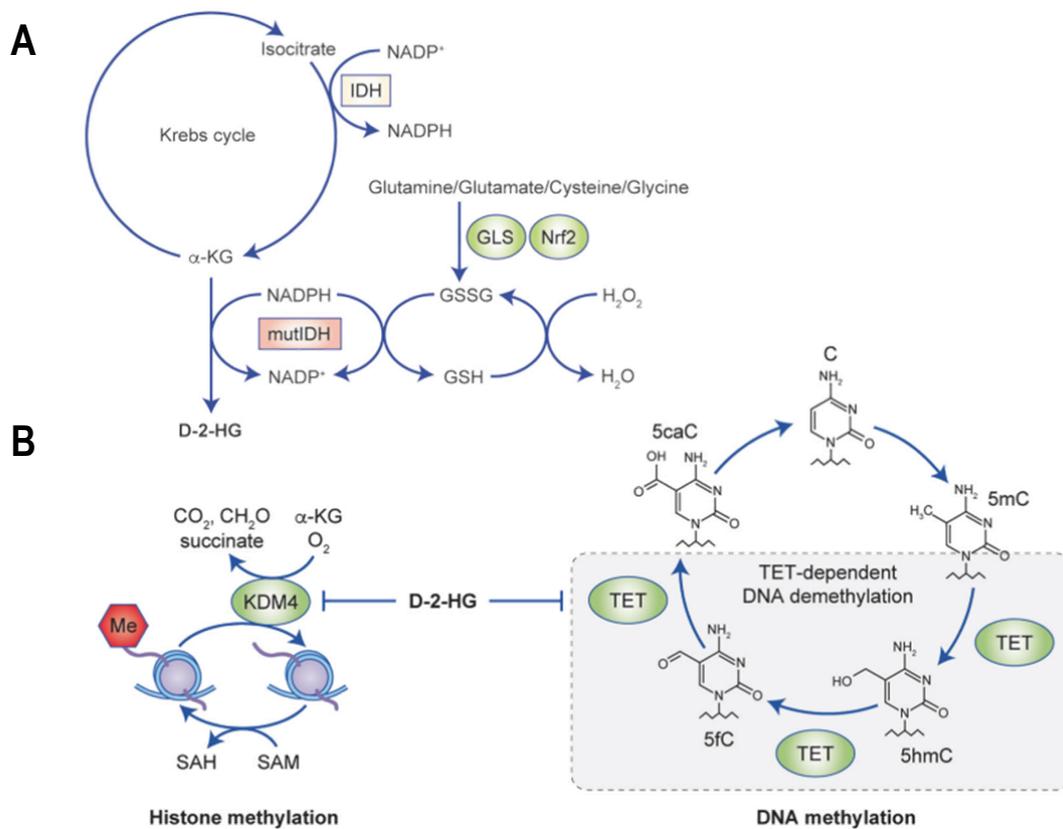


Figure 3 – Fonctions du R-2-hydroxyglutarate dans le métabolisme, l'homéostasie redox et la reprogrammation épigénétique (Han et al., 2020)

La production de 2HG suite à l'acquisition d'une mutation *IDH* induit de nombreuses modifications cellulaires. **A.** La production de 2HG entraîne une diminution de la quantité de NADPH. Cela entraîne une diminution de l'état réduit de la glutathion synthase (GSH) conduisant à une accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et donc une augmentation de l'état d'oxydation. **B.** Enfin, le 2HG induit également des modulations de l'expression génique en favorisant la méthylation des histones par sa qualité d'inhibiteur compétitif des dioxygénases α-cétoglutarate-dépendantes (KDM4) mais également de l'ADN en inhibant les enzymes TET responsables de l'hydroxylation des 5-méthyl-Cytosine.

Les mutations des gènes *FUBP1* et *CIC* : Bettgowda et al., sont les premiers à démontrer la présence de mutations dans les gènes *FUBP1* (Far Upstream element Binding Protein 1) et *CIC* (Capicua) dans les oligodendrogliomes [12]. Les deux gènes codent des facteurs de transcription dont les mutations dans les ODGs sont inactivatrices [12], [13], [14]. Des mutations inactivatrices du gène *FUBP1* sont retrouvées dans environ 15% des ODGs [12], [15], [16], tandis que des mutations inactivatrices du gène *CIC* sont retrouvées dans 50 à 70% des cas [12], [14], [17]. Il est intéressant de noter que les gènes *FUBP1* et *CIC* sont respectivement situés sur les bras chromosomiques 1p et 19q, entraînant ainsi une première délétion hétérozygote des deux gènes. Ainsi, les mutations de ces gènes retrouvées dans les

ODGs entraînent une inactivation homozygote de ces derniers. FUBP1 est surexprimé dans plusieurs types de cancer et ainsi décrit comme un oncogène [18], [19]. Cependant, l'absence de son expression dans les ODGs suggère plutôt un rôle suppresseur de tumeur [12], [15], [20]. Une étude démontre par ailleurs que la perte de FUBP1 dans un modèle murin d'inactivation altère la différenciation terminale de progéniteurs neuraux [20]. Cumulée à la présence des mutations *IDH1<sup>R132H</sup>* et *PIK3CA<sup>H1047R</sup>*, la perte de FUBP1 induit la prolifération des progéniteurs neuraux et le développement de tumeurs *in vivo* [20]. Les conséquences des mutations inactivatrices de *CIC* seront quant à elles discutées dans la dernière partie de l'introduction.

Autres altérations génétiques : une étude de la cohorte d'ODGs du Cancer Genome Atlas (TCGA) montrent également des mutations dans les gènes *PIK3CA* (20%) et *NOTCH1* (31%) [21] ainsi que de nombreuses autres à des fréquences inférieures à 5%. Les mutations du gène *NOTCH1* servent comme les mutations des gènes *FUBP1* et *CIC* de critères désirables pour le diagnostic des ODGs. Cet ensemble d'altérations génétiques, résumées en **Figure 4**, distinguent les ODGs des autres types de gliomes.

Au-delà des altérations histologique, clinique et génétiques décrites précédemment, les gliomes présentent une hétérogénéité moléculaire importante aux échelles génétiques, transcriptomique et méthylomique. Une hétérogénéité qui se reflète également au niveau de leurs mécanismes de développement que nous nous proposons de détailler dans cette seconde partie.

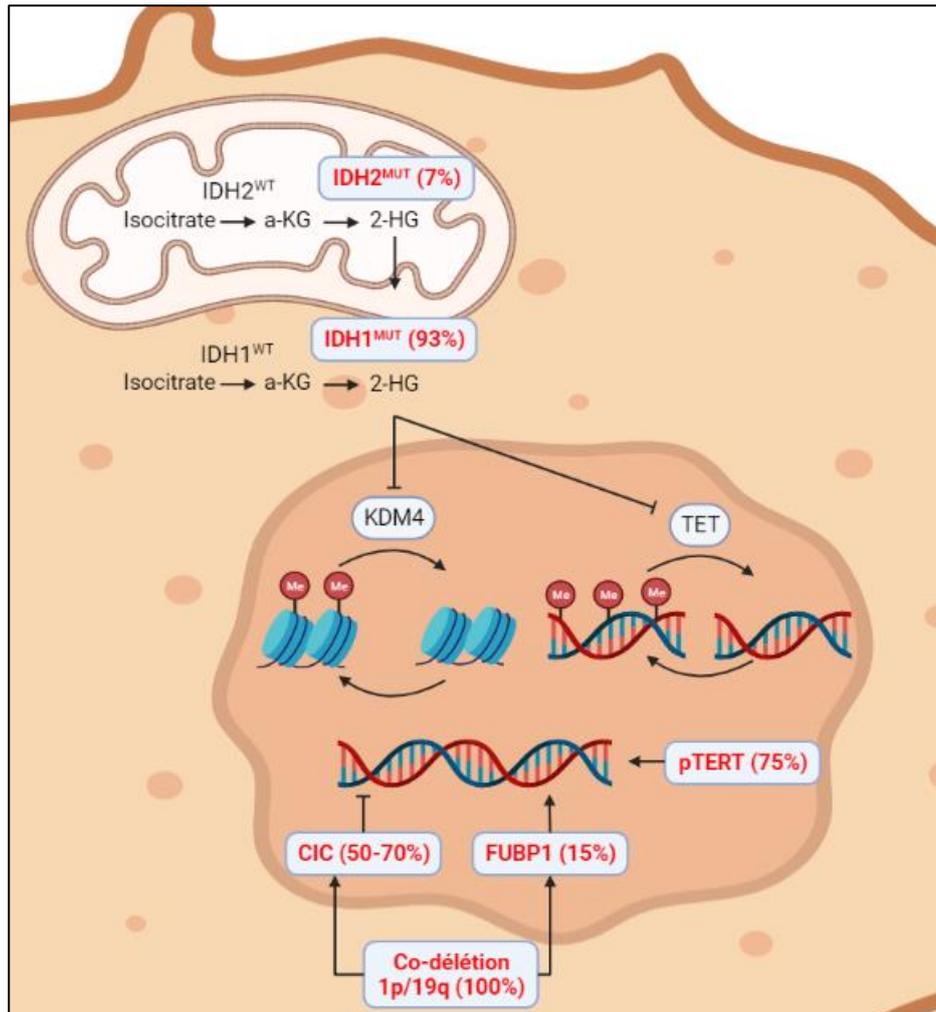


Figure 4 – Altérations génétiques les plus fréquentes retrouvées dans les oligodendrogliomes

Définies par une signature unique des mutations des gènes *IDH1/2* et une co-délétion hétérozygote des bras chromosomiques 1p/19q, les oligodendrogliomes présentent également d'autres mutations permettant d'affiner le diagnostic génétique à savoir : des mutations inactivatrices des gènes *CIC* (50-70%) et *FUBP1* (15%) ainsi que des mutations du promoteur du gène *TERT* (75%), on retrouve également des mutations dans les gènes *PIK3CA* (20%) et *NOTCH1* (31%) non-décrites sur la figure.

## 1.2. *Hétérogénéité des gliomes et de leurs mécanismes de développement*

Les tumeurs constituent un ensemble de cellules dont l'homéostasie n'est plus respectée. La prolifération, la différenciation, le métabolisme et les mécanismes de mort cellulaire sont des processus cellulaires extrêmement régulés permettant le développement correct d'un organisme. Les cellules tumorales parviennent à échapper à cette régulation par la survenue d'altérations de leur patrimoine génétique. Ces altérations peuvent être causées par des mutations génétiques, héréditaires ou spontanées, induisant des changements dans la séquence nucléotidique de la cellule : on parle alors de substitution pour un changement de séquence d'un nucléotide comme c'est le cas pour la mutation R132H du gène *IDH1* dans les oligodendrogliomes et les astrocytomes [6]. On retrouve également des additions ou des délétions de séquences nucléotidiques comme pour la co-délétion hétérozygote des bras chromosomiques 1p et 19q dans les oligodendrogliomes [9].

D'ordinaire, ces mutations sont corrigées par les systèmes de réparation de l'ADN, mais il arrive que des cellules échappent à ce contrôle accumulant ainsi les mutations les transformant en cellules tumorales initiatrices. Cependant, les technologies de séquençage à haut débit nous révèlent que les mécanismes à l'initiation tumorale seraient plus complexes que cela. En effet, un commentaire publié dans *Cancer Cell* en 2021 décrit des études de séquençages réalisées dans différents organes sains et révèlent la présence de mutations somatiques normalement retrouvées dans les tumeurs associées à ses tissus [22]. Une étude publiée dans *Nature* démontrait déjà en 2018, la présence de faibles taux de mutations retrouvées dans le glioblastome au niveau de la Zone Sous-Ventriculaire (SVZ, *Subventricular Zone*), décrite comme un des sites d'origine de ces tumeurs [23]. Ces informations nous incitent à adopter une vision plus *darwinienne* du cancer, dont l'évolution serait le résultat de pressions de sélection et d'accumulations d'évènements mutationnels bien moins linéaires qu'une simple relation de cause à effet reliant directement les mutations à l'apparition de tumeurs.

Dans la même idée d'évolution, il est intéressant de faire le parallèle entre le développement d'une tumeur et celle d'un organisme. Alors que cet amas cellulaire que constitue une tumeur peut sembler anarchique, les tumeurs et notamment les gliomes, sont particulièrement organisés et leur composante cellulaire hiérarchisée. Vers la fin des années 2000, émerge le concept de « Cellules Souches Cancéreuses » (CSC, *Cancer Stem Cells*), qui de manière homologue aux Cellules Souches Neurales (NSC, *Neural Stem Cells*), sont capables d'auto-renouvellement, de produire des types cellulaires différenciés et de reconstituer l'entièreté d'une tumeur [24]. Ces CSCs seraient également à l'origine de la difficulté de traitement des gliomes, car résistantes à la radiothérapie par une activation accrue des mécanismes de réparation de l'ADN [25]. En outre, les cellules tumorales n'inventent pas de nouveaux

mécanismes pour se développer. Elles se contentent de détourner des processus physiologiques à leur avantage par le biais des mutations.

Aujourd'hui encore, les étapes initiatrices du développement des gliomes sont méconnues, c'est pourquoi l'objectif de mes travaux de thèse est d'apporter quelques éléments de réponse, en particulier dans le développement des oligodendrogliomes. Nous développerons dans cette partie la diversité moléculaire des gliomes et de leurs mécanismes de développement notamment via leurs interactions avec le microenvironnement tumoral et les neurones.

### 1.2.1 *L'hétérogénéité moléculaire des gliomes*

Les gliomes et les GBMs, en particulier, présentent une vaste diversité inter-tumorale que *Verhaak et al.*, [26] ont divisée par analyse génomique et transcriptomique, en quatre sous-groupes moléculaires : les groupes « proneuraux » (amplification du gène *PDGFRA* et mutations du gène *IDH1*), « neuraux » (expression des gènes *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* et *SLC12A5*), « classiques » (amplification du gène *EGFR*, gain du chromosome 7 et perte du 10) et enfin « mésenchymateux » (délétion du gène *NF1* et mutations du gène *PTEN*). Ces groupes moléculaires étaient corrélés à un pronostic clinique : les sous-types proneuraux/neuraux présentaient les meilleures réponses aux traitements tandis que les sous-types classiques et mésenchymateux nécessitaient des traitements plus agressifs ; le sous-type mésenchymateux étant décrit comme le plus agressif [26]. Les signatures génétiques et profils d'expression de ces sous-types étaient associés à des profils transcriptomiques de cellules saines du parenchyme cérébral. Le type proneural correspondait à un profil oligodendrocytaire, les types classiques et neuraux à un profil astrocytaire et le type mésenchymateux à un profil glial mixte [26]. Ces données laissaient suggérer une origine cellulaire différente de ces types de GBMs.

Cependant, cette classification présente quelques limitations. La première étant qu'à l'époque de l'étude, les GBMs pouvaient présenter des mutations *IDH1*, on parlait de « GBMs secondaires » qui correspondent aujourd'hui à des astrocytomes de grade 4. Le groupe publiera d'ailleurs quelques années plus tard une seconde étude dans laquelle ils n'incluront que des GBMs sans mutations *IDH1* et élimineront le type « neural » décrit comme une contamination non tumorale des marges d'exérèse des échantillons [27]. Une deuxième limitation est due à la plasticité cellulaire des GBMs. Bien que les types de GBMs sont associés à un pronostic clinique spécifique, ces prévisions ne sont pas utilisées en clinique, car 63% des GBMs présentent un changement de type à la récurrence après traitement [28]. Les types proneuraux notamment ont tendance à migrer vers un type mésenchymateux qui représente le type au pire pronostic, mais également le type de GBM le plus stable après récurrence [28].

Ces observations nous démontrent la nécessité de corrélérer les types de GBMs au pronostic afin de les rendre cliniquement pertinents. C'est ce que propose l'étude multi-omiques de *Park et al.*, [29] qui sur la base d'analyses transcriptomiques, méthylomiques et radiologique ont attribué un score pronostic à une liste de 80 gènes exprimés dans les GBMs. Ils définissent trois groupes prédictifs : invasif (surexprimant *PDPN*, pronostic sombre), intermédiaire et mitotique (surexprimant *TMEM100*, pronostic favorable) [29]. Le groupe mitotique est enrichi en méthylation du promoteur du gène *MGMT* associé à une meilleure réponse au traitement dans les glioblastomes [30]. Toutefois, cette classification risque également de présenter des limites de prédiction pronostique, car en plus de l'hétérogénéité inter-tumorale, les gliomes présentent une hétérogénéité intra-tumorale révélée par séquençage transcriptomique à l'échelle de la cellule unique (*Single-cell RNA-Seq*). L'accès à cette échelle de précision encore inédite a mis en évidence la nécessité de développer des approches ciblées par patient sous forme de médecine personnalisée [31]. Cette technique a permis la description du contenu cellulaire des gliomes et d'émettre des hypothèses sur leur cellule d'origine. Nous développerons ces études et leur contribution à la description des cellules d'origines des gliomes dans la partie correspondante.

Tout comme les GBMs, les ODGs présentent également une hétérogénéité inter-tumorale. Une étude à laquelle a participé le laboratoire, intégrant analyses génomique, transcriptomique et méthylomique, décrit pour la première fois trois types d'oligodendrogliomes [32]. Le groupe O1 présente un profil transcriptomique de progéniteurs d'oligodendrocytes et les caractéristiques cliniques les plus agressives. Il est associé à une activation de *MYC* causé par des gains et une hypométhylation du gène [32]. Les groupes O2 et O3 expriment quant à eux des profils transcriptomiques neuronaux et oligodendrocytaires et présentent des caractéristiques cliniques similaires de meilleur pronostic que le groupe O1 [32].

L'intérêt majeur de la description de cette hétérogénéité inter-tumorale est de décrire la diversité des mécanismes de développement des gliomes et de permettre l'émergence de thérapies ciblées. Cette hétérogénéité se retrouve également au niveau des interactions des gliomes avec le micro-environnement tumoral que nous nous proposons de décrire à présent.

### 1.2.2 Interaction des cellules tumorales avec le micro-environnement

L'étude du microenvironnement tumoral (TME, *Tumor Microenvironnement*) a pris une place importante ces dernières années dans la recherche sur le développement des gliomes. D'abord centrés sur la génétique de ces tumeurs, les chercheurs reconnaissent aujourd'hui la place capitale des interactions des cellules tumorales avec l'environnement extracellulaire, immunitaire et vasculaire pour leur développement. Le TME des gliomes est constitué de cellules non néoplasiques pouvant constituer jusqu'à 30% de la masse tumorale [33]. Il inclut une composante cellulaire et une composante sécrétoire et matricielle. Au niveau cellulaire, on retrouve des cellules du parenchyme cérébral comme les neurones et les cellules gliales, mais aussi des cellules immunitaires comme la microglie, des monocytes et macrophages périphériques infiltrant (dénommés TAM, *Tumor Associated Macrophages*), des lymphocytes ainsi que des cellules vasculaires comme les cellules endothéliales et les péricytes [33], [34]. Dans les gliomes, ces cellules sécrètent des cytokines promouvant la prolifération et l'invasion des cellules tumorales, mais également des remodelages de la matrice extracellulaire et de l'angiogenèse au profit du développement tumoral. Ces différents mécanismes ont été théorisés sous le concept de « niches tumorales ». Développé originellement pour décrire l'environnement neurogénique des NSCs dans la SVZ en contact avec la vascularisation, le concept de niches tumorales pour les CSCs a longtemps été débattu [35], [36]. *Schiffer et al.*, décrivent dans une analyse histologique extensive l'existence de ces niches tumorales dans le glioblastome [37]. On décrit trois types de niches tumorales correspondant à trois mécanismes de développement : périvasculaire, invasive et hypoxique détaillée en **Figure 5** [35]–[37]. Dans cette partie nous présenterons succinctement les rôles du système immunitaire, des cellules vasculaires et des neurones dans le développement des gliomes.

#### *Un environnement immunosuppresseur des gliomes*

Pour échapper au système immunitaire, les gliomes développent un processus en trois phases appelé « édition immunitaire » : une phase d'élimination, d'équilibre et d'échappement [38]. Lors de la première phase, le système immunitaire reconnaît les néo-antigènes des cellules tumorales et parvient à les éliminer. Commence alors une forme de résistance des cellules tumorales qui sécrètent des facteurs anti-inflammatoires. Enfin vient la phase d'épuisement du système immunitaire pendant laquelle la tumeur se développe et favorise le recrutement de cellules myéloïdes immunosuppressives [39]. Les gliomes sont définis comme des « tumeurs froides » à cause de cet environnement immunosuppresseur. Un environnement notamment provoqué par la sécrétion par les TAMs de cytokines anti-inflammatoires et pro-tumorales comme le TGF- $\beta$ , l'IL-10 ou la Prostaglandine E2 [39].

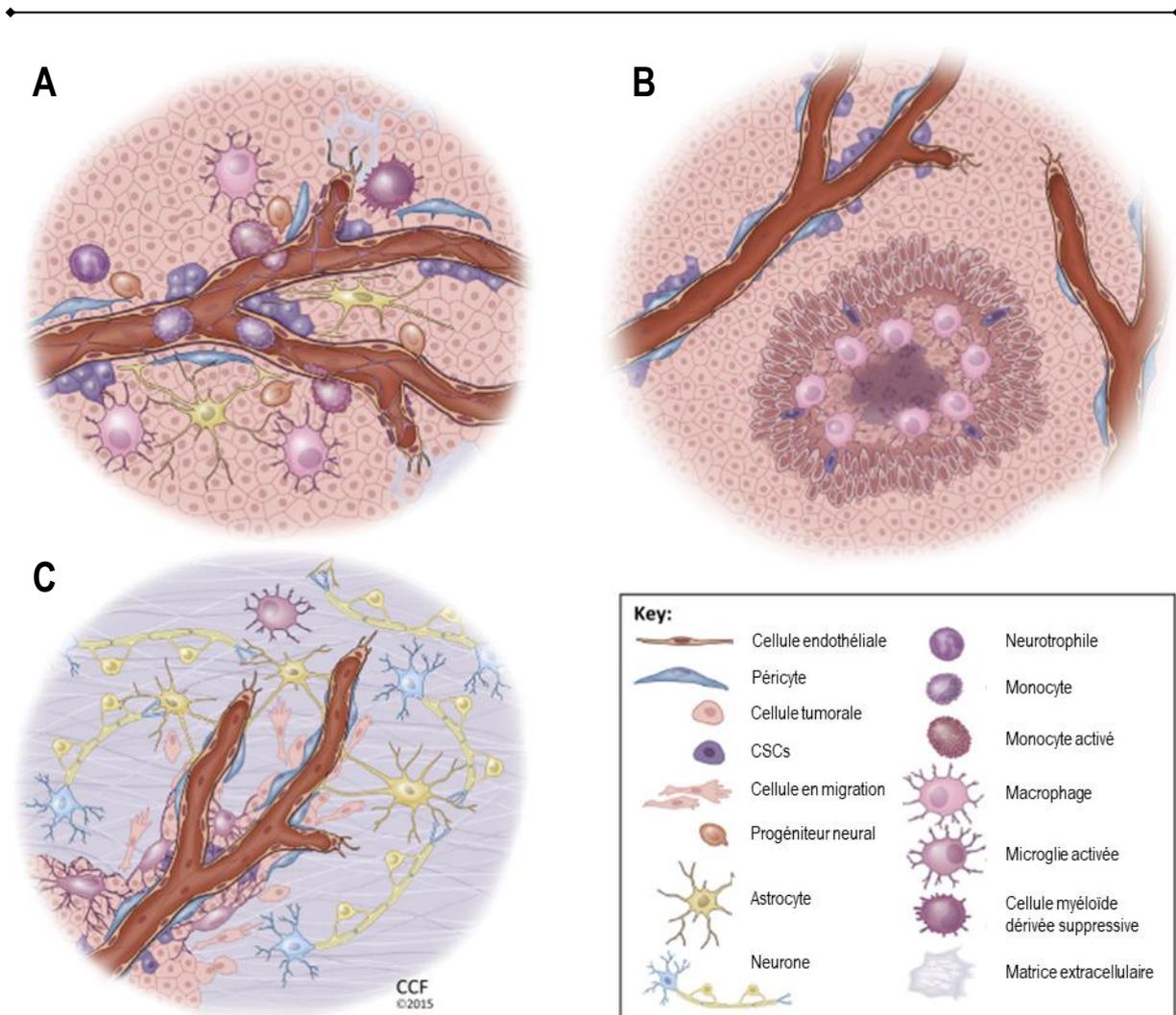


Figure 5 – Concepts de niche tumorales dans le développement des gliomes (*Hambardzumyan et Bergers, 2015*)

**A.** La niche périvasculaire. Les cellules non néoplasiques interagissent avec les cellules tumorales pour créer un environnement vasculaire spécialisé permettant le support trophique des CSCs, leur maintenance et leur survie. Les cellules immunitaires sont recrutées par les cellules tumorales et les CSCs ; elles sécrètent des facteurs pro-angiogéniques permettant le développement de la niche périvasculaire. **B.** La niche hypoxique. Les cœurs nécrotiques des tumeurs sont cerclés d'une palissade cellulaire, constituant un milieu pauvre en oxygène (hypoxique). Cette hypoxie induit en outre l'expression du facteur HIF-1 $\alpha$  promouvant l'invasion et l'expansion des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse. **C.** La niche invasive. Contrairement à la niche périvasculaire, la niche invasive est un environnement utilisant les vaisseaux sanguins établis permettant l'invasion des zones non tumorales. CSCs : Cancer Stem Cells

En effet, les cellules de gliomes promeuvent cet état inflammatoire qui a pour conséquence de diminuer l'expression des CMH de classe II des TAMs et microglies [40]. De cette manière, les cellules immunitaires ne pourront plus être activées et dirigées contre les cellules tumorales, permettant ainsi la prolifération et l'invasion de ces dernières : c'est l'échappement immunitaire. Les TAMs constituent jusqu'à un tiers du contenu cellulaire des gliomes et leur densité est associée à une progression en grade, l'invasion et un mauvais pronostic [41].

Un autre mécanisme majeur d'immunosuppression retrouvé dans les gliomes est l'inhibition par les cellules tumorales, des lymphocytes T par l'expression du ligand PD-L1 [42], [43]. L'expression de PD-L1 est associée à un mauvais pronostic dans les GBMs [43]. Ce ligand active le récepteur PD-1 des lymphocytes T entraînant une diminution de la signalisation du TCR et donc de la réponse cytotoxique (**Figure 6**). Ainsi le système immunitaire initialement programmé pour éliminer les cellules tumorales se retrouve détourné et même recruté afin de promouvoir leur progression. De nouveau, les gliomes font preuve d'hétérogénéité par rapport à ce contenu immunitaire, les ODGs présentant le plus de cellules dendritiques et de monocytes tandis que les GBMs présentent le plus de macrophages et lymphocytes T régulateurs, expliquant le contexte immunosuppresseur plus important de ces derniers [44].

### *Des mécanismes d'invasion et d'angiogenèse*

Un autre système détourné par les tumeurs au profit de leur développement, en lien avec le précédent, est le système vasculaire. En effet, les microglies présentes au sein de la tumeur favorisent l'angiogenèse tumorale par la sécrétion de chimiokines telle que CXCL2 [45]. *Cheng et al.*, démontrent une capacité des CSCs de gliomes de se différencier en péricytes *in vitro* et *in vivo* dans des niches périvasculaires [46]. Cette transdifférenciation est provoquée par sécrétion du TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*  $\beta$ ) par les TAMs recrutant les CSCs au niveau des vaisseaux par l'axe SDF-1/CXCR4 [46]. Le TGF- $\beta$  est un inducteur important de l'invasion dans les gliomes (**Figure 6**) [40], [47], [48]. Il induit la sécrétion par les cellules tumorales de la pro-métalloprotéase 2 (pro-MMP2, forme inactive) qui sera activée en MMP2 par les TAMs TLR2 activés [47], [48]. Les TAMs sécréteront également la MMP9 permettant la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion des cellules tumorales [48].

Ajoutées à ces mécanismes immunitaires, les conditions d'hypoxie des gliomes induisent l'expression du facteur hypoxique HIF-1 $\alpha$ , un inducteur important de l'invasion et de l'angiogenèse associé à la progression tumorale des gliomes [49]. L'expression de HIF-1 $\alpha$  est potentialisée par la présence de la mutation *IDH1<sup>R132H</sup>* et induit l'augmentation des niveaux de VEGF, un facteur de croissance des cellules vasculaires [50]. Un des mécanismes majeurs induits par HIF-1 $\alpha$  est notamment l'expression de MMP2 et MMP9 des facteurs de remodelage de la matrice extracellulaire [51]. Les cellules immunitaires et l'hypoxie sont ainsi des mécanismes majeurs de l'invasion et de la progression des gliomes notamment par des remodelages de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse.

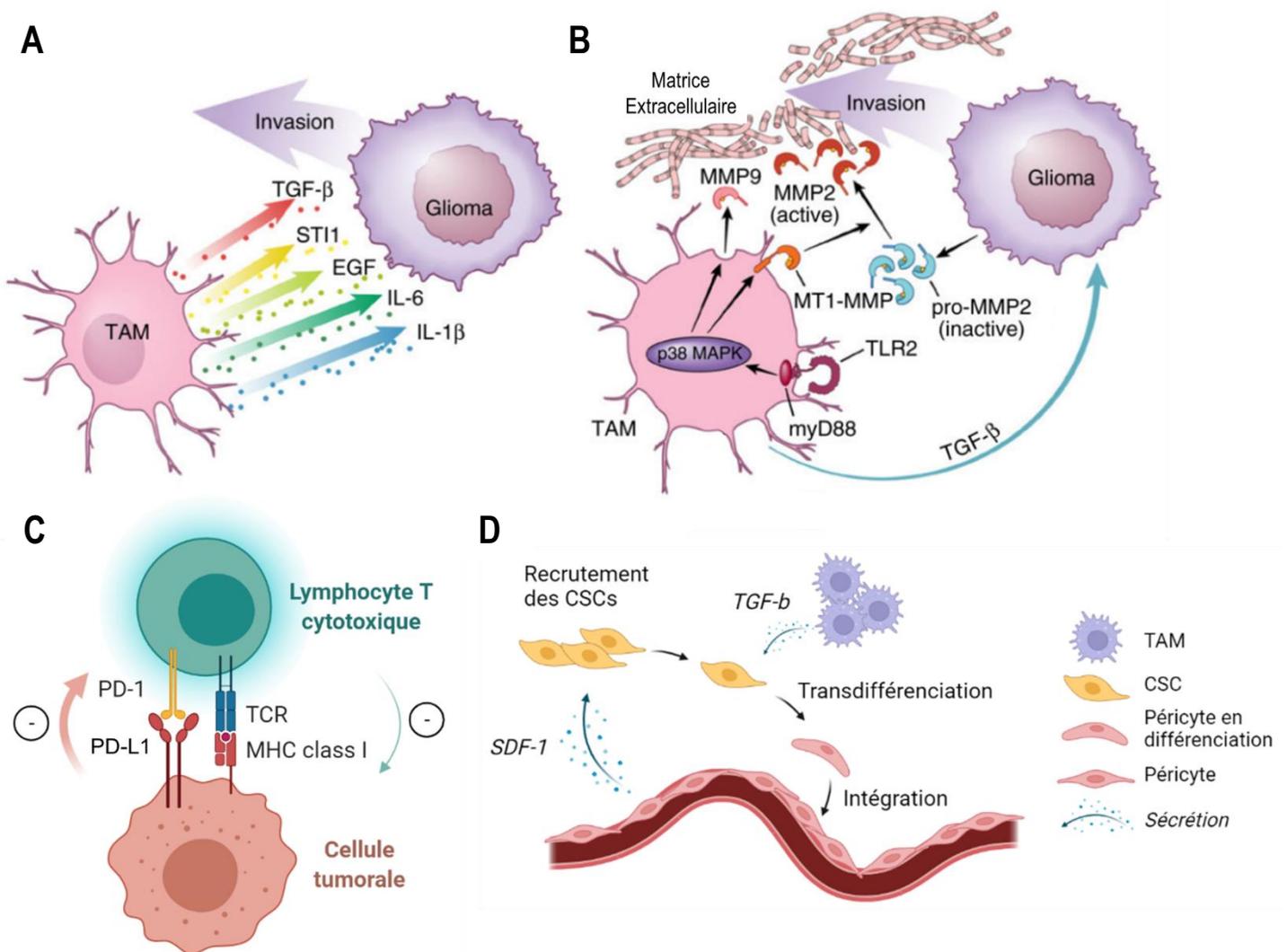


Figure 6 – Les gliomes interagissent avec le système immunitaire pour promouvoir leur progression, leur invasion et l'angiogenèse (adapté de *Hambardzumyan et al., 2016*)

**A.** Les TAMs sécrètent un nombre important de facteurs favorisant l'invasion des cellules tumorales des gliomes et notamment le TGF- $\beta$ . **B.** La sécrétion du TGF- $\beta$  permet l'expression par les cellules tumorales de pro-MMP2 activée en MMP2 par la protéine MT1-MMP des TAMs. Ces derniers sécrètent également la MMP9 après activation du TLR2. **C.** Les cellules tumorales échappent à l'élimination par les lymphocytes T grâce à l'expression du ligand PD-L1. Sa liaison au récepteur PD-1 induit l'exhaustion des lymphocytes T et la diminution de la réponse cytotoxique par inhibition de la signalisation du TCR. **D.** Les CSCs sont recrutées au niveau des vaisseaux sanguins par l'axe SDF1/CXCR4 et induites à se transdifférencier en péricyte via la sécrétion de TGF- $\beta$  par les TAMs, promouvant ainsi une angiogenèse tumorale. TCR=Toll-like Receptor.

### *Une interaction sécrétoire et électrique entre les neurones et les cellules de gliomes*

Les gliomes en particulier bénéficient de l'environnement unique du parenchyme cérébral permettant des interactions étroites avec les cellules neurales. Le groupe de Michelle Monje, neuro-oncologue et professeur en neurologie à Stanford, a produit des résultats majeurs, sur lesquels nous nous focaliserons ci-après, sur la question de l'interaction entre les neurones et les cellules de gliomes. Ces mécanismes utilisés par les cellules tumorales ne sont pas nouveaux, ils dérivent d'interactions physiologiques entre les neurones et les cellules d'origine des gliomes, à savoir les cellules gliales. Le groupe de Michelle Monje s'est alors demandé si ces interactions neurogliales, et en particulier l'activité neuronale, pourraient jouer un rôle dans le développement des gliomes. Nous développerons en particulier les travaux de Humsa S. Venkatesh, qui décrit deux mécanismes principaux d'interaction entre les neurones et les cellules de gliomes : une composante sécrétoire et composante électrique.

Dans une première étude publiée dans *Cell* en 2015, *Venkatesh et al.*, utilisant un modèle murin d'optogénétique montre que l'activité neuronale induit une augmentation de la prolifération et de l'invasion d'une lignée tumorale dérivée de patients greffée (PDX, *Patient Derived Xenograft*) chez la souris [52]. Les auteurs identifient la *Neurologin 3* (NLGN3) comme le mitogène à l'origine du phénotype. La NLGN3 induit l'activation de la voie de signalisation PIK3/Akt/mTor entraînant une surexpression de la protéine c-FOS à l'origine de la prolifération des cellules tumorales [52]. Dans la continuité, les auteurs s'intéressent au potentiel thérapeutique de l'inhibition de la NLGN3 et à son mécanisme de sécrétion dans un article publié dans *Nature* en 2017 [53]. En utilisant un modèle murin d'inactivation constitutif de NLGN3, ils démontrent la nécessité de cette protéine pour le développement de PDXs *in vivo* [53]. Ils détaillent également le mécanisme de sécrétion de la NLGN3 dans les neurones, dépendant des métalloprotéases ADAM10 et MMP9 [53]. L'administration d'inhibiteurs de l'ADAM10 dans des modèles de souris xénotreffées avec des PDXs diminue la progression et le développement des tumeurs [53]. L'un des mécanismes d'interaction entre les neurones et les cellules de gliomes est donc la sécrétion de NLGN3 dépendante de l'activité neuronale responsable de la prolifération des cellules tumorales par la voie PI3K/mTor illustrée en **Figure 7**.

Ils publieront par la suite une étude [54] décrivant une nouvelle interaction entre les neurones et les cellules de gliomes sous la forme de synapses fonctionnelles dont les observations sont confortées par une autre équipe dans un article compagnon de *Venkataramani et al.*, [55]. Les deux groupes présentent la présence de synapses glutamatergiques entre neurones et cellules tumorales dans différents types de gliomes [54], [55]. Ces synapses induisent des courants glutamatergiques de composante AMPA pour 5 à 10% des cellules ainsi que des

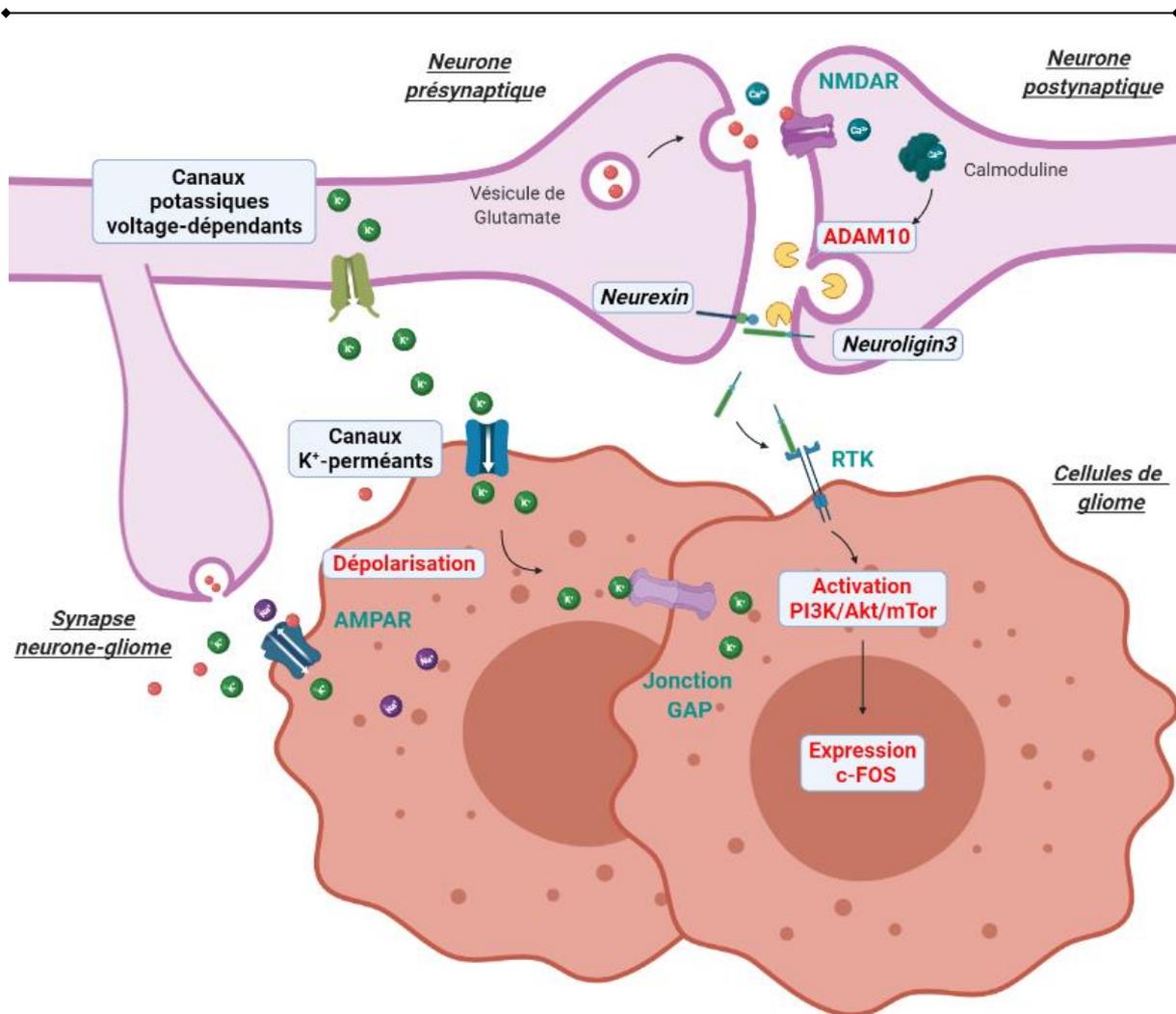


Figure 7 – Interactions entre les neurones et les cellules de gliomes : des mécanismes sécrétoires et électriques

Les travaux de Humsa Venkatesh ont permis de mettre en évidence deux types d'interaction induits par l'activité neuronale entre les neurones et les cellules tumorales. Le premier est la sécrétion activité-dépendante de la NLGN3 par la métalloprotéase ADAM10. Ce facteur sécrété viendra ensuite activer la voie PI3K/Akt/mTor au niveau des cellules de gliome afin de promouvoir leur prolifération via la surexpression de c-FOS. Le deuxième mécanisme est une communication électrique au niveau de synapse (notamment glutamatergique) induisant des courants AMPA (10% des cellules) mais également provoqué de manière spontanée par la concentration potassique matricielle induisant d'amples courants potassiques (40% des cellules) qui se propagent par les jonctions communicantes et induisent également une prolifération cellulaire.

courants potassiques pour 40% des cellules ; ces derniers étant amplifiés par les jonctions communicantes entre les cellules de gliomes [54]. Enfin, en utilisant de nouveau leur modèle murin d'optogénétique, *Venkatesh et al.*, observent que les courants dépolarisants induits dans les cellules de gliomes induisent leur prolifération (**Figure 7**) [54]. Toujours dans cette étude, les auteurs montrent que cette interaction entre neurones et cellules tumorales est réciproque. Dans les zones infiltrées, les gliomes induisent une hyperexcitabilité neuronale chez les patients, notamment due au relargage de glutamate dans le parenchyme cérébral par les cellules tumorales

[56]. Ces études illustrent l'importance de l'activité neuronale dans le développement des gliomes, en particulier au niveau de la neurotransmission glutamatergique. Cependant, il existe de nombreuses autres neurotransmissions que les gliomes détournent au profit de leur prolifération. Une revue du groupe publiée dans *Trends in Cancer* dresse avec exhaustivité la vaste diversité de ces interactions [57].

Après avoir décrit les caractéristiques des gliomes et leurs mécanismes de développement, détaillons à présent les possibilités thérapeutiques pour le traitement de ces tumeurs. Nous développerons les thérapies actuelles en précisant la nécessité de développer des alternatives spécifiques.

### 1.3. Traitements actuels des gliomes : la nécessité de thérapies ciblées

Malheureusement pour les patients atteints de gliomes, les perspectives ne sont pas très encourageantes. Parfois lorsque la tumeur est de petite taille et le patient présentant des contre-indications, on peut adopter une attitude attentiste. Mais si la tumeur est de haut grade et de taille importante, le protocole général demeure le même depuis 2005. Initié par l'oncologue Dr. Roger Stupp, le protocole consiste en une administration de six semaines de chimio-radiothérapie. *Stupp et al.*, [58] évaluèrent l'efficacité du Témazolomide (TMZ, Temodal®), un agent alkylant induisant une réparation aberrante du nucléotide méthylé conduisant à la mort de cellules en prolifération, en concomitance avec un protocole de radiothérapie. C'est en partie grâce à ce protocole que l'on doit la survie actuelle des patients atteints de glioblastomes.

L'European Association for Neuro-Oncology (EANO) détaille la marche à suivre présentée en **Figure 8** : si le gliome est dans une zone opérable, on réalise une exérèse maximale de la lésion tumorale. Pour les oligodendrogliomes et l'astrocytome de bas grade, on peut décider d'administrer ou non une triade médicamenteuse appelée PCV (Procarbazine, Lomustine, Vincristine) en fonction du grade et de la condition clinique du patient [59]. Pour les astrocytomes de haut grade cependant, on administre du TMZ en plus d'un protocole de radiothérapie de 60 Gy (Grey) légèrement plus important que celui des oligodendrogliomes (50 Gy) [59]. Pour les glioblastomes, le traitement dépend de plusieurs facteurs : la méthylation du promoteur MGMT qui est associée à l'efficacité du TMZ [60], l'âge et l'indice de Karnofsky (un indice décrivant la condition clinique de 0 (mort) à 100 (bon état général)) qui permettent d'évaluer la balance bénéfico-risque du traitement à administrer en fonction de la condition clinique [59].

Les mutations des gènes *IDH* et la codélétion 1p/19q sont associées à une sensibilité aux chimiothérapies alkylantes plus importante, expliquant le meilleur pronostic des oligodendrogliomes [61]. Les glioblastomes sont les tumeurs les plus résistantes aux traitements, les astrocytomes constituent à nouveau un intermédiaire de réponse aux traitements [61]. La réponse au traitement s'effectue notamment par imagerie. Toutefois, les récurrences après traitements sont très fréquentes, donnant naissance à des tumeurs différentes de la lésion initiale, plus agressives et résistantes aux traitements [28], [62].

On peut alors se demander au vu des avancées thérapeutiques de ces dernières années, s'il n'existe pas d'alternatives au protocole Stupp standard qui comme toute chimiothérapie classique, entraîne de nombreux effets indésirables. De plus, l'hétérogénéité des gliomes, que nous avons précédemment décrite, permet et nécessite le développement de stratégies thérapeutiques ciblées. Pour le traitement

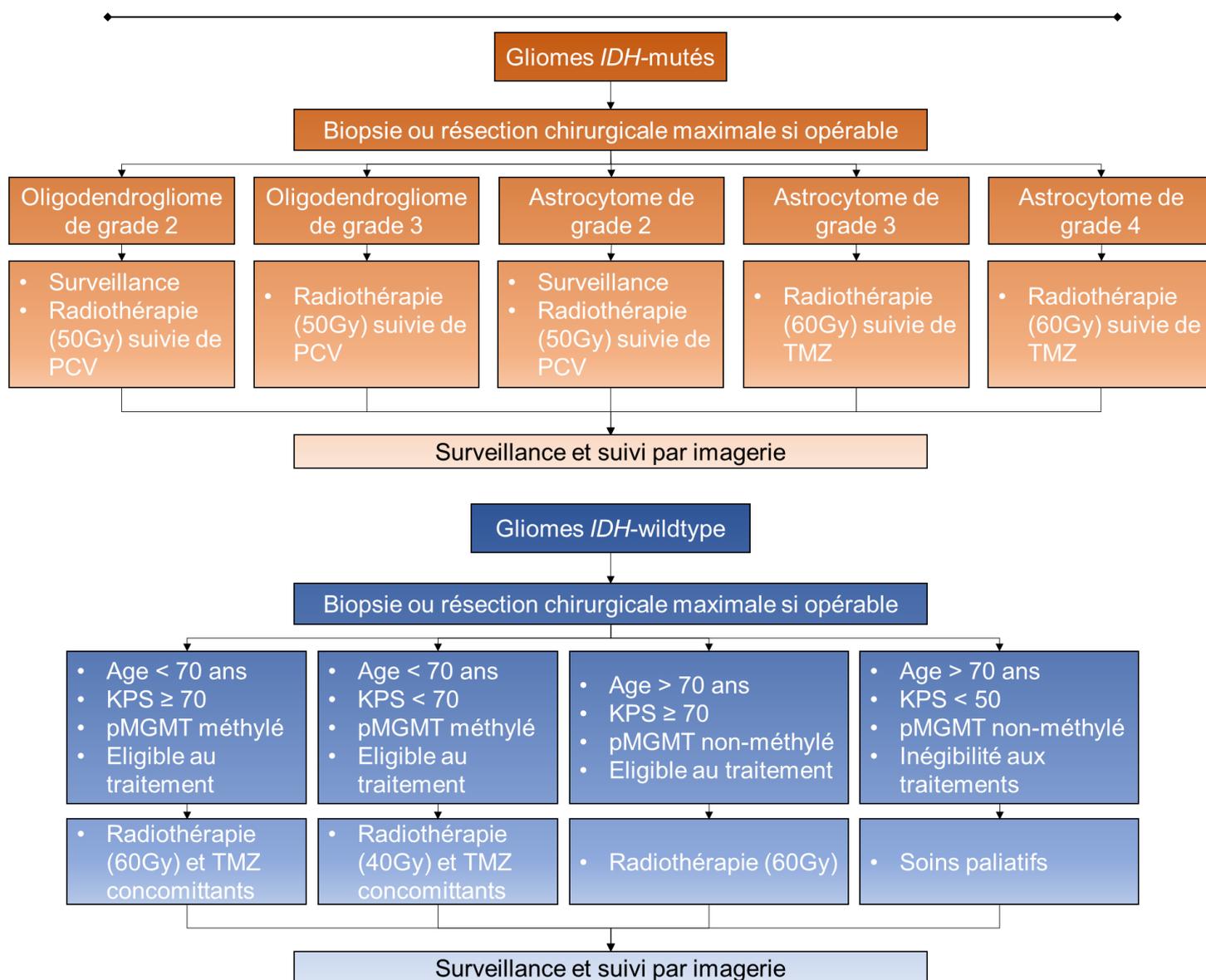


Figure 8 – Lignes directrices pour le traitement des gliomes diffus de l'adulte de l'EANO (d'après *Weller et al.*, 2021)

Les gliomes *IDH*-mutés sont de meilleurs pronostics que les gliomes *IDH*-wild-type. C'est pourquoi le clinicien peut, dans le bas des tumeurs de bas grade, décider de surveiller uniquement la tumeur par imagerie afin d'éviter les effets secondaires des traitements aux patients. Les gliomes *IDH*-mutés de haut grade sont traités par radiothérapie et/ou PCV pour les oligodendrogliomes ou TMZ pour les astrocytomes. Les traitements des glioblastomes dépendent notamment de l'âge, de l'indice de Karnofsky et de la méthylation du promoteur du gène *MGMT*. En effet, le TMZ n'est efficace que chez les patients *pMGMT* méthylés. Pour les patients *pMGMT* non méthylés, on administre uniquement un protocole de radiothérapie dépendant de la condition clinique du patient. Gy=Grey.

du cancer, de nouvelles technologies pouvant répondre à ce besoin de spécificité ont vu le jour en immunothérapie : anticorps monoclonaux, inhibiteurs de *checkpoint* immuns, vaccins anti-cancéreux et lymphocytes T modifiés. Chacun de ces types d'immunothérapies mériterait à lui seul un chapitre entier, mais nous nous écarterions

du sujet. Dans ce manuscrit, nous nous contenterons de décrire l'immunothérapie comme l'ensemble des stratégies thérapeutiques utilisant ou visant à stimuler notre système immunitaire pour permettre un ciblage spécifique et l'élimination des cellules tumorales. En essayant de mettre en lumière son apport thérapeutique dans le contexte des gliomes. Le principe est donc d'éduquer notre système immunitaire afin d'induire une réponse importante et ciblée : (i) soit en favorisant l'élimination des cellules tumorales par couplage d'anticorps monoclonaux à des drogues ou l'inhibition de *checkpoints* immunitaires, (ii) soit en injectant au patient un antigène tumoral ou des cellules présentatrices d'antigènes tumoraux afin d'entraîner une réponse vaccinale ou enfin (iii) en modifiant par transgénèse les récepteurs de reconnaissance aux antigènes des Lymphocytes T afin de cibler spécifiquement des antigènes des cellules tumorales, on parle de *CAR T-cells* (*Chimeric Antigen Receptor T Lymphocyte*) [63].

Ces techniques présentent toutes des avantages et des inconvénients intrinsèques très bien détaillés dans une récente revue de *Han et al.*, publiée en janvier 2022 [64] résumés dans la **Table 2** ci-dessous. La plupart de ces techniques ont notamment été développées dans le traitement du glioblastome pour lequel la recherche clinique est la plus active. Il s'agit également pour la plupart d'étude de tolérance (phase I) ne présentant pas encore forcément de résultats sur l'efficacité du traitement. Chacune de ces différentes stratégies thérapeutiques souffre d'un aspect particulier du TME ou du parenchyme cérébral. En effet, la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) représente une barrière physique importante isolant le cerveau du reste de l'organisme. Ainsi, le passage de molécules et de cellules est fortement régulé, ce qui limite les solutions monoclonales. Pour les *CAR-T cells* et les vaccins, il s'agit cette fois de l'environnement tumoral immunosuppresseur ne permettant pas la production d'une réponse immunitaire efficace. Les perspectives actuelles sont assez décourageantes, mais des stratégies alternatives commencent à voir le jour. Ces stratégies visent à combiner les thérapies actuelles pour pallier leurs défauts. Ainsi, des *CAR-T cells* et des vaccins en synergie avec des inhibiteurs de *checkpoints* pourraient révéler leur plein potentiel [64]. De même des ouvertures temporaires de la BHE par des dispositifs ultrasoniques comme le SonoCloud® (développé par Carthera) permettraient une délivrance plus importante des solutions monoclonales au site de la tumeur [65]. En effet, une étude à laquelle a participé notre laboratoire montre dans un modèle préclinique l'augmentation de la délivrance de carboplatine dans un modèle de souris greffées avec des PDX, augmentant ainsi leur survie par diminution de la taille de la tumeur [66].

	Immunothérapie passive		Immunothérapie active	
	Solutions monoclonales couplées	CAR T-cells	Vaccins peptidiques	Vaccins à cellule dendritique
Description	Anticorps monoclonal spécifique d'un antigène tumoral couplé à des agents cytotoxiques, radioactifs, chimiothérapeutiques ou ARN interférons	Récepteur chimérique composé en extracellulaire de chaînes d'immunoglobulines pour la reconnaissance d'antigène tumoraux spécifique et en intracellulaire des domaines de signalisation permettant une réponse cytotoxique	Injection d'antigènes tumoraux pour amplifier la réponse immunitaire adaptative contre la tumeur	Cellules dendritiques cultivées <i>in vitro</i> éduquée pour présenter un antigène tumoral afin de provoquer une réponse immunitaire
Avantages/ Opportunité	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spécificité du ciblage</li> <li>• Variété de l'agent couplé</li> <li>• Effets secondaires inférieurs (chimiothérapie)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spécificité du ciblage</li> <li>• Réponse cytotoxique modulable</li> <li>• Effets secondaires inférieurs (chimiothérapie)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spécificité du ciblage</li> <li>• Réponse immunitaire modulable</li> <li>• Effets secondaires inférieurs (chimiothérapie)</li> <li>• Possibilité d'anticorps bivalent/spécifiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spécificité du ciblage</li> <li>• Réponse immunitaire puissante</li> <li>• Effets secondaires inférieurs (chimiothérapie)</li> </ul>
Inconvénients/ Menaces	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Passage difficile de la BHE</li> <li>• Nécessité d'une cible internalisable</li> <li>• Résistance à l'agent couplé</li> <li>• Stabilité du linker</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Environnement immunosuppresseur</li> <li>• Reconnaissance d'antigènes solubles</li> <li>• Passage ambiguë de la BHE (diapédèse)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réponse immunitaire faible nécessitant d'être amplifiée (adjuvant, checkpoint inhibitors)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Environnement immunosuppresseur</li> <li>• Echappement immunitaire des gliomes (perte du CMH)</li> <li>• Environnement immunosuppresseur</li> <li>• Echappement immunitaire des gliomes (perte du CMH)</li> <li>• Environnement immunitaire « froid » entraînant des réponses faibles</li> </ul>
Bénéfice clinique	Faible à modérée	Moderé	Faible	Moderé
				Faible

Table 2 – Description des stratégies d'immunothérapies utilisées pour le traitement des gliomes diffus de l'adulte (d'après Han et al., 2022)

On distingue deux types d'immunothérapies en fonction qu'elles nécessitent un rôle actif ou passif de la réponse immunitaire adaptative. Prise séparément, chacune de ces méthodes a l'avantage de cibler spécifiquement les cellules tumorales réduisant ainsi les effets secondaires provoqués par des réponses non spécifiques. Elles rencontrent cependant toutes les mêmes désavantages liés à l'environnement immunitaire unique du cerveau : une difficulté d'accès au site à cause de la BHE et une difficulté à déclencher une réponse immunitaire efficace à cause de l'environnement immunosuppresseur des gliomes et notamment du glioblastome. Les nombreux essais cliniques montrent des effets modérés sur l'augmentation de la survie et/ou de la survie sans progression, mais ne présentent jamais de rémission totale. Les conclusions cliniques démontrent l'importance de combiner ces différentes thérapies pour des pallier les défauts de ses thérapies et ainsi induire des réponses cliniques durables.

Une des difficultés pour le traitement des gliomes réside également dans le fait qu'au diagnostic, le gliome et son contexte tumoral invasif, hétérogène, immunosuppresseur et angiogénique sont déjà bien établis. Les interventions thérapeutiques à ce stade sont par complexes et la plasticité des gliomes permet une résistance accrue aux traitements. Pour ces raisons, agir en amont en s'intéressant au développement des gliomes afin de le prévenir représente une stratégie prometteuse pour le traitement de ces tumeurs. Bien que la médiane d'apparition des tumeurs cérébrales chez l'adulte est de 59 ans [5], on soupçonne que son développement se fasse bien plus tôt. Il est par conséquent fondamental de comprendre le développement des gliomes afin de proposer des stratégies alternatives pour l'endiguer. Pour ce faire, il est nécessaire de décrire les cellules d'origine des gliomes que nous nous proposons de traiter dans cette deuxième partie de l'introduction.

## 2. Des cellules d'origine des gliomes : les progéniteurs d'oligodendrocytes

---

Les tumeurs se développent à partir de cellules dites d'origine, fonction du type de tumeur considéré. Dans ces cellules initiales se produisent des événements génétiques et épigénétiques entraînant l'apparition de mutations. Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, ces mutations seules ne sont parfois pas suffisantes pour induire le développement d'une tumeur. Ces mutations doivent se produire dans des gènes critiques favorisant le développement tumoral à savoir des mutations activatrices d'oncogènes ou inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs. Toutefois, ces mutations doivent survenir dans des types cellulaires constituant un contexte favorable au développement oncogénique. Les neurones, par exemple, sont des cellules post-mitotiques ne se divisant pas ; ils ne constituent pas un site d'initiation privilégié. En effet, nous retrouvons très peu de neurones dans les cellules tumorales, hormis dans les neuroblastomes et certains cancers pédiatriques [4], stade auquel les neurones ou plutôt les progéniteurs neuronaux en développement présentent encore des caractéristiques prolifératives [67]. Une étude du groupe de Luis Parada, montre que la susceptibilité de transformation tumorale décroît avec la maturation et la restriction dans le lignage des neurones [68]. En effet, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs *Nf1*, *Trp53* et *Pten* dans les neurones adultes (*Camk2a-creER<sup>T2</sup>*) n'induit pas de prolifération des neurones ni de lésions tumorales [68]. Lorsque ces mutations sont introduites dans des neurones immatures NEUROD1<sup>+</sup> (*Neurod1-creER<sup>T2</sup>*), on observe une prolifération anormale, mais pas de lésions néoplasiques [68]. Il faudra introduire ces mutations dans les progéniteurs neuronaux (*Dlx1-creER<sup>T2</sup>*) pour observer les premiers défauts d'hyperplasie [68].

Les neurones éconduits, il existe de nombreux types cellulaires dans le parenchyme cérébral adulte pouvant constituer des cellules d'origines des gliomes, elles sont présentées en **Figure 9**. Parmi ces types cellulaires, se distinguent notamment les progéniteurs d'oligodendrocytes (OPCs) et les progéniteurs neuronaux (NPCs, *Neural Progenitor Cells*), des cellules au potentiel prolifératif. Les OPCs constituent par ailleurs, la plus grande population de cellules proliférative du cerveau adulte, comptant pour ~5% des cellules neurales [69].

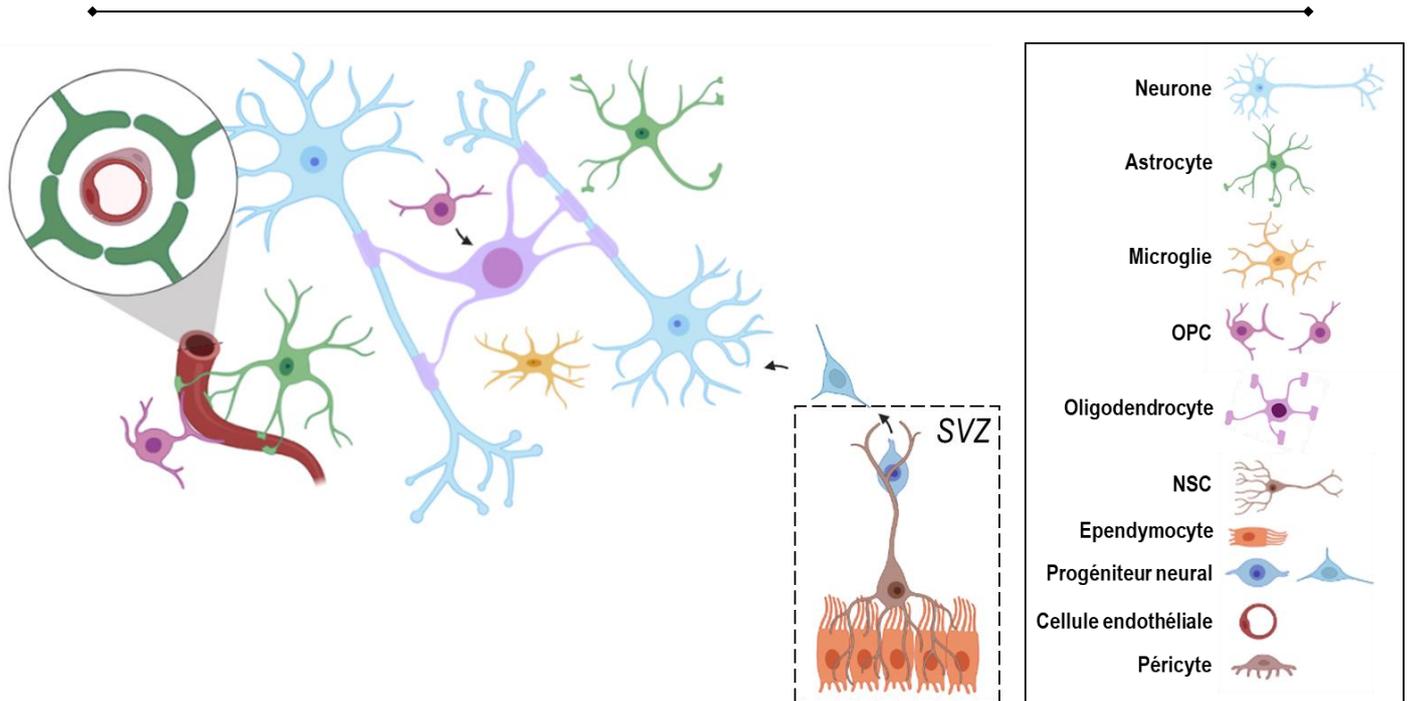


Figure 9 – Diversité et fonction des types cellulaires du parenchyme cérébral adulte

Le parenchyme cérébral est un espace de grande diversité cellulaire. On distingue les neurones, cellules effectrices du SNC, des cellules gliales dont les rôles sont notamment d'assurer soutien aux neurones sur les plans trophiques, conducteurs et homéostatiques : parmi ces cellules gliales on retrouve la macroglie, composée des oligodendrocytes (cellules responsables de la formation de la gaine de myéline) et de leurs progéniteurs, les astrocytes (support trophique et régulation des neurotransmetteurs), et les épendymocytes (cellules constituant une barrière communicante entre le parenchyme cérébral et le liquide cébrospinal) ainsi que les cellules microgliales (cellules immunitaires à fonction phagocytaire). Les cellules gliales sont les seules capables de prolifération dans le cerveau adulte. Cependant, seuls les OPCs ainsi que les NSCs sont capables de proliférer en condition physiologique tandis que les microglies et astrocytes proliféreront plutôt en cas de lésions cérébrales (réaction astrocytaire ou activation microgliale). Ainsi les OPCs et les NSCs constituent un contexte cellulaire privilégié pour le développement de tumeurs. *Les flèches noires représentent la différenciation des cellules.*

## 2.1. Deux candidats à l'origine des oligodendrogliomes : OPCs et NPCs

Les gliomes sont nommés historiquement par la ressemblance histologique des cellules qui les composent aux cellules gliales : les astrocytomes sont nommés d'après la ressemblance de leur contenu cellulaire aux astrocytes et les ODGs d'après leur contenu cellulaire ressemblant aux oligodendrocytes et à leurs progéniteurs. Cependant, la réalité est plus complexe et de récentes études de la composition cellulaire des gliomes, détaillées ci-après, dévoilent l'hétérogénéité intra-tumorale des gliomes. De nombreuses études des cellules d'origine de ces tumeurs ont été conduites dans des modèles murins que nous avons pu décrire dans un chapitre de livre dédié aux tumeurs cérébrales [70], démontrent le potentiel de différentes cellules à induire le développement de tumeurs en fonction des mutations introduites dans celles-ci. Nous les développerons dans ce manuscrit.

Il est important de distinguer les cellules à l'origine des mutations (cellules initiales) des cellules à l'origine de l'amplification (cellules amplificatrices) de la tumeur. Nous décrivons le premier type comme celui dans lequel les événements mutationnels initiaux apparaissent sans pour autant que ces cellules ne soient transformées et prolifèrent de manière massive. Le second type correspond à la population cellulaire responsable de la production de la masse tumorale. Les cellules à l'origine de l'amplification de la tumeur sont forcément porteuses des mutations initiales, mais ne sont pas forcément des cellules initiatrices, tandis que les cellules initiales peuvent ou non être des cellules à l'origine de l'amplification. Les travaux que nous allons décrire ont permis de révéler de manière très résolue les deux types de cellules d'origine des gliomes.

### 2.1.1 *Les OPCs comme cellules constituant de la masse tumorale*

Comme nous le rappelions précédemment, les premières tentatives de description du contenu cellulaire des gliomes se sont effectuées historiquement par histologie. Des marquages réalisés sur des coupes de biopsie de patients ainsi que dans des modèles murins de gliomes révélaient déjà la présence du marqueur NG2 (*Neural/Glial Antigen 2*), exprimé par les OPCs dans tous les types de gliomes et préférentiellement les ODGs [71], [72]. En 2016, le groupe de Mario Suvà, débute une série de séquençage à l'échelle de la cellule unique de gliomes mené par Itay Tirosh. Dans une première étude publiée dans *Nature* [73], ils s'intéressent aux populations cellulaires de six oligodendrogliomes de grade II (OMS 2016) (4 347 cellules séquencées). Ils identifient trois populations : une population de type oligodendrocytaire (*OPC-like*) majoritaire dans quatre des six tumeurs, une population de type astrocytaire (*AC-like*) et enfin une population plus progénitrice/souche (*NPC-like, Neural Progenitor Cell*) constituant la quasi-totalité des cellules prolifératives [73]. Une analyse de lignage par des méthodes bio-informatiques de *pseudo-time* révèlent une hiérarchie développementale dans les six tumeurs : la population progénitrice se différencie en cellules de type astrocytaire et en oligodendrocytaire (majoritairement) [73]. Cette étude démontre élégamment que les oligodendrogliomes sont effectivement constitués de cellules de type oligodendrocytaire mais également d'astrocytes et de cellules progénitrices dans une moindre mesure (**Figure 10**).

L'année suivante, ils publient dans *Science*, un séquençage additionnel de dix astrocytomes de grade II, III ou IV (OMS 2016) (9 879 cellules séquencées) afin de réaliser une étude comparative avec les précédents ODGs [74]. Une analyse différentielle de l'expression des gènes de ces deux groupes de gliomes montre un enrichissement de gènes associés aux microglies dans les astrocytomes et de gènes neuronaux dans les ODGs [74]. Les auteurs expliquent que les différences majeures

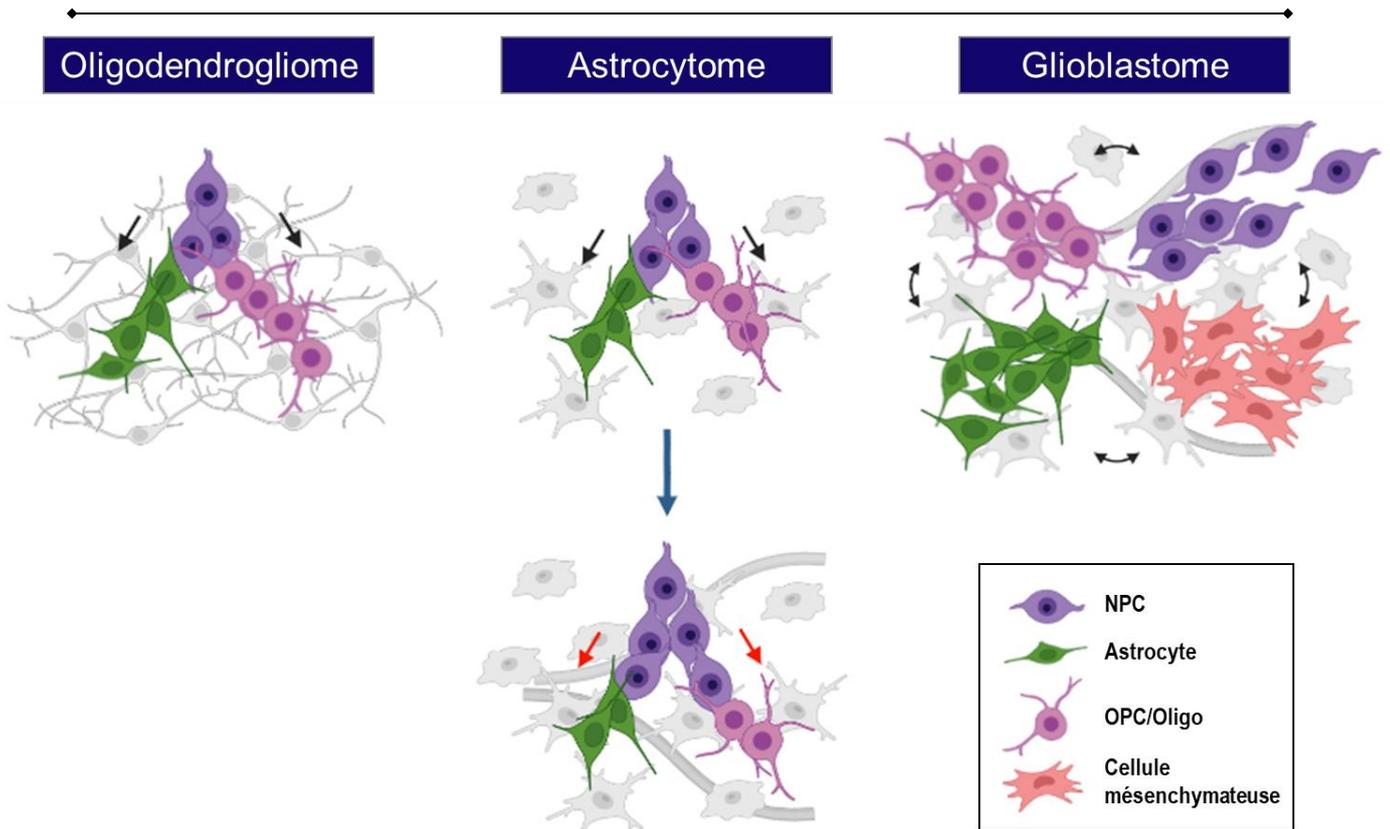


Figure 10 – Modèle cellulaire des gliomes diffus de l'adulte (d'après *Tirosh et al., 2016, Venteicher et al., 2017, Nefel et al., 2019*)

Les gliomes diffus de l'adulte dérivent de cellules gliales transformées. Les différents types de gliomes partagent des populations cellulaires communes : des cellules de type oligodendrocytaires, astrocytaires et progénitrices. Les GBMs présentent la particularité de contenir également des populations de type mésenchymateuses. La présence de cellules progénitrices dans ces tumeurs supporte la notion de *cancer stem cells* (CSCs) et un développement hiérarchique (différenciation) dans les gliomes, indiqué par les flèches noires. Cette différenciation est d'ailleurs diminuée lorsque les astrocytomes évoluent en grade, présentant alors un pronostic plus sombre. On note la présence d'un TME de composante neuronale dans les ODGs alors que les astrocytomes et les GBMs présentent des signatures plus immunitaires.

entre ces deux groupes de gliomes découlent de leur TME plutôt que de leur contenu cellulaire tumoral. En effet, la proportion des cellules et leur contenu transcriptomique sont assez similaires entre les astrocytomes et les ODGs : on retrouve des cellules *OPC-like*, *AC-like* et *NPC-like* (**Figure 10**). Toutefois, on observe une forte expression des marqueurs astrocytaires *GFAP* et *ID4* et des gènes situés sur les bras chromosomiques 1p et 19q dans les astrocytomes, tandis que l'on observe des marqueurs oligodendrocytaires *OLIG1* et *SOX8* ainsi que des gènes réprimés par la protéine CIC, dans les oligodendrogliomes [74]. Enfin, en ségrégant les astrocytomes par grade, les auteurs décrivent une augmentation de la population *NPC-like* proliférative associée à une diminution des populations différenciées [74]. Ces données suggèrent que l'agressivité des gliomes est potentiellement due à cette population progénitrice. De plus, la similitude des lignages gliaux des cellules

tumorales entre les astrocytomes et les ODGs indique une potentielle origine commune pour ces gliomes *IDH*-mutés. Les principales différences entre ces deux groupes de gliomes reposent essentiellement sur la composition de leur TME avec une abondance de macrophages et de microglie associée à l'évolution en grade dans les astrocytomes [74].

Après avoir exploré la diversité cellulaire des gliomes *IDH*-mutés, Itay Tirosh s'intéresse aux populations cellulaires de 20 GBMs chez l'adulte et 8 GBMs pédiatriques (24 131 cellules séquencées) dans un dernier article publié dans *Cell* [75]. *Neftel et al.*, décrivent quatre états cellulaires particulièrement dynamiques à l'origine de l'hétérogénéité de ces gliomes et correspondant aux sous-types de GBMs décrits par *Verhaak et al.*, [26]. On retrouve ainsi une population *OPC-like* et *NPC-like* majoritaire dans le sous-type proneural, une population *AC-like* associée aux sous-types classiques, une population mésenchymateuse (*MES-like*) associée au sous-type éponyme (**Figure 10**). Les populations *OPC-like* et *MES-like* sont enrichies dans les GBMs pédiatriques (respectivement 30 et 20% vs 12 et 12%) alors que la population *AC-like* est particulièrement enrichie dans les GBMs adultes (35 vs 6%) [75]. Toutes les populations contiennent des cellules prolifératives : 12,5% pour les cellules *MES-like*, 17% pour les *AC-like*, 25% pour les *NPC-like* et enfin 30% pour les *OPC-like* [75]. Ces données sont cohérentes avec les propriétés prolifératives physiologiques de ces cellules et les données des deux articles précédents décrivant une population *NPC-like* proliférative dans les gliomes *IDH*-mutés [73], [74].

Plus intéressant encore, *Neftel et al.*, démontrent le potentiel souche de certaines de ces populations. En effet, la greffe de cellules *MES-like* ou d'un échantillon contenant les quatre populations chez la souris induit le développement de GBMs sauvegardant la distribution cellulaire de la tumeur d'origine [75]. Cela démontre expérimentalement la présence de CSCs dans ces populations, capables de reconstituer une tumeur pouvant être à l'origine des récurrences du GBM et de sa plasticité. La greffe de cellules *NPC-like* induit le développement de GBM dont la distribution cellulaire est variable d'une greffe à l'autre [75]. Cela suggère une présence de ces CSCs plus importante dans la population *MES-like* associée au sous-type de GBM présentant le pire pronostic [26]. Enfin, ce sont les différentes altérations génétiques retrouvées dans les GBMs qui dictent les proportions de ces quatre états cellulaires. Ainsi, les amplifications des gènes *PDGFRA*, *CDK4* et *EGFR* ainsi que des mutations du gène *NF1* sont respectivement associées à un programme *OPC-like*, *NPC-like*, *AC-like* et *MES-like* dans les GBMs [75].

Toutes ces informations nous permettent d'observer que les cellules amplificatrices qui constituent la masse tumorale des gliomes sont variées. On retrouve dans les gliomes *IDH*-mutés des cellules ressemblant aux OPCs, aux astrocytes et aux progéniteurs neuraux ; tandis que l'on retrouve dans les GBMs, en

plus de ces derniers, des cellules *MES-like* associées à l'hypoxie, la glycolyse et la présence de microglie et de macrophages. La présence dans les GBMs de CSCs peut expliquer l'agressivité et la récurrence observée dans ces tumeurs et notamment dans les types mésoenchymateux. Le TME est également important dans le développement des gliomes et définit même l'identité transcriptomique des ODGs et des astrocytomes. Les cellules *OPC-like* et *NPC-like* représentent les clusters de cellules les plus prolifératifs constituant des cellules amplificatrices des gliomes. Les lignages communs dans les compositions cellulaires des gliomes suggèrent des origines cellulaires communes. Explorons à présent au travers de modèles murins de gliomes comment les chercheurs de ces dernières années ont mis en évidence les cellules initiatrices dans le développement des gliomes.

### 2.1.2 *Les OPCs et les NPCs comme cellules à l'origine des mutations*

La question des cellules d'origine des gliomes a longtemps été débattue. L'émergence de modèles murins ces dernières années a permis de tester le potentiel initiateur de cellules putatives d'origine par l'introduction spécifique de mutations oncogéniques dans ces cellules. La plupart de ces études résumées en **Table 3** se sont notamment focalisées sur l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs retrouvés mutés dans les GBMs ou les astrocytomes comme *Pten*, *Trp53*, *Nf1* et *Cdkn2a* ou l'introduction d'oncogènes comme *Egfr<sup>vIII</sup>*, *Ras*, *Akt* et *Pdgf(a/b)* dans les astrocytes, les NPCs et les OPCs [70].

La question des astrocytes comme cellules initiatrices des gliomes est longtemps demeurée une énigme [76]. Ces cellules gliales prolifératives dans les premières semaines périnatales avant d'entrer en quiescence [77]. Chez l'adulte, elles sont décrites comme étant capables de rentrer à nouveau dans le cycle cellulaire en conditions de lésions [77], [78]. Les groupes de Luis Parada et d'Eric Holland ont mis au point de nombreux modèles murins présentant les mutations retrouvées dans les astrocytomes et les GBMs pour tester le potentiel tumorigénique de différentes cellules. Le groupe de Luis Parada décrit que l'inactivation conditionnelle du gène *Nf1* dans les cellules GFAP<sup>+</sup> (*hGfap-Cre*) de souris déficiente pour *Trp53* induit le développement d'une grande variété d'astrocytomes se développant autour de la SVZ [79]. L'ajout à ces altérations de l'inactivation hétérozygote de *Pten* accélère la formation d'astrocytomes de haut grade (3/4) [80]. Le groupe d'Eric Holland décrit également le développement d'astrocytomes (40%) dans les cellules GFAP<sup>+</sup> (*Gfap-creTVA*) et d'ODGs (30%) dans les cellules NESTIN<sup>+</sup> (*Nes-creTVA*) après introduction par le rétrovirus RCAS de l'oncogène *Pdgf-b* dans ces cellules [81].

Modèle murin	Cellule d'origine ciblée	Phénotype	Référence
<i>hGfap-Cre</i> ; <i>p53<sup>-/-</sup></i> ; <i>Nf1<sup>fllox/+</sup></i> ; <i>Pten<sup>fllox/+</sup></i>	NSCs/astrocytes (GFAP <sup>+</sup> )	Induction d'astrocytomes de grade 3 à 4 (100%) ~ 4 mois	<i>Kwon et al.</i> , [80]
<i>Nestin-TVA + RCAS Ras+Akt</i> <i>Gfap-TVA + RCAS Ras+Akt</i>	NSCs (NESTIN <sup>+</sup> ) et NSCs/astrocytes (GFAP <sup>+</sup> )	<i>Nestin-TVA</i> : glioblastomes (25%) <i>Gfap-TVA</i> : pas d'induction de tumeurs ~ 2,5 mois	<i>Holland et al.</i> , [82]
<i>Nestin-TVA + RCAS Pdgf-b</i> <i>Gfap-TVA + RCAS Pdgf-b</i>	NSCs (NESTIN <sup>+</sup> ) et NSCs/astrocytes (GFAP <sup>+</sup> )	<i>Nestin-TVA</i> : oligodendrogliomes (60%) <i>Gfap-TVA</i> : gliomes mixtes (40%) ~ 3 mois	<i>Dai et al.</i> , [81]
<i>Nestin-creER<sup>T2</sup></i> ; <i>Pten<sup>fl/+</sup></i> ; <i>Nf1<sup>fllox/fllox</sup></i> ; <i>p53<sup>fllox/fllox</sup></i>	NSCs (NESTIN <sup>+</sup> )	Induction d'astrocytomes de haut-grade (100%) ~ 4 à 9 mois	<i>Alcantara Liaguno et al.</i> , [83]
Rétrovirus ( <i>Pdgf-b + Gfp</i> )	Progéniteurs adultes prolifératifs (NG2 <sup>+</sup> )	Induction de glioblastomes (100%) ~ 17 jours	<i>Assanah et al.</i> , [84]
<i>Asc1-CreER<sup>TM</sup></i> ; <i>p53<sup>fllox/fllox</sup></i> ; <i>Nf1<sup>fllox/fllox</sup></i> +/- <i>Pten<sup>fllox/+</sup></i> <i>NG2-CreER<sup>TM</sup></i> ; <i>p53<sup>fllox/fllox</sup></i> ; <i>Nf1<sup>fllox/fllox</sup></i> ; <i>Pten<sup>fllox/+</sup></i>	Progéniteurs adultes bipotents (ASCL1 <sup>+</sup> ) OPCs (NG2 <sup>+</sup> )	<i>Asc1-CreER<sup>TM</sup></i> : glioblastomes de type 1 et 2 (100%) <i>NG2-CreER<sup>TM</sup></i> : glioblastomes de type 2 (100%) ~ 4 mois	<i>Alcantara Liaguno et al.</i> , [85]
<i>Cnp-TVA + RCAS Pdgf-b</i>	OPCs (CNPase <sup>+</sup> )	Induction d'oligodendrogliomes de grade 2 (33%) ~ 14 jours	<i>Lindberg et al.</i> , [86]
<i>S100β-verbE</i> ; <i>p53<sup>fllox/fllox</sup></i>	Progéniteurs gliaux (non-NSCs) ; OPCs	Induction d'oligodendrogliomes ~ 2 mois	<i>Persson et al.</i> , [87]
<i>Nestin-Cre</i> ; <i>p53<sup>-/-</sup></i> ; <i>NF1<sup>-/-</sup></i> <i>NG2-Cre</i> ; <i>p53<sup>-/-</sup></i> ; <i>NF1<sup>-/-</sup></i>	NSCs (NESTIN <sup>+</sup> ) et OPCs (NG2 <sup>+</sup> )	Induction de gliomes avec les deux modèles ~ 5 mois	<i>Liu et al.</i> , [88]
<i>Nestin-CreER<sup>T2</sup></i> ; <i>IDH1<sup>R132H</sup></i> ; <i>Rosa26<sup>SL-YFP</sup></i>	NSCs (NESTIN <sup>+</sup> )	Nodules prolifératifs invasifs, prolifération NSCs ~ 2 mois	<i>Bardella et al.</i> , [89]

Table 3 – Tableau des principaux modèles murins génétiquement modifiés permettant l'étude des cellules d'origine des gliomes diffus de l'adulte

Ces dernières années ont vu l'émergence de modèles murins de plus en plus sophistiqués dans le but de mettre en évidence les cellules d'origine des gliomes. Les premiers modèles, essentiellement viraux permettant déjà l'introduction d'oncogènes de manière spécifique grâce à un système d'expression d'un récepteur aviaire, TVA, par le rétrovirus RCAS permettant la surexpression d'oncogènes : parmi eux, *Pdgf-b*, un oncogène mimant la surexpression des voies des PDGFR dans les gliomes ou encore *Akt* et *Ras* mimant la surexpression des voies éponymes. Ces modèles permettaient un développement de gliomes particulièrement rapide, ce qui ne correspond pas au développement clinique d'oligodendrogliomes en particulier. De plus, ils présentent des effets indésirables d'immunogénicité provoquée par l'infection virale. Les modèles suivants utilisent la CRE recombinase, sous le contrôle de promoteurs permettant la recombinaison spécifique des gènes cibles, ont permis l'introduction d'altérations génétiques plus fidèles à la génétique des gliomes. Les premiers modèles introduisaient des mutations spécifiques des GBMs et des astrocytomes ne reflétant pas le profil génétique des oligodendrogliomes, ce vers quoi s'orientent aujourd'hui les derniers modèles murins comme celui de *Bardella et al.*,

Le souci de ces modèles et qu'ils ne permettent pas d'affirmer avec certitude que les astrocytes sont des cellules d'origine. En effet, bien que les astrocytes soient encore prolifératifs aux stades périnataux des études, les NSCs expriment également le marqueur GFAP et constituent potentiellement les cellules d'origines de ces tumeurs. Toutefois, la surexpression des gènes *Ras* et *Akt* induit le développement de glioblastomes (25%) dans les cellules NESTIN<sup>+</sup> mais pas dans les cellules GFAP<sup>+</sup>, dévoilant un potentiel initiateur plus important des NSCs [82]. Pour distinguer les deux types cellulaires, le groupe de Luis Parada réalise une étude dans laquelle ils présentent un modèle d'inactivation introduisant les mêmes mutations des gènes *Trp53*, *Pten* et *Nf1* dans les NSCs (*Nes-CreER<sup>T2</sup>*) [83]. Ils constatent le développement d'astrocytomes de grade 3 et 4 en postnatal et chez l'adulte, similaires à ceux décrits dans le modèle *hGfap-Cre* [79]. De plus, l'injection stéréotaxique d'adénovirus permettant l'expression de la CRE recombinase dans les cellules infectées, n'induit le développement de tumeurs que lorsque cette injection a lieu dans la SVZ [83]. Ces données suggèrent que ce sont les NSCs plutôt que les astrocytes qui sont à l'origine des astrocytomes et des GBMs dans ces modèles murins.

*Assanah et al.*, cherchent à explorer le potentiel initiateur de progéniteurs gliaux adultes pour mimer au plus proche la clinique des gliomes diffus de l'adulte [5]. Ils réalisent alors des injections de rétrovirus (infectant les cellules prolifératives) permettant aux cellules transduites de surexprimer l'oncogène *Pdgf-b* ainsi que la GFP (*Green Fluorescent Protein*) afin d'identifier les cellules infectées [84]. Ils décrivent la formation de GBMs dans 100% des cas, 14 jours après infection. Les auteurs montrent également que la plupart des cellules tumorales fluorescentes correspondent à des cellules *OPC-like* (NG2<sup>+</sup>) et non à des cellules *AC-like* ou *NSC-like* (GFAP<sup>-</sup>) [84]. Cette étude est la première à décrire les OPCs comme cellules amplificatrices dans le développement des glioblastomes.

Une nouvelle étude du groupe de Luis Parada étudiera également le potentiel initiateur de progéniteurs neuraux bipotents ASCL1<sup>+</sup> (*Ascl1-creER<sup>TM</sup>*) en y inactivant les gènes *Trp53* et *Nf1* uniquement (AscNP) soit en inactivant également le gène *Pten* (AscNPP) [85]. Les deux modèles induisent le développement de deux types de GBMs de localisation et de caractéristiques histologiques différentes. Les GBMs de type 1 (AscNPP) présentent une surexpression de marqueurs astrocytaires dont la GFAP, une survie et une prolifération cellulaire plus importante et une localisation dorsale ; tandis que les GBMs de type 2 présentent une prolifération moins importante, une localisation ventrale circonscrite et la présence de marqueurs d'OPCs [85]. Pour confirmer l'hypothèse que les GBMs de type 2 dérivent d'OPCs adultes, ils génèrent un nouveau modèle *NG2-creER<sup>TM</sup>* pour y introduire toutes les mutations précédentes entre 4 et 8 semaines postnatales [85]. Les tumeurs résultantes expriment OLIG2 et PDGFRA, des marqueurs d'OPCs, confirmant le potentiel initiateur des OPCs pour le développement des GBMs. Afin de démontrer le potentiel

initiateur des OPCs cette fois dans les ODGs, *Lindberg et al.*, utilisent le même système de transduction spécifique RCAS-TVA du groupe d'Eric Holland afin de surexprimer les oncogènes *Pdgf-b*, *Ras*, *Akt* ou une combinaison de *Ras* et *Akt* dans les OPCs (*Cnp-CreTVA*) [86]. Ils observent une incidence de développement de gliomes de 33% uniquement dans les souris surexprimant *Pdgf-b*; des gliomes identifiés comme des ODGs de grade II, dévoilant les OPCs comme cellules initiatrices de ces tumeurs.

Dans la continuité de l'étude précédente, les travaux d'Anders Persson publiés dans *Cell* en 2010 explore le potentiel de progéniteurs gliaux (NSCs exclus) dans le développement d'ODGs à travers la surexpression d'un allèle constitutivement actif du gène *Egfr* (*v-erbB*) sous le contrôle du promoteur du gène *S100β* (populations neuronales, OPCs, astrocytes matures) chez des souris inactivées pour le gène *p53* [87]. Les auteurs démontrent le développement d'ODGs associés aux structures de la matière blanche à travers l'expansion d'OPCs (NG2<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>). Contrairement aux tumeurs induites de manière virale précédemment décrites, ces tumeurs se développent en environ deux mois. Elles expriment également d'autres marqueurs du lignage oligodendrocytaire comme PDGFR $\alpha$ , SOX10 et OLIG2 plutôt que des marqueurs de NSCs au niveau transcriptomique. Enfin, seule la greffe de cellules NG2<sup>+</sup> (OPCs) dans des souris immunodéprimées induit la formation d'ODGs décrivant de nouveau les OPCs comme potentielles cellules initiatrices de ces tumeurs. Néanmoins, seuls les OPCs ont pu être également décrits comme des cellules amplificatrices à l'origine du développement des gliomes.

L'année suivante, une élégante étude menée par *Liu et al.*, finit de confirmer le potentiel initiateur des NSCs et des OPCs de manière très spécifique [88]. Ils développent un système appelé *MADM* (*Mosaic Analysis with Double Markers*) dans lequel ils parviennent à suivre par un système de recombinaison interchromosomique induit par la CRE recombinase, la descendance des cellules initiales dans des cellules contenant les mutations inactivatrices de *Trp53* et *Nf1* (cellules GFP<sup>+</sup>) et d'autres sans mutations (cellules RFP<sup>+</sup>) par fluorescence [88]. L'avantage de ce modèle est qu'il permet une recombinaison dans un nombre restreint de cellules (la recombinaison interchromosomique étant un événement rare) mimant plus fidèlement le développement tumoral. Ainsi, et pour la première fois, les auteurs peuvent décrire la descendance cellulaire des gliomes induits par ces deux types de cellules initiatrices que sont les OPCs (*NG2-Cre*) et les NSCs (*Nes-Cre*). Ils observent dans les deux modèles, l'induction de gliomes, au bout de cinq mois, confirmant à nouveau le potentiel initiateur de ces deux types cellulaires [88]. Que les mutations soient introduites dans les NSCs ou les OPCs, on remarque que la population cellulaire pour laquelle la proportion de cellules mutantes (GFP<sup>+</sup>) est bien plus importante que les cellules contrôles (RFP<sup>+</sup>) correspondent à une population d'OPC (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>) [88]. Un marquage BrdU avant perfusion révèle à P60 que la totalité des cellules

prolifératives sont des OPCs. Les cellules prolifératives mutantes constituent 84% des cellules prolifératives et sont situées hors de la SVZ [88]. Cette étude nous confirme que les cellules amplificatrices dans les gliomes sont les OPCs plutôt que les NSCs ; toutefois, les deux types cellulaires peuvent être des cellules initiatrices des gliomes.

Cependant, la plupart des mutations introduites dans ces modèles murins correspondent à des mutations retrouvées dans les GBMs [4]. Des modèles murins s'intéressant à l'étiologie des ODGs ont émergé ces dernières années présentant des mutations retrouvées dans ces tumeurs et notamment la mutation *IDH1<sup>R132H</sup>*. Le groupe de Chiara Bardella a développé un modèle murin dans lequel la mutation *IDH1<sup>R132H</sup>* est introduite dans les NSCs (*Nes-Cre<sup>ERT2</sup>*) de manière inducible par injection de tamoxifène [89]. Un rapporteur fluorescent (*Rosa26<sup>LSL-YFP</sup>*) permet de suivre le destin des cellules recombinaisonnées après injection [89]. *Bardella et al.*, décrivent une augmentation de la prolifération des NSCs et la formation de nodules invasifs originaires de la SVZ envahissant le parenchyme cérébral à partir de deux mois post-injection [89]. Les mutations du gène *IDH1* seraient donc initiatrices dans le développement d'oligodendrogliomes.

Dans cette partie, nous avons pu décrire les OPCs et les NSCs comme cellules initiatrices dans les gliomes. Les OPCs constituent également des cellules amplificatrices pour les gliomes et en particulier pour les ODGs. C'est pourquoi nous nous proposons au laboratoire d'étudier le développement des oligodendrogliomes en étudiant les conséquences de mutations retrouvées dans ces tumeurs, dans les OPCs en particulier. De ce fait, nous nous focaliserons à présent sur ces cellules et leur physiologie afin de comprendre leur rôle dans le développement tumoral.

## 2.2. Physiologie du lignage oligodendrocytaire

Nous avons pu décrire dans la partie précédente les OPCs comme une origine cellulaire des oligodendrogliomes. Afin de comprendre comment des tumeurs se développent à partir de ces cellules, il est important de comprendre leur physiologie. Les progéniteurs d'oligodendrocytes, comme leur nom l'indique, sont des cellules capables de produire des oligodendrocytes. Découvertes en même temps que les cellules microgliales par Pio del Rio Hortega grâce à la méthode d'imprégnation argentique<sup>6</sup>, les « cellules interfasciculaires » appelées par la suite oligodendrogliie arborent des faisceaux dendritiques [90]. Cependant, l'existence de cette population gliale fait débat et n'est pas reconnue en particulier par Santiago Ramon y Cajal. La production des travaux de Hortega en langue espagnol n'aidant pas à la diffusion de ses découvertes, il faudra attendre sa première description systémique des oligodendrocytes (OLs) en 1928 pour convaincre la communauté scientifique [90]. Néanmoins, ce n'est qu'à l'avènement de la microscopie électronique que nous avons été en mesure de démontrer la production par les OLs des feuillet de myélines, principaux constituant de la matière blanche, permettant l'isolation des axones des neurones afin de permettre la conduction saltatoire du potentiel d'action [91].

Une revue de Mikael Simons, professeur de neurobiologie moléculaire et expert dans la myélinisation décrit particulièrement bien ce processus [91]. Chez la souris, la myélinisation débute dès la naissance et est quasiment complète après deux mois [92], [93]. Chez l'Homme, elle débute dans le dernier trimestre embryonnaire et s'achève au début de l'âge adulte [94], [95]. C'est un processus extrêmement hétérogène qui dépend de la structure et de l'âge de l'organisme : dans le cortex et le corps calleux, les OLs peuvent myéliniser jusqu'à 80 internœuds (segments myélinisés d'axones) d'axones de faible diamètre ( $>0,2\mu\text{m}$ ) ; tandis que dans la moelle épinière, les OLs myélinisant de plus gros axones (1 à  $15\mu\text{m}$ ) ont moins d'internœuds, mais ces derniers sont plus larges et épais [96]. Il y a ainsi une relation linéaire entre le diamètre de l'axone, l'épaisseur du feuillet et leur nombre montrant ainsi l'importance de modulation de la myéline pour une conduction efficace de l'influx nerveux et sa plasticité [97].

Le processus d'enroulement du feuillet de myéline décrit en **Figure 11** a longtemps été débattu. Différents modèles basés sur des observations en microscopie électronique ont été proposés, le plus communément répandu étant celui de Mikael Simons. La régulation de ce mécanisme d'enroulement est finement régulée, mais nous ne développerons pas ici ces subtilités décrites de manière extensive dans la revue de Mikael Simons [91]. Les OLs n'assurent pas que des fonctions de support

---

<sup>6</sup> Méthode d'imprégnation argentique : une technique de coloration des cellules neurales dérivée de la coloration de Golgi

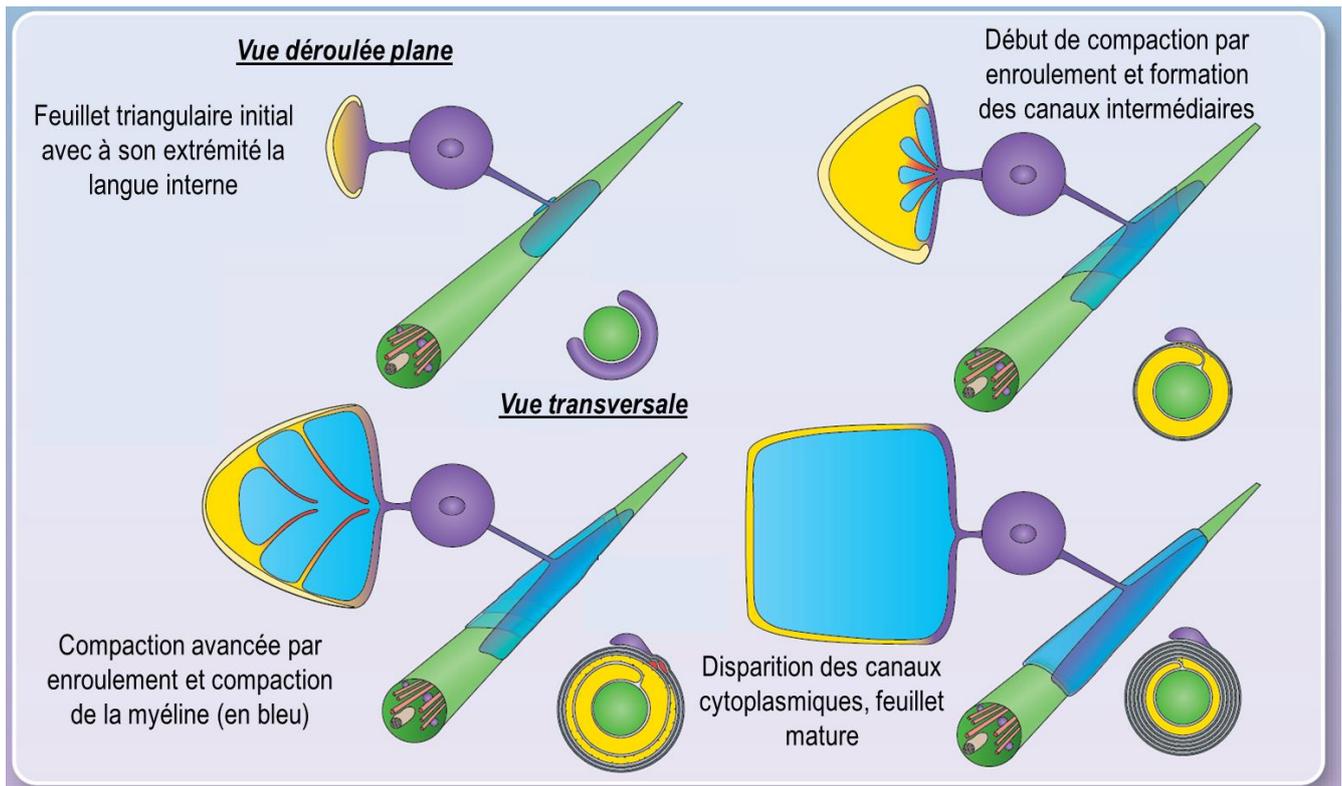


Figure 11 – Développement morphologique du feuillet de myéline du SNC (d'après *Snaidero et Simons*)

Ce modèle produit en 2014 par Snaidero et Simons propose que les oligodendrocytes produisent un premier feuillet triangulaire qui fera un premier contact avec l'axone. L'enroulement se produit par deux phénomènes : le premier est le mouvement de la langue interne (en jaune) du feuillet s'enroulant autour de l'axone et responsable de l'empilement des couches. Le deuxième est la compaction des couches produisant une extension latérale cette fois des couches produisant ainsi à son extrémité des bourrelets cytoplasmiques permettant une communication entre les parties les plus internes et externes du feuillet (langue externe, en violet). Des canaux intermédiaires appelés canaux cytoplasmiques (en rouge) sont également présents pendant le développement du feuillet permettant notamment un trafic vésiculaire. Ces canaux disparaissent lorsque le feuillet mature est stabilisé. L'activité neuronale et des facteurs exogènes peuvent cependant entraîner une plasticité de ces feuillettes et ainsi moduler l'activité de l'axone correspondant.

physique des axones, mais également des fonctions trophiques. En effet, les OLs par leur besoin énergétique conséquent pour la genèse du feuillet de myéline disposent d'un arsenal métabolique important. Ils assurent un support trophique aux axones notamment par la production de lactate afin d'assurer la synthèse d'ATP nécessaire au bon fonctionnement des neurones [98], [99]. Comme nous l'évoquons plus haut, ces oligodendrocytes sont produits par les OPCs que nous allons étudier à présent.

Ces cellules progénitrices sont notamment décrites pour leur capacité à produire par différenciation des OLs [100], [101]. Cette génération est massive dans les premières semaines périnatales puis cette production se tarit au fur et à mesure de la progression de la myélinisation [92]. Cependant, la population des OPCs se maintient tout au long de la vie bien que leur temps de cycle augmente avec le temps, constituant ainsi la population la plus importante de cellules prolifératives à l'âge adulte

représentant 2 à 8% de la population cellulaire totale [69], [102]. Dans le corps calleux notamment, leur temps de cycle est inférieur à 2 jours de P6 à P21, augmente à 9 jours à P60 jusqu'à atteindre un plateau de 70 jours à partir de P240, cette augmentation est encore plus importante dans le cortex [69] [103]. Cette population constitue à l'âge adulte un réservoir ayant le potentiel de se différencier de nouveau en OLs en cas de démyélinisation assurant une homéostasie de la densité d'OLs [104] [105] [106].

Longtemps considéré comme une quatrième population de cellules gliales à part entière, l'existence de ces cellules également appelées « glie NG2<sup>+</sup> » (du nom du marqueur ayant permis à les identifier) ou encore « polydendrocytes », avait déjà été pressentie par del Rio Hortega qui décrivait une population de cellules dont les prolongements cytoplasmiques bipolaires étaient plus courts [90]. Le groupe d'Akiko Nishiyama a longtemps étudié le devenir cellulaire des cellules NG2<sup>+</sup>. Bien que souvent décrits comme des OPCs, les cellules NG2<sup>+</sup> constituent un ensemble plus vaste de cellules comprenant des cellules murales dont les péricytes, des cellules mésenchymateuses et des myoblastes notamment [107]. Cependant le fait que la plupart des OPCs expriment le marqueur NG2 et que la plupart des cellules NG2<sup>+</sup> expriment également le marqueur PDGFR $\alpha$  rend difficile la distinction entre ces deux populations cellulaires et leur descendance étant donné que l'expression de ces marqueurs diminue lors de la différenciation [101] [107].

Ces dernières années, l'émergence de modèles murins permettant d'effectuer du *lineage-tracing* (suivi du destin cellulaire) via l'expression conditionnelle et spécifique de rapporteurs fluorescents, ont permis d'élucider la question de la progénie des cellules NG2<sup>+</sup> et PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>. Ainsi, *Rivers et al.*, démontre *in vivo* que les cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> chez le rat adulte donnent quasiment exclusivement des OLs ainsi qu'un faible nombre d'interneurones dans le cortex piriforme [108]. Le groupe de Nishiyama montre pour les cellules NG2<sup>+</sup>, une production embryonnaire transitoire d'astrocytes suivie d'une production exclusive de cellules NG2<sup>+</sup> et d'oligodendrocytes à des stades plus tardifs de l'embryogenèse et en postnatal [92]. *In vitro*, des OPCs purifiés depuis des nerfs optiques de rats capables de se différencier en astrocytes, potentiel conservé lorsque ces OPCs sont transplantés dans un environnement murin déplété en cellules gliales [109], [110]. On observe ainsi une certaine plasticité dépendante de l'âge, de la région et du contexte cellulaire des cellules progénitrices d'oligodendrocytes. Nous décrivons dans cette sous-partie plus particulièrement l'origine embryonnaire de ces OPCs, la différenciation et la maturation de ce lignage et ses propriétés électrophysiologiques.

### 2.2.1 Origines embryonnaires du lignage oligodendrocytaire

Dans les premiers jours de la neurulation et du développement de la plaque neurale, les cellules souches neurales appelées *cellules neuro-épithéliales* prolifèrent de manière symétrique afin d'augmenter leur nombre (**Figure 12**). Ces cellules neuro-épithéliales commencent ensuite à se diviser de manière asymétrique pour s'auto-renouveler d'une part, et pour produire des neurones directement ou indirectement via la production de progéniteurs neuraux d'autre part [111]. On parle alors de *cellules de la glie radiaire* (cellules RG) nommées d'après prolongement s'étendant dans l'épaisseur du cortex, servant de support aux neuroblastes en migration. Après cette première étape de neurogenèse qui démarre dans les deux premières semaines de l'embryogenèse chez la souris, débute un second programme développemental permettant la production de progéniteurs gliaux et d'astrocytes : on parle de gliogenèse (*neurogenic-to-gliogenic switch*), produisant de manière séquentielle, astrocytes et OPCs ainsi que cellules épendymaires [112].

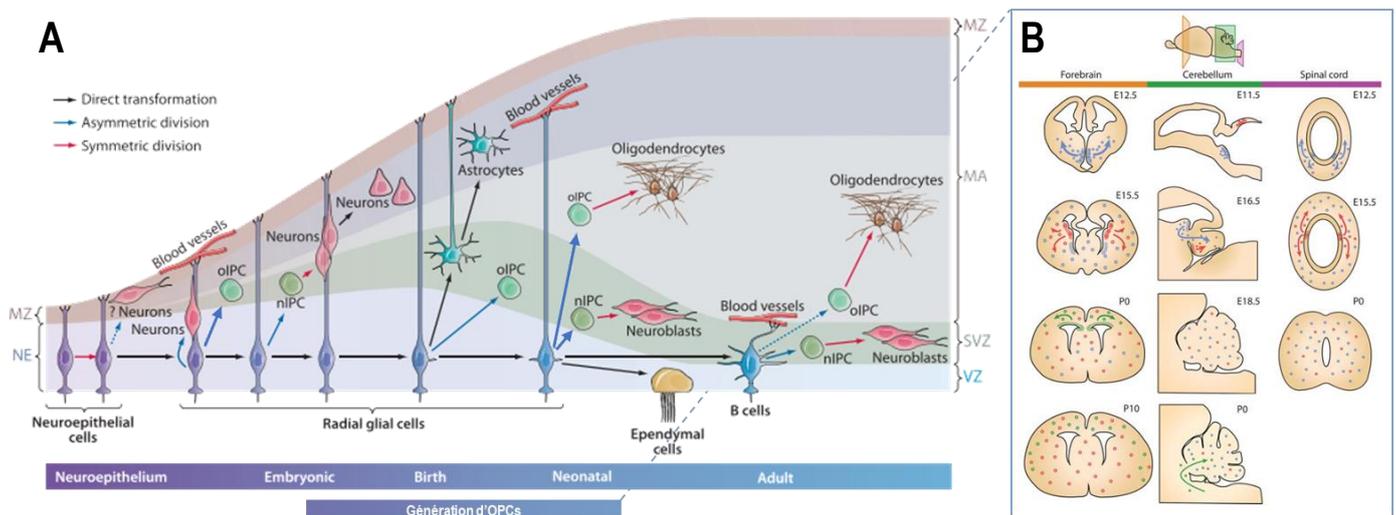


Figure 12 – Des origines variées et séquentielles de la production de cellules gliales (d'après Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009 et Tilborg et al., 2018)

**A.** Les cellules neuro-épithéliales se divisent symétriquement pour assurer le développement du tissu neural. Ces cellules adoptent par la suite une division asymétrique permettant d'une part leur renouvellement et d'une autre la production de progéniteurs intermédiaires à l'origine de la production de neurones, ce sont les cellules de la glie radiaire (RG). Dans la seconde partie de l'embryogenèse, les cellules RG subissent un changement de destinée cellulaire passant d'une neurogenèse à une gliogenèse avec la production d'OPCs, d'astrocytes et de cellules épendymaires. A l'âge adulte, les cellules RG se sont différenciées en cellules épendymaires ou maintenues en cellules de type B. Elles sont responsables de la neurogenèse à travers une production d'OPCs et d'interneurones dans la zone sous-ventriculaire et de neurones dans le gyrus denté de l'hippocampe. **B.** Les OPCs sont produits durant l'embryogenèse sous forme de vagues successives originaires de différentes régions ventriculaires. Dans le télencéphale, on décrit trois vagues consécutives de E12 à la naissance, dont seules subsistent les deux dernières. Dans le cervelet, on décrit une faible production locale d'OPCs largement complétée par une colonisation d'OPCs de structures extra-cérébelleuses. Enfin dans la moelle épinière, on décrit également deux vagues de production : une première ventrale Shh-dépendante et une deuxième dorsale Shh-indépendante.

Au cours de l'embryogenèse, le facteur de transcription OLIG2 est important dans le développement du lignage oligodendrocytaire. Il promeut la spécification de neurones et d'oligodendrocytes en fonction de son état de phosphorylation : dans un premier temps, sa phosphorylation entraîne les cellules embryonnaires vers le lignage neuronal et sa déphosphorylation successive le rend spécifique au demeurant du lignage oligodendrocytaire [113]. Pour la spécification des cellules dans le lignage oligodendrocytaire, OLIG2 interagit notamment avec le facteur MASH1/ASCL1 [114]. Une étude réalisée au sein de l'Institut, par le groupe de Carlos Parras, démontre dans un modèle murin inactivé pour ASCL1 que son absence entraîne une réduction de la spécification des NSCs dans le lignage oligodendrogial au profit d'astrocytes ainsi qu'une réduction de la myélinisation chez la souris juvénile [115] [116]. ASCL1 est également impliqué dans la remyélinisation comme le montre sa surexpression dans les OPCs dans un modèle de démyélinisation [115].

L'origine embryonnaire des OPCs a été particulièrement étudiée dans la moelle épinière et le télencéphale (**Figure 12**). La myélinisation du SNC est dite antérograde, c'est-à-dire qu'elle débute de manière caudale au niveau de la moelle épinière pour s'achever dans les régions corticales autour de deux mois chez la souris et jusqu'à 30 ans chez l'Homme [92]–[95]. Cependant, la production d'OPCs débute dans ces structures quasiment en même temps autour de la deuxième semaine de gestation chez la souris [117]. Dans la moelle épinière, les OPCs dérivent de progéniteurs neuraux du domaine pMN ventral distincts des pMN dorsaux donnant naissance à des motoneurones [118], [119]. L'expression graduelle de la voie *Sonic-Hedgehog* (Shh) induira l'expression du facteur de transcription OLIG2 dans les pMN ventraux induisant la production graduelle d'OPCs [118], [119]. Survient ensuite une vague dorsale de production d'OPCs indépendante de la voie Shh.

Dans le télencéphale, *Kessarlis et al.*, décrivent trois vagues embryonnaires successives de production d'OPCs [120]. Une première vague ventrale d'OPCs est produite par des progéniteurs NKX2.1<sup>+</sup> de l'éminence ganglionnaire médiane et de l'aire entopédonculaire antérieure à E12,5 (*embryonic day*). Ils envahissent alors le parenchyme cérébral jusqu'à des niveaux dorsaux où ils sont rejoints par une seconde vague originaire des éminences ganglionnaires caudales et latérales autour d'E15. Enfin, une dernière vague provenant de la SVZ dorsale produira la plupart des OPCs demeurant des structures périnatales. Par exemple, 80% des OPCs du corps calleux proviennent de la troisième vague [121]. Alors que l'on pensait que la première vague embryonnaire de production d'OPCs ne persistait pas en postnatal [120], de récentes études montrent une persistance de ces OPCs en postnatal : à P12, 20% des OPCs du corps calleux dérivent de la première vague et cette proportion monte à 48% dans la moelle épinière dorsale [121], [122]. Afin de coloniser le parenchyme cérébral, les OPCs migrent le long des vaisseaux sanguins par activation de la voie Wnt de manière autocrine pour induire l'expression de CXCR4,

un récepteur impliqué dans la migration chez l'embryon [123]. Ainsi, les OPCs peuvent entamer leur processus de différenciation.

À l'âge adulte, des OPCs se maintiennent par auto-renouvellement mais peuvent également être produits par spécification de NSCs au niveau de la SVZ dorsale en condition de lésions [104], [124]. De manière remarquable, les OPCs sont capables de réguler leur densité et de migrer et proliférer dans des zones lésées afin de maintenir leur homéostasie et une population constante en embryonnaire et chez l'adulte [106], [120]. Pour atteindre leur destination finale, les OPCs nécessitent un système vasculaire fonctionnel pour migrer le long des vaisseaux grâce au couplage du récepteur CXCR4 des OPCs au ligand SDF-1 (CXCL12) exprimé par les cellules endothéliales [123]. L'activation de la voie Wnt, induit l'expression de CXCR4 et donc la migration des OPCs ; d'autres facteurs comme le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) favorisent également la migration [117], [123]. Arrivés à destination, les OPCs prolifèrent jusqu'à atteindre un équilibre homéostatique [106].

### 2.2.2 *Différenciation et maturation du lignage oligodendrocytaire*

Dès lors, les progéniteurs subissent d'importants changements transcriptionnels induisant leur différenciation que nous allons décrire [117]. Lorsque les OPCs atteignent leur équilibre homéostatique, ils entament leur processus de différenciation en oligodendrocytes immatures (iOLs). Parmi les voies régulant la différenciation des OPCs, l'activation de la voie Wnt a été décrite comme un inhibiteur majeur de ce processus [125]–[127]. La surexpression de son effecteur TCF4/TCF7L2 ou l'inactivation de son inhibiteur APC dans les cellules OLIG2<sup>+</sup> altère la maturation des oligodendrocytes en conditions physiologiques et en condition de remyélinisation [125]. CC1 constitue par ailleurs un marqueur *pan*-oligodendrocyte reflétant l'inhibition de cette voie dans ces cellules (**Figure 13**) [128]. Lors de lésions de la myéline, on retrouve une surexpression de l'AXIN2, un inhibiteur de la voie Wnt, associée à la maturation des oligodendrocytes ; son inactivation entraînant une diminution du nombre de ces derniers [126].

L'activité neuronale induit l'expression de miARNs (micro ARNs), inhibant l'expression de marqueurs d'OPCs comme PDGFR $\alpha$  et NG2 (**Figure 13**), favorisant la différenciation [117], [129]. OLIG1 est facteur important de la différenciation des OPCs corticaux. En effet, son inactivation constitutive entraîne un défaut de myélinisation dans les structures de la matière blanche cérébrales comme le corps calleux alors que la moelle épinière n'est pas impactée [130]. En combinaison avec OLIG2, il induit l'expression de SOX10, un facteur de transcription induisant l'expression de protéines constitutives de la myéline comme MBP [131]. Toutefois,

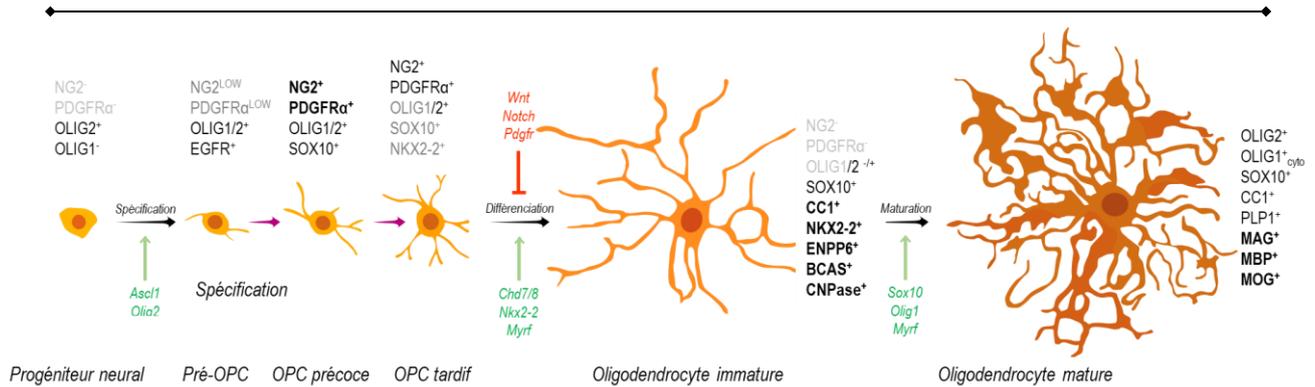


Figure 13 – Spécification et différenciation du lignage oligodendrocytaire et ses marqueurs (d'après *Nishiyama et al., 2021*)

Le lignage oligodendrocytaire est caractérisé par une grande variété de marqueurs définissant l'identité cellulaire de ses composants. Les facteurs ASCL1 et OLIG2 permettent une spécification des progéniteurs neuronaux dans la voie oligodendrocytaire en induisant l'expression des marqueurs PDGFR $\alpha$  et NG2, caractéristiques du stade OPC. Dans les stades les plus précoces, on observe la présence de pré-OLCs, récemment décrits, exprimant le récepteur EGFR. On note également l'expression nucléaire des facteurs OLIG2 (dont l'expression reste constante dans le lignage) et OLIG1. Lors de la différenciation cellulaire, l'expression de ce dernier diminue tandis que des facteurs de différenciation s'expriment de manière plus importante comme SOX10 et NKX2.2. Suite à la différenciation, une multitude de changements transcriptomiques et épigénétiques se déroule bouleversant la biologie des marqueurs du lignage. Les iOLs commencent à exprimer APC/CC1, ce dernier constituant un marqueur des stades différenciés. L'expression de NKX2.2 est alors maximale, on note également l'expression d'ENPP6, BCAS et notamment CNPase qui constituent tous des marqueurs des stades immatures. Lors de la maturation, le facteur OLIG1 est exprimé de nouveau, mais de manière cytoplasmique, participant au développement de la myéline. Il induit notamment l'expression de protéines constitutives de la myéline de manière progressive telles que PLP1, MAG, MBP et enfin MOG.

pour que la différenciation des OPCs soit efficace, OLIG1 doit être exprimé de manière transitoire pour permettre la maturation complète des oligodendrocytes. Sa surexpression dans les NSCs *in vitro* induit la différenciation en OPCs, mais empêche le développement d'OLs matures (mOLs) [132]. Son expression nucléaire est largement diminuée dans les OPCs en différenciation [130], [133]. On retrouve ensuite une expression cytoplasmique dans les OLs en cours de maturation [115], [130]. On observe également une surexpression du facteur NKX2.2 dans les OPCs engagés dans la différenciation, son inactivation conduisant à une altération de la différenciation causant une accumulation d'OPCs [134].

En plus de ces changements transcriptionnels au cours de la différenciation, les OPCs subissent également une reprogrammation épigénétique. Le groupe de Carlos Parras établit le rôle inédit et redondant des remodelleurs chromatinien CHD7 et CHD8 dans la différenciation initiale des OPCs [135]. *Marie et al.*, démontrent que l'inactivation conditionnelle de ces remodelleurs dans les OPCs (*Chd7iKO* et *Chd8iKO*) induit l'apoptose des OPCs par surexpression de p53 et une diminution du nombre d'OLs [135]. En effet, CHD7 réprime l'expression de p53 et induit

l'expression des facteurs de transcription NKX2.2 et SOX10 ainsi que de GPR17, tous trois impliqués dans la différenciation du lignage [135]. Les histones désacétylases HDAC1 et HDAC2 ont également été décrites dans la différenciation des OPCs. L'inactivation conditionnelle de HDAC1 et HDAC2 dans le lignage oligodendrocytaire cause une diminution des populations d'OPCs et d'OLs, suggérant que ces histones désacétylases interviennent à différentes étapes du développement oligodendrocytaire [129].

Enfin, les iOLs achèvent leur maturation au niveau des axones des neurones pour induire la myélinisation. On observe une induction de gènes codant des protéines associées à la myéline comme PLP, MAG, MBP notamment induits par OLIG1 et SOX10 (**Figure 13**) [131]. Un autre régulateur important dans la différenciation et notamment la maturation des OLs est le facteur régulateur de la myéline, MYRF. Une inactivation conditionnelle de ce facteur résulte en une altération sévère de la myélinisation du SNC chez la souris [136]. L'expression de MYRF induit l'expression des protéines constitutives de la myéline pour l'établissement correct des feuillettes membranaires des mOLs.

### 2.2.3 *Propriétés électrophysiologiques des OPCs*

Au-delà de la régulation de l'activité électrique des neurones par l'établissement du feuillet de myéline permettant la conduction saltatoire, les OLs et les OPCs interagissent également avec les neurones via une communication électrique. Dwight E. Bergles montre pour la première fois au début des années 2000, la présence de synapses glutamatergiques fonctionnelles dans l'hippocampe murin entre des neurones et des OPCs [137]. Quelques années plus tard, il étend cette observation en décrivant la présence de synapses GABAergiques toujours dans l'hippocampe entre les neurones et les OPCs mais également entre les neurones et les oligodendrocytes [138]. *Karadottir et al.*, détaillent ensuite des courants de composante AMPA et NMDA (du nom des récepteurs ionotropiques qui les composent) de synapses glutamatergiques dans les oligodendrocytes et montrent que l'intensité des courants induits diminue avec la maturation du lignage oligodendrocytaire [139]. On s'interroge alors à cette époque sur les conséquences fonctionnelles de telles interactions dans les OLs et leurs progéniteurs.

Les travaux du groupe de Michelle Monje ont permis de décrire les conséquences fonctionnelles de l'activité neuronale dans le lignage oligodendrocytaire. Ils démontrent dans un modèle murin d'optogénétique que l'activité neuronale induite par les motoneurones corticaux induit une augmentation du nombre et de la prolifération des OPCs ainsi qu'une augmentation du nombre d'OLs et de l'épaisseur de leurs feuillettes de myéline [140]. Ainsi, l'activité neuronale exerce un rôle important dans le développement du lignage oligodendrocytaire.

### 2.3. Hétérogénéité du lignage oligodendrocytaire

A l'image des cellules tumorales qui en dérivent, les cellules du lignage oligodendrocytaire sont particulièrement hétérogènes, notamment en termes de capacité proliférative, de différenciation et de myélinisation en conditions physiologiques et pathologiques, constituant ainsi une population diverse et complexe. Nous décrivons dans cette partie les travaux pionniers du groupe de Magdalena Götz et de sa collaboratrice Leda Dimou, qui ont largement contribué à la description de l'hétérogénéité régionale des cellules du lignage oligodendrocytaire. Nous présenterons également les désormais incontournables travaux du groupe de Gonçalo Castelo-Branco, qui ont permis de décrire l'hétérogénéité au niveau transcriptomique du lignage par *Single-cell RNA-Seq*. Enfin, nous aborderons les travaux du groupe de Ragnhildur Thora Karadottir qui s'est intéressé à la composante électrophysiologique de cette hétérogénéité.

#### 2.3.1 Hétérogénéité régionale des progéniteurs d'oligodendrocytes

Depuis plus de dix ans, les OPCs sont décrits comme présentant des particularités physiologiques dues à leur environnement régional. Magdalena Götz et Leda Dimou ont été pionnières dans ces découvertes en démontrant, grâce à un modèle de suivi du destin cellulaire des cellules OLIG2<sup>+</sup> (Olig2::CreER<sup>TM</sup>; Z/EG/R26R), une dynamique de différenciation différente entre les structures de la matière blanche (WM, *White Matter*) et celles de la matière grise (GM, *Grey Matter*) chez la souris adulte [141]. Ce modèle permet le suivi après injection au tamoxifène de la descendance des cellules OLIG2<sup>+</sup> en induisant par recombinaison l'expression d'un rapporteur fluorescent (GFP ; Z/EG) ou colorimétrique ( $\beta$ -galactosidase ; R26R) [141]. Alors qu'elles ne constatent pas de différence régionale dans les premiers jours suivants la recombinaison, elles décrivent qu'à partir de deux mois, les OPCs des structures de la GM demeurent des progéniteurs NG2<sup>+</sup> (73%) tandis que ceux de la WM se sont différenciés en oligodendrocytes (81% de cellules CC1<sup>+</sup>) [141]. Pour évaluer si les progéniteurs NG2<sup>+</sup> demeurant dans la GM et la WM sont prolifératifs, elles réalisent une expérience d'incorporation au BrdU (sur 3 jours) à 5-8 jours, 27-30 jours ou 117-120 jours après recombinaison. Les auteures observent que seules 8% des cellules recombinées de la GM demeurent prolifératives après 117-120 de recombinaison alors que cette proportion est de 14% pour les cellules de la WM [141]. Ces résultats illustrent une différence des dynamiques de différenciation et de prolifération des OPCs dépendantes de la région, démontrant un état plus immature et quiescent des OPCs de la GM (gmOPCs) contre un état plus prolifératif et un potentiel de différenciation plus important des OPCs de la WM (wmOPCs) participant à une myélinisation active (**Figure 14**).

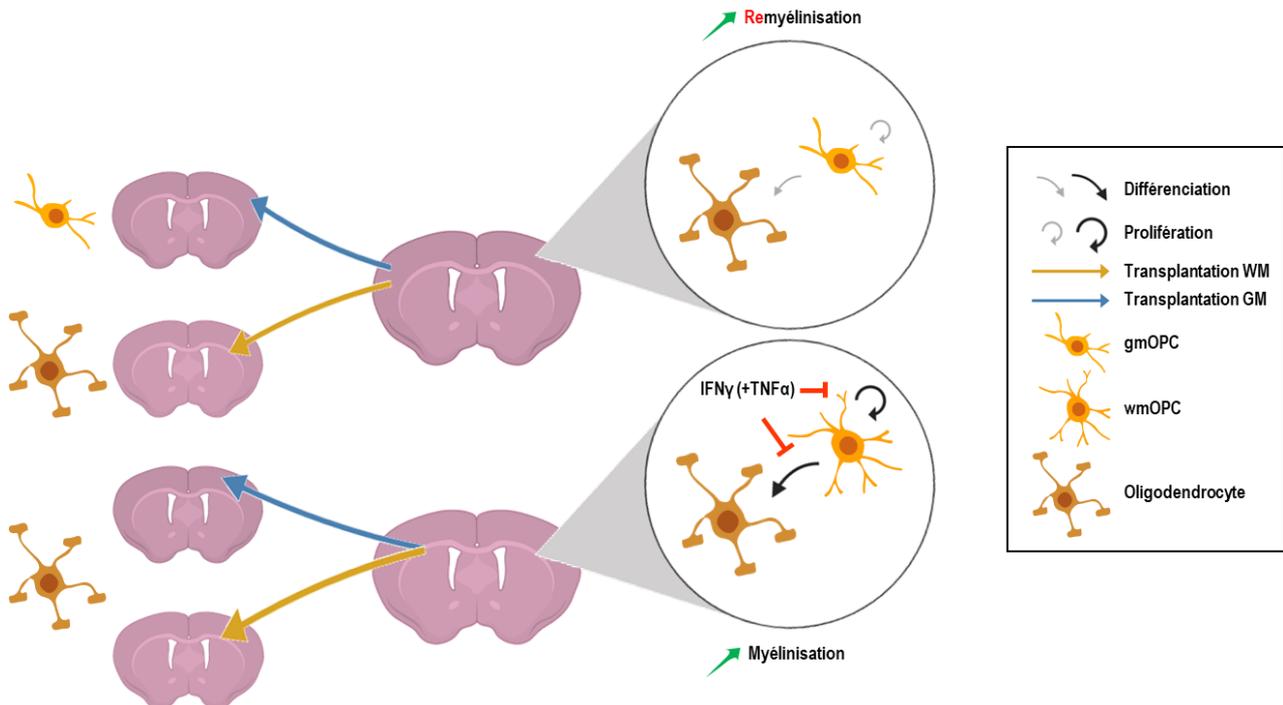


Figure 14 – Hétérogénéité régionale de OPCs de la matière grise et de la matière blanche

Le lignage oligodendrocytaire est caractérisé par une importante hétérogénéité régionale entre les structures de la matière blanche (WM) et les structures de la matière grise (GM). Les gmOPCs conservent une sensibilité à l'environnement leur permettant une certaine plasticité. Lorsqu'ils sont transplantés dans des structures de la GM, ils conservent leurs propriétés immatures. Alors que lorsqu'ils sont transplantés dans des structures de la WM, ils se différencient massivement en oligodendrocytes myélinisants. À l'inverse, les wmOPCs conservent leurs propriétés intrinsèques et se différencient pleinement indépendamment de la structure. En condition de lésion, ces derniers sont cependant plus sensibles aux cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  diminuant leur capacité à proliférer et à se différencier. De plus, la remyélinisation chez des patients atteints de sclérose en plaques est plus efficace dans le cortex que dans les structures de matière blanche, témoignant d'un potentiel de réserve des gmOPCs en cas de lésions.

Les auteures se sont alors demandées si cette population de gmOPCs quiescents pouvait constituer une population de cellules de réserve capable de générer des oligodendrocytes en cas de lésion. Leur modèle de lésion consiste en l'introduction d'une aiguille, au niveau de la GM, 5 jours après recombinaison. Les animaux sont analysés à différents jours post-lésion (3, 5, 7, 30 et 60) [141]. Les auteures montrent une augmentation temporaire, due à une mort précoce (Caspase3<sup>+</sup>), du nombre de gmOPCs ainsi que de leur prolifération au site de lésion à 3 et 5 jours post-lésion [141], [142]. En dehors de ces changements, les auteurs ne décrivent pas de différences entre le cortex lésé et son contrôle ipsilatéral sain. Ce modèle présente cependant le biais de ne pas reconstituer l'environnement moléculaire et les facteurs sécrétés induits par la démyélinisation. *Dimou et al.*, proposent une explication des différences physiologiques mesurées par la composition des microenvironnements différents entre la GM et la WM. D'autres rôles sont

également proposés pour ces gmOPCs : ils pourraient constituer la population d'OPCs communiquant dans les synapses avec les neurones. Les différences physiologiques entre les gmOPCs et wmOPCs pourraient également être dues à une distribution différente en OPCs des trois vagues embryonnaires pouvant avoir des spécificités fonctionnelles [120].

*Simon et al.*, illustrent trois ans plus tard que ces progéniteurs corticaux adultes sont sensibles à l'activité neuronale induits par l'exercice physique volontaire, favorisant leur différenciation [142]. Plus encore, lorsque les gmOPCs sont transplantés dans la WM, ils se différencient à hauteur de 80% alors que ce pourcentage chute à 40% lorsqu'ils sont transplantés dans la GM [143]. À l'inverse, les wmOPCs génèrent des oligodendrocytes myélinisants indépendamment du lieu de transplantation (**Figure 14**). Cette spécification régionale s'acquiert au cours du temps et dépend de l'environnement dans la période périnatale [143]. Les gmOPCs conservent une sensibilité à l'environnement plus importante que les wmOPCs, leur permettant une certaine plasticité. Ces expériences témoignent de l'importance des facteurs environnementaux plutôt que de l'origine embryonnaire pour la modulation des propriétés physiologiques des OPCs.

Enfin, *Lentferink et al.*, s'intéressent en 2018 à la nature de ces facteurs environnementaux en étudiant des populations triées de gmOPCs et de wmOPCs *in vitro* [144]. Les auteurs montrent une arborisation plus complexe des wmOPCs et une immaturité plus importante des gmOPCs au niveau transcriptomique, notamment via la surexpression de *Pdgfra* et la répression des protéines de la myéline (*Cnp*, *Opalin*, *Mbp*), ainsi qu'une capacité migratoire deux fois plus importante des gmOPCs. Pour comprendre le comportement hétérogène des OPCs dans le contexte de la sclérose en plaques, les auteurs ont exposé des gmOPCs et wmOPCs à des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  [145]. Ces cytokines induisent une diminution de la prolifération et de la différenciation, de manière synergique, qui semblent cibler plus spécifiquement les wmOPCs (**Figure 14**) [144]. En effet, ces derniers expriment de manière plus importante le gène codant le récepteur de l'IFN $\gamma$ , *Ifngr1*. Sachant que la démyélinisation entraîne un phénomène de conversion du transcriptome des OPCs adultes vers des états plus immatures et migratoires d'OPCs postnataux [146], et que la remyélinisation semble être plus importante dans la GM que la WM chez les patients atteints de sclérose en plaques [147], ces gmOPCs résistants aux cytokines pro-inflammatoires et plus sensibles aux facteurs environnementaux, pourrait constituer une population importante dans les processus de remyélinisation.

### 2.3.2 *Hétérogénéité transcriptomique et temporelle des OPCs*

Pour caractériser cette hétérogénéité régionale au niveau transcriptomique, le groupe de Gonçalo Castelo-Bronco a réalisé de plusieurs études de *Single-cell RNA-seq* sur le lignage oligodendrocytaire décrites en **Figure 15**. Dans une étude publiée dans *Science* en 2016, les auteurs décortiquent l'hétérogénéité du continuum du lignage oligodendrocytaire de régions distinctes du cerveau et de la moelle épinière de souris juvéniles (P21-P30) et adultes (P60) [148]. Alors que les premiers stades du lignage sont plutôt homogènes, ils décrivent une hétérogénéité croissante des populations d'oligodendrocytes matures (MOLs) qu'ils divisent en six stades, spécifiquement enrichis dans certaines régions. Ils présentent également une seconde population PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> distincte des OPCs et associée aux vaisseaux, identifiée comme une population vasculaire (VLMC, *Vascular and Leptomeningeal cells*) exprimant des gènes tels que *Tbx18*, *Vtn*, ou encore *Lum*. Les OPCs (*Pdgfra*<sup>High</sup>, *Cspg4*) engagés vers la différenciation sont identifiés comme COP (*Committed Oligodendrocyte Precursor* : *Gpr17*, *Nkx2-2*, *Tns3*) et donneront naissance à deux populations séquentielles d'oligodendrocytes immatures (NFOL1 et 2, *Newly Formed Oligodendrocyte*) exprimant notamment les gènes *Tns3*, *Itpr2* et *Tcf7l2*. Ces nouveaux oligodendrocytes entament alors leur processus de maturation et développent leur feuillet de myéline (MFOL1 et 2, *Myelin Forming Oligodendrocyte*) par l'expression des gènes *Mog*, *Plp1* et *Opalin*. Enfin, ces oligodendrocytes myélinisants achèveront leur processus de maturation dans l'une des six populations d'oligodendrocytes matures décrites (MOL1 à 6, *Mature Oligodendrocyte*).

Les auteurs décrivent aussi une dynamique temporelle de différenciation dépendante de la structure : en fonction de la distribution des cellules du lignage, ils décrivent chez la souris juvénile des structures immatures comme l'amygdale, le gyrus denté et l'hippocampe, des structures intermédiaires comme le striatum et le corps calleux, et des structures matures comme la corne dorsale et la substance noire. Cette dynamique de différenciation est dépendante de l'âge : alors que le cortex S1 (aire somatosensorielle) présente une maturité du lignage plus importante que le corps calleux à P20-30, la tendance s'équilibre à P50-60. Les auteurs décrivent également ne pas avoir pu distinguer dans cette étude de populations d'OPCs en fonction de l'âge ou de la région, ne permettant pas de révéler l'hétérogénéité régionale des OPCs.

Les oligodendrocytes et en particulier les populations matures, semblent présenter cependant une spécificité régionale : alors que les MOL5 sont retrouvés dans toutes les régions, on retrouve les MOL3 au niveau de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale tandis que les MOL4 se retrouvent plutôt au niveau de la moelle épinière. Cette étude descriptive ne présume cependant pas de fonctions spécifiques des sous-populations décrites.

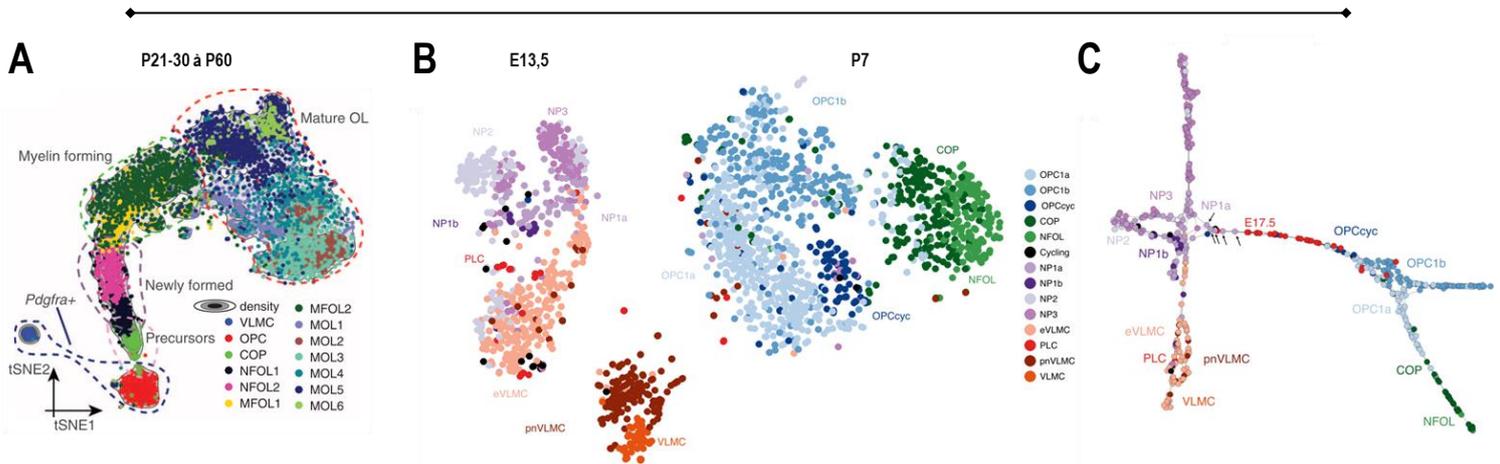


Figure 15 – Hétérogénéité transcriptomique du lignage oligodendrocytaire du cerveau et de la moelle épinière au cours du temps (d'après *Marques et al.*, 2016 et 2018)

Les études transcriptomiques à l'échelle de la cellule unique du groupe de Castello Bronco ont permis de mettre en évidence la diversité du lignage oligodendrocytaire au cours du développement. **A.** Les différents types cellulaires du lignage oligodendrocytaire forment un continuum de différenciation et de maturation des progéniteurs constituant un cluster homogène d'OPCs (OPC) jusqu'aux six stades décrits d'oligodendrocytes matures (MOL1-6). Entre les deux états se trouve une continuité de stades intermédiaires d'oligodendrocytes immatures (NFOL1 et 2) et myélinisants (MFOL1 et 2). Les auteurs décrivent une population PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> constituée de VLMC distincte des OPCs. **B.** Au niveau embryonnaire, on observe une similitude importante au niveau transcriptomique des OPCs des différentes vagues et des différentes régions (télencéphale et moelle épinière). Les premiers clusters OPCs et VLMC apparaissent à P7 tandis que les clusters embryonnaires sont composés à majorité de progéniteurs neuraux et de VLMC embryonnaires. **C.** Une analyse *pseudo-time*, permettant d'étudier les liens développementaux entre les clusters, décrit les lignages oligodendrocytaires et vasculaires comme dérivant de progéniteurs différents. Au niveau du lignage oligodendrocytaire, on décrit une population OPC1b qui ne se différencie pas en oligodendrocytes et qui semble constituer une population quiescente.

Par la suite ils se focalisent sur les OPCs pour étudier l'hétérogénéité régionale décrite des OPCs en réalisant de nouvelles études transcriptomiques dans la moelle épinière et le cerveau de souris embryonnaires (E13,5) et postnatales (P7) [122]. Ils démontrent en premier lieu que le profil transcriptomique des OPCs de la moelle épinière et du cerveau sont assez similaires, quoique la moelle épinière soit légèrement plus mature au même stade, ce qui est cohérent avec la myélinisation antérograde au cours du développement [117]. Les auteurs décrivent plutôt une divergence transcriptomique qui est fonction du temps. Les OPCs postnataux présentent de manière attendue un enrichissement en gènes de la différenciation (*Sox10*, *Nkx2-2*) tandis que les OPCs embryonnaires expriment des gènes en lien avec la spécification dans le lignage oligodendrocytaire (*Otx2*, *Nkx2-1*, *Arx*) [122]. Les OPCs postnataux présentent également l'expression de canaux ioniques, de gènes impliqués dans la transmission synaptique et des récepteurs GABAergiques, rappelant les fonctions électrophysiologiques des OPCs évoquées plus haut.

En réalisant un *Single-cell RNA-Seq* sur des cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>, le groupe présente au niveau embryonnaire quatre populations de progéniteurs neuraux (NP1a et b, NP2 et NP3) ainsi que deux populations vasculaires (PLC et eVLMC) (**Figure 15**). Ils constatent l'apparition de clusters OPCs uniquement au stade postnatal et décrivent trois populations : OPC1a et b et OPCcyc. Les deux premières populations, quasiment confondues, se distinguent du cluster OPCcyc qui constitue un cluster d'OPCs prolifératifs [122]. Les auteurs décrivent les clusters NP1a et NP3 comme plus proches des clusters OPC postnataux tandis que le cluster NP1b est plus proche des clusters VLMC. Cela suggère que les OPCs et VLMC dérivent de progéniteurs PDGFR $\alpha$  distincts. Une analyse de réseau (*pseudo-time analysis*), permettant de mettre en évidence une progression développementale entre les clusters, renforce l'idée que les lignages oligodendrocytaires (clusters OPC) et vasculaires (clusters VLMC) dérivent de progéniteurs PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> distincts (clusters NP1a pour les OPCs et NP1b pour les VLMC). Les auteurs le démontrent expérimentalement en utilisant un modèle inductible au tamoxifène permettant l'expression spécifique du rapporteur fluorescent GFP dans la descendance des cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> injectées à E12.5 (*Pdgfra::creERT ; LoxP-eGFP*). Ils rapportent à P21 que 47% de cette population GFP<sup>+</sup> est constituée d'OPCs et 15% de VLMC/péricytes.

Enfin, afin d'observer s'il existe des différences transcriptomiques entre les OPCs des différentes vagues embryonnaires, les auteurs réalisent un nouveau *Single-cell RNA-Seq* sur le modèle murin précédent à P7 après induction d'un premier groupe de souris à E13,5 (première vague) et d'un second groupe à P3 (dernières vagues). Ils observent alors un profil similaire des OPCs des différentes vagues témoignant d'une convergence transcriptomique des OPCs durant le développement embryonnaire et dans la période périnatale (**Figure 15**). Les OPCs acquerraient ainsi cette hétérogénéité au cours du temps comme le démontrent les travaux du groupe de Leda Dimou réalisés chez l'adulte. La question du mécanisme d'acquisition au cours du temps de cette hétérogénéité demeure ouverte.

### 2.3.3 *Hétérogénéité électrophysiologique des OPCs*

À cette question, la réponse pourrait bien être électrophysiologique. Dans un récent article de *Spitzer et al.*, étudient la densité en canaux ioniques des OPCs et leur rôle dans la physiologie des OPCs en fonction du stade de développement et de la région [149]. Jusqu'à la fin de la première semaine postnatale, le comportement électrophysiologie et la densité des canaux ioniques des OPCs des différentes structures sont particulièrement homogènes. Les premiers courants ioniques mesurables chez les OPCs apparaissent à E18 et sont de composantes potassiques (85% des OPCs) et sodiques (38%). Les canaux sodiques voltage-dépendants seront exprimés de manière plus importante durant la période périnatale

pendant laquelle la différenciation est la plus active, de même que les récepteurs NMDA, dont les travaux du groupe de Monje ont démontré l'importance dans la différenciation des OPCs [140]. De plus, les auteurs démontrent que la densité de ces canaux ioniques est dépendante de la région considérée, coïncidant avec le développement de la myéline dans ces structures : on retrouve ainsi une proportion d'OPCs du corps calleux exprimant une densité de récepteurs NMDA plus importante que celle du cortex, allant de pair avec une myélinisation plus importante des structures de la matière blanche. Ces différences électrophysiologiques pourraient bien être l'une des causes fonctionnelles de l'hétérogénéité régionale des OPCs.

En effet, une corrélation est observée entre l'état prolifératif des OPCs et la densité en canaux sodiques. Cette densité est modulée en fonction de l'état prolifératif des OPCs : on retrouve une densité 1,7 fois plus importante des canaux sodiques des OPCs en phase G2/M par rapport à ceux en phase G<sub>0</sub>/G1 [149]. Plus encore, cette densité en canaux ioniques, ainsi que la capacité proliférative associée est dépendante de l'environnement. Dans les premières semaines périnatales, des milieux conditionnés permettent *in vitro* de moduler l'expression des canaux ioniques des OPCs périnataux. Cependant, après migration et établissement des OPCs dans leur région finale, la sensibilité de l'expression des canaux ioniques des OPCs adultes à l'environnement diminue.

Ces résultats expliquent ainsi l'homogénéité des OPCs à des stades postnataux, observée par le groupe de Castello Bronco. L'expression de ces canaux ioniques, corrélée à la myélinisation et la prolifération, est dépendante de l'âge. En effet, le contenu en canaux ioniques des OPCs, durant la période embryonnaire et dans la première semaine postnatale, est très homogène. L'hétérogénéité décrite des OPCs s'acquerrait ainsi au cours du temps et de l'environnement régional.

Constituant la plus grande population de cellules prolifératives du cerveau adulte, les OPCs sont des cellules à l'origine de l'initiation et du développement des oligodendrogliomes avec lesquelles elles partagent de nombreuses similitudes histologiques et transcriptomiques. Les hétérogénéités temporelles, régionales et électrophysiologiques sont des sources de diversité des OPCs modulant leurs propriétés physiologiques et notamment leur capacité à se différencier et à proliférer. Des phénomènes retrouvés dans les gliomes également caractérisés par une grande hétérogénéité notamment retrouvée au niveau des altérations génétiques des oligodendrogliomes. Parmi ces altérations discutées dans la première partie, nous retrouvons des mutations du gène *CIC*, un facteur de transcription régulant la voie des MAP kinases (*Mitogene-Activated Protein*). Nous nous intéresserons au rôle de ce facteur de transcription dans la dernière partie de cette introduction.

### 3. *Le facteur de transcription CIC : un important régulateur de la voie des MAP kinases*

---

Comprendre les altérations génétiques retrouvées dans les oligodendrogliomes est fondamental pour appréhender les mécanismes à l'origine de leur développement. Retrouvé muté dans plus de la moitié des oligodendrogliomes, le gène *CIC*, est *a priori* un facteur important pour le développement de ces tumeurs. Dans cette dernière partie de l'introduction, nous détaillerons en premier lieu le gène *CIC* et sa protéine résultante d'un point de vue structural et fonctionnel avant de nous focaliser dans un deuxième temps sur les fonctions physiologiques de *CIC* et son rôle dans le développement de tumeurs et en particulier des gliomes.

#### 3.1. *CIC, un régulateur central de la voie des MAP Kinases*

Découvert chez la *Drosophile* en l'an 2000 par Gerardo Jimenez, spécialiste du développement de ce modèle animal, le gène *capicua* (*cic*) est nommé ainsi suite à la contraction de l'expression catalane « *cap i cua* » signifiant littéralement « tête et queue » en référence au développement des structures dans lesquelles le gène *cic* est impliqué [150]. Les embryons mutés pour *cic* ne présentent pas les segments terminaux de l'embryon permettant le développement de la tête et de la queue dans lesquels il est exprimé [150]. Le gène *CIC* code un facteur de transcription régulant notamment l'expression de la voie des MAP kinases.

##### 3.1.1 *CIC, un répresseur transcriptionnel*

*CIC* est un répresseur transcriptionnel de la super-famille des *High Mobility Group* (HMG), comprenant notamment les protéines SOX et certaines protéines TCF [151]. La protéine *CIC* est hautement conservée à travers l'évolution en termes de structures et de fonctions de *Caenorhabditis elegans* à l'Homme [150]. Le gène *CIC* code deux isoformes décrites en **Figure 16**, appelées *CIC-S* (*Short*) de 148kDa (kiloDalton ; kDa) et *CIC-L* (*Long*) de 250kDa différant seulement par la longueur de leur région N-terminale [152], [153]. L'étude descriptive de *Lee et al.*, présente chez l'Homme un gène de 20 exons localisé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.2). L'exon 1A est spécifique de l'isoforme *CIC-L* tandis que l'exon 1B est spécifique de l'isoforme *CIC-S* [154]. Alors que l'isoforme *CIC-L* est conservée au cours l'évolution, une étude d'homologie de séquence suggère que l'isoforme *CIC-S* a dérivé, de manière indépendante, de l'isoforme *CIC-L* à travers un mécanisme de gain d'intron ayant introduit un site d'initiation de la transcription alternatif [153].

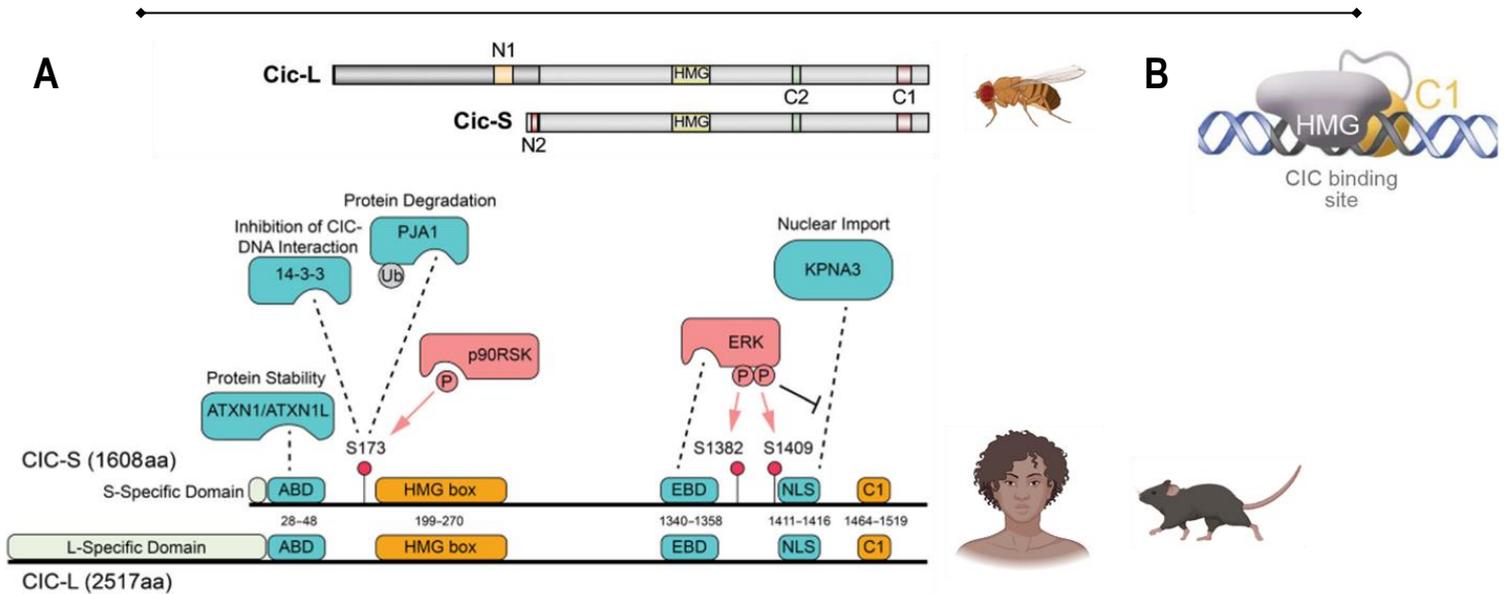


Figure 16 – Structure et fonction des domaines du gène *CIC* et de ces isoformes protéiques (d'après *Simon Carrasco et al., 2018, Wong et Yip, 2020 et Forès et al., 2017*)

**A.** Le gène *CIC* code deux isoformes : les isoformes *CIC-S* (1608 acides aminés) et *CIC-L* (2517 acides aminés). Les domaines de liaison à l'ADN de *CIC* sont les domaines HMG et C1. Le motif N2 présent uniquement dans la région N-terminale de l'isoforme *CIC-S* de la *Drosophile* permet l'interaction avec GROUCHO (GRO) avec qui *CIC* exerce sa fonction de répresseur. Chez les mammifères, on retrouve le motif ABD (*Ataxin Binding Domain*) de liaison à ATXN1 et ATXN1L, partenaires majeurs de *CIC*. Les isoformes mammaliennes de *CIC* possèdent une séquence d'adressage au noyau (NLS, *Nuclear Localization Sequence*) dans la région C-terminale alors que celle des *Drosophiles* est contenue dans le domaine HMG. Dans le cytoplasme, les domaines C2 et EBD (*Erk Binding Domain*) permettent, respectivement chez la *Drosophile* et les mammifères, la phosphorylation de *CIC* par les MAP Kinases/ERK induisant l'inhibition de son import nucléaire par l'importine  $\alpha 4$  (KPNA3). Dans le noyau, la phosphorylation du résidu Sérine 173 de *CIC* chez les mammifères par p90RSK, induit son export nucléaire par la protéine 14-3-3 et son adressage au protéasome par PJA1, une ubiquitine (E3) ligase. **B.** Le mécanisme de liaison unique de *CIC* à l'ADN décrit par Forès et al., est induit par la reconnaissance par le domaine HMG de la séquence octamérique de liaison de *CIC* et stabilisé par le domaine C1.

Les isoformes de *CIC* présentent des domaines hautement conservés de la *Drosophile* aux mammifères comme le domaine HMG (HMG-box : exons 2 à 6) et le domaine C1 (**Figure 16A**). Le domaine HMG est une séquence d'environ 75 acides aminés (AA) permettant la liaison à l'ADN de facteur de transcription telles que les protéines SOX, TCF1, TCF3 et LEF1 [151]. Le domaine C1, particularité de la protéine *CIC*, est également nécessaire pour une liaison à l'ADN efficace [12], [155], [156]. Le motif C2 est spécifique de la *Drosophile* et est décrit comme un site de liaison des MAP kinases modulant l'expression de *Cic* [155]. Chez les mammifères, il existe différents sites de phosphorylation induite par l'interaction des ERKs avec le domaine EBD (*Erk Binding Domain*) dans la région C-terminale [157].

Outre ces homologies de domaines, il existe une divergence évolutive entre la *Drosophila* et les mammifères qui ont permis de diversifier les rôles contextuels de CIC et ses mécanismes de régulation. La séquence d'adressage nucléaire (NLS) de CIC est présente dans le domaine HMG chez la *Drosophila* alors qu'elle constitue un motif singulier dans la région C-terminale chez les mammifères [155], [157], [158]. CIC nécessite la présence de partenaires pour une activité répressive efficace. Ces corépresseurs diffèrent notamment en fonction du type cellulaire, du stade de l'organisme et de l'espèce considérée, suggérant une importante dépendance du contexte pour les fonctions de CIC [153]. Cette dépendance du contexte s'inscrit notamment dans la divergence évolutive de certains domaines des isoformes de CIC (**Figure 16A**). Chez la *Drosophila*, on retrouve, de manière spécifique dans la région N-terminale de l'isoforme Cic-S, le motif N2 d'interaction avec GRO, un corépresseur intervenant notamment avec Cic dans la différenciation des structures terminales de l'embryon [150], démontrant une spécificité fonctionnelle des isoformes. Chez les mammifères, 80% de la quantité totale de protéine CIC interagit exclusivement avec ATXN1 et en particulier son paralogue<sup>7</sup> ATXN1L [152], via le domaine ABD, pour moduler ensemble une variété de processus développementaux et notamment la répression de gènes effecteurs de la voie des MAP kinases [159] [160].

En tant que répresseur transcriptionnel, CIC réprime l'expression de ses gènes cibles en se liant à des séquences régulatrices ou régions promotrices contenant le site de liaison octamérique « T(G/C)AATG(A/G)A » [161] (**Figure 16B**). Jusqu'à récemment, le mécanisme de liaison à l'ADN de CIC était méconnu. Les protéines HMG sont connues pour lier faiblement l'ADN et nécessitent une interaction avec d'autres facteurs de transcription pour augmenter leur affinité et spécificité de liaison [151]. Par exemple, les familles de protéines SOX et TCF se dimérisent ou utilisent un clamp<sup>8</sup> protéique, respectivement, pour se lier de manière spécifique à l'ADN. Le groupe de Gerardo Jimenez propose un mécanisme de liaison atypique de CIC. En effet, CIC se distingue des autres protéines HMG en initiant la liaison à ses gènes cibles via son domaine HMG. L'affinité de cette interaction sera renforcée par la liaison du domaine C1, sans site de reconnaissance, venant fermer comme un clamp la protéine autour de l'ADN assurant une liaison efficace [122]. Ce mécanisme de liaison explique, par ailleurs, le profil mutationnel de *CIC* dans les cancers, et notamment les oligodendrogliomes, où les mutations faux-sens et non-sens de CIC sont pour la plupart présentes dans le domaine HMG et le domaine C1 [12], [13].

---

<sup>7</sup> Paralogie : lien évolutif entre deux gènes présentant des homologies de séquence et de fonction

<sup>8</sup> Clamp : motif protéique permettant d'entourer la double hélice d'ADN

Enfin, *Weissmann et al.*, ont récemment démontré, chez l'Homme et la souris, une interaction de CIC avec le complexe de désacétylation SIN3 [162] suggérant que la répression de CIC s'exerce par le recrutement des histones désacétylases HDAC1 et HDAC2 menant à une diminution de l'acétylation et donc de la transcription de ses gènes cibles.

### 3.1.2 Gènes cibles de CIC

Les gènes cibles de CIC régulent des fonctions très diverses. Les premiers ont été décrits chez la Drosophile, il s'agit de facteurs de transcription impliqués dans l'établissement de l'axe dorsoventral, la différenciation des ailes et des segments terminaux de l'embryon ainsi que des ovaires [150], [163], [164], [165]. Des études chez les mammifères ont révélé une régulation directe par CIC de gènes de la famille des facteurs de transcription *ETV* comme *ETV5*, *ETV1* et *ETV4* [157], [161]. Cette famille de gènes correspond à des activateurs transcriptionnels largement décrits et impliqués dans la prolifération, la migration et la tumorigenèse [166]. Récemment, *Leblanc et al.*, ont mis en évidence dans des oligodendrogliomes humains de nouvelles cibles de CIC comme *DUSP4* et *DUSP6*, des phosphatases impliquées dans la gliomagenèse [167], ainsi que *SPRED1* et *SPRY4* impliqués dans la différenciation des lymphocytes T [168], ou encore *ASCL1* et *SHC3* des régulateurs du développement oligodendrocytaire [115]. La littérature montre également une importante similitude entre les gènes cibles de CIC et d'ATXN1L confirmant une relation fonctionnelle importante entre ces deux facteurs dans la régulation de l'expression notamment de gènes du cycle cellulaire comme les cyclines (*CCND*, *CCNE*, *CCNA* et *CCNB*) [169].

CIC est aussi décrit pour se lier à son propre promoteur suggérant des mécanismes d'auto-régulation de son expression [162]. De plus, en réprimant l'expression de *DUSP6*, un gène codant une phosphatase inhibant ERK, CIC participe à sa propre répression par rétrocontrôle négatif [170].

Les gènes cibles de CIC lui confèrent donc des fonctions dans de très nombreux processus cellulaires et en particulier des processus développementaux que nous décrivons par la suite, comme le développement embryonnaire, alvéolaire et cérébral, l'homéostasie cellulaire et la régulation métabolique. La plupart des gènes cibles de CIC étant des effecteurs de la voie des MAP kinases, CIC exerce des fonctions associées à la prolifération et à la migration cellulaire. Néanmoins, la voie des RTK, et en particulier l'EGFR, induit l'expression de gènes qui ne sont pas régulés par CIC [171]. Réciproquement, l'expression de certains gènes de CIC n'est pas dépendante de l'activation de l'EGFR suggérant d'autres mécanismes de régulations des gènes cibles de CIC [171]. En effet, *Yang et al.*, ont réalisé une étude transcriptomique sur des NSCs inactivées pour *Cic* (*Cic*<sup>-/-</sup>) et contrôles (*Cic*<sup>+/+</sup>) plus ou moins stimulées par l'EGF [171]. Parmi les gènes différentiellement exprimés, les

auteurs décrivent trois groupes : un groupe de 192 gènes dont la régulation est indépendante de l'EGF, un groupe de 183 gènes dont la régulation est indépendante de CIC et un groupe de 44 gènes seulement régulés par l'EGF et CIC [171]. Ces données nous indiquent qu'au-delà des gènes cibles de CIC sous régulation de l'EGFR, CIC régule l'expression de gènes cibles indépendants. Pour comprendre la plupart de ces fonctions que nous développerons par la suite, il est important de décrire les contextes dans lesquels la protéine CIC est exprimée ainsi que sa régulation.

### 3.1.3 *Régulation de CIC par la voie des MAP kinases*

De nombreux gènes cibles de CIC, parmi lesquels les gènes *ETV*, sont des gènes effecteurs de la voie des RTK et plus particulièrement, des effecteurs de la voie des MAP kinases. En effet, les séquences cis-régulatrices des gènes effecteurs de la voie des RTK présentent le site octamérique de liaison de CIC, faisant de CIC un régulateur général des voies des RTK [158]. De plus, la perte de CIC induit une résistance aux inhibiteurs pharmacologiques de la voie des MAP kinases, démontrant l'importance de CIC dans la régulation des gènes de la voie de MAPK et sa régulation par cette même voie [160].

Chez la Drosophile, la plupart des fonctions de Cic se résument aux voies de signalisation Torso (RTK) et EGFR dans l'ovogenèse et le développement embryonnaire et adulte [150], [155], [163]–[165]. L'activation de Torso, dans les pôles embryonnaires de la Drosophile, conduit à l'inhibition de l'expression de Cic tandis que l'activation de l'EGFR induit l'exclusion nucléaire de Cic dans les ovaires et les ailes de la Drosophile [163], [165]. Lorsque la voie des RTK/MAPK n'est pas active, CIC est exprimé dans le noyau des cellules et réprime ses gènes cibles : on parle de « répression par défaut » [172] comme illustré en **Figure 17**. Bien que l'expression de CIC soit régulée par les RTK, les mécanismes de cette régulation diffèrent entre les voies des RTK. L'activation de l'EGFR conduit à une rétention cytoplasmique de Cic dépendante du motif C2 alors que l'inhibition par Torso nécessitant également le motif C2 conduit à une dégradation de la protéine [155]. Dans les deux cas, le motif C2 permet l'interaction avec la MAPK Rolled induisant la phosphorylation de Cic, l'absence du motif conduisant à un phénotype dominant négatif de Cic [155]. Cependant, les modalités de cette régulation diffèrent d'une voie à l'autre et jusqu'à récemment, les mécanismes de la dégradation de CIC dépendante des MAPK étaient méconnus.

*Suisse et al.*, découvrent en 2017 chez des Drosophiles dont la sous-unité Csn1b du signalosome COP9 était inactive, des altérations du développement de l'œil et des ailes de la Drosophile [173]. Ces altérations phénotypent le développement anormal des Drosophiles mutées pour Cic [163]. L'inactivation de COP9 induit l'expression des gènes cibles de l'EGFR et une diminution de l'expression de Cic dans des régions où la voie EGFR n'est pas fortement active [173].

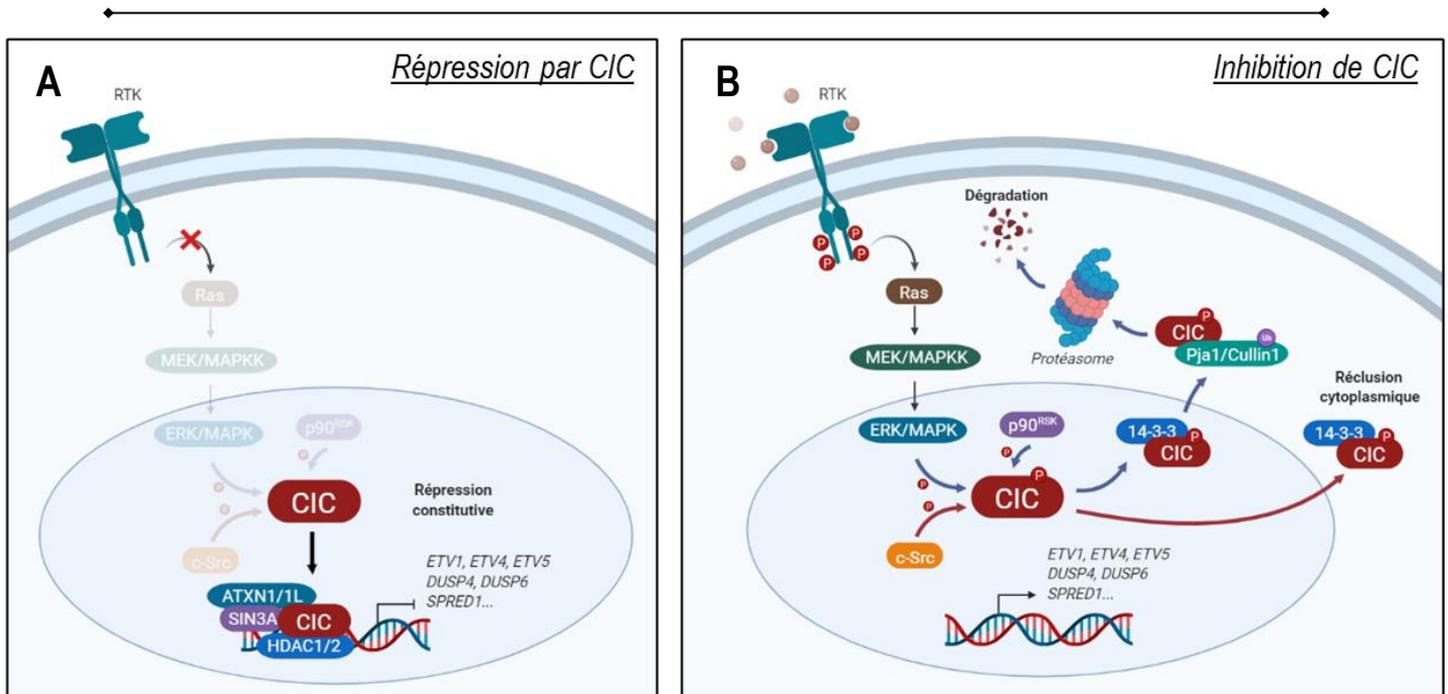


Figure 17 – CIC, une protéine réprimée par la voie des MAP Kinases (d'après *Simon Carrasco et al., 2018* et *Wong et Yip, 2020*)

**A.** La protéine CIC est un effecteur majeur de la voie des RTK/MAPK. Elle réprime par défaut l'expression des gènes effecteurs de la voie des MAPK en se liant aux séquences régulatrices de ses gènes cibles avec ses partenaires ATXN1 et ATXN1L. CIC interagit également avec le complexe de désacétylation SIN3 permettant le recrutement des histones désacétylases HDAC1 et 2 induisant une diminution des niveaux d'acétylation des histones et donc de la transcription des gènes cibles. **B.** Lorsque les RTK sont activées, la protéine CIC subira une inhibition par phosphorylation dont les conséquences régulatrices dépendront de la voie de signalisation. Une phosphorylation par ERK/MAPK/p90<sup>RSK</sup> inhibera l'import nucléaire et promouvra l'export de CIC dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 afin que ce dernier soit reconnu par l'Ubiquitine E3 ligase PJA1 pour son adressage et dégradation au protéasome (voie des flèches bleues). Cependant, une phosphorylation par c-Src (ou la MAPK Rolled chez la *Drosophile*) conduira à une simple réclusion cytoplasmique de CIC (voie des flèches rouges).

L'inactivation de Cullin1, une ubiquitine ligase, conduit à une accumulation de la protéine Cic dans les cellules où elle est normalement réprimée par l'EGFR [173]. La présence d'un signalosome COP9 actif prémunit Cic de la dégradation par inhibition de Cullin1 (**Figure 17B**). Cette inhibition de CIC par la voie des MAPK est conservée chez les mammifères suggérant un rôle évolutif de CIC pour la répression par défaut des gènes effecteurs des MAPK. La réclusion cytoplasmique de CIC est induite par phosphorylation par s-Src permettant l'export nucléaire par la protéine 14-3-3 [174]. La dégradation de CIC est quant à elle induite par la phosphorylation par ERK/p90<sup>RSK</sup> conduisant à un export nucléaire par 14-3-3 et une reconnaissance de la protéine CIC phosphorylée par l'E3 ligase Pja1 menant à son ubiquitination et dégradation graduelle par le protéasome [175] (**Figure 17B**). Il est intéressant de noter qu'en dehors de la voie des MAPK, la voie Hippo régule l'expression de CIC. *Pascual et al.*, décrivent une accumulation de CIC induite par des effecteurs de la voie Hippo chez la *Drosophile* [176].

### 3.2. *CIC, un répresseur inactivé dans les oligodendrogliomes*

Dans la sous-partie précédente, nous avons décrit les gènes cibles de CIC les plus connus, la plupart étant des gènes effecteurs de la voie des MAP kinases conférant à CIC des rôles dans des processus cellulaires divers et variés et notamment la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. De la Drosophile à l'Homme, CIC est décrit comme un important régulateur développemental au niveau cellulaire et tissulaire, contribuant au développement de nombreux organes. Nous détaillerons dans un premier temps les fonctions canoniques de CIC avant de nous focaliser par la suite sur ses fonctions décrites au niveau cérébral afin de conclure sur cette dernière partie introductive en détaillant les fonctions de CIC dans le développement tumoral et en particulier dans le développement des gliomes.

#### 3.2.1 *Fonctions physiologiques de la protéine CIC*

Pour comprendre les conséquences des mutations du gène *CIC* retrouvées dans les oligodendrogliomes, il est nécessaire de comprendre les fonctions de ce gène et de sa protéine associée. CIC est une protéine exprimée de manière ubiquitaire au stade embryonnaire chez la souris : on retrouve une expression de CIC dans le cerveau, les poumons, le cœur, l'estomac et le thymus, avec une présence plus faible dans le foie, les reins et les intestins [159]. Après la naissance, l'expression de CIC est principalement maintenue dans le cerveau, le foie, les poumons ainsi que le thymus, où il continue présumément d'exercer des fonctions [177]. Ce profil d'expression reflète une importance de CIC dans les processus développementaux des différents organes dans lequel il est exprimé, sa perte de fonction totale entraînant la mort embryonnaire et périnatale (autour de P20) causée par un développement anormal des organes dans des modèles d'inactivation : les embryons présentent une omphalocèle, un défaut de fermeture de la paroi abdominale, et une hyperplasie pulmonaire tandis que les souris juvéniles présentent des défauts d'alvéolisation, un volume cérébral et corporel réduit [159], [178]–[180].

Les premières fonctions de CIC ont été décrites dans le développement embryonnaire chez la Drosophile. Cic module l'établissement des axes dorso-ventraux et antéro-postérieurs ainsi que la différenciation des pôles terminaux de l'embryon et des ovaires [150], [164], [165]. Au niveau postnatal, Cic induit la différenciation des cellules inter-veineuses permettant la définition correcte des veines des ailes de la Drosophile [163]. Plus encore, Cic inhibe la prolifération, dépendante de l'EGFR, des cellules intestinales et des ommatidies (œil composé des drosophiles) en réprimant des gènes du cycle cellulaire et les gènes ETV [181], [182]. Les rôles développementaux de CIC sont conservés dans l'évolution. On retrouve chez les mammifères une importance de la protéine notamment dans le développement et la différenciation de divers organes décrits dans la **Table 4**.

Rôles physiologiques de CIC	Modèle expérimental	Mécanismes moléculaires	Références
<b>Développement pulmonaire</b>			
Différenciation terminale de l'épithélium pulmonaire, développement alvéolaire et sécrétion de mucus	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modèle d'inactivation constitutive de CIC</li> </ul>	Répression d'ETV4 et de MIMP9 en interaction avec ATXN1L	Lee et al., [159] Simon Carrasco et al., [178]
<b>Développement des lymphocytes T</b>			
Régulation de l'expansion clonale et de l'activation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> mémoires hépatiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inactivation spécifique de CIC dans le lignage hématopoïétique (<i>Vav1-Cre</i>)</li> <li>Inactivation spécifique de CIC dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (<i>Cd4-Cre</i>)</li> </ul>	Répression d'ETV5 et de HOBIT	Park et al., [184] Park et al., [185]
Régulation de la sélection thymique des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inactivation spécifique de CIC dans le lignage hématopoïétique (<i>Vav1-Cre</i>)</li> </ul>	Répression de SPRY4, DUSP4, DUSP6 et SPRED1	Kim et al., [168]
<b>Développement hépatique</b>			
Maintien de l'homéostasie des acides biliaires par modulation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modèle d'inactivation constitutive de CIC</li> </ul>	Répression de facteurs de transcription hépatiques (HNF1 $\alpha$ , RXR $\alpha$ , FOXA2, EBP $\beta$ ), induction du TNF $\alpha$	Kim et al., [177]
Modulation du métabolisme du citrate	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lignée humaine HEK CIC<sup>R1515H</sup></li> <li>Lignée d'oligodendroglome HOG CIC<sup>R1515H</sup></li> </ul>	Modulation de la phosphorylation de ACLY	Chittaranjan et al., [183]

Table 4 – CIC, une protéine impliquée dans la différenciation de divers organes chez les mammifères

L'émergence de modèles murins d'inactivation de CIC de ces dernières années a permis de mettre en évidence des rôles spécifiques de CIC dans le développement et en particulier la différenciation des poumons, de la vésicule biliaire mais également des lymphocytes T. Les fonctions de CIC s'exercent notamment via son activité de répresseur transcriptionnel, réprimant l'expression de gènes cibles responsables des phénomènes physiologiques décrits. Cependant, des fonctions métaboliques non canoniques de CIC rapportées par Chittaranjan et al., montrent également la diversité des rôles de cette protéine.

Il est important de noter que la plupart des fonctions connues de CIC sont restreintes aux domaines communs aux deux isoformes ne permettant pas de les discriminer. Certes, le domaine N-terminal spécifique de l'isoforme CIC-L n'est à ce jour pas associé à une fonction décrite. Seule l'étude de *Chittaranjan et al.*, montre pour la première fois, un rôle spécifique de l'isoforme CIC-S chez l'Homme et dans des lignées d'oligodendrogliomes [183]. Les auteurs décrivent une localisation préférentielle de l'isoforme CIC-S dans le cytoplasme à proximité des mitochondries, suggérant un rôle non canonique de CIC (**Table 4**), tandis que l'isoforme CIC-L est retrouvée dans le noyau où elle exerce présumément l'activité répressive canonique de CIC. Ils démontrent une interaction de l'isoforme CIC-S avec ACLY, une protéine impliquée dans le métabolisme du citrate. Une mutation du domaine C1 de CIC ( $CIC^{R1515H}$ ) réduit le niveau de phosphorylation d'ACLY diminuant son activité en faveur d'une production accrue d' $\alpha$ -cétoglutarate au détriment d'Acétyl-CoA [183]. Dans une lignée d'oligodendrogliomes, la mutation  $CIC^{R1515H}$  augmente, de manière synergique avec la mutation  $IDH1^{R132H}$ , la production de 2-HG, l'oncométabolite associé aux tumeurs mutées pour le gène *IDH1*. En dehors de cette fonction, aucune autre spécificité des isoformes n'a été clairement décrite à ce jour. Nous décrirons ainsi les fonctions suivantes de CIC comme communes aux deux isoformes.

L'expression de CIC contrôle de nombreux processus développementaux embryonnaires et postnatals. En interaction avec l'ATXN1L, CIC assure le développement normal des alvéoles pulmonaires (**Table 4**). La perte de l'ATXN1 et ATXN1L en particulier, dans un modèle murin d'inactivation constitutive, mène à une diminution de l'expression des isoformes de CIC [159]. Cette diminution d'expression lève la répression du gène *ETV4* induisant une surexpression de MMP9 dans les macrophages alvéolaires. Cette surexpression cause une hypertrophie alvéolaire causée par la dégradation de l'élastine par la métalloprotéase MMP9 [159]. Toujours dans les poumons, l'inactivation constitutive CIC entraîne des défauts de différenciation de l'épithélium respiratoire pulmonaire et de sécrétion de mucus causés par une prolifération excessive des cellules épithéliales chez l'embryon à E18,5 [178]. En postnatal, l'inactivation constitutive de *Cic* induit une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et une diminution de facteurs hépatiques comme HNF1 $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , FOXA2 et RXR $\alpha$  responsables d'une sécrétion importante d'acides biliaires causant des cholestases dans le foie (**Table 4**) [177]. Cette signature pro-inflammatoire a ensuite été décrite comme le résultat d'une expansion de lymphocytes T mémoires hépatiques, induite par l'inactivation de *Cic* [184]. Cette expansion est médiée par la levée de la répression de *ETV5* induisant l'expression de *Hobit*, un régulateur important du développement des lymphocytes T mémoires [184]. Plus précisément, on décrit l'augmentation de la différenciation et de l'activation des lymphocytes T CD4 $^+$ , dans un modèle d'inactivation spécifique de CIC dans les lymphocytes T (*Cd4-Cre*) et ce de manière plus importante dans un modèle

d'inactivation hématopoïétique plus précoce (*Vav1-Cre*) [185]. Dans ce modèle, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> sécrètent des taux plus importants d'IL-2 (interleukine 2) [185]. Enfin, CIC régule dans le thymus le processus de sélection des lymphocytes T. Son inactivation dans les cellules CD4<sup>+</sup> (*Cd4-Cre*) entraîne des phénomènes d'auto-immunité dus à une augmentation de la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dits doubles positifs (**Table 4**) [168]. Cette altération du processus de sélection clonale est due à une diminution de la signalisation TCR induite par la levée de répression de *Spry4* [168]. Ensemble, ces données montrent l'importance de CIC dans le développement et la différenciation du foie, des poumons ainsi que des lymphocytes T chez les mammifères.

### 3.2.2 Fonctions cérébrales de CIC

C'est dans le cerveau qu'a été observée pour la première fois l'expression d'un orthologue du gène *Capicua* chez les mammifères, deux ans après sa découverte chez la Drosophile, dans différentes régions cérébrales. *Lee et al.*, décrivent en particulier l'expression transitoire de CIC dans les neurones granulaires de l'hippocampe et du cervelet témoignant d'un rôle potentiel de CIC dans leur développement [154]. Il faudra attendre quelques années pour qu'une première fonction de CIC, associée à cette expression dans le cervelet, soit décrite par le groupe d'Huda Zoghbi, dans l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 (SCA1) (**Table 5**) [152]. Dans cette pathologie, la poly-glutamination des Ataxines conduit à la neurodégénérescence des cellules de Purkinje. La mutation *ATXN1<sup>S776A</sup>* annule la neurodégénérescence induite par l'*ATXN1* poly-glutaminée (*ATXN1<sup>PolyQ</sup>*) en diminuant son interaction avec CIC, révélant ainsi son rôle dans l'étiologie de cette pathologie [152]. En effet, une inactivation hétérozygote de CIC permet une amélioration de la condition clinique dans des modèles murins ataxiques (*ATXN1<sup>154Q</sup>*) : on observe une amélioration des tests d'apprentissage et de mémoire ainsi qu'une survie plus importante des cellules de Purkinje [186]. Cependant, la seule perte de CIC dans les cellules de Purkinje (*En1-Cre*) ne conduit pas au développement de la SCA1 [187]. Le développement de la SCA1 est en réalité due à un mécanisme de gain de fonction du complexe CIC-*ATXN1<sup>PolyQ</sup>* conduisant à une répression plus importante des gènes cibles de CIC et d'*ATXN1* [152], [186], [187].

Au niveau cognitif, la perte embryonnaire du complexe *ATXN1-CIC* dans le télencéphale (*Emx1-Cre*) entraîne des troubles neurocognitifs importants tels que des troubles de mémoire et d'apprentissage et une hyperactivité chez des souris âgées de 12-13 semaines [188]. Ces troubles sont associés à une diminution de l'épaisseur des couches corticales 2 à 4 notamment causée par une diminution progressive, jusqu'à la moitié de la proportion des souris contrôles, des neurones CUX1<sup>+</sup> [188]. Cette diminution est provoquée par une perte d'expression de CUX1 entraînant une diminution de l'arborisation dendritique des neurones [188]. Des troubles du spectre

Fonctions cérébrales de CIC	Modèle expérimental	Mécanismes moléculaires	Références
<b>Développement des lignages neuraux</b>			
Prolifération des progéniteurs des zones ventriculaire et différenciation du lignage oligodendrocytaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modèle d'inactivation constitutive de <i>C/C</i></li> </ul>	Diminution de l'expression de gènes oligodendrocytaires	Yang et al., [171]
Spécification dans le lignage neuronale des NSCs et différenciation du lignage oligodendrocytaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inactivation spécifique de <i>C/C</i> dans le télencéphale (<i>Foxg1-Cre</i>)</li> </ul>	Répression d' <i>ETV5</i>	Ahmad et al., [179]
Régulation de l'auto-renouvellement des NSCs et différenciation des neurones granulaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inactivation spécifique dans les NSCs (<i>Nes-Cre</i>)</li> </ul>	Répression de VGF	Hwang et al., [189]
<b>Développement cognitif et social</b>			
Régulation de l'apprentissage et de la mémoire, développement de l'ataxie spino-cérébelleuse de type 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inactivation spécifique dans le télencéphale (<i>Emx1-Cre</i>)</li> </ul>	Régulation de <i>CUX1</i> pour le développement dendritique des neurones	Lu et al., [188]
Modulation du comportement : hyperactivité et isolation sociale	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inactivation spécifique dans l'hypothalamus et l'amygdale (<i>Otp-Cre</i>)</li> </ul>	Régulation de gènes impliqués dans la transmission synaptique et le comportement social	Lu et al., [188]

Table 5 – Fonctions cérébrales de CIC : de la maturation des lignages neuraux à la cognition

De nombreux modèles murins embryonnaires ont permis de mettre en évidence le rôle de CIC dans le développement des lignages neuraux. L'inactivation du complexe CIC-ATXN1 dans les souris *Emx1/Otp-Cre* ont révélé des défauts d'interaction sociale et de troubles cognitifs tels qu'une altération de l'apprentissage et de la mémoire ainsi que de l'hyperactivité. Au niveau cellulaire, une inactivation constitutive de *C/C* entraîne une augmentation de la proportion de NSCs dans la SVZ. Dans le modèle *Foxg1-Cre*, l'inactivation de *C/C* dans les derniers stades embryonnaires démontre le rôle de CIC dans la spécification neuronale des NSCs ; son absence entraînant une augmentation de la proportion d'OPCs. Dans des stades plus tardifs, l'inactivation de *C/C* dans le modèle *Nes-Cre* entraîne une altération de la différenciation et de la maturation des neurones granulaires entraînée par une maintenance de l'état immature des neuroblastes.

autistique et notamment une isolation sociale ont également été relevés chez des souris présentant une perte de CIC dans l'hypothalamus et l'amygdale (*Otp-Cre*) [188]. En accord avec ces données obtenues dans les deux modèles murins, des mutations hétérozygotes *de novo* du gène *CIC*, prédites être inactivatrices, ont été identifiées chez des patients atteints de troubles neurocognitifs. Ces données suggèrent que CIC joue un rôle majeur dans le développement cognitif et social (**Table 5**).

Trois articles récents décrivent également un rôle de CIC dans la régulation des processus de maintenance, de prolifération et de différenciation des NSCs (**Table 5**) [171], [179], [189]. Le premier de *Yang et al.*, décrit, dans un modèle d'inactivation constitutif de CIC, une prolifération aberrante de progéniteurs neuraux au niveau de la SVZ [171]. *In vitro*, ces NSCs inactivées pour *Cic* outrepassent le besoin d'EGF pour proliférer en condition d'hypoxie. La perte de *Cic* induit dans ces cellules une altération de la différenciation : les NSCs se maintiennent à un stade immature d'OPC en condition de différenciation [171]. Collectivement, ces données montrent l'importance de CIC dans la promotion de la différenciation et l'inhibition de la prolifération des NSCs. Le deuxième article de *Ahmad et al.*, précise les mécanismes à l'origine de ces phénotypes et décrit dans un modèle d'inactivation de *Cic* dans le télencéphale (*Foxg1-Cre*) une légère diminution de la proportion de neurones et de la densité de myéline associée à une augmentation de la proportion d'OPCs chez les souris inactivées pour *Cic* [179]. Ces résultats suggèrent un rôle de CIC dans la spécification des NSCs vers des lignages neuronaux plutôt que gliaux, données renforcées par l'expression plus importante de CIC dans les lignages neuronaux que dans les cellules gliales [179]. Les auteurs précisent également que ces changements de proportions sont phénocopiés *in vivo* et *in vitro* par ETV5, révélant ainsi le gène cible à l'origine du phénotype [179]. Enfin, la dernière étude publiée par *Hwang et al.*, précise la fonction de CIC dans la différenciation des lignages neuronaux [189]. Ils démontrent dans un modèle d'inactivation de *Cic* dans les NSCs (*Nes-Cre*), une prolifération anormale de neuroblastes empêchant la transition vers des neurones immatures dans l'hippocampe et présentent des défauts de différenciation et de maturation des neurones [189]. Les cerveaux des souris *Cic*<sup>KO</sup> présentent une épaisseur corticale amoindrie et un volume global réduit. Ce défaut de développement neuronal est notamment dû à la surexpression de *Vgf* (*VGF nerve growth factor*) une cible de CIC [189].

Ces résultats présentent CIC comme un important régulateur du développement cérébral tant au niveau de la physiologie des cellules neurales qu'au niveau cognitif et social. Détaillons à présent les rôles que CIC peut exercer dans le développement tumoral.

### 3.2.3 Rôles de CIC dans le développement tumoral

Exerçant des fonctions dans la différenciation et la maturation de différents lignages, CIC est retrouvé muté ou inactivé dans plusieurs types de cancers, permettant l'expression de programmes prolifératifs et migratoires par les cellules tumorales (**Figure 18**). Les premières altérations génétiques de *CIC* ont été identifiées dans un sous-type de sarcomes d'Ewing [161]. Dans ces tumeurs, des translocations chromosomiques sont à l'origine d'une fusion des gènes *CIC* et *DUX4* convertissant la fonction de répresseur de CIC en un activateur transcriptionnel. La protéine de fusion CIC-DUX4 est en effet capable d'induire la transformation de fibroblastes *in vitro* via la surexpression des gènes *ETV1* et *ETV5* [161]. D'autres fusions du gène *CIC* sont également décrites dans des angiosarcomes (*CIC-LEUTX*) et des tumeurs périphériques du neuroectoderme (*CIC-NUTM1*) [190].

Ces dernières années, de nombreuses altérations du gène *CIC* ont été décrites dans de nombreuses tumeurs périphériques (**Figure 18**). En plus des événements de fusions génétiques, les altérations génétiques les plus fréquentes du gène *CIC* sont des mutations faux-sens ou non-sens inactivatrices ou des délétions hétérozygotes ou homozygotes. Lorsque CIC n'est pas inactivé de manière génétique, il peut être retrouvé inactivé de manière fonctionnelle par répression par la voie des MAPK, nous parlerons alors d'inactivation fonctionnelle (**Figure 18**). Ces altérations de l'expression de CIC conduisent à une dérégulation des gènes *ETV* induisant la

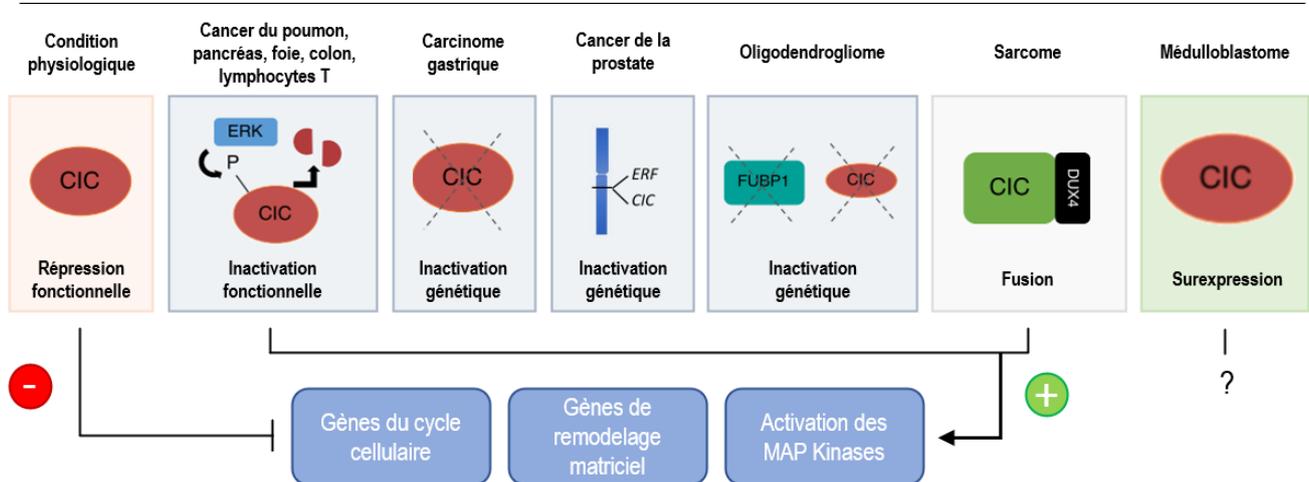


Figure 18 – Altérations génétiques et fonctionnelles de CIC dans le cancer

Régulateur majeur de la voie des MAP kinases, CIC régule une vaste diversité de fonctions permettant notamment la différenciation et la maturation de nombreux organes et tissus. Les altérations génétiques et fonctionnelles de *CIC* sont ainsi à l'origine de nombreuses fonctions physiopathologiques permettant l'initiation ou la progression tumorale. Pour ce faire, la plupart des tumeurs répriment l'expression de CIC soit au niveau génétique par mutations inactivatrices, délétion ou fusion, ou bien régulation post-traductionnelle par l'activation de la voie des MAP kinases (inactivation fonctionnelle). L'absence de CIC entraîne par conséquent, une surexpression des gènes du cycle cellulaire, de métalloprotéases et protéines de remodelage de la matrice extracellulaire, et une suractivation de la voie des MAP kinases.

prolifération, un remodelage de la matrice extracellulaire permettant l'invasion et une augmentation de la signalisation des MAPK (**Figure 18**). On retrouve ainsi dans les cancers de la prostate des micro-délétions focales dans la région 19q13.2 entraînant la perte du gène *CIC* et du gène *ERF*, un autre répresseur des gènes ETV [191]. Des délétions et mutations de *CIC* sont également retrouvées dans 26% des adénocarcinomes gastriques, des altérations dont la fréquence augmente dans des stades avancés et agressifs [192]. De même, l'inactivation de *CIC* dans les adénocarcinomes pulmonaires induit la formation de métastases causée par la dérégulation d'ETV4 et de MMP24 [192]. Malgré une incidence faible d'altérations du gène *CIC* dans les leucémies lymphoblastiques T aiguës, deux études révèlent que l'inactivation de *CIC* chez la souris est suffisante pour induire des leucémies lymphoblastiques T [178], [193]. Il s'agit d'ailleurs des premières études validant le rôle de *CIC* comme suppresseur de tumeurs dans un modèle murin de tumeurs.

Enfin, des données récentes décrivent l'impact de l'inactivation fonctionnelle de *CIC* dans la progression d'hépatocarcinomes, de cancers colorectaux, de cancers pancréatiques ainsi que de cancers du sein [194]–[197]. Dans les trois premiers, l'expression de *CIC* dans des bases de données de patients est diminuée et associée à une surexpression de ces gènes cibles dont ETV4 [194], [195], [197]. Des modèles d'inactivation de *CIC* dans des lignées cellulaires et des modèles de souris PDX montrent dans ces trois types de cancer une augmentation de la prolifération de la migration et de l'invasion médiées par la dérégulation de l'axe ETV4-MMP9 induisant des remaniements matriciels [194], [195], [197]. Dans des lignées cellulaires de cancers du sein, l'inactivation de *CIC* augmente l'expression des marqueurs souches et la capacité d'auto-renouvellement des CSCs via la dérégulation de *ETV4*, *ETV5* et *SOX2* [196]. Toutefois, la perte de *CIC* n'altère pas la prolifération et l'invasion des CSCs, confirmant le rôle de *CIC* dans le contrôle du maintien de l'état souche des CSCs [196].

Dans les glioblastomes, *CIC* est inactivé de manière fonctionnelle par la suractivation de la voie des MAPK [175]. L'étude de *Bunda et al.*, est la première à décrire un mécanisme de dégradation de *CIC* chez l'Homme. L'activation de ERK induit la phosphorylation de *CIC* sur le résidu S173 reconnu par l'ubiquitine E3 ligase PJA1 adressant la protéine au protéasome [175]. L'inhibition de PJA1 ou de ERK restaure les niveaux de *CIC* et réduit la prolifération et l'invasion de lignées de GBMs [175]. La dégradation continue de *CIC* dans les GBMs induit notamment l'expression de *ETV5*, responsable des phénotypes de prolifération et d'invasion [175]. Le même groupe démontre dans une autre étude que la réclusion cytoplasmique de *CIC* induite par phosphorylation par c-Src favorise la prolifération des GBMs [174].

De manière intrigante, on retrouve une expression importante de *CIC* dans les médulloblastomes et en particulier dans les neurones granulaires immatures [198]. Cependant, les conséquences fonctionnelles de cette surexpression ne sont pas connues. Enfin, des mutations inactivatrices de *CIC* ont été décrites dans 50 à 70% des oligodendrogliomes [12], [13], [17]. La moitié d'entre elles sont des mutations faux-sens enrichies dans les exons codant le domaine HMG et l'autre moitié des mutations non-sens conduisant majoritairement à une perte partielle ou totale du domaine C1 [13], [17]. Les mutations les plus retrouvées étant les mutations *CIC*<sup>R215W</sup> et *CIC*<sup>R210W</sup> présentant chacune un changement d'affinité du domaine HMG à l'ADN résultant en une perte de fonction [13]. Alors que la perte d'expression de *CIC* est associée dans les tumeurs périphériques à un mauvais pronostic, il semblerait que l'impact pronostique de *CIC* dans les oligodendrogliomes soit moins clair. Les études décrivent toutes les associations possibles décrivant en fonction de la cohorte étudiée un impact défavorable, favorable ou une absence d'association des mutations *CIC* et de son expression à la survie des patients [199]–[201]. Une étude de notre laboratoire associe les mutations du gène *CIC* à un pronostic défavorable dans la cohorte du réseau POLA et dans les oligodendrogliomes du TCGA [13]. Ce pronostic est corrélé à une croissance plus rapide et importante après résection des ODGs mutés pour *CIC* (**Figure 19B**). De plus, l'étude transcriptomique des ODGs mutés pour *CIC* montre un enrichissement de signatures associées à la prolifération et aux OPCs, ainsi que la dérégulation de nombreux gènes cibles de *CIC* comme les gènes *ETV1-5*, *CCND1*, *DUSP4*, *SHC3*, et *SPRED1* (**Figure 19D-F**) [13]. Ces données démontrent l'importance de *CIC* dans le développement des oligodendrogliomes et suggèrent un lien fonctionnel entre l'inactivation de *CIC* et l'enrichissement en d'OPCs dont l'étude sera l'objectif principal de ma thèse.

Les altérations génétiques ou la répression de *CIC* conduisant à son inactivation pour promouvoir la prolifération et la migration font de ce gène un suppresseur de tumeur pan-cancer. L'inactivation de *CIC* peut conduire à l'initiation tumorale ou bien à la progression tumorale en fonction du contexte cellulaire. Dans les oligodendrogliomes en particulier, l'inactivation de *CIC* induit une progression plus agressive associée à un enrichissement de la prolifération et d'une signature transcriptomique associée aux OPCs, rappelant son rôle dans le développement de ce lignage.

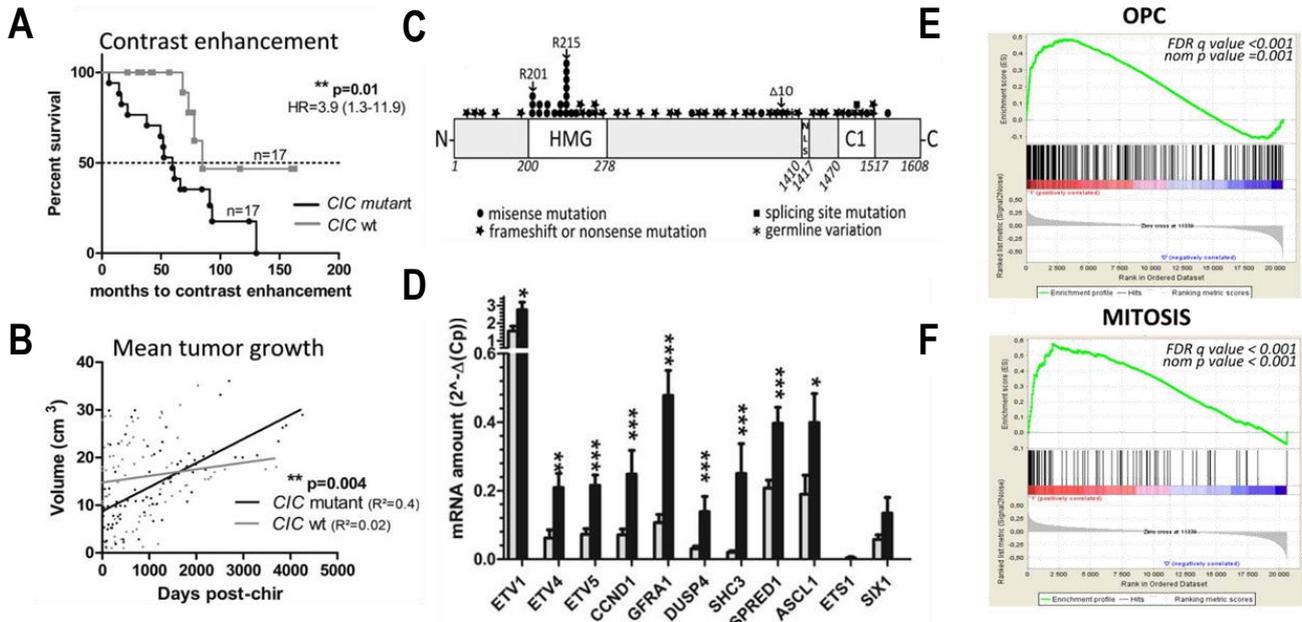


Figure 19 – Conséquences de l’inactivation de *CIC* dans les oligodendrogliomes (Gleize *et al.*, 2015)

**A.** Analyse de la survie sans progression (prise de contraste après chirurgie signifiant une récurrence) des ODGs mutés pour *CIC* (*CIC mutant*) et non mutés (*CIC wt*) ( $p$ -value=0,01). **B.** Volume en cm<sup>3</sup> des ODGs *CIC mutant* et *CIC wt* au cours du temps après chirurgie ( $p$ -value=0,004). **C.** Distribution des mutations le long de la protéine *CIC*. Parmi les 127 ODGs de la cohorte POLA, 63 mutations ont été observées chez 60 patients différents : 25 mutations faux-sens (cercle noir) le plus souvent restreintes au domaine HMG, 38 mutations conduisant à une protéine tronquée (non-sens, site d'épissage alternatif, indel; étoile noire) distribuées en amont et dans le domaine C1, 1 mutation produisant un site d'épissage alternatif de l'exon 20 (carré noir) et 1 mutation représentant un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). **D.** Analyse de l'expression des gènes cibles de *CIC* dans les ODGs *CIC mutant* (barres noires) et *CIC wt* (barres grises) par qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). **E et F.** Analyse de l'enrichissement des signatures OPC (E ;  $p$ -value=0,001 ; FDR<0,001) et MITOSIS (F ;  $p$ -value<0,001 ; FDR<0,001) dans les ODGs *CIC mutant* par rapport aux ODGs *CIC wt*.



## 4. *Objectifs de thèse*

---

Dans cette introduction, nous avons d'abord présenté les tumeurs cérébrales en nous focalisant sur les gliomes afin de décrire leur épidémiologie, leur étiologie, ainsi que l'hétérogénéité de leurs caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires. Diagnostiqués à des stades très avancés, il est nécessaire de comprendre les mécanismes de développement des gliomes afin de les endiguer. Nous avons détaillé ces mécanismes et notamment les interactions des cellules tumorales avec le microenvironnement tumoral et les neurones pour promouvoir leur prolifération et invasion. Nous avons conclu cette première partie en décrivant les possibilités et les limites de l'arsenal thérapeutique actuel en insistant sur l'importance de développer des thérapies alternatives spécifiques ciblant l'hétérogénéité des mécanismes de développement des gliomes.

Toujours dans une logique développementale, nous nous sommes intéressés dans une seconde partie à l'origine cellulaire des gliomes. Nous avons pu décrire les travaux ayant révélé le potentiel initiateur des OPCs et des NSCs pour le développement des oligodendrogliomes. Toutefois, seules des cellules proches des OPCs sont également décrites comme cellules amplificatrices, constituant de la masse tumorale des oligodendrogliomes. Pour comprendre le fonctionnement de ces cellules à l'origine des gliomes, nous avons décrit la physiologie du lignage oligodendrocytaire en détaillant leur origine embryonnaire ainsi que les mécanismes transcriptomiques, épigénétiques et électrique permettant la différenciation et la maturation du lignage. Nous avons conclu cette seconde partie en détaillant la vaste hétérogénéité régionale, transcriptomique et électrophysiologique du lignage oligodendrocytaire diversifiant leur propriété proliférative, leur capacité à se différencier et à produire la gaine de myéline.

Afin de comprendre comment ces cellules d'origines se transforment, nous avons étudié les rôles de CIC, un répresseur transcriptionnel retrouvé muté dans les oligodendrogliomes. Ce répresseur induit le développement et la différenciation d'organes sous la régulation de la voie des MAP kinases. Son inactivation dans de nombreux cancers entraîne la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Dans les oligodendrogliomes, son inactivation induit notamment l'expression de marqueurs d'OPCs. Alors que la fonction de CIC commence à être décrite dans les NSCs, le rôle spécifique de CIC dans les OPCs demeure méconnu. Suite à cette étude, le but de ma thèse consiste à décrire les fonctions de CIC spécifiquement dans le développement des OPCs afin de comprendre le développement des oligodendrogliomes. Pour ce faire, notre équipe a développé un modèle murin unique d'inactivation conditionnelle et inductible de CIC dans les OPCs permettant d'étudier son rôle à différents stades du développement.

Notre hypothèse en vue des données de la littérature est que l'expression de CIC dans le lignage oligodendrocytaire permettrait sa différenciation et sa maturation tandis que son inactivation entrainerait une altération de la différenciation et potentiellement une accumulation d'OPCs prolifératifs à l'origine de la croissance tumorale.

Les objectifs de ma thèse sont les suivants : (i) caractériser l'expression de CIC dans le lignage oligodendrocytaire, (ii) caractériser les conséquences de l'inactivation de *Cic* dans les OPCs du modèle murin *Pdgfra::CreERT<sup>T</sup>; Cic<sup>f</sup>; Rosa26<sup>LSL-YFP</sup>* (détail dans la partie matériel et méthodes), (iii) identifier les mécanismes moléculaires altérés dans les OPCs inactivés pour *Cic* et (iv) étudier l'impact des mutations *CIC* au niveau pronostic et moléculaire dans des oligodendrogliomes de patients.

Le matériel et les méthodes utilisés au cours des expériences réalisées pour accomplir les objectifs seront décrits dans la partie correspondante ci-après. Nous détaillerons ensuite les résultats obtenus au cours de ces trois ans et demi de travaux de thèse sur la fonction du facteur de transcription CIC dans le développement des OPCs et des oligodendrogliomes.



# Matériel et méthodes

---

## SOURIS

Les souris ont été hébergées, croisées et traitées dans l'animalerie réglementaire de type SPF et SOPF de l'Institut du Cerveau (numéro d'agrément : A751319). Tous les protocoles et procédures impliquant les souris ont été évalués et approuvés par les comités d'éthiques ainsi que le Ministère de l'Education Supérieure de la Recherche et de l'Innovation (APAFIS#20939-2020052811427837). Les souris *Cic<sup>f</sup>* ont été générées à l'Institut Clinique de la Souris à Strasbourg et ont été croisées avec des souris C57BL/6J des laboratoires Janvier. Ces souris ont été croisées avec des souris *Pdgfra ::CreERT<sup>T</sup>* [105] et des souris *Rosa26<sup>LSL-YFP</sup>* [202] pour générer des souris mâles *Pdgfra ::CreERT<sup>wt</sup> ; Cic<sup>f/+</sup> ; Rosa26<sup>LSL-YFP/LSL-YFP</sup>* afin de les croiser avec des femelles *Cic<sup>f/+</sup>* pour générer les lots expérimentaux. Des animaux mâles et femelles ont été utilisés pour les expériences après avoir vérifié que les variations entre les groupes étaient bien du fait de l'inactivation de *Cic* pour les variables mesurées. Le génotypage des animaux a été réalisé dans l'équipe et par la plateforme iGenSeq (ICM). Pour induire la recombinaison médiée par la recombinaison CRE, les souris *Pdgfra ::CreERT<sup>wt</sup> ; Cic<sup>f/f</sup> ; Rosa26<sup>LSL-YFP/+</sup>* (groupe expérimental, ci-après appelé *Cic<sup>CKO</sup>*) et les souris *Pdgfra ::CreERT<sup>wt</sup> ; Cic<sup>+/+</sup> ; Rosa26<sup>LSL-YFP/+</sup>* (groupe contrôle, ci-après appelé *Control*) ont été injectées en sous-cutané avec une concentration de 100µg/g de tamoxifène (*Sigma*, T5648 ; dissous dans de l'huile de maïs ; concentration initiale de 20mg/mL) à P5, et avec la même concentration en intrapéritonéal pendant 5 jours consécutifs à P60.

## PERFUSION ET CONGELATION DES CERVEAUX

Les souris ont été euthanasiées par injection péritonéale d'euthazol (140µg/g) avant d'être perfusées en intracardiaque après section de l'oreillette droite par une première solution de NaCl (0,9%) pour dialyse suivie d'une solution de paraformaldéhyde (PFA 2%, *Electron Microscopy Sciences*, 15713) pour la fixation des tissus. Les cerveaux ont ensuite été disséqués et post-fixés pendant 15min (PFA 2%) avant d'être immergés dans une solution de sucrose 20% pour imprégnation sur la nuit à 4°C. Les hémisphères cérébraux ont été séparés et recouverts de *CryoMATRIX* (*Tissue-Tek*, 16-004004) dans des cassettes pour congélation dans un bain d'isopentane refroidi (~-50°C) pendant 1min. Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C.

## IMMUNOFLOUORESCENCE SUR COUPES CONGELEES

Nous avons réalisé des coupes congelées de 14µm d'épaisseur au cryostat CM3050S (*Leica*). Ces coupes ont été séchées puis incubées avec une solution contenant 10% de sérum de chèvre (NGS, *Eurobio*) et 0,3% de Triton X-100 (*Sigma*) dans du PBS

(*Phosphate Buffer Saline*) 1X (*Gibco*). Les anticorps primaires souhaités ont été ajoutés aux dilutions décrites en annexe 1 pour une incubation sur la nuit à 4°C ou pendant 2h à température ambiante (RT). Après trois lavages au PBS, les coupes ont été incubées dans une solution d'anticorps secondaires de la gamme AlexaFluor® (*ThermoFisher*) de même composition que la première (PBS-Triton 0,3%-NGS 10%). Après trois autres lavages au PBS, les coupes ont été incubées avec une solution de DAPI (300nM, *Invitrogen*, D3571) pour marquage des noyaux pendant 10min à RT. Les lames ont été montées avec le milieu de montage *Fluoromount™* (*Sigma-Aldrich*) et gardées à 4°C.

## ACQUISITION DES IMAGES ET QUANTIFICATION

Les images d'immunofluorescence ont été acquises sur un système de microscopie confocale *Leica SP8X*. Les images ont été analysées avec le logiciel collaboratif Fiji. Les comptages des cellules ont été réalisés soit manuellement avec le *plugin Cell Counter* de Fiji ou bien à l'aide de macros que j'ai développées sur Fiji.

## TRI PAR FLUORESCENCE DE PROGENITEURS D'OLIGODENDROCYTES

Des souris *Cic<sup>CKO</sup>* et *Cic<sup>WT</sup>* injectées au tamoxifène à P5, ont été sacrifiées à P8 et les cerveaux disséqués et rincés dans une boîte de Pétri contenant du DMEM/F12 en excluant les bulbes olfactifs et le cervelet. Une dissociation mécanique a été réalisée par cisaillement au scalpel, suivie d'une dissociation enzymatique à l'aide d'une solution composée de 460µg/mL de papaïne (*Worthington*, WOLS03126), 100µg/mL de DNase (*Worthington*, WOLS02139) et de 124µg/mL de L-cystéine (*Sigma*, C7880) dans du DMEM. La solution a été incubée sous agitation 20min à 37°C. Après digestion, la suspension a été filtrée par des filtres 70µm (*Miltenyi Biotec*, 130-110-916) et rincée dans cinq volumes de DMEM/F12. La solution a été déposée sur un gradient de Percoll permettant l'élimination de la myéline après centrifugation à 20 000g pendant 15min à 4°C sur rotor angulaire. La myéline a ensuite été éliminée et la fraction cellulaire récupérée pour être rincée par 10 volumes de DMEM/F12 et de nouveau centrifugée à 1340g pendant 10min à 4°C. La suspension cellulaire a été resuspendue dans un volume de DMEM contenant un marqueur de viabilité (eFluor 450, *Invitrogen*, 19799387) et l'anticorps Anti-PDGFRα (*BD Pharmingen*, 558774) chacun à la dilution 1/200<sup>ème</sup>. Les cellules ont été incubées sur glace à l'obscurité pendant 30min avant d'être triées par fluorescence (fraction PDGFRα<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup> correspondant aux OPCs recombines) au trieur *MoFlo ASTRIOS* (*Beckman Coulter*).

## EXTRACTION D'ARN, QRT-PCR ET SEQUENÇAGE

Les ARN messagers (ARNm) des OPCs recombines (PDGFRα<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>) ont été extraits grâce au kit *RNA XS NucleoSpin* (*Macherey-Nagel*, 740902.50) et quantifiés au spectrophotomètre *Nanodrop* (*ThermoFisher*). Les ARNm sont rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) grâce au kit *Maxima 1str cDNA Synth* (*LifeTechnologies*, K1642). La PCR quantitative a été réalisée en utilisant le *Master Mix Light Cyclor 480*

*SYBR Green I* (Roche, 4707516001) sur le thermocycleur *LightCycler® 96* (Roche). Les analyses ont été réalisées en utilisant la méthode du *delta-delta Cq*. Le séquençage a été réalisé par la plateforme *iGenSeq* (ICM) et l'analyse bio-informatique des données par la start-up *GenoSplice* représentée par Pierre de la Grange. Les filtres retenus pour les analyses d'expression différentielle étaient les suivants :  $p$ -value ajustée  $<0,05$  et  $\log_2FC > 1,5$ . Les analyses d'enrichissement ont été réalisées à partir des bases de données *Gene Ontology*, *KEGG* et *Reactome* ( $p$ -value ajustée  $<0,05$ ).

## TRI MAGNETIQUE DE PROGENITEURS D'OLIGODENDROCYTES

Des souris *Cic<sup>CKO</sup>* et *Cic<sup>WT</sup>* injectées au tamoxifène à P5, ont été sacrifiées à P8 et les cerveaux disséqués et rincés dans une boîte de Pétri contenant du HBSS froid (sans Calcium ni Magnésium) en excluant les bulbes olfactifs et le cervelet. La dissociation a été réalisée en utilisant le *gentleMACS Octo Dissociator with Heaters* (program 37C\_NTDK\_1, *Miltenyi Biotec*) avec le kit de dissociation *NTDK(P)* (*Miltenyi Biotec*). Après dissociation, les échantillons ont été gardés à 4°C, filtrés par des filtres 70µm (*Miltenyi Biotec*, 130-110-916) et rincés dans dix volumes de HBSS ( $Ca^{2+}$ ;  $Mg^{2+}$ ). Les échantillons ont été centrifugés à 300g pendant 10min à 4°C. Les cellules ont ensuite été incubées avec des billes anti-O4 (*Miltenyi Biotec*, 130-109-398) permettant le tri magnétique grâce au *MultiMACS Cell24 Separator Plus* dans un bloc de colonnes 24 puits (*Miltenyi Biotec*, 130-098-637 et 130-095-692). Les cellules O4<sup>+</sup> triées ont été collectées dans une solution de PBS+BSA (*Bovine Serum Albumin*) 0,5%, comptées et utilisées pour des extractions d'ARN/protéines ou une mise en culture.

## CULTURES DE CELLULES O4<sup>+</sup>

Après tri magnétique, les cellules O4<sup>+</sup> ont été resuspendues dans un milieu de culture contenant de la L-glutamine (2mM, *Gibco*, A2916801), de la Pénicilline et de la Streptavidine (100U/ml, *Gibco*, 15140122) et du B27 (0,5X, *Gibco*, 17504044) dans du milieu Neurobasal™ (*Gibco*, 21103049). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques NUNC p24 (*ThermoFisher*) sur une surface de Poly-L-Lysine (20µg/mL, *Sigma*, P6282-5MG) à la densité de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les conditions de prolifération et de 40 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les conditions de différenciation. Pour les conditions de prolifération, le milieu de culture a été complété en FGF et PDGF-AA aux concentrations respectives de 20 et 10ng/ml (*PeptoTech*, 100-18B et 100-13A). Pour les conditions de différenciation, le milieu de culture a été complété en T3 à la concentration de 40ng/ml (*Sigma*, T5516). Afin de réaliser des marquages en immunofluorescence, les cellules en culture ont été rincées une fois par du PBS puis fixées par du PFA 2% pendant 10min à RT, avant d'effectuer trois nouveaux rinçages. Les incubations avec les solutions d'anticorps ont été effectuées comme décrit dans la partie « immunofluorescence sur coupes congelées » à la différence que la solution ne contient que 0,1% de Triton final.

## ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE SUR CELLULE UNIQUE (SINGLE-CELL RNA-SEQ)

Des cellules O4<sup>+</sup> triées à P8 chez des souris *Cic<sup>CKO</sup>* et *Cic<sup>WT</sup>* injectées au tamoxifène à P5, ont été utilisées pour un protocole de *Single-cell RNA-Seq* en collaboration avec la start-up *Scipio*. Les cellules ont été couplées à des billes et étalées sur un gel permettant leur dilution à l'échelle de la cellule unique. Lorsque le gel est solidifié, une lyse cellulaire permet aux ARNm contenus dans chaque cellule de se lier aux séquences portées par les billes associées. Ce tapis de gel a ensuite été digéré et les billes récupérées pour une rétrotranscription et une PCR quantitative permettant la constitution d'une librairie d'ADNc. Le séquençage a été réalisé par la plateforme iGenSeq à l'Institut du Cerveau et l'annotation et la matrice de transcrits ont été réalisées par *Scipio*. Le contrôle qualité, la normalisation, l'analyse de composantes principales, le dimensionnement et le clustering ont été réalisés au sein de l'équipe.

## WESTERN BLOT

Pour réaliser des *Western Blots*, des neurosphères isolées à partir d'embryons de souris *Cic<sup>CKO</sup>* et *Cic<sup>WT</sup>* ont été réalisées. Lorsque les neurosphères atteignent une taille suffisante, elles ont été dissociées à l'aide d'acutase/trypsine puis rincées et centrifugées à 300g pendant 10min pour récupérer des culots secs de cellules. Les culots ont été lysés sur glace pendant 10min, par un volume de 50µL/million de cellules de tampon RIPA (*ThermoScientific*, 10230544) additionné d'un centième d'inhibiteurs de protéases et phosphatases (*ThermoScientific*, 1861281). Après une centrifugation à 12 000g à 4°C pendant 15min, le surnageant a été prélevé et les protéines dosées par BCA (*ThermoScientific*, 23227). Une quantité de 20µg de protéines a été déposée pour migration sur gel précoulés (*Biorad*, 4561086). Après transfert sur membrane, un blocage a été réalisé par une solution de BSA 5%-TBS-Tween 0,1% pendant 30min à RT. L'incubation aux anticorps primaires a été faite sur la nuit à 4°C, suivie de lavages au TBS et d'une incubation finale par une solution d'anticorps secondaires fluorescents DyLight™ (680 et 800, *Cell Signaling Technology*) 1h à RT pour visualisation à l'analyseur (*BioRad*).

## ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel Excel du Pack Microsoft Office, *GraphPad Prism 9* et *R Studio*, sauf cas spécifiés. Pour les figures de comptage de proportions cellulaires, les données ont été présentées par moyenne de groupe et nuages de points (chaque point représentant un échantillon indépendant). Pour les figures de comptage d'intensité de fluorescence, les données ont été présentées par médiane de groupe et nuages de points. La variabilité des échantillons a été représentée par l'écart standard à la moyenne (SEM). Les tests statistiques réalisés pour chaque figure ont été explicités dans la légende correspondante. Pour les autres types de données, les choix de représentation ont été explicités dans la légende correspondante. P-value<0.05=\* ; <0.01=\*\* ; <0.001=\*\*\*.



# Resultats

---

Dans cette partie résultats, nous détaillerons les résultats obtenus afin de répondre aux différents objectifs de ma thèse à savoir : (i) caractériser l'expression de CIC dans le lignage oligodendrocytaire, (ii) caractériser les conséquences de l'inactivation de *Cic* dans les OPCs du modèle murin *Pdgfra::CreERT*; *Cic<sup>d</sup>*; *Rosa26<sup>LSL-YFP</sup>*, (iii) identifier les mécanismes moléculaires altérés dans les OPCs inactivés pour *Cic* et (iv) étudier l'impact des mutations *CIC* au niveau moléculaire et du pronostic dans les oligodendrogliomes de patients.

Les travaux de ma thèse font l'objet d'un manuscrit en préparation dans lequel je suis co-premier auteur et qui sera soumis pour publication avant l'été 2022. Ce manuscrit est intitulé (titre provisoire) : « *The transcriptional repressor CIC regulates differentiation and induces vascular features in oligodendroglial cells and oligodendrogliomas* ». Les auteurs sont : Yanis Khenniche<sup>#</sup>, Julie Lerond<sup>#</sup>, Corentine Marie, Isaias Hernandez, Vincent Gleize, Pierre Dal-col, Stanislas Lipin, Sophie Paris, Guillaume Gauchotte, Sylvie Poggioli Meimoun, Costanza Lo Cascio, Noémie Robil, Shwetal Mehta, Justine Guegan, Jun Komatsu, Pierre de la Grange, Marc Sanson, Carlos Parras et Emmanuelle Huillard. <sup>#</sup> = co-premiers auteurs.

En vue de la préparation de l'article de recherche associé à ces travaux de thèse, le contenu des figures de la partie résultat contiendra de l'anglais et sera traduit sur la figure ou dans les légendes associées. Dans un premier temps, je décrirai l'expression du facteur de transcription CIC dans le lignage oligodendrocytaire, afin d'émettre des hypothèses sur son rôle dans ce lignage.

## 1. *L'expression de CIC augmente avec la maturation du lignage oligodendrocytaire*

---

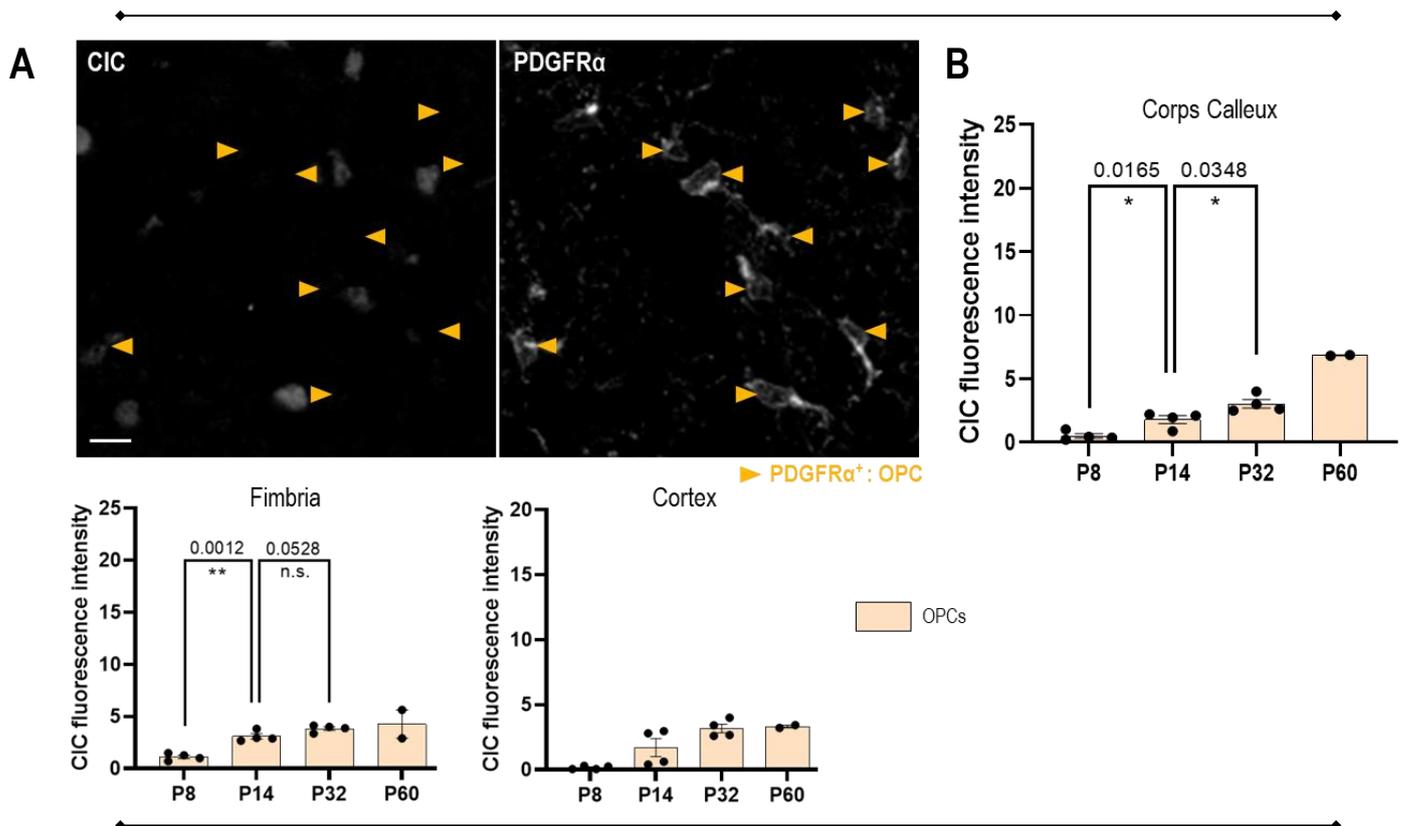
Pour étudier l'expression de CIC dans le lignage oligodendrocytaire, j'ai fait le choix d'utiliser la technique d'immunofluorescence, afin de pouvoir corrélérer par intensité lumineuse, l'expression de la protéine CIC dans différents types cellulaires de façon concomitante au microscope confocal. J'ai entrepris cette étude à différents stades et dans plusieurs régions cérébrales de souris C57BL/6J. En effet, il est décrit dans la littérature que l'expression de CIC dans le développement des lignages cellulaires peut être transitoire. C'est le cas notamment pour son expression dans les neurones granulaires dans l'hippocampe, le cervelet et le bulbe olfactif chez la souris [154]. J'ai utilisé à chacun de ces stades, les marqueurs suivants pour identifier les cellules du lignage oligodendrocytaire : PDGFR $\alpha$  pour marquer les OPCs, APC/CC1 pour marquer les OLs et enfin OPALIN afin de distinguer une population d'OLs myélinisants avancés dans la maturation, en plus du marquage CIC pour mesurer son intensité.

L'étude de l'expression de CIC a été entreprise à différents stades afin d'observer de potentielles différences d'expression en fonction du stade de développement de la myélinisation dans le cerveau et donc de la maturation du lignage oligodendrocytaire [94], [95]. J'ai ainsi choisi un stade précoce, P8, auquel la plupart des cellules du lignage sont encore dans un stade immature d'OPC. Le stade suivant, P14, correspond à l'initiation de la myélinisation de certaines structures cérébrales comme le *corps calleux* et la *fimbria*, permettant d'étudier l'expression de CIC dans un contexte d'initiation de la différenciation oligodendrocytaire. Le stade P32, plus tardif, correspond à un stade plus avancé de différenciation où la majorité des cellules du lignage se sont différenciées en OLs voire en mOLs dans les régions de la matière blanche. Enfin, le dernier stade P60 correspond à un stade où la myélinisation est bien établie voire achevée dans certaines structures de matière blanche, constituant un stade très différencié du lignage oligodendrocytaire. Pour chacun de ces stades, j'ai réalisé l'étude de l'expression de CIC dans différentes structures afin de révéler une potentielle hétérogénéité d'expression de CIC. En effet, nous avons largement décrit dans l'introduction les différences régionales et leurs conséquences sur la physiologie du lignage oligodendrocytaire. Notre hypothèse étant que CIC joue un rôle dans la différenciation et la maturation du lignage oligodendrocytaire, nous laisse penser que l'expression de CIC pourrait être plus importante au même stade dans des régions de la matière blanche due à leurs caractéristiques plus différenciées que les régions de la matière grise [141], [142], [203]. Ainsi, j'ai choisi de focaliser l'étude en particulier sur les régions du télencéphale et en particulier le *cortex* comme structure de la matière grise et le *corps calleux* et la *fimbria* comme structures de la matière blanche.

La région du télencéphale et en particulier ses domaines frontaux étant également les zones les plus associées à la survenue d'oligodendrogliomes [4], [5], [87].

### 1.1. *CIC est faiblement exprimé dans les OPCs*

Décrivons premièrement l'expression de CIC dans les OPCs. Comme on peut l'observer dans la **Figure 20**, l'intensité de fluorescence de CIC dans les OPCs est faible en comparaison avec les cellules avoisinantes (**Figure 20A**). Elle se distingue cependant du bruit de fond, et augmente entre P8 et P60 même si son niveau d'expression reste très bas. L'expression de CIC est assez similaire entre la fimbria et le cortex et semble seulement un peu plus importante dans le corps calleux. (**Figure 20B**) On peut en conclure que l'expression de CIC dans les OPCs est très faible, similaire entre les différentes régions et augmente légèrement au cours du temps. Explorons maintenant le profil d'expression de CIC dans les différentes populations d'OLs.

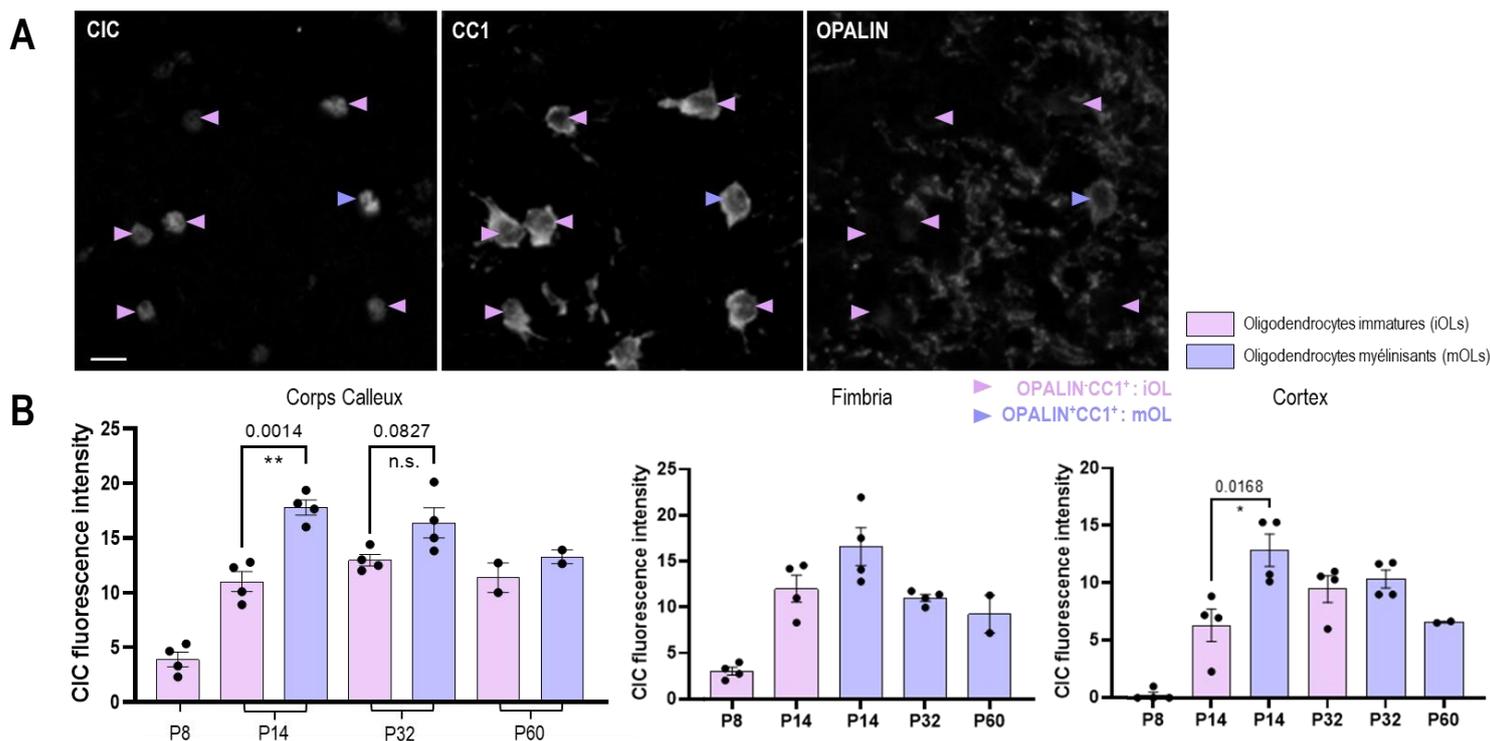


**Figure 20 – L'expression de CIC dans les OPCs augmente de manière discrète avec le temps.**

**A.** Coupes du corps calleux de souris C57BL/6J à P14 montrant par immunofluorescence l'expression de CIC dans les cellules PDGFR $\alpha^+$  (flèches jaunes montrant les OPCs) acquises par microscopie confocale (40X). Barre d'échelle : 10 $\mu$ m **B.** Quantification de l'intensité du marquage CIC dans le corps calleux, la fimbria et le cortex à différents stades de développement (P=postnatal ; le nombre associé correspond à l'âge de la souris en jours). Chaque point correspond à une mesure indépendante de la médiane d'expression des cellules pour une souris (Welch t-test, n=4 à P8-P32; n=2 à P60).

## 1.2. L'expression de CIC augmente dans les oligodendrocytes

Pour mesurer l'expression de CIC dans les OLs, j'ai utilisé le marqueur CC1 permettant un marquage de la population totale de ces cellules ainsi que le marqueur OPALIN permettant d'identifier une population plus mature et myélinisante, le but étant d'observer une potentielle corrélation de CIC avec la maturation dans le lignage oligodendrocytaire. Ce que l'on peut observer en **Figure 21** est une expression de CIC en moyenne trois fois plus importante dans les OLs que dans les OPCs (**Figure 21B**). L'expression de CIC est assez similaire entre les structures avec de nouveau une légère tendance à une expression plus importante dans les structures de la matière blanche (**Figure 21B**). Parmi les OLs, on retrouve une expression de CIC 25 à 45% plus importante dans les OLs matures (**Figure 21A et B**) démontrant une corrélation entre l'expression de CIC et la maturation dans le lignage oligodendrocytaire. Cependant, l'expression de CIC dans les OLs n'est pas croissante avec le temps comme observé dans les OPCs. En effet, l'expression de CIC dans les OLs représente une gaussienne dont le maximum d'expression correspond à la



**Figure 21 – L'expression de CIC est associée à la maturation du lignage oligodendrocytaire.**

**A.** Coupes du corps calleux de souris C57BL/6J à P14 montrant par immunofluorescence l'expression de CIC dans les cellules CC1<sup>+</sup>OPALIN<sup>-</sup> (flèches roses montrant les iOLs) et CC1<sup>+</sup>OPALIN<sup>+</sup> (flèches violettes montrant les mOLs) acquises par microscopie confocale (40X). Barre d'échelle : 10µm **B.** Quantification de l'intensité du marquage CIC dans le corps calleux, la fimbria et le cortex à différents stades de développement (P=postnatal ; le nombre associé correspond à l'âge de la souris en jours). Chaque point correspond à une mesure indépendante de la médiane d'expression des cellules pour une souris (Welch t-test, n=4 à P8-P32; n=2 à P60).

période active de myélinisation des structures étudiées, elle diminue ensuite à P60, un stade à laquelle la myélinisation est moins active [117].

Ainsi l'expression de CIC est associée avec la maturation du lignage oligodendrocytaire avec une expression plus importante dans les OLs et en particulier les OLs plus matures. Ce profil d'expression a du sens quand on voit que le maximum d'expression de CIC correspond au stade de différenciation active des structures étudiées. Cela conforte notre hypothèse d'un rôle de CIC dans la différenciation des OLs. Il convient par conséquent de valider à présent fonctionnellement cette hypothèse en étudiant l'impact de l'inactivation de *Cic* spécifiquement dans les OPCs.

## 2. Caractérisation d'un modèle murin d'inactivation de CIC dans les cellules d'origine des gliomes

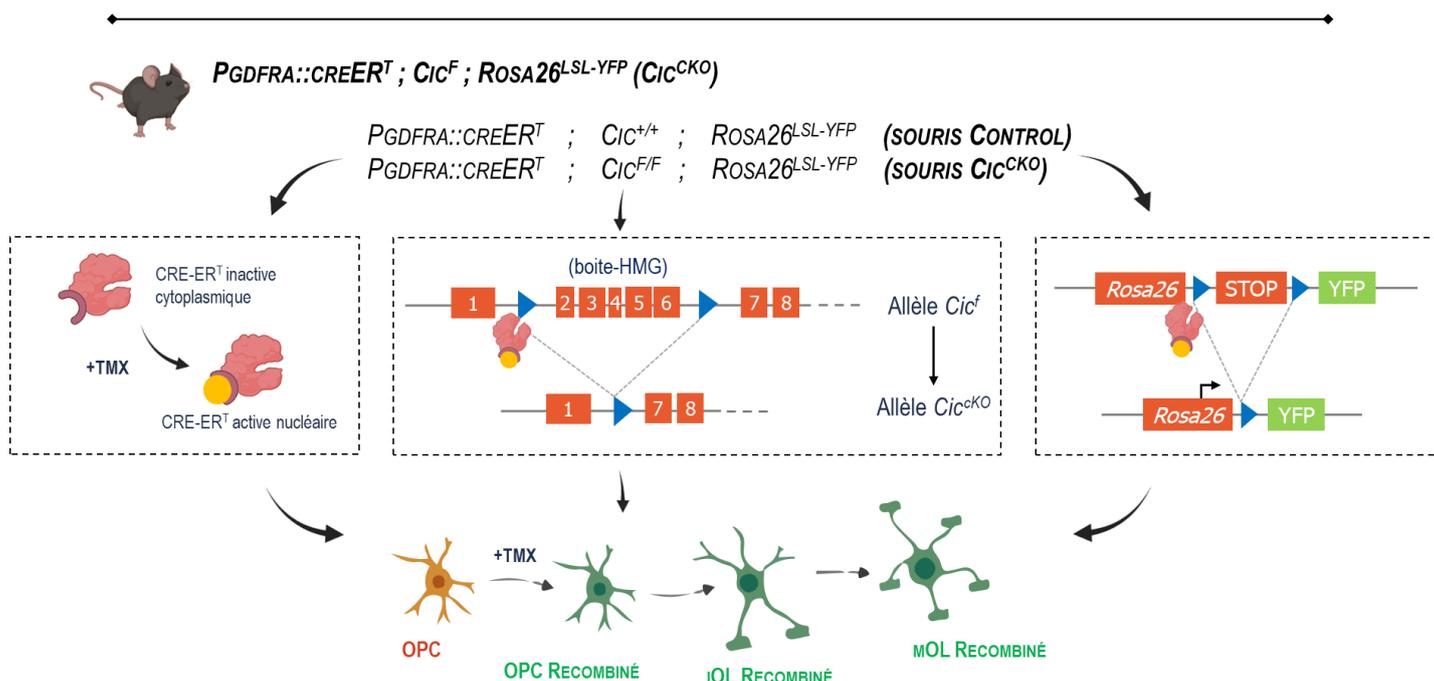
---

Afin d'étudier la fonction de CIC dans le lignage oligodendrocytaire, le laboratoire a développé un modèle d'inactivation de *Cic* dans les cellules d'origine des oligodendrogliomes : c'est le modèle murin *Pdgfra::creER<sup>T</sup> ; Cic<sup>f</sup> ; Rosa26<sup>LSL-YFP</sup>*. Décrivons dans la sous-partie suivante ce modèle afin de comprendre ses possibilités et limites.

### 2.1. Description du modèle : *Pdgfra::creER<sup>T</sup> ; Cic<sup>f</sup> ; Rosa26<sup>LSL-YFP</sup>*

Ce modèle murin permet l'inactivation conditionnelle et inductible de *Cic* dans les cellules PDGFR $\alpha^+$  (**Figure 22**). Ces cellules expriment dans le cytoplasme une protéine fusion CRE-ER<sup>T</sup> [105], dont l'activation par le tamoxifène, permettra une translocation nucléaire induisant des événements de recombinaison au niveau de sites appelés *lox P*. Chez les souris *Cic<sup>f</sup>*, les premiers sites encadrent les exons 2 à 6 du locus *Cic*, codant le domaine HMG. L'excision de ces exons est prédite pour ne pas perturber le cadre de lecture et résulter en l'expression d'un ARN tronqué produisant une protéine CIC incapable de se lier à l'ADN [178]. Notre équipe a choisi d'exciser ces exons en particulier pour mimer les mutations inactivatrices du domaine HMG des oligodendrogliomes [13]. De ce fait, les souris du groupe expérimental présenteront une inactivation homozygote du gène *Cic* similaire à la perte des deux allèles du gène *CIC* des oligodendrogliomes mutés. Chez les souris contrôles, l'induction au tamoxifène entrainera également une translocation de la CRE-ER<sup>T</sup> dans le noyau, mais l'absence de sites *lox P* au niveau du locus *Cic* empêchera toute excision, produisant une version fonctionnelle du répresseur transcriptionnel.

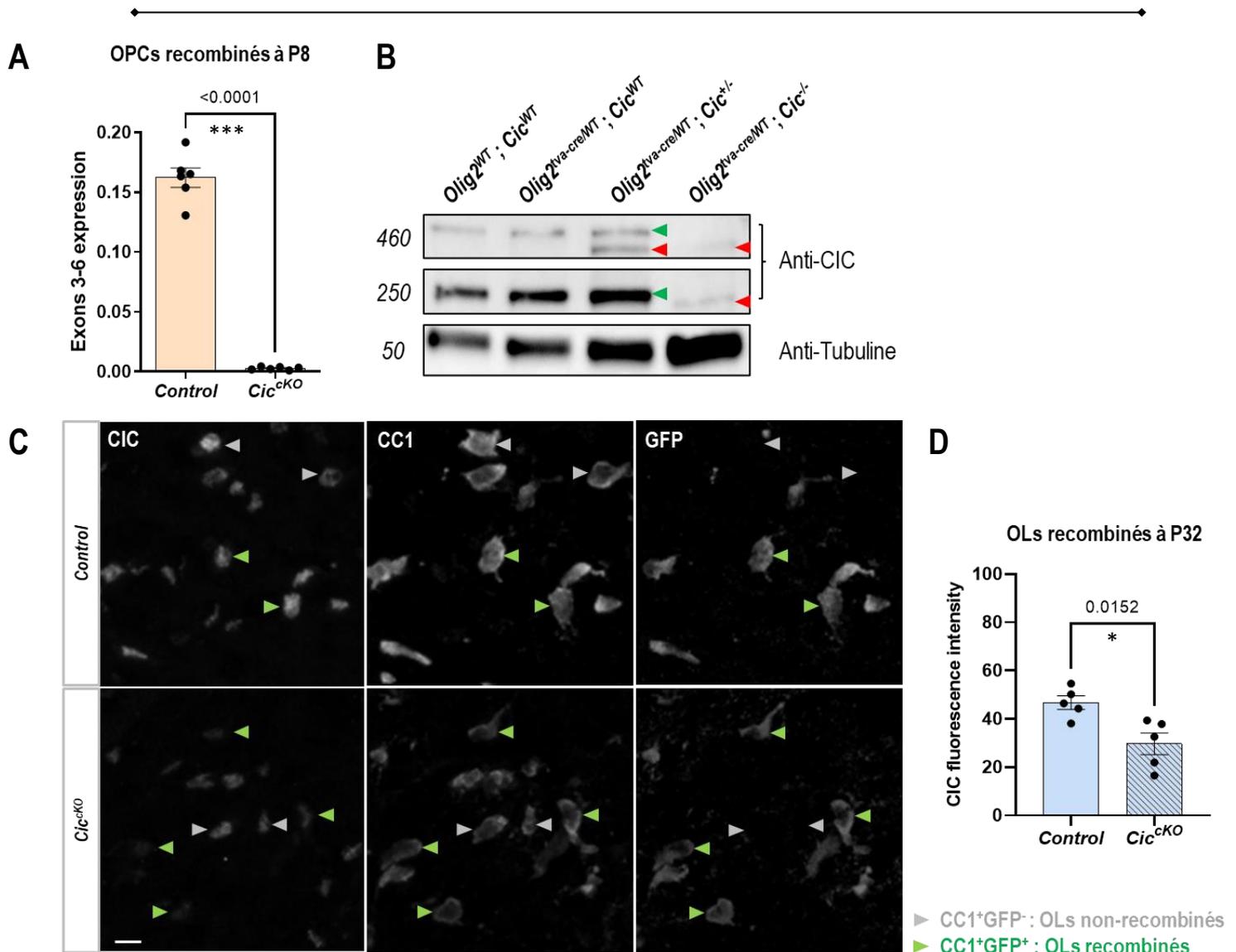
Afin de pouvoir suivre le devenir des cellules ayant été recombinaison suite à l'injection, les souris *Cic<sup>cKO</sup>* et *Control* présentent de manière hétérozygote au niveau du locus *Rosa26*, le gène rapporteur YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) précédé d'une cassette STOP encadrée par des sites *lox P*, empêchant l'expression du gène rapporteur de manière constitutive [202]. Après induction au tamoxifène, la CRE-ER<sup>T</sup> vient exciser cette cassette STOP induisant l'expression de la YFP dans les deux groupes de souris, ce qui permet leur comparaison. L'expression de la YFP étant maintenue, on peut suivre la différenciation et la maturation des cellules recombinaison. Pour la suite du manuscrit, les animaux contrôles injectés (*Pdgfra::creER<sup>T/wt</sup> ; Cic<sup>+/+</sup> ; Rosa26<sup>LSL-YFP/+</sup>*) seront dénommés *Control* et les animaux expérimentaux injectés (*Pdgfra::creER<sup>T/wt</sup> ; Cic<sup>cKO</sup> ; Rosa26<sup>LSL-YFP/+</sup>*) seront appelés *Cic<sup>cKO</sup>*. Maintenant que nous avons décrit le modèle, détaillons les expériences ayant permis sa validation.



**Figure 22 – Un modèle d’inactivation conditionnelle et inducible de *Cic* dans les OPCs : le modèle *Pdgfra::creERT; Cic<sup>F</sup>; Rosa26<sup>LSL-YFP</sup>*.** De manière constitutive, l’expression de la CRE-ERT dans les cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> est maintenue dans le cytoplasme grâce au récepteur aux œstrogènes (ERT), empêchant tout évènement de recombinaison. Après injection de tamoxifène, un analogue aux œstrogènes, le récepteur ERT est activé induisant une translocation nucléaire de la protéine fusion CRE-ERT. Chez les souris *Cic<sup>F/F</sup>*, la CRE induit au niveau du locus *Cic*, l’excision des exons 2 à 6 codant le domaine HMG (souris *Cic<sup>CKO</sup>*). Les souris *Cic<sup>+/+</sup>* ne possédant pas de sites lox P (flèches bleues), les deux allèles du gène *Cic* restent intacts. De plus, dans les souris *Cic<sup>F/F</sup>* et *Cic<sup>+/+</sup>*, la présence d’un gène rapporteur YFP dont l’expression est permise par excision d’une cassette STOP par la CRE, permet de suivre la descendance des cellules ayant été recombinée par l’injection de tamoxifène. TMX=Tamoxifène.

## 2.2. L’excision du domaine HMG est efficace dans le modèle *Cic<sup>CKO</sup>*

Afin de caractériser le modèle *Cic<sup>CKO</sup>*, mon laboratoire d’accueil a validé au préalable l’efficacité de l’excision des exons 2 à 6 dans les OPCs recombinés (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>) de souris *Cic<sup>CKO</sup>* triés par FACS trois jours après injection de tamoxifène à P5 (**Figure 23A**). Pour cela, les niveaux d’ARNm contenant les exons 2-6 ont été mesurés par RT-qPCR. Comme on peut l’observer, l’efficacité de l’excision de ces exons est quasi-totale (98% d’efficacité). Cependant, les sondes utilisées permettant uniquement de détecter l’expression des exons excisés, il nous était impossible de savoir à ce stade si des ARNm *Cic* tronqués étaient tout de même exprimés et produisaient des protéines CIC tronquées. J’ai ainsi réalisé deux analyses au niveau protéique de l’expression d’une protéine CIC tronquée par *Western Blot* et immunofluorescence.



**Figure 23 – Instabilité de l'expression de CIC chez les souris  $Cic^{CKO}$  causée par l'inactivation du domaine HMG.** **A.** qRT-PCR sur les exons 3 à 6 (amplification des exons codant le domaine HMG) sur des OPCs recombines triés à P8 après injection au tamoxifène à P5 de souris *Control* et  $Cic^{CKO}$  (n=6 par groupe, Welch t-test). **B.** Western Blot contre CIC sur des souris contrôles ( $Olig2^{WT}$  ;  $Cic^{WT}$  et  $Olig2^{iva-cre/WT}$  ;  $Cic^{WT}$ ), mutantes hétérozygotes ( $Olig2^{iva-cre/WT}$  ;  $Cic^{+/-}$ ) et mutantes homozygotes ( $Olig2^{iva-cre/WT}$  ;  $Cic^{-/-}$ ) (contrôle de chargement, tubuline ; n=2 ; flèches vertes=isoformes sauvages ; flèches rouges=isoformes mutées). **C.** Sections du corps calleux de souris *Control* et  $Cic^{CKO}$  à P32 montrant par immunofluorescence l'expression de CIC dans les cellules CC1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> (flèches vertes montrant les OLs recombines) et CC1<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> (flèches blanches montrant les OLs non recombines) acquises par microscopie confocale (40X). Barre d'échelle : 10µm **D.** Quantification de l'intensité du marquage CIC dans le corps calleux d'OLs recombines à P32 (induits à P5). Chaque point correspond à une mesure indépendante de la médiane d'expression des cellules pour une souris (Welch t-test, n=5).

### 2.2.1 *La recombinaison au locus Cic induit une instabilité de la protéine*

Pour valider l'expression potentielle d'une protéine CIC tronquée traduite depuis un ARNm *Cic* excisé, j'ai réalisé des *Western Blot* contre CIC sur des cultures de neurosphères à partir d'un modèle d'inactivation constitutive de *Cic* dans les progéniteurs neuraux réalisé précédemment dans le laboratoire (le modèle *Olig2<sup>tva-cre</sup>* ; *Cic<sup>f</sup>* présenté en annexe 2). Comme on peut le voir dans les échantillons contrôles (*Olig2<sup>WT</sup>* ; *Cic<sup>WT</sup>* et *Olig2<sup>tva-cre/WT</sup>* ; *Cic<sup>WT</sup>*), les deux isoformes sauvages de CIC sont exprimées au poids moléculaire attendu à savoir 460 kDa pour l'isoforme CIC-L et 250 kDa pour l'isoforme CIC-S (**Figure 23B**). Dans l'échantillon hétérozygote (*Olig2<sup>tva-cre</sup>* ; *Cic<sup>+/-</sup>*), on retrouve en plus de l'expression des isoformes sauvages de CIC, une bande supplémentaire de poids moléculaire légèrement inférieur (d'environ 10kDa ; correspondant au poids du domaine HMG [151]) pouvant correspondre à l'isoforme CIC-L mutée. Quant aux souris mutantes homozygotes (*Olig2<sup>tva-cre/WT</sup>* ; *Cic<sup>-/-</sup>*), on distingue à peine la présence de l'isoforme CIC-L mutée ainsi qu'une deuxième bande de poids moléculaire légèrement inférieur à l'isoforme CIC-S sauvage, correspondant à l'isoforme CIC-S mutée présente à des niveaux d'expression quasiment nuls. Ces résultats nous permettent de conclure que des versions tronquées des deux isoformes de CIC sont bel et bien exprimées chez les souris mutantes. Ces résultats démontrent que la perte du domaine HMG entier induit une instabilité des isoformes de CIC.

Toutefois, *Forés et al.*, montrent dans une lignée cellulaire humaine que la surexpression de constructions de CIC portant des mutations ponctuelles du domaine HMG, du domaine C1 ou une perte du domaine C1 n'induisent pas de changement d'expression des protéines résultantes par rapport à la construction intacte de CIC [156]. Cette différence avec nos résultats peut être due à la différence des constructions génétiques des modèles : la perte entière du domaine HMG dans notre cas induirait une instabilité tandis que des mutations ponctuelles ou une perte du domaine C1 n'auraient pas de conséquence sur la stabilité de CIC. Elle peut également être expliquée par le contexte cellulaire qui engendrerait des régulations différentes ou encore à la stabilisation dans le cas de l'étude *Forés et al.*, des constructions mutantes par la protéine CIC endogène. En effet, la présence des formes sauvages de CIC dans notre modèle semble chez le mutant hétérozygote stabiliser l'expression des formes tronquées (**Figure 23B**) Plus précisément, on observe une expression plus importante de l'isoforme CIC-L tronquée chez les souris mutantes hétérozygotes que chez les souris mutantes homozygotes. Ensemble ces données démontrent l'existence de formes mutantes instables des isoformes de CIC induites par la perte du domaine HMG.

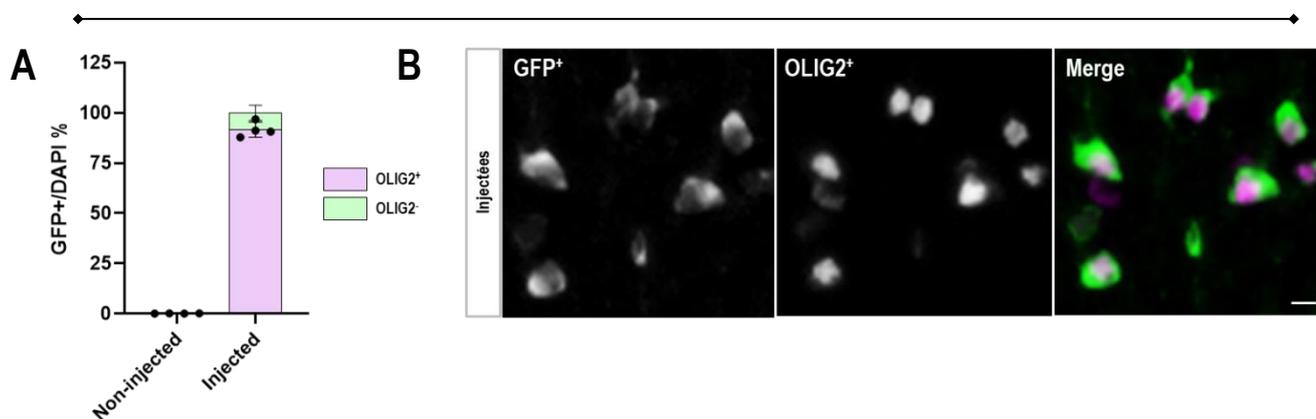
Afin de confirmer ces résultats *in vivo* et de valider l'inactivation de *Cic* dans les OLs, j'ai conduit une étude de l'expression de CIC dans le modèle *Cic<sup>CKO</sup>* par immunofluorescence à P32 après induction au tamoxifène des souris à P5.

L'immunofluorescence montre la présence d'OLs recombinés (identifiées grâce au marquage anti-GFP) et non recombinés chez les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* (**Figure 23C**). La quantification du signal fluorescent du marquage anti-CIC révèle une diminution significative des niveaux de CIC dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>* par rapport aux souris *Control* (**Figure 23D** ; cette diminution est également détectée dans la fimbria et dans une moindre mesure dans le cortex, données non montrées). Ces données confirment *in vivo* une instabilité de l'expression de CIC causée par l'excision des exons codant le domaine HMG sans toutefois causer une perte totale de l'expression de la protéine tronquée.

Ces différentes expériences de validation transcriptomique et protéique ont permis de démontrer l'efficacité de l'excision des exons codant le domaine HMG dans les OPCs ainsi que dans les OLs des souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Cependant, il convient également de valider la spécificité de recombinaison des allèles *Cic* dans le lignage oligodendrocytaire.

### 2.2.2 La recombinaison est spécifique du lignage oligodendrocytaire

Afin d'étudier la question de la spécificité de la recombinaison dans le lignage oligodendrocytaire, j'ai réalisé une immunofluorescence anti-GFP pour marquer les cellules recombinées et anti-OLIG2 pour marquer les cellules du lignage oligodendrocytaire (**Figure 24**). L'étude a été effectuée sur des souris injectées et non injectées au tamoxifène. De cette manière, nous pourrions également observer une potentielle activation non spécifique de la CRE-ER<sup>T</sup>. On observe tout d'abord que les souris non injectées ne présentent pas de cellules recombinées (**Figure 24A**), ce qui montre l'absence d'activation non spécifique de la CRE-ER<sup>T</sup> dans les OPCs. Dans les souris injectées, la plupart des cellules recombinées expriment également le marqueur OLIG2 (91%) montrant une grande spécificité de la recombinaison dans le lignage oligodendrocytaire (**Figure 24B**).



**Figure 24 – La recombinaison au locus *Rosa26YFP* est spécifique du lignage oligodendrocytaire.** **A.** Quantification de la proportion de cellules OLIG2<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> parmi les cellules GFP<sup>+</sup> chez des souris injectées (P5) et non injectées à P14. **B.** Sections du corps calleux de souris *injectées* à P14 montrant par immunofluorescence l'expression d'OLIG2 dans les cellules GFP<sup>+</sup> (recombinées) acquises par microscopie confocale (40X). Barre d'échelle : 10µm

En conclusion, dans le modèle *Cic<sup>CKO</sup>* nous avons pu montrer l'efficacité de l'excision des exons codant le domaine HMG dans les OPCs menant à une diminution de l'expression de la protéine CIC tronquée dans les OLs. De plus, cette recombinaison est spécifique au lignage oligodendrocytaire permettant l'étude de l'inactivation de *Cic* dans ce lignage que nous allons décrire à présent.

### 3. Conséquences de l'inactivation de *Cic* dans la physiologie des OPCs

---

Après avoir validé le modèle *Cic<sup>CKO</sup>*, nous avons entrepris la caractérisation de l'inactivation de *Cic* dans le développement du lignage oligodendrocytaire. Pour ce faire, nous avons réalisé l'inactivation de *Cic* dans des OPCs postnataux (P5) afin de nous placer dans la période de différenciation active de la souris [92], [93], [117] pour mesurer un potentiel effet de CIC dans ce processus physiologique. J'ai ainsi étudié les conséquences de l'inactivation de *Cic* dans des stades précoces (P8, 3 jours), intermédiaires (P14, 9 jours) et tardifs (P32, 27 jours). Par la suite, afin de nous rapprocher de la médiane de diagnostic des oligodendrogliomes, j'ai réalisé une inactivation de *Cic* dans les OPCs adultes afin d'en décrire les conséquences fonctionnelles.

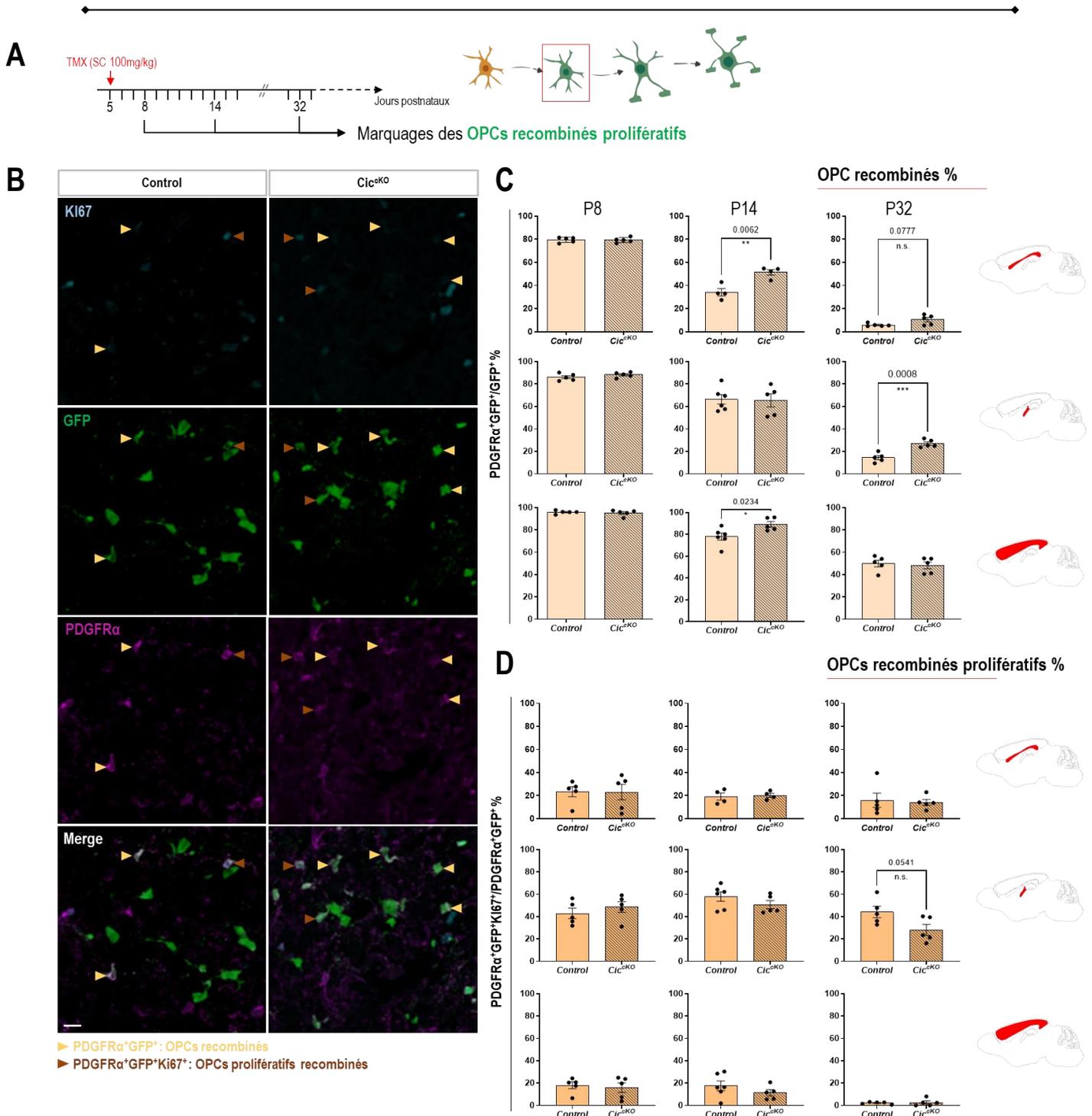
#### 3.1. Étude de l'inactivation de *Cic* dans les OPCs postnataux : *in vivo*

Pour mesurer de potentiels changements dans les proportions d'OPCs et d'OLs recombines entre les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>*, j'ai conduit des immunomarquages des cellules recombines (GFP<sup>+</sup>) après induction pour marquer les OPCs (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>), leur prolifération (KI67<sup>+</sup>) et les OLs (CC1<sup>+</sup>) aux stades P8, P14 et P32, dans le corps calleux, le cortex et la fimbria.

##### 3.1.1 L'inactivation de *Cic* n'induit pas la prolifération des OPCs

Trois jours après inactivation de *Cic*, la proportion d'OPCs ayant été recombines (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>) dans le corps calleux chez les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* est d'environ 74%. Les taux de recombinaison pour le cortex et la fimbria sont respectivement de 79% et de 78%. La proportion d'OPCs parmi les cellules recombines (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>) chez les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* à P8 varie entre 80 et 95% suivant les structures (**Figure 25C, P8**), montrant que la vaste majorité de cellules recombines n'a pas encore démarré son processus de différenciation. Par ailleurs, on n'observe pas de différence de proportion d'OPCs recombines entre les deux groupes dans les trois structures à ce stade précoce après inactivation.

J'ai ensuite mesuré la proportion d'OPCs recombines prolifératifs (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>KI67<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) (**Figure 25D, P8**). Elle est d'environ 20% pour le corps calleux et le cortex alors qu'elle monte à 40% pour la fimbria. Comme pour la proportion d'OPCs totale, la proportion d'OPCs prolifératifs est similaire entre les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* pour les différentes structures. Nous pouvons en conclure que l'inactivation de *Cic* n'a pas d'effet sur la prolifération ni la proportion d'OPCs dans les trois premiers jours.



**Figure 25 – L'inactivation de *Cic* dans les OPCs induit une accumulation transitoire d'OPCs.**

**A.** Schéma de la procédure expérimentale. **B.** Sections du corps calleux de souris *Control* et *Cic*<sup>CKO</sup> à P14 marquant par immunofluorescence les OPCs (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>), les cellules recombinées (GFP<sup>+</sup>) et les cellules prolifératives (Ki67<sup>+</sup>) ; les flèches jaunes montrant les OPCs recombinés (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) et les flèches marrons les OPCs recombinés prolifératifs (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>), chez les souris *Control* (panel gauche) et *Cic*<sup>CKO</sup> (panel droit). Acquisition au microscope confocal (20X). Barre d'échelle : 20 $\mu$ m **C et D.** Quantification de la proportion d'OPCs recombinés (C) et d'OPCs recombinés prolifératifs (D) aux différents stades de l'étude dans le corps calleux, le cortex et la fimbria. Chaque point correspond à une mesure indépendante de la moyenne de la proportion étudiée pour une souris (Welch t-test (+SEM)).

Neuf jours après l'induction au tamoxifène, la proportion d'OPCs ayant été recombines est à présent de 59% pour le corps calleux, de 82% pour le cortex et de 69% pour la fimbria chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* et *Control*. En effet, sachant qu'une seule injection a été réalisée et que des OPCs sont produits de manière continue par la SVZ [104], [124], la population de cellules recombines à P5 sera progressivement diluée avec l'âge. On observe en particulier, une diminution pour le corps calleux et la fimbria alors que la proportion d'OPCs recombines pour cortex semble se stabiliser voire légèrement augmenter. Cela pourrait potentiellement être dû à la migration d'OPCs recombines du corps calleux dans les zones corticales. Au niveau des proportions d'OPCs parmi les cellules recombines, on observe chez les souris *Control* une diminution de moitié de la proportion observée à P8 dans le corps calleux, et diminution d'environ 20% dans la fimbria et le cortex (**Figure 25C, P14**). Dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*, nous observons dans le corps calleux une augmentation significative de 20% de la proportion d'OPCs par rapport aux souris *Control*. Dans le cortex, cette augmentation est de 10%. Cependant, elle n'est pas observée dans la fimbria qui présente des proportions similaires entre souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>*.

Concernant la proportion d'OPCs recombines prolifératifs, nous n'observons pas de changement significatif entre les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* (**Figure 25D, P14**). Nous notons une très légère tendance à la diminution dans le cortex. Plus encore, les proportions d'OPCs recombines prolifératifs sont très similaires entre P8 et P14 pour les différentes structures hormis pour la fimbria qui présente une augmentation de 18% de la proportion d'OPCs prolifératifs à P14. Ces résultats nous permettent de conclure que l'inactivation de *Cic* entraîne au bout de neuf jours, une augmentation de la proportion d'OPCs qui n'est pas liée à une augmentation de leur prolifération.

Au bout de 27 jours d'inactivation, la proportion d'OPCs ayant été recombines n'est plus que de 21% dans le corps calleux, de 64% pour le cortex et de 60% pour la fimbria chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* et *Control*. Pour les proportions d'OPCs parmi les cellules recombines, elles ne constituent plus que 7% dans le corps calleux, 20% dans la fimbria et 50% dans le cortex. Alors qu'on observait une augmentation significative de la proportion d'OPCs recombines chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* à P14, il ne s'agit plus que d'une tendance à P32 (**Figure 25C, P32**), ce qui peut être dû au faible nombre d'OPCs résiduels (~70 OPCs recombines/mm<sup>2</sup>). L'accumulation d'OPCs décrite à P14 ne semble ainsi pas persister et finit par ne représenter plus qu'une faible proportion parmi les cellules recombines à P32. Dans le cortex également, l'accumulation observée ne persiste pas à P32. Cependant, une augmentation significative de 10% de la proportion d'OPCs est à présent mesurée dans la fimbria (**Figure 25C, P32**). Ces différences structurelles peuvent refléter des dynamiques de développement des OPCs dépendantes des régions.

De nouveau, nous n'observons aucune différence de proportion d'OPCs recombinaisonnels prolifératifs entre les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* hormis une tendance à la diminution de près de 15% en moyenne chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* dans la fimbria. Dans le corps calleux, les proportions d'OPCs prolifératifs se maintiennent alors qu'elles deviennent quasiment inexistantes dans le cortex chez les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* (**Figure 25D, P32**).

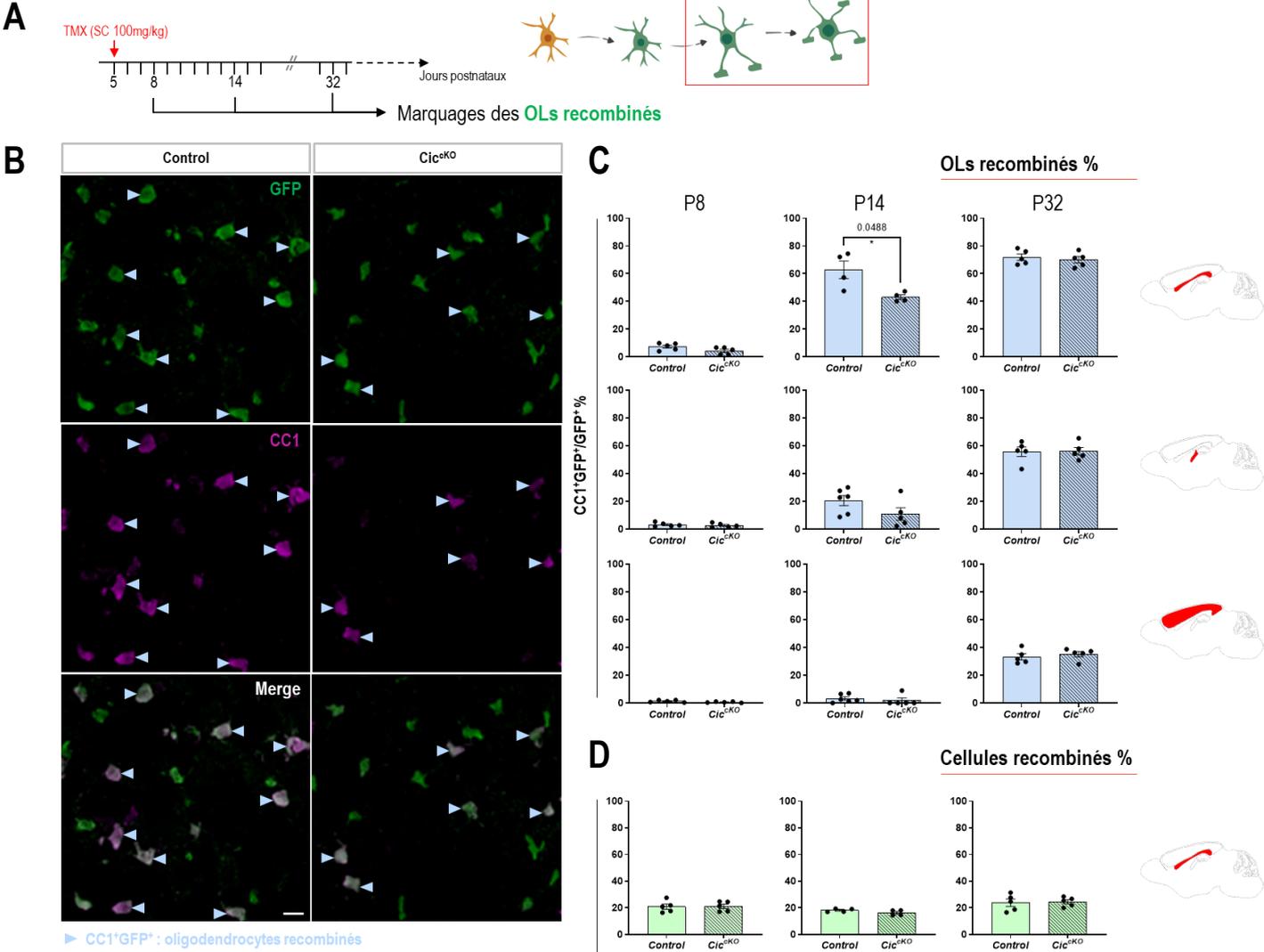
Tous ces résultats nous permettent de décrire un effet transitoire de l'inactivation de *Cic* sur l'augmentation de la proportion d'OPCs sans changement de leur état de prolifération. Cette augmentation apparaît à différents stades dans les structures étudiées révélant des différences régionales de développement. Le fait que cette accumulation d'OPCs ne soit pas associée à une augmentation de la prolifération nous laisse supposer qu'elle peut être due à un défaut de différenciation de ces OPCs. Ainsi, j'ai réalisé des marquages des OLs afin de valider cette hypothèse.

### 3.1.2 *L'inactivation de Cic induit un délai de différenciation des oligodendrocytes*

À P8, la proportion d'OLs parmi les cellules recombinaisonnelles (CC1+GFP+/GFP+) chez les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* est de 7% en moyenne dans le corps calleux, de moitié dans la fimbria et presque inexistante dans le cortex (**Figure 26C, P8**). Cela confirme que les OPCs recombinaisonnels ne se sont pas encore différenciés massivement. Cela démontre également avec les résultats précédents de proportions d'OPCs recombinaisonnels, que l'induction est bien spécifique du lignage oligodendrocytaire. Par ailleurs, on n'observe pas de différence de proportion d'OLs recombinaisonnels entre les deux groupes dans les trois structures à ce stade hormis une tendance à la baisse chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* dans le corps calleux (**Figure 26C, P8**).

À l'inverse des OPCs, la proportion d'OLs parmi les cellules recombinaisonnelles augmente au cours du temps, en raison de la différenciation, pour rapidement atteindre 60% à P14 tandis qu'elle est de 20% dans la fimbria et de 6% dans le cortex. On observe cette fois une diminution significative de 20% de la proportion d'OLs chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* par rapport aux souris *Control*. Dans la fimbria, on retrouve une tendance à la diminution de la proportion d'OLs chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* (**Figure 26C, P14**).

Enfin à P32, la proportion d'OLs représente à présent 70% des cellules recombinaisonnelles dans le corps calleux, 60% dans la fimbria et 35% dans le cortex. De plus, on ne retrouve pas à ce stade de différences significatives de proportion d'OLs dans les trois structures, illustrant le caractère transitoire de la diminution d'OLs observée à P14 dans le corps calleux (**Figure 26C, P32**). Prises ensemble ces données indiquent que l'inactivation de *Cic* induit une diminution de la proportion d'OLs. Cette diminution est du même ordre de grandeur que l'augmentation de la proportion d'OPCs à ce stade dans le corps calleux (**Figure 25**).



**Figure 26 – L’inactivation de *Cic* dans les OPCs altère la différenciation des oligodendrocytes.**

**A.** Schéma de la procédure expérimentale. **B.** Sections du corps calleux de souris *Control* et *Cic<sup>KO</sup>* à P14 marquant par immunofluorescence les oligodendrocytes (CC1<sup>+</sup>) et les cellules recombinaées (GFP<sup>+</sup>) ; les flèches bleues montrant les oligodendrocytes recombinaés (CC1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>), chez les souris *Control* (panel gauche) et *Cic<sup>KO</sup>* (panel droit). Acquisition au microscope confocal (20X). Barre d’échelle : 20μm

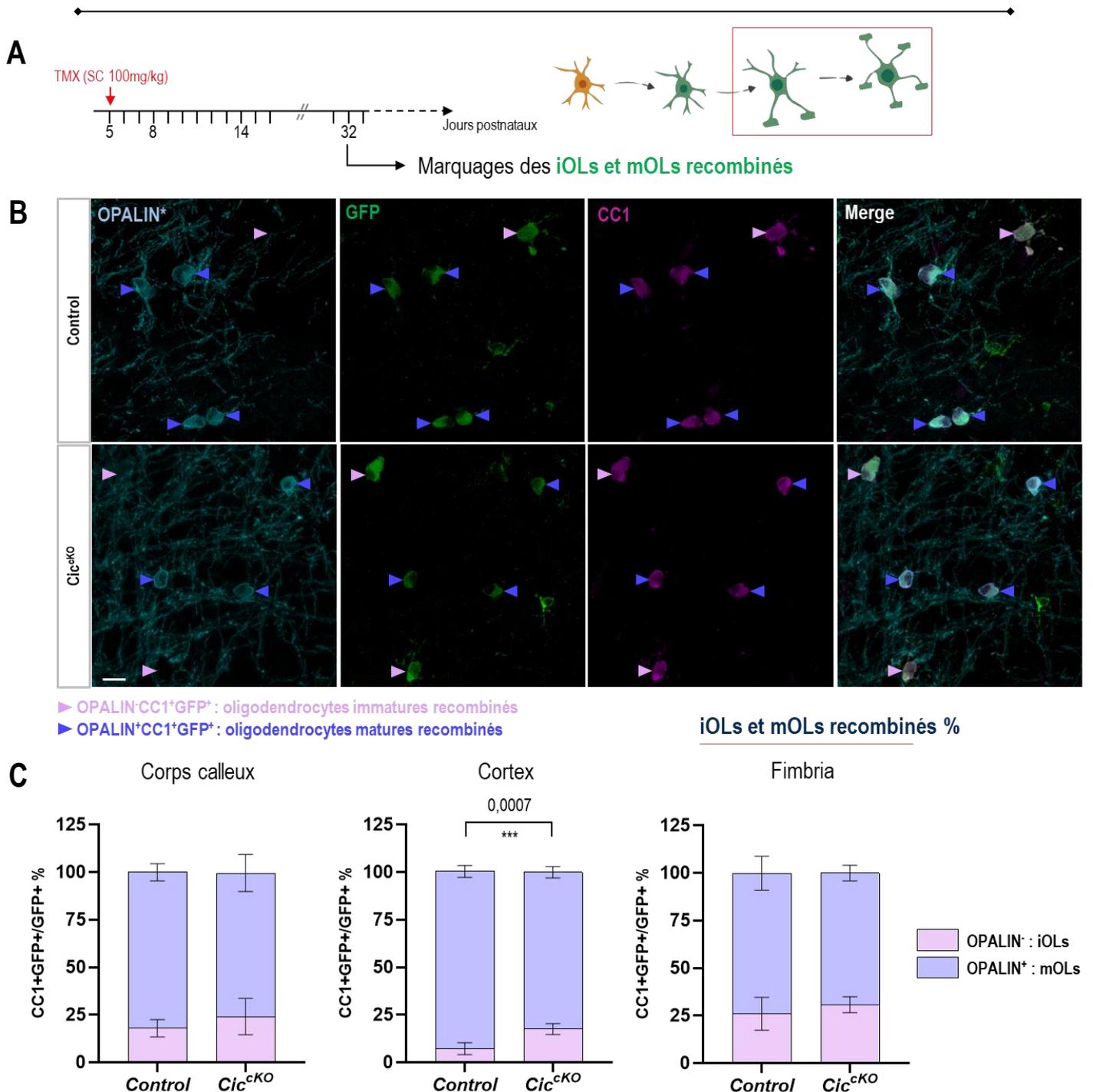
**C et D.** Quantification de la proportion d’oligodendrocytes recombinaés (C) et de la proportion de cellules recombinaées totales (D) aux différents stades de l’étude dans le corps calleux, le cortex et la fimbria. Chaque point correspond à une mesure indépendante de la moyenne de la proportion étudiée pour une souris (Welch t-test (+SEM)).

Pour nous assurer que ces changements de proportion sont corrélés, il nous faut démontrer que les populations totales de cellules recombinaées sont similaires entre les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>*. Ainsi, si la population totale est inchangée, alors les variations internes de cette population doivent se compenser. Comme on peut le voir en **Figure 26D**, les proportions totales de cellules recombinaées sont identiques entre les deux groupes et stables au cours du temps pour le corps calleux et le cortex et augmentent pour la fimbria. La population de cellules recombinaées du corps calleux constitue 20% des cellules totales et cette proportion est d'environ 5% pour le cortex. Pour la fimbria, cette proportion est de 20% à P8 et augmente jusqu'à 40% en moyenne à P32. Ces résultats démontrent ainsi que l'accumulation d'OPCs observée à P14 dans le corps calleux est bel et bien corrélée à la diminution de la proportion d'OLs au même stade dans cette structure révélant un défaut de différenciation induit par l'inactivation de *Cic*. Ce défaut est cependant transitoire, car ces variations de proportion ne sont plus observées à P32. L'ensemble de ces données conforte notre hypothèse d'un rôle de CIC dans la différenciation du lignage oligodendrocytaire.

Toutefois, cette première analyse ne nous a pas permis d'étudier dans le détail les populations d'OLs et notamment de mesurer de potentiels effets de l'inactivation de *Cic* sur la maturation des OLs. Pour ce faire, j'ai réalisé deux analyses indépendantes des populations d'OLs immatures et matures à un stade tardif d'inactivation permettant d'obtenir d'importantes populations d'OLs : le stade P32.

### 3.1.3 *L'inactivation de Cic induit une altération de la maturation des oligodendrocytes*

La première méthode d'analyse des sous-populations d'OLs est l'utilisation du marqueur OPALIN utilisé précédemment lors de l'analyse de l'expression de CIC dans le lignage oligodendrocytaire. Ce marqueur, permettant d'identifier les populations d'OLs myélinisants, peut être utilisé en combinaison avec le marqueur CC1 afin de distinguer les populations d'OLs immatures (iOLs) des populations plus matures (mOLs). Conformément à notre hypothèse selon laquelle CIC induit la maturation du lignage oligodendrocytaire, nous nous attendons à ce que l'inactivation de *Cic* entraîne un défaut de maturation des OLs. Les résultats des quantifications des proportions d'iOLs et de mOLs dans les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* sont détaillés en **Figure 27**. Dans le cortex, le marquage OPALIN permet une distinction claire des mOLs recombinaés qui représentent la vaste majorité des OLs à ce stade (87,8% des OLs recombinaés). On observe cependant dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>* une augmentation de 10% la proportion d'iOLs par rapport aux souris *Control* (**Figure 27C**), suggérant un état plus immature des OLs chez les souris inactivées pour *Cic*. Dans le corps calleux et la fimbria, la majorité des OLs sont également matures (respectivement 78,8 et 71,5%). On n'observe toutefois pas de différence en



**Figure 27 – L’inactivation de *Cic* dans les OPCs altère la maturation des oligodendrocytes.**

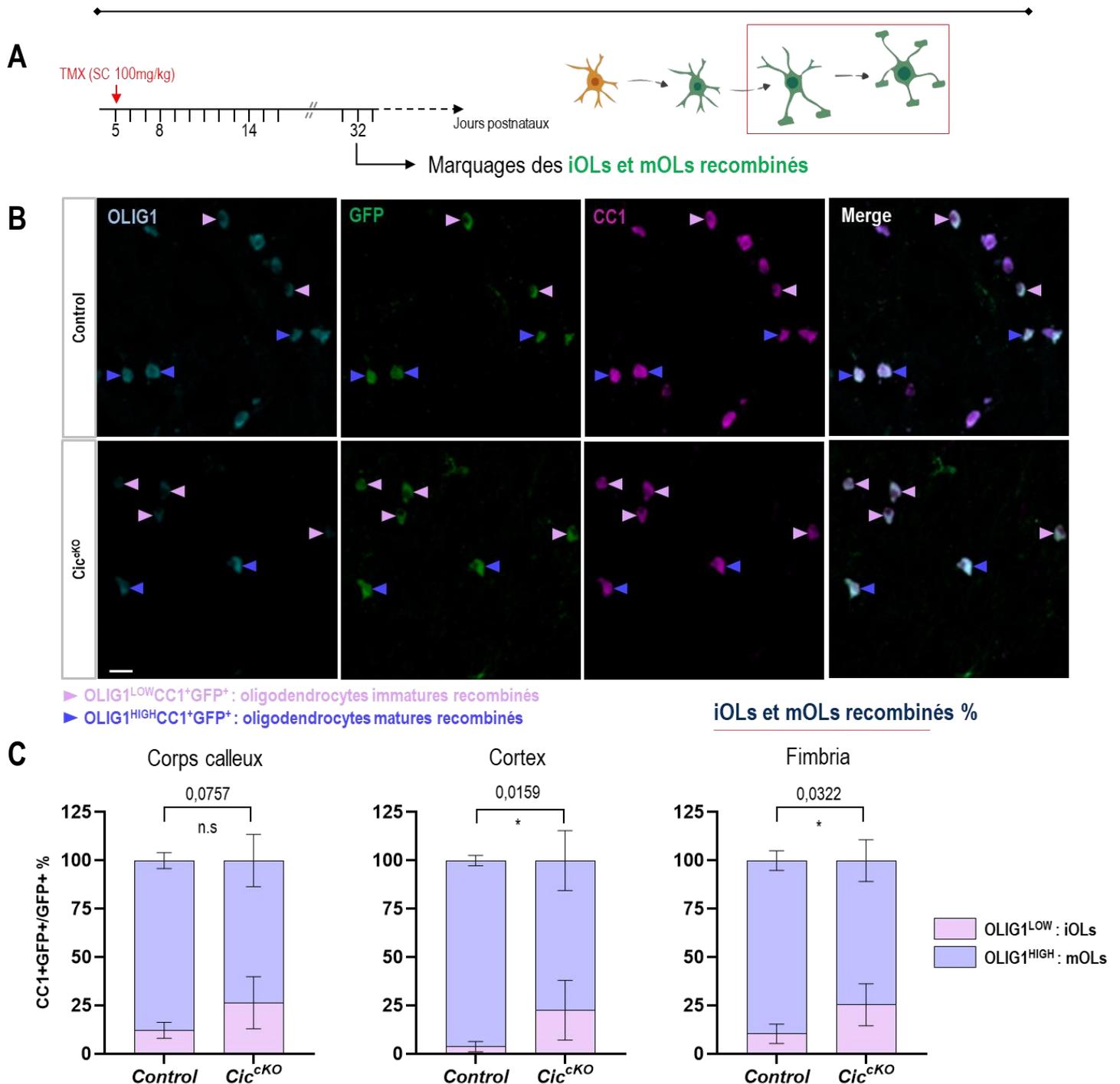
**A.** Schéma de la procédure expérimentale. **B.** Sections du cortex de souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* à P32 marquant par immunofluorescence les iOLs recombines (OPALIN-CC1+GFP<sup>+</sup> ; flèches roses) et les mOLs recombines (OPALIN+CC1+GFP<sup>+</sup> ; flèches bleu foncé) chez les souris *Control* (panel haut) et *Cic<sup>CKO</sup>* (panel bas). Acquisition au microscope confocal (20X). Barre d'échelle : 20µm **C.** Quantification de la proportion d'iOLs et de mOLs recombines à P32 dans le corps calleux, le cortex et la fimbria. Diagrammes en boîte correspondant à la moyenne de la proportion étudiée par groupe (n=5 ; Welch t-test (+SEM)).

proportion des sous-types d'OLs dans ces structures. Cependant, il est important de noter que le marquage OPALIN ne permet de distinguer que difficilement les iOLs des

mOLs à cause de l'omniprésence de la myéline dans ces régions de la matière blanche. C'est pourquoi nous avons opté pour une seconde méthode de marquage des sous-types d'OLs.

Afin de distinguer clairement les iOLs des mOLs, je me suis basé sur l'expression par les OLs du marqueur OLIG1 dont nous avons pu décrire le rôle en introduction. En effet, ce dernier est faiblement exprimé dans les iOLs en cours de différenciation et son expression augmente dans les mOLs [115], [130], [204]. Ainsi, nous avons utilisé un seuil d'expression d'OLIG1 décrit par *Nakatani et al.*, [115] pour distinguer les iOLs des mOLs, en combinaison avec le marqueur CC1. Le marquage OLIG1 présente effectivement une moindre intensité (<40/255, sur une échelle de 8 bits) dans les iOLs par rapport aux mOLs (**Figure 28**). Tout d'abord, on constate que le seuillage du marquage OLIG1 ( $OLIG1^{LOW} < 40$  ;  $OLIG1^{HIGH} > 40$ ) nous permet de distinguer les mêmes proportions d'iOLs et de mOLs dans les trois structures que les proportions obtenues avec le marqueur OPALIN (**Figure 27**), décrivant une majorité de mOLs. Conformément au résultat du marquage précédent, on constate dans le cortex une proportion d'iOLs plus importante de 19% dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Cependant, on observe cette fois une augmentation significative de 15% de la proportion d'iOLs toujours chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* dans la fimbria (**Figure 28C**). Dans le corps calleux, la tendance observée d'une augmentation de la d'iOLs n'est pas significative. Ce comptage par seuillage de l'expression d'OLIG1 nous a ainsi permis de distinguer plus facilement les populations d'OLs dans les structures de matière blanche et de révéler des changements de proportions similaires à ceux du cortex. L'inactivation de *Cic* entraîne dans les OLs, un défaut de maturation révélant un rôle de CIC dans ce processus cellulaire comme nous l'avions supposé.

Les résultats de cette étude de l'inactivation de *Cic* dans les OPCs postnataux a démontré un rôle de CIC dans la différenciation et la maturation du lignage oligodendrocytaire dans le corps calleux, le cortex et la fimbria. Ce rôle pourrait être dépendant de la dynamique de développement de la région considérée, comme le suggère l'augmentation de la proportion d'OPCs à un stade précoce dans le cortex et le corps calleux et à un stade plus tardif dans la fimbria. Nous notons cependant un impact transitoire, étant donné que les proportions d'OPCs altérées chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>* finissent par revenir à des niveaux similaires aux proportions des souris *Control*. Quant aux OLs, l'effet de CIC sur la maturation semble plus durable, car il persiste 27 jours après l'inactivation *Cic*. En résumé, l'inactivation de *Cic* dans les OPCs postnataux entraîne un phénotype immature du lignage oligodendrocytaire menant à une accumulation d'OPCs. Pour nous rapprocher de la médiane de diagnostic des oligodendrogliomes, et donc observer un effet de l'inactivation de *Cic* dans la survenue de ces derniers, j'ai ensuite procédé à son inactivation dans des OPCs adultes.



**Figure 28 – Confirmation de l’altération de la maturation par le marqueur OLIG1.** **A.** Schéma de la procédure expérimentale. **B.** Sections du cortex de souris *Control* et *Cic<sup>cko</sup>* à P32 marquant par immunofluorescence les iOLs recombines (OLIG1<sup>LOW</sup>CC1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>; flèches roses) et les mOLs recombines (OLIG1<sup>HIGH</sup>CC1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>; flèches bleues foncées) chez les souris *Control* (panel haut) et *Cic<sup>cko</sup>* (panel bas). Acquisition au microscope confocal (20X). Barre d’échelle : 20µm **C.** Quantification de la proportion d’iOLs et de mOLs recombines à P32 dans le corps calleux, le cortex et la fimbria. Diagrammes en boîte correspondant à la moyenne de la proportion étudiée par groupe (n=5; Welch t-test (+SEM)).

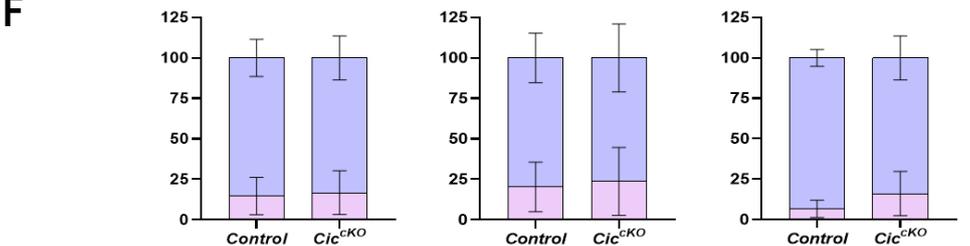
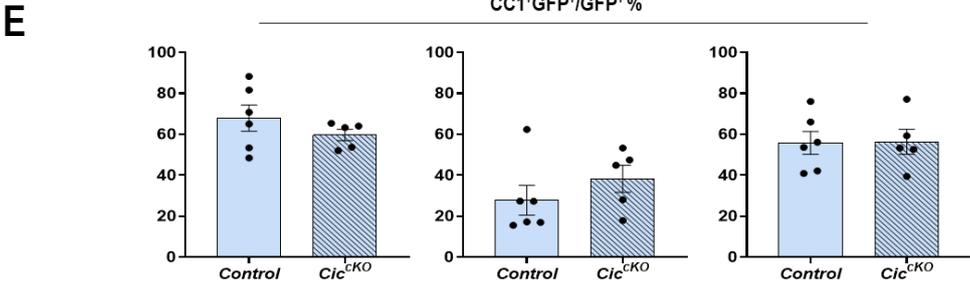
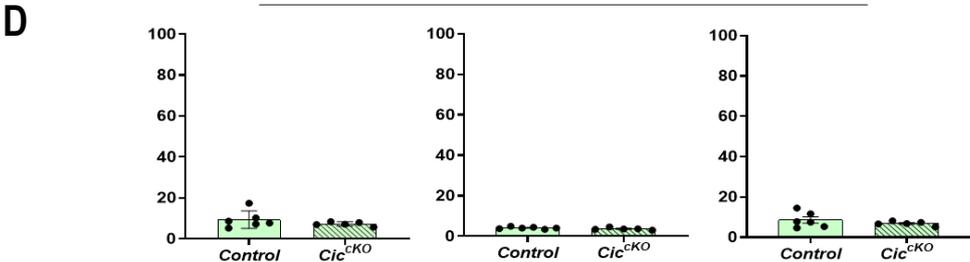
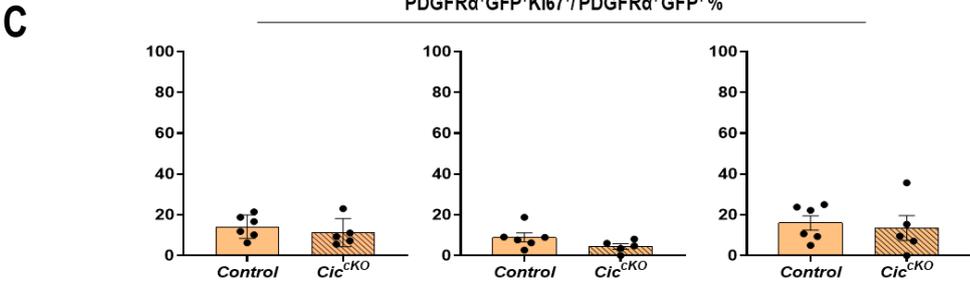
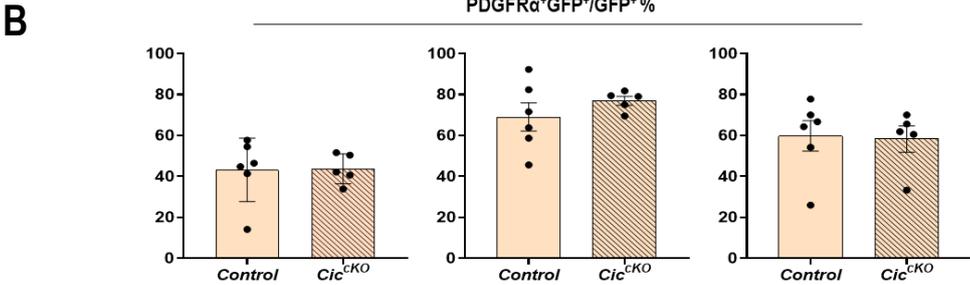
### 3.2. L'inactivation de *Cic* n'induit pas d'effets dans les OPCs adultes

Afin d'induire l'inactivation de *Cic* dans les OPCs adultes, j'ai réalisé une série de 5 injections quotidiennes consécutives à P60 en intrapéritonéale. Le temps de cycle des OPCs augmentant et la différenciation des OLs tarissant avec le temps [69], [100], [103], j'ai analysé les conséquences de l'inactivation de *Cic* un mois après induction à P90.

Un mois après l'inactivation de *Cic* à P60, la proportion d'OPCs ayant été recombines (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>) dans le corps calleux chez les souris *Control* et *Cic*<sup>CKO</sup> est de 89% à P90, alors qu'elle était de 21% après 27 jours d'inactivation au stade postnatal. Ces différences de pourcentage montrent une production tarie d'OPCs à l'âge adulte en comparaison à des stades postnataux. Les taux de recombinaison pour le cortex et la fimbria sont respectivement de 91% et de 87% chez les souris *Control* et *Cic*<sup>CKO</sup>. Comme on peut le voir en **Figure 29B**, la proportion d'OPCs parmi les cellules recombines (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>) varie de 40 à 60% entre le corps calleux et la fimbria et monte jusqu'à 80% environ dans le cortex. À l'inverse, le cortex présente les plus basses proportions d'OLs recombines (CC1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>) autour de 20%, tandis que le corps calleux et la fimbria sont respectivement autour de 60%. Cela démontre un potentiel de différenciation plus important des structures de la matière blanche par rapport aux structures de la matière grise comme décrit dans la littérature [141]–[144]. De plus, le taux d'OPCs prolifératifs est de 14% dans les structures de la matière blanche et de 8% dans le cortex reflétant la quiescence des OPCs adultes (**Figure 29C**). Parmi les OLs, on retrouve également une majorité de mOLs (80% en moyenne ; **Figure 29F**). Le taux de cellules recombines dans les trois structures ne dépasse pas 10% (**Figure 29D**).

Entre les souris *Control* et *Cic*<sup>CKO</sup>, on ne retrouve pas de différence significative dans les différents types de cellules du lignage oligodendrocytaire. De même, les proportions de cellules recombines totales sont inchangées, tout comme la proportion d'OPCs prolifératifs et les proportions des sous-types d'OLs. Ces résultats démontrent une absence d'effet de l'inactivation de *Cic* dans les OPCs adultes.

Comme nous avons pu le décrire en introduction, le microenvironnement module de façon importante la physiologie du lignage oligodendrocytaire. Il est possible que l'impact de l'inactivation de *Cic* sur la différenciation et la maturation soit causé par une modification du microenvironnement qui influencerait ces processus ou bien par un rôle intrinsèque de *CIC* dans les OPCs. Afin d'éliminer la présence du microenvironnement et d'évaluer les conséquences intrinsèques de l'inactivation de *Cic* dans les OPCs *in vitro*, j'ai mis en place un modèle de culture cellulaire O4<sup>+</sup> (cf. matériel et méthodes), dont nous allons détailler à présent les résultats obtenus.



légende sur la page suivante

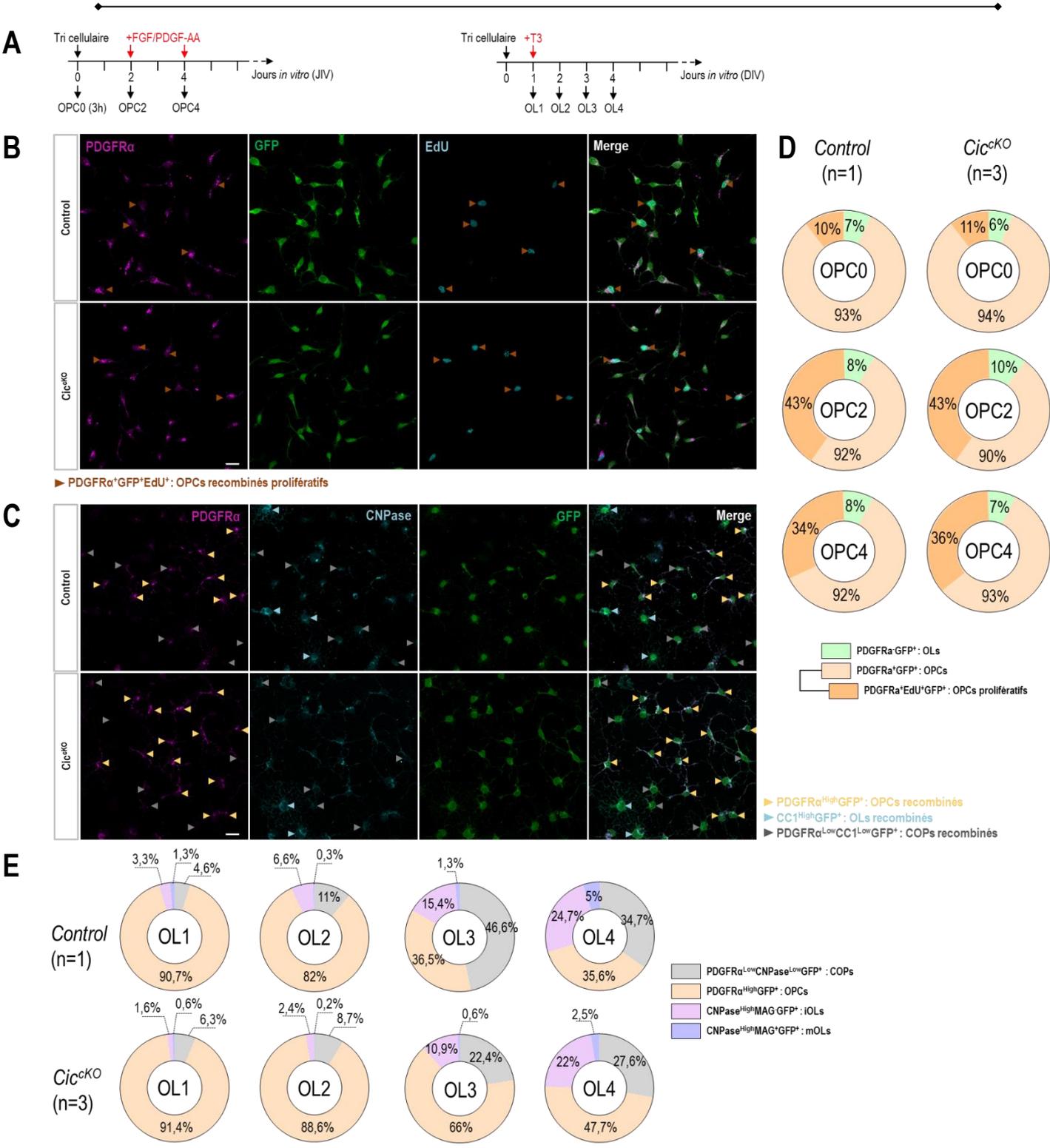
**Figure 29 – L'inactivation de *Cic* dans les OPCs adultes ne présente pas d'effet sur les populations oligodendrocytaires.** A. Schéma de la procédure expérimentale. B-F. Quantification de la proportion d'OPCs (B), d'OPCs prolifératifs (C), de cellules recombinées (D), d'OLs totaux (E) et d'iOLs et de mOLs (F) recombinés à P90 après inactivation de *Cic* à P60 dans le corps calleux, le cortex et la fimbria. Chaque point correspond à une mesure indépendante de la moyenne de la proportion étudiée pour une souris (Welch t-test (+SEM)). Pour les sous populations d'oligodendrocytes, les diagrammes en boîte correspondant à la moyenne de la proportion étudiée par groupe (n=6 ; Welch t-test (+SEM)).

### 3.3. Étude de l'inactivation de *Cic* dans les cultures $O4^+$ : *in vitro*

Pour mettre en place les cultures d'OPCs, j'ai injecté des souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* à P5 et réalisé un tri cellulaire  $O4^+$  sur les cerveaux dissociés afin de les mettre en culture à P8. Dans le but d'étudier les conséquences intrinsèques de l'inactivation de *Cic* dans la prolifération et la différenciation cellulaire, j'ai établi des conditions de culture spécifiques (cf. matériel et méthodes). Ayant été réalisés en fin de thèse, ces résultats sont encore préliminaires et doivent être reproduits pour confirmer ou infirmer les tendances observées.

Dans les conditions de prolifération, nous avons analysé les proportions d'OPCs recombinés ( $PDGFR\alpha^+GFP^+$ ) et leur prolifération ( $PDGFR\alpha^+GFP^+EdU^+$ ) par une courte incorporation de l'analogue de thymidine EdU, dans les cultures de cellules  $O4^+$  de souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* à 3h après tri (OPC0), 2 jours (OPC2) et 4 jours en culture (OPC4) (**Figure 30A**). Après la mise en culture, nous constatons que les cultures *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* sont très similaires en condition de prolifération (**Figure 30B**). A OPC0, les proportions d'OPCs recombinés sont respectivement de 93 et 94% pour les cultures *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* (**Figure 30D**). Les proportions d'OPCs recombinés prolifératifs sont également similaires autour de 10%. Alors que le pourcentage d'OPCs recombinés reste stable à OPC2 et OPC4 dans les deux conditions, la proportion d'OPCs recombinés prolifératifs augmente jusqu'à 43% à OPC2 puis diminue jusqu'à ~35% dans les deux conditions (**Figure 30D**). Ces résultats préliminaires nous indiqueraient que les proportions d'OPCs recombinés et d'OPCs recombinés prolifératifs semblent identiques entre les cultures *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>*. Ce résultat est concordant avec l'absence d'effet sur la prolifération de l'inactivation de *Cic*, observée *in vivo*.

Dans les conditions de différenciation, les proportions d'OPCs ( $PDGFR\alpha^{High}GFP^+$ ) recombinés, d'iOLs recombinés ( $CNPase^{High}MAG^+GFP^+$ ) et de mOLs recombinés ( $CNPase^{High}MAG^+GFP$ ) dans les cultures de cellules  $O4^+$  de souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>* ont été mesurées à 1 jour (OL1), 2 jours (OL2), 3 jours (OL3) et 4 jours (OL4) de culture (**Figure 30A**). Après induction de la différenciation, nous constatons une certaine mort cellulaire habituelle de ces protocoles. Nous décrivons également la présence grandissante au cours du temps d'une population  $PDGFR\alpha^{Low}CNPase^{Low}$  recombinées qui pourrait correspondre à un intermédiaire



entre les OPCs et les iOLs tels que les COPs décrits par *Marques et al.*, [148]. Toutefois, l'absence de marqueurs spécifiques de cette population nous empêche d'affirmer cela, ainsi nous appellerons cette population les *COP-like*. Dans les deux premiers jours de la différenciation (OL1 et OL2), nous constatons que les proportions de chacun des types cellulaires sont très similaires entre les cultures *Control* et *Cic<sup>cKO</sup>*:

**Figure 30 – L'inactivation de *Cic* in vitro récapitule le phénotype décrit in vivo.** **A.** Schéma de la procédure expérimentale. **B.** Marquage par immunofluorescence des OPCs recombinaux prolifératifs (PDGFR $\alpha$ +KI67+GFP $^{+}$  ; flèches marron) chez les souris *Control* (panel haut) et *Cic*<sup>CKO</sup> (panel bas) après 4 jours de prolifération (OPC4). **C.** Marquage par immunofluorescence des OPCs recombinaux (PDGFR $\alpha$ <sup>High</sup>GFP $^{+}$  ; flèches jaunes), des COPs recombinaux (PDGFR $\alpha$ <sup>Low</sup>CNPase<sup>Low</sup>GFP $^{+}$  ; flèches grises) et des OLs recombinaux (CNPase<sup>High</sup>GFP $^{+}$  ; flèches bleues) chez les souris *Control* (panel haut) et *Cic*<sup>CKO</sup> (panel bas) après 3 jours de différenciation (OL3). Acquisition au microscope confocal (20X). Barre d'échelle : 20 $\mu$ m. **D.** Quantification de la proportion d'OPCs recombinaux et d'OPCs recombinaux prolifératifs à OPC0, OPC2 et OPC4. **E.** Quantification de la proportion d'OPCs recombinaux, de COPs recombinaux, d'iOLs recombinaux (CNPase<sup>High</sup>MAG $^{+}$ GFP $^{+}$ ) et de mOLs recombinaux (CNPase<sup>High</sup>MAG $^{+}$ GFP $^{+}$ ) à OL1, OL2, OL3 et OL4 dans les cultures O4 $^{+}$  de souris *Control* (n=3) et *Cic*<sup>CKO</sup> (n=1).

nous observons une vaste majorité d'OPCs recombinaux (~90% ; **Figure 30E**) suggérant que les cellules n'ont pas encore débuté leur différenciation à ce stade. Cependant, nous observons à OL2, dans la culture *Control*, 6,6% d'iOLs recombinaux et 11% de COPs-like recombinaux. Ces populations sont sous-représentées dans les cultures *Cic*<sup>CKO</sup> : 2,4% d'iOLs recombinaux et 8,7% de COPs-like (**Figure 30E**). Cette tendance devient plus importante dans le troisième jour de culture marquant l'écart entre les conditions. En effet, la population d'OPCs recombinaux est diminuée de moitié dans la culture *Control* par rapport aux cultures *Cic*<sup>CKO</sup>, tandis qu'à l'inverse, la population de COP-like recombinaux est deux fois plus importante et la population d'iOLs augmentée de 35% (**Figure 30E**). Enfin, au quatrième jour, les écarts entre les populations s'amenuisent : la proportion d'OPCs recombinaux des cultures *Cic*<sup>CKO</sup> ne représente plus qu'une augmentation de 33% par rapport à la culture *Control* et la population de COP une diminution de 31%. Les populations de mOLs bien que très minoritaires, sont deux fois plus importantes à OL3 et OL4 dans la culture *Control* par rapport aux cultures *Cic*<sup>CKO</sup> (**Figure 30E**).

Ces résultats, bien que préliminaires et à reproduire, confortent le défaut de différenciation des OPCs inactivés pour *Cic* mesuré *in vivo*. On retrouve à deux et trois jours de différenciation une accumulation progressive de populations oligodendrocytaires plus immatures dans les cultures *Cic*<sup>CKO</sup>, alors que les OPCs ont déjà entamés leur différenciation dans la culture *Control*. Cependant, ce retard de différenciation des cultures *Cic*<sup>CKO</sup>, semble compensé un jour suivant, présentant le même caractère transitoire que décrit *in vivo*. Ainsi, CIC modulerait de façon intrinsèque la différenciation et la maturation du lignage oligodendrocytaire. Toutefois, il n'en serait pas un effecteur primordial au vu du caractère transitoire du défaut de différenciation observé lors de son inactivation.

Après avoir décrit le phénotype associé à l'inactivation de *Cic* dans les OPCs, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires par lesquels CIC régule la différenciation des OPCs, pour cela nous avons réalisé une étude

transcriptomique et une analyse des gènes cibles de CIC dans les OPCs que nous présentée ci-après.

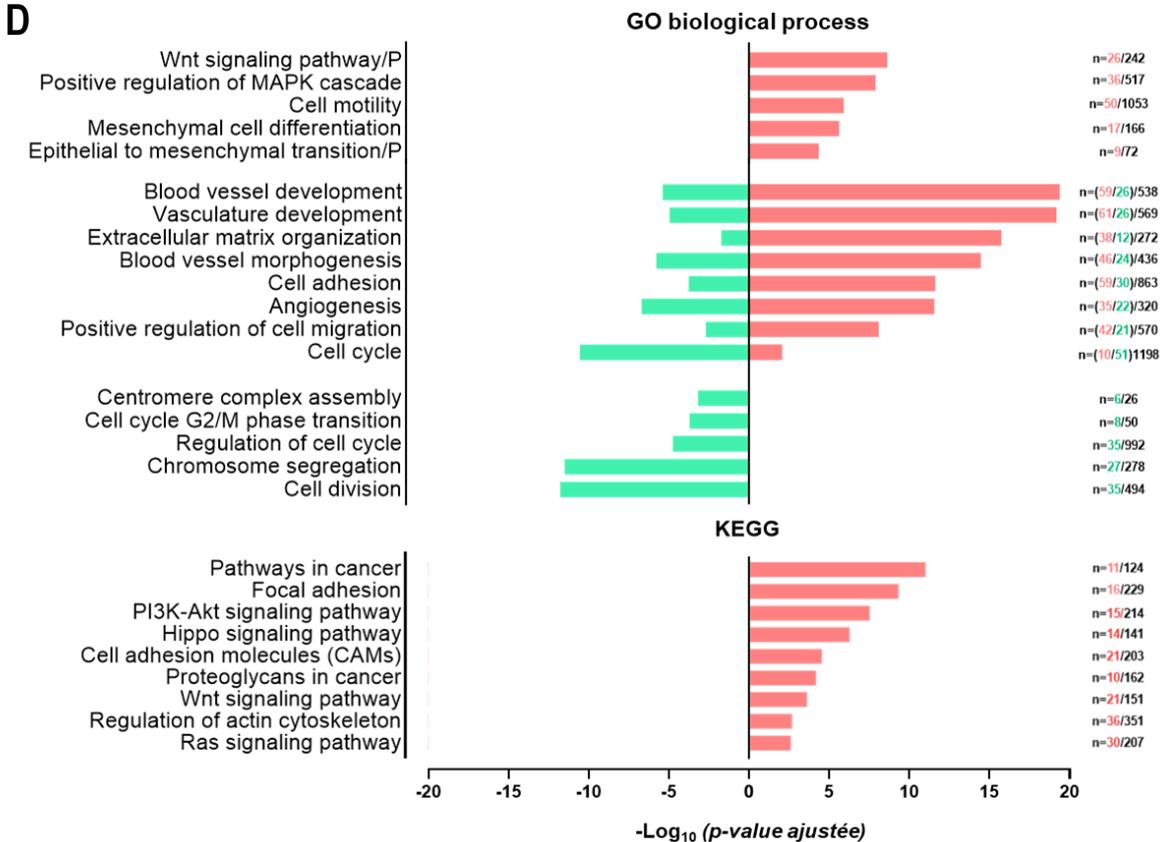
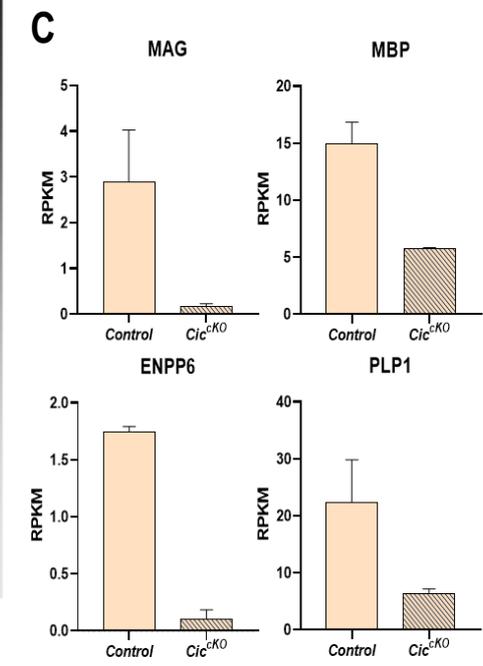
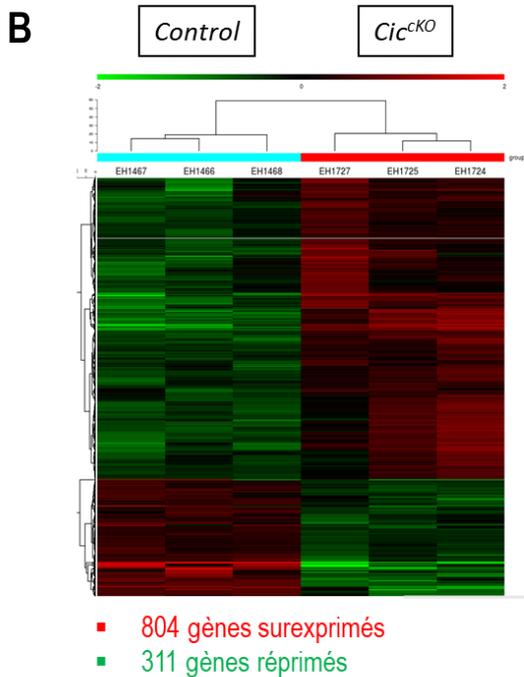
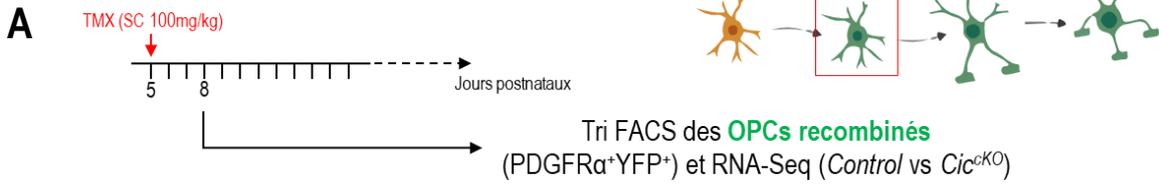
## 4. Mécanismes moléculaires de CIC dans les OPCs postnataux : une étude transcriptomique et des gènes cibles de CIC

---

Nos résultats précédents suggèrent que CIC régule la différenciation cellulaire et la maturation des OPCs. N'ayant pas observé d'effets notables de CIC dans les OPCs adultes, nous avons focalisé la suite de l'étude dans les OPCs postnataux. Pour ce faire, nous avons réalisé dans un premier temps un séquençage des transcrits (*RNA-Seq*) d'OPCs postnataux de souris *Cic<sup>CKO</sup>* et *Control* et réalisé par la suite un séquençage par immunoprécipitation de la chromatine liée par CIC (*ChIP-Seq*) en collaboration avec les Dr. Corentine Marie et Carlos Parras. L'objectif de ces deux études est de décrire respectivement les voies altérées par l'inactivation de *Cic* dans les OPCs et d'identifier les gènes cibles de CIC qui pourraient être à l'origine de ces altérations.

### 4.1. Voies altérées dans les OPCs inactivés pour *Cic*

Le *RNA-Seq* est une méthode permettant d'évaluer l'abondance des transcrits d'une cellule à un temps donné, révélant les programmes cellulaires actifs de cette dernière. Nous avons ainsi souhaité décrire les voies cellulaires altérées dans les OPCs après inactivation du gène *Cic*. Pour ce faire, nous avons réalisé l'inactivation de *Cic* à P5 et réalisé un tri cellulaire par cytométrie en flux P8 pour isoler les OPCs recombinés corticaux (*PDGFR $\alpha$* <sup>+</sup>*YFP*<sup>+</sup>) chez trois souris *Control* et trois souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Dans les OPCs de souris *Cic<sup>CKO</sup>*, nous observons en premier lieu une vaste majorité de gènes induits (804 gènes) contre une minorité de gènes réprimés (311 gènes). Ce résultat est cohérent avec le rôle de répresseur décrit de CIC. Parmi les gènes réprimés, on retrouve notamment une diminution des marqueurs de la différenciation et de la maturation du lignage oligodendrocytaire, en accord avec notre phénotype immature des OPCs inactivés pour *Cic*. En effet, on retrouve une diminution de l'expression de *Mag*, *Mbp*, *Plp1* et *Enpp6* (**Figure 31C**). Les analyses d'enrichissement ont révélé parmi les gènes différentiellement exprimés, trois grands processus cellulaires dans les OPCs de souris *Cic<sup>CKO</sup>* : un enrichissement de l'angiogenèse et de la migration cellulaire, l'activation de voies de signalisation et notamment de la voie Wnt et enfin une répression des gènes du cycle.



légende sur la page suivante

**Figure 31 – L'inactivation de *Cic* induit l'expression de la voie Wnt, la migration cellulaire et le développement vasculaire.** **A.** Schéma de la procédure expérimentale. **B.** Carte thermique des gènes différentiellement exprimés dans les OPCs recombinaux des souris *Cic<sup>CKO</sup>* (n=3 par groupe) **C.** Expression de marqueurs de la différenciation oligodendrocytaire en RPKM (Log2FC ≥ 1.5; Unadjusted P-Value ≤ 0.05). **D.** Analyses d'enrichissement de signatures dans les OPCs recombinaux des souris *Cic<sup>CKO</sup>* d'après les bases de données Gene Ontology (GO) et KEGG exprimées en  $-\log_{10}$  de la p-value associée. Les nombres de gènes enrichis pour chaque signature est indiqué à droite de la figure (rouge=enrichis dans les OPCs *Cic<sup>CKO</sup>*; vert=enrichis dans les OPCs Control).

#### 4.1.1 Une diminution de l'expression des gènes du cycle cellulaire

Hormis les gènes de la maturation oligodendrocytaire, un grand nombre des gènes réprimés dans les OPCs inactivés pour *Cic*, sont des gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Nos analyses d'enrichissement des signatures des bases de données *GO* (*biological process*) et *KEGG* ont permis de mettre en évidence un enrichissement négatif de signatures associées notamment aux phases G2/M et en particulier à la ségrégation des chromosomes (**Figure 31D**). On retrouve notamment une diminution de l'expression des gènes *Ccna1*, *Ccna2*, *Ccnb2* codant respectivement les Cyclines A1, A2 et B2, des gènes cibles décrits de CIC [169]. Cette répression des gènes du cycle est cohérente avec notre absence de prolifération observée *in vivo* voire une tendance à la diminution de cette dernière dans les OPCs des souris *Cic<sup>CKO</sup>* dans la fimbria à P32. Ces résultats nous confirment l'absence d'une régulation de la prolifération par CIC dans les OPCs.

#### 4.1.2 Un enrichissement de voies de signalisation associées au cancer

Nos analyses d'enrichissement révèlent également un fort enrichissement de signatures associées à la prolifération et la migratoire cellulaire ainsi qu'à la tumorigenèse (**Figure 31D**). On observe notamment dans les OPCs inactivés pour *Cic*, un enrichissement des voies Wnt, PI3K-Akt, Hippo et RAS/MAPK. CIC étant un répresseur des effecteurs de la voie des MAP kinases [160] [205], il était logique d'observer une dérégulation de cette voie associée à son inactivation. A l'inverse, le rôle de la voie Hippo n'est pas décrit dans les OPCs. Cependant, l'activation de cette voie connue pour moduler la taille des organes est associée, tout comme la voie PI3K-Akt, au développement de cancer [206]. De plus, l'expression de YAP1, un effecteur de la voie surexprimé dans nos OPCs de souris *Cic<sup>CKO</sup>*, est associée à un mauvais pronostic dans les gliomes de bas grade [207].

Enfin, on observe une surexpression de la voie Wnt particulièrement intéressante au vu de notre phénotype d'altération de la différenciation. En effet, la voie Wnt est décrite pour réprimer la différenciation des OPCs dans le développement embryonnaire, postnatal et dans la remyélinisation [125], [126], [208], [209]. L'activation de la voie Wnt réprime l'expression de *Olig2* et de *Mbp* via le complexe  $\beta$ -

caténine/TCF7L2, une inhibition bloquée par compétition de liaison des HDAC1 et 2 avec TCF7L2 [209]. Plus encore, la surexpression de TCF7L2, dans un modèle murin présentant une suractivation de la voie Wnt (*Olig2cre/DA-Cat*), promeut l'expression de marqueurs d'OPCs comme PDGFR $\alpha$  dans la moelle épinière [125]. Le gène *Tcf7l2* est surexprimé dans les OPCs inactivés pour *Cic*, il pourrait ainsi être un candidat potentiel du phénotype d'altération de la différenciation décrit *in vivo*. De plus, ce dernier est inhibé par interaction avec les HDAC1 et 2, des histones désacétylases connues pour interagir avec CIC [162]. A l'inverse AXIN2, un inhibiteur de la voie Wnt, entraîne une diminution du nombre des mOLs et un défaut de myélinisation *in vivo* et *in vitro* [126]. Son expression témoignant de l'activité de la voie Wnt est retrouvée de manière plus importante dans les OPCs de souris *Cic<sup>CKO</sup>* prouvant de nouveau l'activation de la voie Wnt dans ces cellules. On retrouve également une surexpression des gènes codant des ligands de la voie : *Wnt6*, *Wnt5a*, *Wnt4* et *Wnt2b*. l'expression de WNT6 dans les glioblastomes est notamment associée à une prolifération, une migration et une résistance thérapeutique plus importante, constituant un facteur indépendant de mauvais pronostic [210]. Ainsi, l'inactivation de *Cic* dans les OPCs entraîne l'activation de voies de signalisation associées au cancer ainsi que de la voie Wnt, connue pour réprimer la différenciation des OLs pouvant constituer le mécanisme par lequel CIC régule la différenciation des OPCs.

#### 4.1.3 *Un enrichissement de l'angiogenèse et de la migration*

Le dernier processus cellulaire altéré dans les OPCs inactivés pour *Cic* concerne la migration cellulaire et l'angiogenèse. On retrouve dans la base de données GO, un enrichissement de signatures associées à la migration, la motilité cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse. Au niveau des gènes, on retrouve une surexpression de *Cxcl12*, un gène codant une chimiokine décrite en introduction comme impliquée dans la migration des OPCs [123]. En effet, les OPCs migrent le long des vaisseaux sanguins par liaison au ligand CXCL12 exprimé par les cellules endothéliales grâce à leur récepteur CXCR4 ; ce dernier étant surexprimé par l'activation de la voie Wnt [106], [120], [123]. La suractivation de cette voie dans les OPCs de souris *Cic<sup>CKO</sup>* permettrait ainsi le maintien du stade OPC et un profil plus migratoire de ces cellules.

De manière intrigante, parmi toutes ces voies décrites, les voies les plus enrichies dans les OPCs inactivés pour *Cic* concernent le développement vasculaire, le remodelage matriciel et l'angiogenèse. Des gènes codant des métalloprotéases comme *Mmp19*, *Mmp23*, *Mmp28* ou encore *Adamts7*, *Adamts12* et *Adamts14* sont surexprimés dans les OPCs de souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Ce potentiel remodelage matriciel semble aller de pair avec une migration plus importante de ces OPCs. Parmi les gènes impliqués dans le développement vasculaire, on retrouve une surexpression de *Tbx18*,

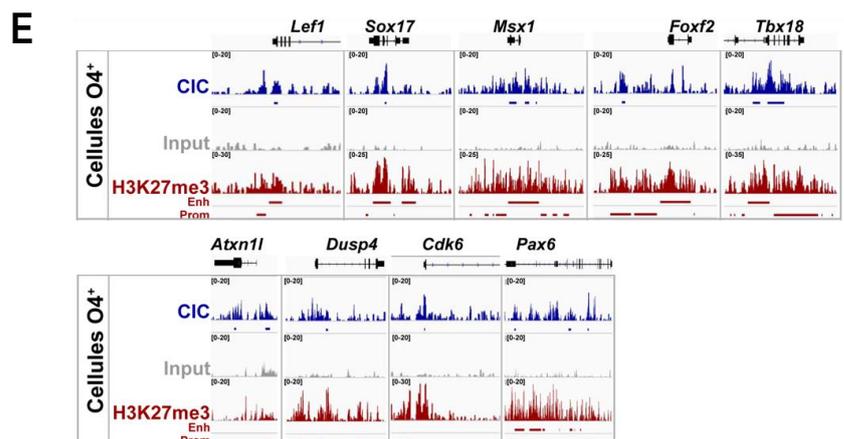
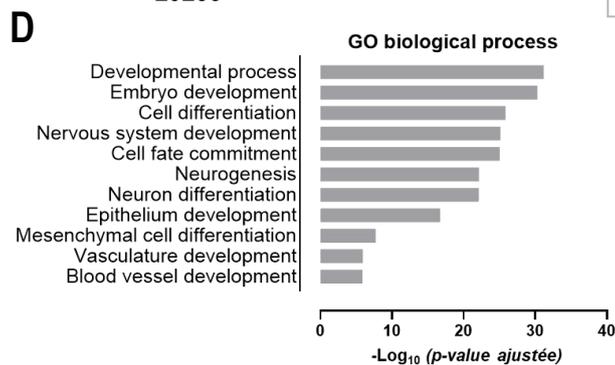
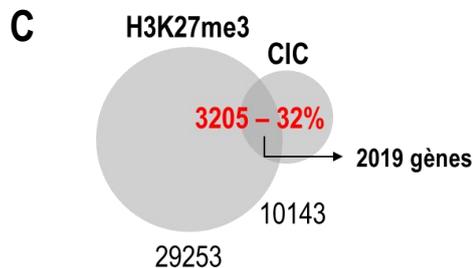
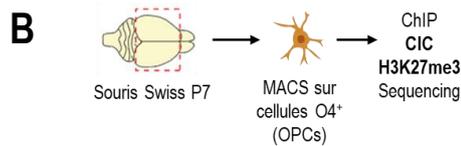
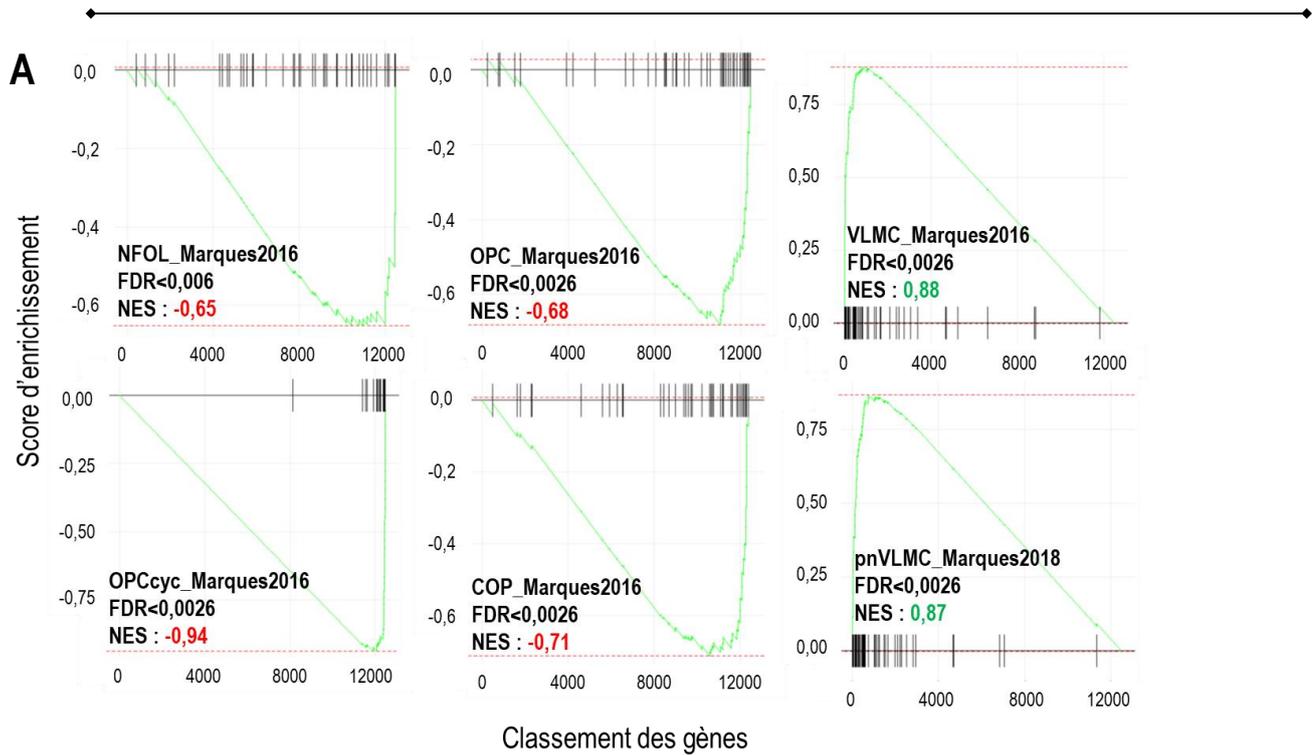
*Msx1*, *Foxf2* ou encore *Lef1*, effecteur bien connu de la voie Wnt, également impliqué dans la différenciation des cellules endothéliales cérébrales [211].

L'enrichissement de marqueurs vasculaires dans les OPCs inactivés pour *Cic* nous conduit à émettre à ce stade plusieurs hypothèses : (i) les péricytes, cellules murales entourant les cellules endothéliales notamment des capillaires, sont des cellules exprimant le marqueur PDGFR $\alpha$  et pouvant être recombinaisons dans le modèle *Pdgfra* ::*creERT* ; *Rosa26*<sup>LSL-YFP</sup> décrit par *Kang et al.*, [105] à hauteur de 1,5% des cellules recombinaisons chez l'adulte ; la surexpression de gènes vasculaires serait ainsi associée à une conséquence d'une inactivation minoritaire de *Cic* dans les péricytes. (ii) l'inactivation de *Cic* dans les OPCs pourrait entraîner l'acquisition d'un phénotype vasculaire par l'expression de marqueurs péricytaire et endothéliaux dans ces cellules, enfin (iii) les OPCs inactivés pour *Cic* interagiraient de manière paracrine avec les vaisseaux pour promouvoir l'angiogenèse. En effet, une étude décrit un rôle des OPCs dans le maintien de l'intégrité de la BHE par la sécrétion de TGF- $\beta$  modulant son épaisseur [212]. En condition de lésion de la matière blanche, la sécrétion d'IL-1 induit l'expression de MMP9 dans les OPCs conduisant à une angiogenèse et une ouverture de la BHE [213], [214].

Les analyses et expériences décrites par la suite auront pour objectif d'étayer l'une ou l'autre des deux premières hypothèses. Dans un premier temps, nous avons pu valider l'enrichissement significatif par analyse GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) de trois différentes signatures de populations vasculaires dans les OPCs inactivés pour *Cic* (**Figure 32A**). De plus, conformément à la diminution de l'expression des marqueurs de la différenciation oligodendrocytaire dans ces cellules, nous décrivons un enrichissement négatif des signatures COP et NFOL définies dans l'article de *Marques et al.*, de 2016, correspondant à des OPCs en différenciation et à des iOLs. Nous constatons également dans ces cellules un enrichissement négatif de signature OPCs. Cela pourrait signifier soit que les OPCs inactivés pour *Cic* perdent leur identité oligodendrocytaire au profit d'un phénotype vasculaire, soit que la population de cellules vasculaires est plus importante dans la population PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>YFP<sup>+</sup> triée après l'inactivation de *Cic* entraînant une contamination transcriptomique. En effet, les cellules périvasculaires comme les péricytes expriment le marqueur PDGFR $\alpha$  [122], [148]

#### 4.2. *CIC se lie à de gènes vasculaires dans les OPCs*

Afin d'identifier les gènes à l'origine des altérations de la différenciation et des voies de signalisation induites par l'inactivation de *Cic*, mais également d'explorer les hypothèses d'un rôle vasculaire, nous avons souhaité étudier les gènes cibles de CIC dans les OPCs (**Figure 32**). Pour éviter une potentielle contamination



légende sur la page suivante

de péricytes en utilisant le marqueur PDGFR $\alpha$ , nous avons réalisé à l'aide de nos collaborateurs les Dr. Marie et Parras, une expérience de ChIP-Seq à P7 sur des OPCs enrichis après un tri magnétique, réalisé grâce au marqueur O4<sup>+</sup>. Pour cette étude, nous nous sommes focalisés sur les gènes liés par CIC associés à une marque

**Figure 32 – CIC se lie à des gènes impliqués dans le développement neural et vasculaire dans les OPCs.** **A.** Enrichissement de signatures oligodendrocytaires et vasculaires dans les OPCs inactivés pour *Cic*<sup>CKO</sup> ; NES=Normalized Enrichement Score ; FDR=Adjusted p-value. **B.** Schéma de la procédure expérimentale. **C.** Intersection des pics obtenus après séquençage pour les ChIP effectués avec la marque répressive H3K27me3 et CIC et nombre de gènes correspondants. **D.** Analyse GO (biological process) des gènes liés par CIC et associés à des marques de répression (2019 gènes). **E.** Pics de liaison de CIC associée à la marque répressive H3K27me3 pour les gènes *Lef1*, *Sox17*, *Msx1*, *Foxf2*, *Tbx18*, *Atxn1l*, *Dusp4*, *Cdk6* et *Pax6*.

de répression (H3K27me3) pour décrire plus fidèlement les mécanismes moléculaires de ce répresseur transcriptionnel dans les OPCs. On observe une association de 32% (**Figure 32C**) des pics liés par CIC avec la marque répressive H3K27me3 correspondant à un total de 2019 gènes.

L'analyse de la base de données GO (*biological process*) réalisée sur ce groupe de 2019 gènes, révèle des rôles connus de CIC dans le développement embryonnaire, la différenciation et la spécification cellulaire (**Figure 32D**). Comme on pouvait s'y attendre au vu du phénotype de l'inactivation de *Cic* sur la différenciation, nous retrouvons dans les gènes liés par CIC dans les OPCs, des voies concernant le développement du système nerveux, la neurogenèse et la différenciation neuronale et oligodendrocytaire (**Figure 32D**). Nous retrouvons notamment une liaison aux gènes *Itpr2*, *Nkx2-1*, *Otp*, *Pax6*, *Neurog1* et *Neurog2*. Des liaisons de CIC dans les OPCs sont observées à ses gènes cibles connus *Dusp4* et *Cdk6* ainsi qu'à son partenaire *Atxn1l*. Nous ne retrouvons pas cependant de liaisons aux gènes *ETV1*, *4* et *5*, gènes cibles majeurs de CIC décrits en introduction.

De manière surprenante, l'analyse d'enrichissement des gènes cibles de CIC dans les OPCs met en évidence des signatures telles que le développement épithélial, la différenciation des cellules mésenchymateuses ainsi que le développement des vaisseaux sanguins. En effet, nous retrouvons une liaison de CIC dans les régions promotrices des gènes *Lef1*, *Msx1*, *Foxf2* et *Tbx18* (**Figure 32E**), que nous avons précédemment décrits comme surexprimés dans les OPCs inactivés pour *Cic*. Ces résultats démontrent la liaison de CIC, associée à la marque répressive H3K27me3, à des gènes associés au développement vasculaire dans les OPCs. Son inactivation entraînerait la surexpression de ces derniers et l'enrichissement d'une signature vasculaire dans les OPCs, confortant la deuxième hypothèse.

## 5. *L'hypothèse d'un phénotype vasculaire induit par l'inactivation de Cic dans les OPCs*

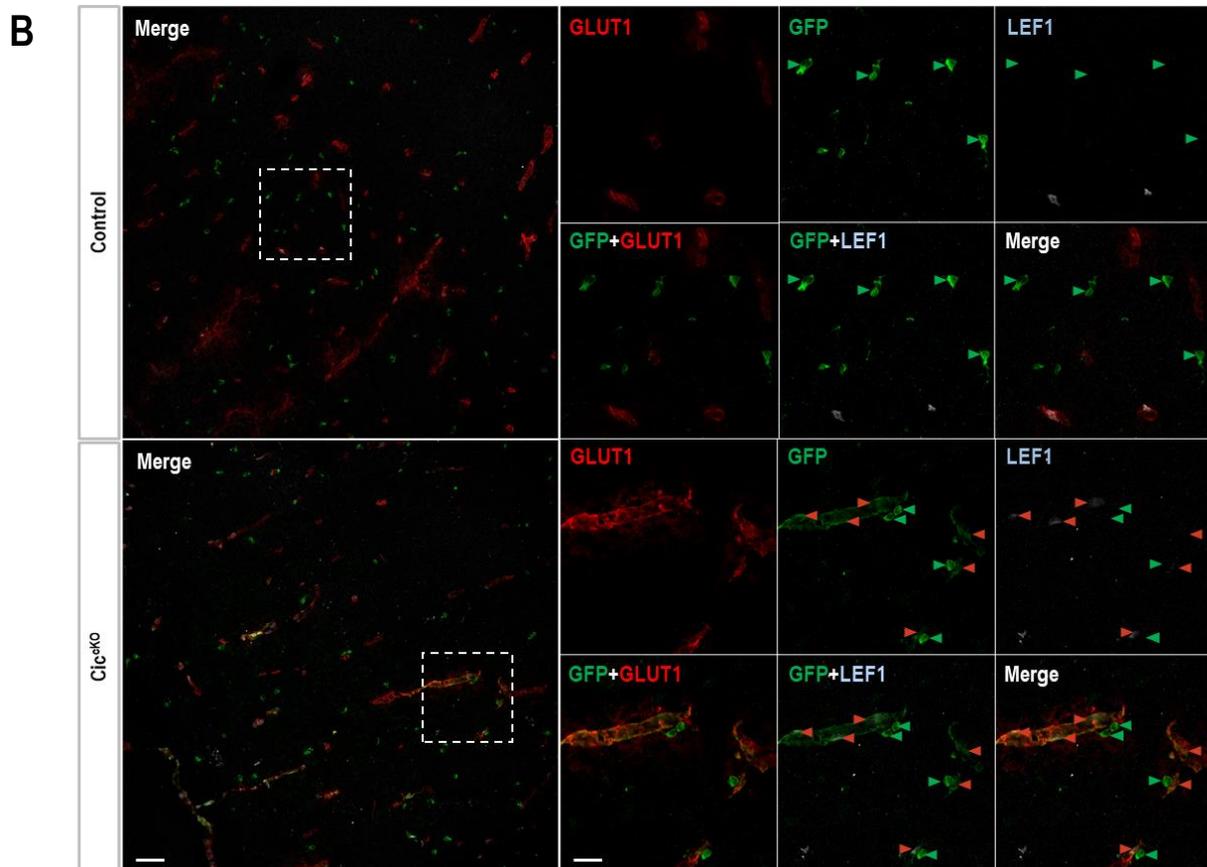
---

Les analyses transcriptomiques des OPCs de souris *Cic<sup>CKO</sup>* ainsi que l'étude des gènes cibles potentiels de CIC suggèrent la présence d'un phénotype vasculaire, au niveau moléculaire. Afin de valider au niveau histologique l'acquisition d'un tel phénotype par les OPCs inactivés pour *Cic*, j'ai souhaité savoir s'il était possible de détecter des cellules oligodendrogiales exprimant des marqueurs vasculaires dans notre modèle *Cic<sup>CKO</sup>*.

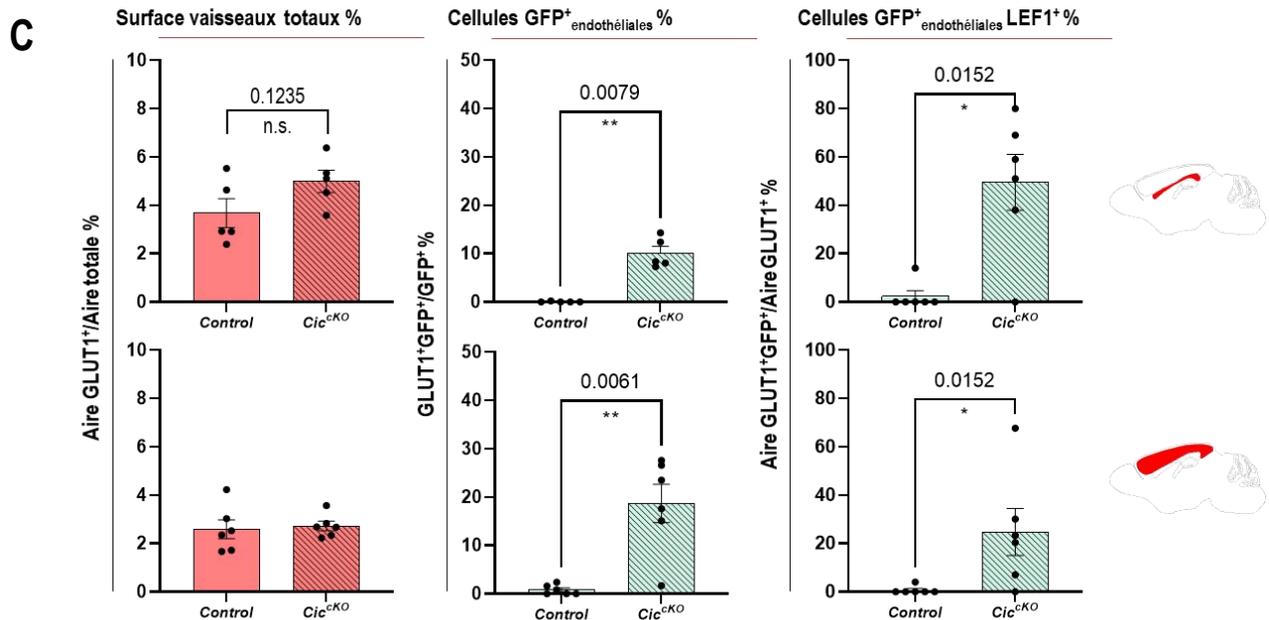
### 5.1. *Présence d'un phénotype vasculaire des cellules recombinaées dans les souris Cic<sup>CKO</sup>*

Dans un premier temps, j'ai réalisé sur les coupes de notre modèle *Cic<sup>CKO</sup>* à P8, un marquage par immunofluorescence des cellules endothéliales et des cellules recombinaées du lignage oligodendrocytaire. J'ai quantifié dans les souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>*, le nombre de cellules endothéliales et la surface des vaisseaux sanguins qu'elles constituent, grâce au marqueur GLUT1, dans le cortex et le corps calleux. De même, j'ai cherché à identifier dans les cellules recombinaées (GFP<sup>+</sup>), des cellules exprimant le marqueur GLUT1 et une morphologie pouvant être assimilée à celle d'une cellule endothéliale. Enfin, nous avons également réalisé un marquage LEF1 afin de valider la surexpression de cet effecteur de la voie Wnt, impliqué dans le développement des cellules endothéliales, dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Les résultats sont présentés en **Figure 33**.

De manière surprenante, dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*, j'observe la présence de cellules recombinaées positives pour le marqueur GLUT1 (GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub>) alors que ces cellules ne sont pas détectées dans les souris *Control* (**Figure 33B et C**). Ces cellules présentent un marquage GFP plus faible que les cellules recombinaées GLUT1<sup>-</sup> (GFP<sup>+</sup><sub>oligo</sub>) mais bien distinct du bruit de fond. De plus, les marquages GFP et GLUT1 de ces cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> se superposent de manière importante (**Figure 33B**), permettant d'exclure la possibilité de cellules GFP<sup>+</sup><sub>oligo</sub> qui se situeraient au-dessus ou en dessous de cellules endothéliales. Cela laisse supposer que ces cellules sont confondues à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Ces cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub>, lorsqu'elles sont retrouvées dans un vaisseau, tapissent tout ce dernier. Nous n'avons pas retrouvé de vaisseaux présentant un marquage GFP discontinu ne recouvrant pas l'entièreté du marquage GLUT1. De plus, il semblerait que ces cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> soient distribuées de manière homogène et indépendante du diamètre du vaisseau.



▶  $GFP^{oligo+}$ : cellules recombines GLUT1 négatives  
 ▶  $GFP^{endo+}$ : cellules recombines GLUT1 positives



légende sur la page suivante

**Figure 33 – Détection de cellules recombinaées présentant un phénotype vasculaire dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*.** **A.** Schéma de la procédure expérimentale. **B.** Marquage par immunofluorescence des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (GLUT1<sup>+</sup>), des cellules recombinaées (GFP<sup>+</sup>) et des cellules endothéliales recombinaées (GLUT1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> ; GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> : flèches vertes) ainsi que du marqueur LEF1 chez les souris *Control* (panel haut) et *Cic<sup>CKO</sup>* (panel bas) dans le cortex à P8. Acquisition au microscope confocal (20X). Barre d'échelle : 60µm (Zoom : 30µm). **C.** Quantification de la surface de vaisseaux totaux, de la proportion de cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub>, de la surface de vaisseaux recombinaés et du pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> exprimant LEF1 dans le corps calleux et le cortex. (Welch t-test (+SEM)).

Dans le cortex et le corps calleux des souris *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>*, la densité de surface des vaisseaux totaux est identique, bien qu'une tendance à l'augmentation de cette densité dans le corps calleux des souris *Cic<sup>CKO</sup>* est observée. Comme décrit précédemment, la présence de cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> est observée quasiment exclusivement dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Elles représentent 10% des cellules recombinaées dans le corps calleux et cette proportion monte à 20% en moyenne dans le cortex (**Figure 33C**). Dans le corps calleux et le cortex, l'expression de LEF1 est uniquement retrouvée dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ainsi, on retrouve en moyenne 50% de cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> exprimant LEF1 dans le corps calleux des souris *Cic<sup>CKO</sup>* et de 22% en moyenne pour le cortex (**Figure 33C**). Cette présence exclusive de LEF1 dans les cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> des souris *Cic<sup>CKO</sup>* confirme la surexpression de cet effecteur de la voie Wnt dans notre analyse *RNA-Seq* et indiquerait la présence de cellules vasculaires dans notre analyse transcriptomique. Dans les souris *Control*, un échantillon présente un pourcentage de 14% de cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> LEF1<sup>+</sup> dans le cortex et de 4% dans le corps calleux. Cela est dû à un artéfact de pourcentage non représentatif causé par une unique cellule GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> LEF1<sup>+</sup> ayant été retrouvée dans ces structures.

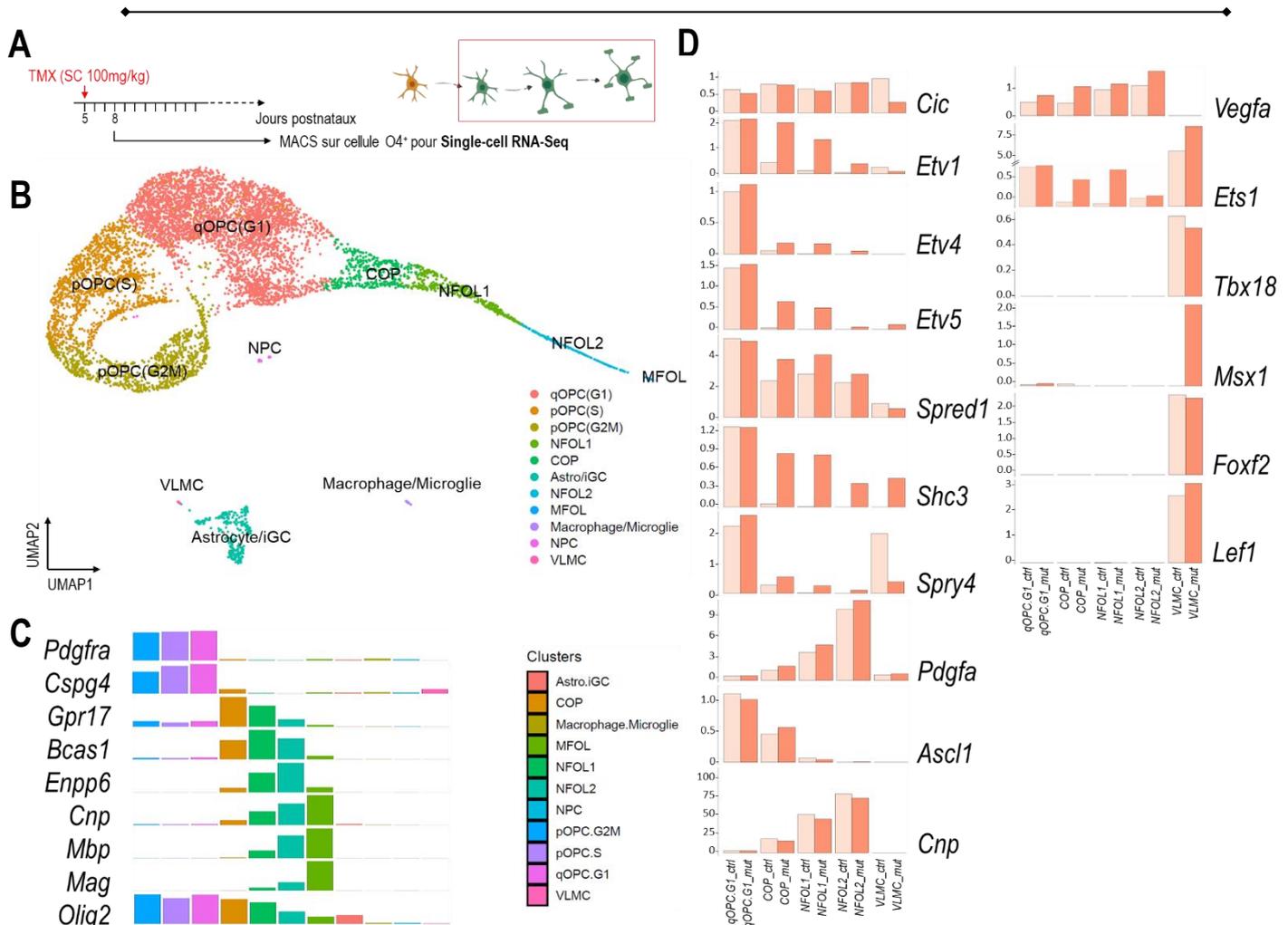
Ces résultats nous confirment *in vivo* l'expression, associée à l'inactivation de *Cic*, de marqueurs vasculaires ainsi que la présence d'un phénotype endothélial pour 10 à 20% des cellules recombinaées. Cependant, ces observations seules ne nous permettent pas d'affirmer que ces cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> sont issues (i) de la prolifération de cellules vasculaires ayant été recombinaées, ou bien (ii) d'OPCs recombinaés ayant acquis un phénotype vasculaire. Pour apporter d'autres éléments de réponses à cette question vasculaire, nous avons réalisé un *Single-cell RNA-Seq* afin d'attribuer l'expression des marqueurs vasculaires associée à l'inactivation de *Cic*, à une population spécifique.

## 5.2. Identification des populations d'origine du phénotype vasculaire

Cette analyse *Single-cell RNA-Seq* a été réalisée en collaboration avec Scipio, une entreprise qui développe une méthode alternative à la micro-fluidique pour la séparation à l'échelle de la cellule unique des échantillons (matériel et méthodes). Nous avons réalisé cette étude sur des cellules O4<sup>+</sup> triées par MACS à P8 après induction au tamoxifène à P5 chez une souris *Control* et une souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Après séquençage et obtention de la matrice des transcrits, les données ont été prétraitées comme décrit dans la partie matériel et méthodes. Nous avons pu obtenir un total de 3096 cellules pour l'échantillon *Control* et de 4194 cellules pour l'échantillon *Cic<sup>CKO</sup>*. Le clustering, présenté en **Figure 34**, a été réalisé à l'aide du package Seuratv3 sur R et validé par des données proches de notre système expérimental, issues des articles de *Marques et al.*, de 2016 et 2018. Ces résultats constituent mes derniers travaux de thèse et sont préliminaires, nous resterons prudents sur l'interprétation de ces données.

Tout d'abord, nous constatons que la vaste majorité des cellules après un tri O4<sup>+</sup> correspondent à des OPCs (clusters qOPC(G1), pOPC(S), pOPC(G2/M)) pour près de 82,1%. Les clusters OPCs se distinguent par leur expression importante des gènes *Pdgfra* et *Cspg4* (**Figure 34C**). Ces clusters se différencient entre eux notamment par l'expression de marqueurs du cycle cellulaire. On retrouve 34% d'OPCs prolifératifs différant par leur phase du cycle cellulaire (clusters pOPC(S) ; 20,1% et pOPC (G2M) ; 13,9%). Le cluster pOPC(S) exprime des marqueurs de la phase S de réplication comme les gènes *Lig1*, *Mcm2* à *6*, *Pcna*, *Brca2* et *Ccnd2*. Le cluster pOPC (G2M) exprime des marqueurs des phases G2 et de la mitose comme *Cenpf*, *Cenpe*, *Top2a*, *Ccnb1* et *Ccna2*. Enfin, le cluster d'OPC le plus important (76% des OPCs), constitue un cluster d'OPCs non prolifératifs exprimant des marqueurs associés au trafic vésiculaire (*Rph3a*, *Epn2*), au métabolisme (*C1ql1*, *Xylt1*) et à la migration (*Pcdh15*, *Dpysl3*). Il est également le cluster qui exprime le plus fortement les marqueurs OPCs (*Pdgfra*, *Cspg4*, *Olig1*). Nous constatons sur la projection UMAP que les clusters OPCs forment un continuum circulaire témoignant de la possibilité pour les OPCs de passer d'un cluster à l'autre et donc de sortir ou d'entrer dans le cycle cellulaire.

À l'opposé des clusters d'OPCs prolifératifs, on retrouve un cluster de COPs constituant 4,4% des cellules, en continuité du cluster d'OPC quiescent. Ce cluster d'OPC engagé dans la différenciation exprime les gènes *Gpr17*, *Bcas1*, *Tns3* et *Enpp6*, des marqueurs de la différenciation oligodendrocytaire. Nous retrouvons également 7,7% d'OLs immatures regroupés dans les clusters NFOL1 et NFOL2 commençant à exprimer à des niveaux importants les gènes *Cnp* et *Mbp*. Enfin, nous identifions également un cluster MFOL correspondant à un cluster d'OLs myélinisants



**Figure 34 – L’inactivation de *Cic* induit l’expression de ces gènes cibles dans les oligodendrocytes immatures et l’induction de marqueurs vasculaires dans les péricytes. A.** Schéma de la procédure expérimentale. **B.** Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) des cellules après MACS O4<sup>+</sup> à P7. **C.** Expression des marqueurs du lignage oligodendrocytaire dans les différents clusters. **D.** Expression par moyenne de transcrits des gènes cibles de *Cic*, de gènes oligodendrocytaires et vasculaires dans les clusters qOPC(G1), COP, NFOL1, NFOL2 et VLNC dans les cellules O4<sup>+</sup> Control (*ctrl*) et *Cic*<sup>CKO</sup> (*mut*).

(0.5% des cellules) exprimant des gènes codant des protéines constitutives de la myéline comme *Mbp*, *Mag*, *Plp1* et *Mog*. Sur la projection UMAP (**Figure 34B**), nous pouvons remarquer que les différents clusters oligodendrocytaires sont continus, révélant une progression développementale et un continuum transcriptomique.

Au-delà des clusters oligodendrocytaires, nous retrouvons divers clusters minoritaires non spécifiques : un cluster d’astrocytes et de progéniteurs gliaux (cluster Astro/iGC ; 4%) exprimant *Gja1*, *Aqp4* et *Gfap* ; un cluster contenant des macrophages et des cellules microgliales (Macrophages/microglie ; 0.4%) exprimant *Csf1r*, *Cx3cr1* et *Tmem119* ; un cluster contenant des progéniteurs neuraux (NPC ; 0.3%) exprimant *Dlx1*, *Tubb3* et *Sox11* et enfin, un cluster de cellules vasculaires (VLNC ; 0,2%) exprimant *Tbx18*, *Msx1*, *Vtn*, *Lef1* et *Kdr*.

Afin d'identifier la population cellulaire responsable de l'expression des marqueurs vasculaires après inactivation de *Cic*, nous avons réalisé une analyse différentielle d'expression dans les différents clusters des cellules *Control* et *Cic<sup>CKO</sup>*. Les clusters pour lesquels l'inactivation de *Cic* a entraîné un différentiel d'expression sont les clusters COP, NFOL1, NFOL2 et VLMC. Ce résultat n'est pas étonnant au vu des phénotypes décrits *in vivo* d'immaturité du lignage oligodendrocytaire et l'expression de marqueurs vasculaires. On ne retrouve que très peu de gènes différentiellement exprimés dans les clusters OPCs et les clusters minoritaires. Parmi les gènes différentiellement exprimés dans les clusters COP, NFOL1, NFOL2 et VLMC, on retrouve une surexpression significative des gènes cibles de CIC dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>* : les gènes *Etv1*, *Etv4*, *Etv5*, *Spred1*, *Shc3* et *Spry4* (**Figure 34D**). Ce premier résultat nous permet de confirmer que la protéine CIC est inactive dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>* de ces clusters. Nous n'observons cependant pas d'induction d'effecteurs de la voie Wnt dans ces clusters, dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>*. Au niveau des gènes oligodendrocytaires, nous ne retrouvons pas de diminution des marqueurs de différenciation du *RNA-Seq*, à savoir, *Mag*, *Enpp6*, *Mbp* et *Plp1*. Néanmoins, nous notons une diminution de l'expression du marqueur de différenciation *Cnp* et une augmentation de l'expression de *Pdgfra* et de *Ascl1* dans les clusters COP, NFOL1 et NFOL2 (**Figure 34D**), ce qui est cohérent avec une maintenance du stade OPC induit par l'inactivation de *Cic*. Ces résultats préliminaires semblent confirmer le phénotype d'altération de la différenciation des OPCs inactivés pour *Cic in vivo* et *in vitro*.

De plus, l'expression des marqueurs vasculaires dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>* décrits dans le *RNA-Seq* serait potentiellement due à une population vasculaire appartenant au cluster VLMC (**Figure 34D**). En effet, la surexpression de *Msx1* et *Lef1* dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>* est associée au cluster VLMC, ce qui conforte les observations réalisées *in vivo* de surexpression de LEF1 dans les cellules *GFP<sup>+</sup>endo*. Cependant, les gènes *Foxf2* et *Tbx18* ne sont pas surexprimés dans cette analyse *Single-cell RNA-Seq*, on retrouve même une diminution de l'expression de *Tbx18* dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>*. Ces résultats préliminaires semblent nous indiquer que l'expression du programme transcriptionnel associé à la vascularisation dans notre *RNA-Seq* est probablement le fruit d'une contamination par des cellules vasculaires. Toutefois, nous retrouvons une surexpression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, les gènes *Vegfa* et *Ets1*, dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>* des clusters qOPCs(G1), COP, NFOL1 et 2.

Notre analyse *Single-cell RNA-Seq* nous permet donc d'identifier trois populations cellulaires exprimant des gènes associés à la vascularisation suite à l'inactivation de *Cic* : les OPCs engagés dans la différenciation, les iOLs ainsi que les VLMC. Ce résultat pourrait renforcer l'hypothèse d'un phénotype vasculaire induit par l'inactivation de *Cic* dans les OPCs (ii), mais le fait que les VLMC aussi expriment ces marqueurs vasculaires favorise plutôt la troisième hypothèse d'OPCs gardant leur identité oligodendrocytaire mais induisant un programme pro-angiogénique (iii).

## 6. *Vers une compréhension du développement des oligodendrogliomes : une analyse de l'impact des mutations CIC*

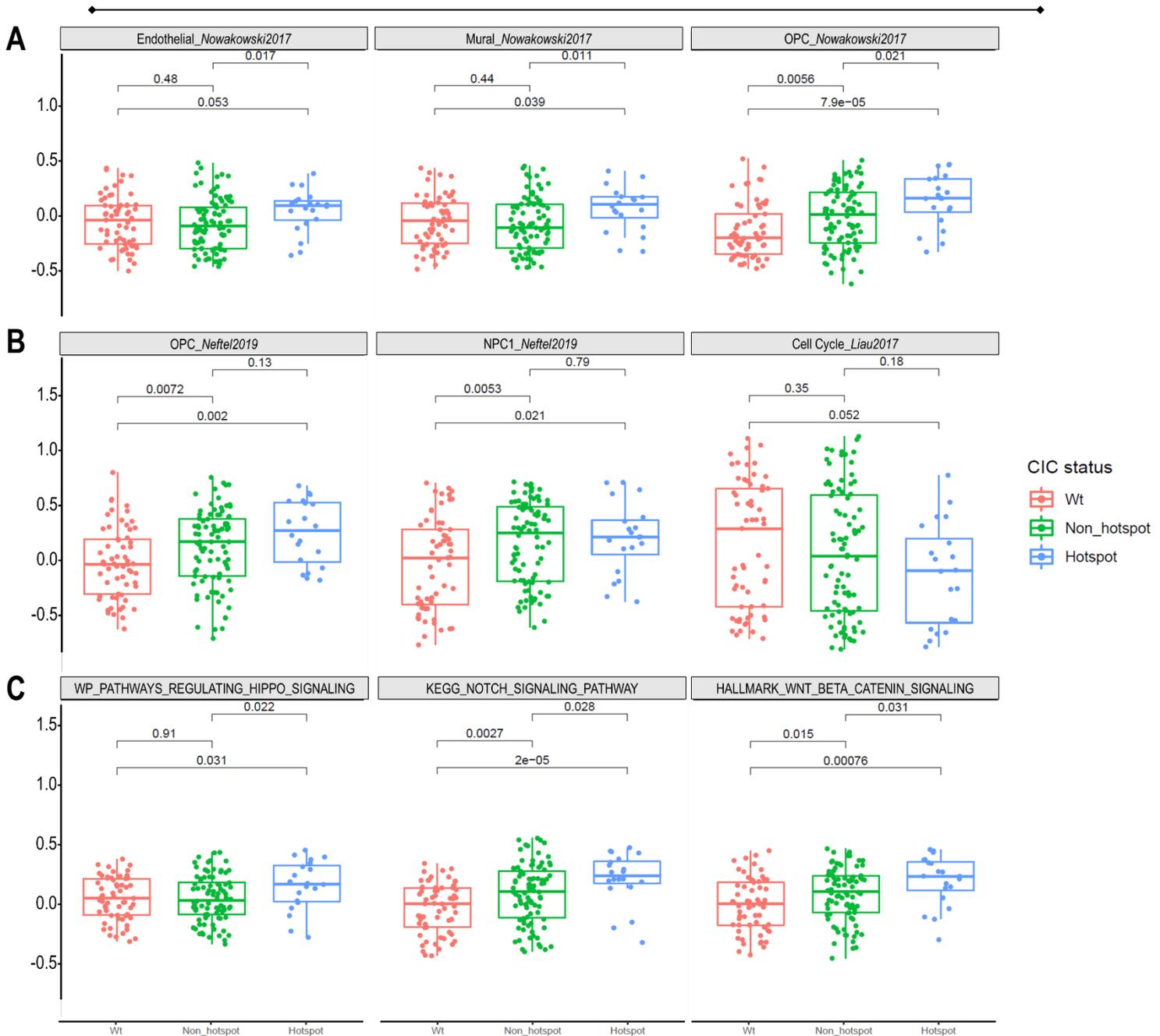
---

Pour apporter une conclusion à ces travaux et déterminer la pertinence chez l'Homme des phénotypes observés chez la souris suite à l'inactivation de *Cic*, nous avons réalisé une analyse des ODGs de différentes cohortes : pour tenter de (i) valider l'enrichissement des signatures décrites dans nos analyses transcriptomiques dans les ODGs mutés pour *CIC* et de déterminer (ii) l'impact du pronostic de ces phénotypes associés aux mutations du gène *CIC* sur la survie des patients atteints d'ODGs.

### 6.1. *Enrichissement d'une signature vasculaire, d'OPC et de la voie Wnt dans les oligodendrogliomes mutés pour CIC*

Afin de mettre en évidence l'enrichissement de signatures OPCs, vasculaires et de la voie Wnt dans les ODGs mutés pour *CIC*, nous avons réalisé avec d'Isaias Hernandez, doctorant en bio-informatique de l'équipe, une analyse d'enrichissement de signatures dans les ODGs du TCGA. Pour ce faire, nous avons divisé les ODGs du TCGA en trois groupes : (i) un groupe d'oligodendrogliomes ne présentant pas de mutations du gène *CIC* (wild-type), (ii) un groupe d'ODGs présentant les mutations les plus fréquentes impactant les domaines HMG et C1 du gène *CIC* (hotspot) et enfin (iii) un groupe d'ODGs présentant les autres mutations du gène *CIC*.

Comme on peut le constater sur les diagrammes en boîtes de la **Figure 35**, les différentes mutations de *CIC* sont associées à un enrichissement particulier des signatures étudiées : les mutations hotspot présentent systématiquement les enrichissements les plus significatifs, tandis que le groupe des mutations non-hotspot constitue un niveau intermédiaire avec le groupe wild-type. Comme chez la souris, les mutations du gène *CIC* sont corrélées à un enrichissement des signatures d'OPCs, de cellules endothéliales et de péricytes (cellules murales) (**Figure 35A**). Parmi les gènes enrichis dans les groupes d'ODGs mutés pour *CIC*, nous observons pour la signature *OPC\_Nowakowski2017*, la surexpression des gènes *PDGFRA*, *OLIG1*, *CSPG4*, *OLIG2* et une diminution de l'expression du gène *BCAS1*. Pour les signatures endothéliales et murales, nous confirmons la surexpression de *LEF1*, et décrivons celle de *DUSP6* et *SPRY4*, gènes cibles connus de *CIC*, dans les groupes d'ODGs mutés pour *CIC*. Ces données confirment l'association de l'inactivation de *CIC* à un programme vasculaire et un enrichissement en OPC dans les ODGs mutés pour *CIC*, cohérents avec les données *in vivo* et transcriptomiques de notre modèle *Cic<sup>CKO</sup>*.



**Figure 35 – Les altérations associées par l'inactivation de *Cic* chez la souris sont retrouvées dans les oligodendroglomes mutés pour *CIC*.** A-C. Diagrammes en boîte présentant l'expression de score GSVA de signatures OPCs, endothéliales et péricytaire (murales) issues de *Nowakowski et al.*, 2017 (A), de signatures OPC, NPC et du cycle cellulaire, issues de *Neftel et al.*, 2019 et *Liau et al.*, 2017 (B) et de signatures des voies Hippo, Notch et Wnt issues des bases de données KEGG et *EnrichR* (C) dans les groupes wild-type (n=61), non-hotspot (n=88) et hotspot (n=20).

De plus, nous observons également, dans les ODGs mutés pour *CIC*, l'enrichissement des voies de signalisation Wnt et Hippo, reflétant les altérations transcriptomiques décrites dans le modèle *Cic*<sup>KO</sup> (**Figure 35B**). Dans les ODGs mutants, nous retrouvons, pour la voie Wnt, la surexpression des gènes *TCF7L2*, *WNT5B*, *AXIN1* ou encore *WNT6* et la surexpression des gènes *TEAD2* à *TEAD4* pour

la voie Hippo. TCF7L2 étant un important inhibiteur de la différenciation oligodendrocytaire, il pourrait expliquer l'enrichissement des signatures OPCs observé dans les ODGs mutants. Au-delà des voies que nous avons déjà pu décrire dans notre modèle, nous observons également l'enrichissement d'une signature de la voie Notch et notamment des gènes codant ses effecteurs : *HES1*, *HES5* et *HEY1* ; ainsi que ses ligands : *DLL1*, *DLL3* et *DLL4* (**Figure 35B**). Ces analyses d'enrichissement de signatures dans les ODGs humains nous ont permis de révéler la pertinence des phénotypes observés dans notre modèle murin. Dans les ODGs, comme chez la souris, les mutations inactivatrices de *CIC* sont associées à l'activation des voies Wnt, Hippo ainsi que Notch, cette dernière étant seulement retrouvée dans les ODGs humains mutés pour *CIC*. De plus, l'inactivation de *CIC* est également corrélée à une expression plus importante d'un profil OPC des oligodendrogliomes qui se reflète par une augmentation transitoire d'OPCs exprimant des gènes associés à la migration et au développement vasculaire chez la souris. Ces mécanismes n'induisent pas le développement de lésions tumorales dans notre modèle *Cic<sup>CKO</sup>*. Toutefois, ces mécanismes pourraient permettre, dans le contexte tumoral des oligodendrogliomes, une progression tumorale par les voies de l'angiogenèse et l'accumulation d'OPCs, cellules d'origine de ces tumeurs. Afin d'étudier l'impact de ces mécanismes associés à l'inactivation de *CIC* dans les ODGs, nous avons réalisé une étude de l'impact des mutations du gène *CIC* dans la survie des patients atteints d'oligodendrogliomes.

## 6.2. *Les mutations du gène CIC ne sont pas un facteur indépendant associé à la survie des patients*

Les données de la littérature quant à l'impact des mutations du gène *CIC* dans la survie des patients atteints d'oligodendrogliomes sont controversées. L'article princeps de mon projet de thèse de Gleize *et al.*, [13], publié par l'équipe, décrit dans une analyse multivariée (âge, mutation du gène *CIC* et grade de la tumeur) les mutations du gène *CIC* comme un facteur pronostic indépendant associé à une survie globale défavorable ( $p$ -value $<0.016$ ) dans la cohorte nationale POLA et Onconeurotek (tumorothèque de la Pitié Salpêtrière). Ils décrivent également dans une analyse univariée des oligodendrogliomes du TCGA, les mutations de *CIC* comme facteur pronostic défavorable, mais le résultat est tout juste significatif ( $p$ -value $<0.048$ ). Une autre étude de Zhang *et al.*, [201] a mis en évidence une association des mutations du gène *CIC* avec une meilleure survie globale en analyse multivariée sur la cohorte du TCGA ( $p$ -value $<0.0362$ ).

Afin d'apporter une réponse à l'impact pronostic des mutations du gène *CIC*, nous avons réalisé une analyse multivariée (intégrant les mutations des gènes *IDH1/2*, la co-délétion 1p/19q et l'âge des patients) de l'association des mutations du gène et de l'expression de *CIC* à la survie globale des patients atteints d'ODGs des

cohortes du TCGA, du réseau POLA et de la tumorothèque du *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (Glioma MSKCC) (**Table 6**).

Cohorte	Impact pronostic des mutations <i>CIC</i>	Impact pronostic de l'expression de <i>CIC</i>
LGG-IDHmut-Codel (TCGA) ; n=169 (108 tumeurs mutées pour <i>CIC</i> vs 61 tumeurs wild-type)	Pas d'association à la survie (p-value=0,81)	Pas d'association à la survie (p=0,18 ; Log-rank Test)
LGG-IDH1/2mut-Codel (POLA) ; n=303 (172 tumeurs mutées pour <i>CIC</i> vs 131 tumeurs wild-type)	Pas d'association à la survie (p-value=0,61)	/
LGG-IDH1/2mut-Codel (Glioma MSKCC) ; n=121 (87 tumeurs mutées pour <i>CIC</i> vs 34 tumeurs wild-type)	Pronostic défavorable pour la survie globale (p-value=0,0412)	/

**Table 6 – Les mutations du gène *CIC* ne sont que faiblement associées à la survie globale.**

Analyse statistique multivariée (mutations IDH1/2, co-délétion 1p/19q, âge) par test Log-rank de l'impact pronostic indépendant des mutations du gène *CIC* ou de l'expression de la protéine *CIC* sur la survie globale dans les cohortes du TCGA, du réseau POLA, et du MSKCC.

Comme on peut l'observer sur la **Table 6**, dans deux des trois cohortes, nous observons que ni les mutations ni l'expression de *CIC* ne constituent un facteur pronostic indépendant pour la survie globale des patients atteints d'ODGs. Seule la cohorte du MSKCC montre une association pronostique défavorable des mutations du gène *CIC* (p-value=0.0412). Cependant, cette cohorte est celle qui contient le moins de patients. La cohorte la plus puissante statistiquement est celle du réseau POLA qui présente des groupes équilibrés et décrit une absence d'association des mutations du gène *CIC* à la survie globale. Une conclusion prudente de cette analyse serait que les mutations du gène *CIC* ne sont pas associées à la survie globale chez les patients atteints d'ODGs. Autrement dit, les altérations transcriptomiques et histologiques induites par l'inactivation de *CIC* dans les oligodendrogliomes mutés pour *CIC* distinguent ce sous-groupe de tumeurs, mais n'auraient pas d'incidence sur le développement de ces tumeurs et donc d'impact sur la survie globale des patients.



# Discussion & perspectives

---

L'objectif principal de ces travaux de thèse a été de caractériser spécifiquement les fonctions méconnues du facteur de transcription CIC dans un type cellulaire constituant une des origines cellulaires des oligodendrogliomes : les progéniteurs d'oligodendrocytes. Nous avons pu présenter dans la première partie des résultats le profil d'expression de CIC dans le lignage oligodendrocytaire : une expression faible dans les OPCs qui augmente au cours de la maturation du lignage oligodendrocytaire. Ceci nous a conduits à émettre l'hypothèse d'un rôle de CIC dans la différenciation et la maturation du lignage que nous avons voulu mettre en évidence par la caractérisation du modèle *Cic<sup>CKO</sup>* permettant l'inactivation spécifique du gène *Cic* dans les OPCs. Après une validation du modèle, nous avons mis en évidence à différents stades et dans plusieurs structures, un délai de différenciation dans les OPCs inactivés pour *Cic* ainsi qu'un défaut de maturation des OLs résultants. L'analyse transcriptomique que nous avons conduite pour révéler les mécanismes expliquant ce phénotype, nous ont permis de mettre en évidence une surexpression de la voie Wnt, de gènes associés à la migration ainsi que des gènes associés au développement vasculaire. Pour comprendre le lien entre ces altérations et une potentielle régulation par CIC, nous avons entrepris d'identifier les gènes cibles de CIC dans les OPCs. Nous avons révélé, en plus de certains gènes cibles connus, des gènes associés au développement oligodendrocytaire mais également des gènes vasculaires. Ces résultats nous ont ramené à l'étude des coupes histologiques à la recherche d'un phénotype vasculaire des cellules inactivées pour *Cic*. Le marquage des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins a révélé la présence de cellules recombinaisons au phénotype endothélial dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Dès lors, nous pouvions émettre l'hypothèse de (i) l'acquisition d'un phénotype endothélial par des OPCs après inactivation de *Cic*, (ii) de la recombinaison minoritaire d'une population vasculaire ou bien (iii) de l'induction d'un programme pro-angiogénique des OPCs induit par l'inactivation de *Cic*. Nous avons conduit une analyse *Single-cell RNA-Seq* pour identifier la population à l'origine de l'expression de ces marqueurs vasculaires. Cette analyse nous a révélé que plusieurs populations expriment ces gènes associés à la vascularisation : une population vasculaire (VLMC) mais également des populations d'OPCs engagés dans la différenciation ainsi qu'une population d'iOLs. Enfin, nous avons cherché à resituer ces phénotypes observés chez la souris dans le contexte des ODGs de patients. Nous avons ainsi conduit une analyse d'enrichissement des signatures découvertes dans notre modèle *Cic<sup>CKO</sup>*, dans les ODGs. Nous avons pu mettre en évidence l'enrichissement de ces signatures dans les tumeurs mutées pour *CIC*. Pour comprendre l'impact de tels enrichissements dans le développement des tumeurs, nous avons réalisé une étude d'association des altérations du gène *CIC* avec

## *Discussion & perspectives*

la survie globale des patients. Les analyses ont révélé que les mutations du gène *CIC* n'ont que peu d'impact sur la survie des patients, bien qu'elles induisent un profil transcriptomique unique dans les oligodendrogliomes mutés.

Au cours de cette discussion, nous confronterons les résultats produits lors de ces quatre ans de thèse aux données de la littérature afin d'en détailler les forces et limites. Nous nous appliquerons à détailler l'apport de ces travaux de recherche en les resituant notamment sur la question du développement des oligodendrogliomes. Nous détaillerons également les interprétations des résultats présentés ainsi que les interprétations alternatives potentielles et les perspectives à conduire pour la suite de ces travaux.

## 1. *CIC régule la différenciation et la maturation des oligodendrocytes*

---

Notre analyse de l'expression de CIC dans le lignage oligodendrocytaire montre une augmentation au cours de la différenciation et de la maturation du lignage. L'étude de *Ahmad et al.*, [179], publiée pendant ma thèse, présente également par immunofluorescence, une expression de CIC plus importante dans les OLs (CNPase<sup>+</sup>) que dans les OPCs (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>). Dans notre analyse, l'expression de CIC dans les OLs est maximale autour de P14 et diminue après P32, montrant une dynamique corrélée à la période de différenciation active des OLs [92], [93]. Ce profil d'expression nous a conduits à émettre l'hypothèse d'un rôle de CIC dans la différenciation et la maturation du lignage. Ainsi, nous avons décidé d'induire l'inactivation de *Cic* à P5, en amont de cette période de développement active pour en étudier les conséquences dans les stades ultérieurs.

### 1.1. *Un délai de différenciation induit par l'inactivation de Cic*

Notre étude *in vivo* montre qu'à P8, la majorité des cellules recombinaées dans les structures étudiées sont encore des OPCs (~92% de cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) dans notre modèle *Cic*<sup>CKO</sup>. Nous n'avons décrit aucune différence de proportion des populations du lignage oligodendrocytaire à ce stade encore peu différencié. Ces données sont cohérentes avec la faible expression de CIC dans ces cellules.

Le stade suivant P14 constitue un stade intermédiaire auquel on retrouve dans le corps calleux une différenciation importante avec des proportions d'OPCs et d'OLs constituant respectivement ~35% et ~60% des cellules recombinaées. Nous avons décrit dans cette structure à ce stade, une augmentation de 20% de la proportion d'OPCs des souris *Cic*<sup>CKO</sup>, corrélée à une diminution de la proportion d'OLs du même ordre. Ce phénotype d'altération de la différenciation n'est pas observé dans les OPCs du cortex et de la fimbria probablement parce que ces cellules n'ont pas encore entamé leur différenciation à ce stade comme le montre leur représentation parmi les cellules recombinaées (respectivement ~80 et 65% de cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>). Toutefois, nous avons décrit dans le cortex une augmentation de la proportion d'OPCs chez les souris *Cic*<sup>CKO</sup> sans pouvoir la corrélérer à une diminution de la proportion d'OLs au même stade. De plus, l'augmentation de cette proportion d'OPCs n'est pas due à une augmentation de la prolifération. Nos résultats démontrent que les proportions d'OPCs et d'OLs représentent la quasi-totalité des cellules recombinaées. Cela signifie que cette augmentation d'OPC corticaux chez les souris *Cic*<sup>CKO</sup> doit pouvoir être corrélée à une diminution de la proportion d'OLs. Cependant, le fait que les marquages OPCs et OLs n'aient pas été réalisés sur les mêmes coupes ne permet pas d'obtenir des pourcentages se recoupant parfaitement. Ainsi parce que

cette augmentation de la proportion d'OPCs des souris *Cic<sup>CKO</sup>* dans le cortex est faible par rapport à celle observée dans le corps calleux (10% vs 17%), elle n'est pas forcément retrouvée dans le marquage oligodendrocytaire.

Enfin, le dernier stade P32 constitue un stade plus mature dans lequel la plupart des OPCs des structures de la matière blanche se sont différenciés. Dans le corps calleux, l'augmentation de la proportion d'OPCs à P14 dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>* ne constitue à ce stade plus qu'une tendance. Cela démontre le caractère transitoire de ce phénotype d'altération de la différenciation des OPCs. La fimbria présente à présent une augmentation significative de la proportion d'OPCs chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>*. En effet, c'est à ce stade que la plupart des OPCs de la fimbria se sont différenciés (~20% de cellules PDGFR $\alpha$ +GFP<sup>+</sup>), permettant d'observer un potentiel effet de l'inactivation de *Cic* sur la différenciation de ces cellules. Cependant, le fait que l'on ne retrouve pas de diminution de la proportion d'OLs associée à ce stade, peut être encore une fois, dû à la faiblesse de l'augmentation (13%). L'absence de stades d'études postérieurs ne nous permet pas d'affirmer si cette augmentation persiste avec le temps. Il est probable qu'elle se dilue avec le temps comme cela est observé pour le corps calleux. Nos données de notre modèle de culture cellules O4<sup>+</sup>, bien que préliminaires, montrent également un défaut transitoire de la différenciation des OPCs.

Ces données sur un phénotype d'altération de la différenciation induit par l'inactivation de *Cic* ont pu être confirmées au laboratoire dans un autre modèle d'inactivation conditionnel de *Cic* dans les cellules OLIG2<sup>+</sup> (modèle présenté en annexe 2). Nous observons dans ce modèle une augmentation de la proportion d'OPC à P14 dans les corps calleux, la capsule externe et la commissure antérieure.

Quant aux données de la littérature, deux articles récents présentent des résultats similaires aux nôtres dans des modèles d'études différents. Le premier article de *Yang et al.*, montre *in vitro* que les lignées de NSCs inactivées pour *Cic* sont capables de proliférer indépendamment de présence EGF et présentent des défauts de différenciation les arrêtant au stade OPC [171]. Le deuxième article de *Ahmad et al.*, illustre *in vitro* un biais vers le lignage oligodendrocytaire de NSCs inactivées pour *Cic* induites à différencier [179]. En effet, seul ~20% de NSCs inactivées pour *Cic* se différencient en neurones TUJ1<sup>+</sup> contre ~70% pour les NSCs contrôles. À l'inverse, lorsque ces NSCs sont induites à se différencier en oligodendrocytes, on retrouve ~75% de NSCs inactivées pour *Cic* différenciés en OPC PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> contre 40% pour les NSCs contrôles [179]. Toutefois, ces OPCs inactivés pour *Cic* sont également arrêtés à ce stade comme le montre la quantité quasiment nulle de mOLs (MBP<sup>+</sup>) inactivés pour *Cic* par rapport aux mOLs contrôles (~10%). Ces données confirment le défaut de différenciation des OPCs induit par l'inactivation de *Cic*, confirmant l'importance de ce répresseur transcriptionnel dans le développement du lignage oligodendrocytaire.

Au-delà du phénotype de différenciation, nous avons également constaté un défaut de maturation des OLs inactivés pour *Cic*. Nos résultats, confirmés par les deux combinaisons de marqueurs (OLIG1<sup>High</sup>CC1<sup>+</sup> et OPALIN<sup>+</sup>CC1<sup>+</sup>), montrent une augmentation de la proportion des iOLs dans les souris *Cic*<sup>CKO</sup> suggérant une altération de la maturation des OLs dans le cortex et la fimbria. *In vitro*, nous observons une légère diminution des proportions de mOLs recombinaison confortant les résultats obtenus *in vivo*. Ce défaut de maturation a également été observé par *Ahmad et al.*, présentant une diminution de la densité du marquage MBP dans les souris *Foxg1-cre ; Cic*<sup>flox/flox</sup> [179].

## 1.2. *La voie Wnt, potentiel candidat de la régulation par CIC de la différenciation*

Au niveau moléculaire, les données de notre *RNA-Seq* nous indiquent une diminution de l'expression des marqueurs oligodendrocytaires *Mag*, *Enpp6*, *Mbp* et *Plp1* dans les OPCs de souris *Cic*<sup>CKO</sup>. Ces altérations d'expression de gènes oligodendrocytaires sont également décrites par *Yang et al.* : dans leur modèle de culture de NSCs inactivées pour *Cic*, ils observent une diminution de l'expression des gènes *Enpp6*, *Plp1*, *Mag* et *Myrf* [171], confirmant nos données. Nous avons également décrit dans les OPCs de souris *Cic*<sup>CKO</sup>, un enrichissement de transcrits de la voie Wnt et notamment de TCF7L2, effecteur de la voie connu pour inhiber la différenciation oligodendrocytaire [125], [209]. Les données de *ChIP-Seq* nous révèlent une liaison de CIC dans les OPCs, associée à la marque répressive H3K27me3, aux promoteurs des gènes *Itp2*, *Nkx2-1* et *Pax6* impliqués dans la différenciation ainsi qu'au promoteur de *Lef1*, effecteur de la voie Wnt. Enfin, nous observons dans notre *Single-cell RNA-Seq*, une augmentation de l'expression du gène *Pdgfra* et une diminution de l'expression du gène *Cnp* des clusters COP, NFOL1 et 2 des cellules *Cic*<sup>CKO</sup>. L'ensemble de ces résultats suggère que CIC pourrait réguler la différenciation des oligodendrocytes en réprimant l'expression de l'effecteur de la voie Wnt, TCF7L2. Cette répression aurait pour conséquence la levée de la répression des gènes oligodendrocytaires favorisant ainsi la différenciation et la maturation des cellules. Toutefois, cette répression de TCF7L2 par CIC serait indirecte, car aucune liaison de CIC à ce gène n'a été observée dans notre *ChIP-Seq*.

En perspective, il serait intéressant d'explorer le lien entre CIC et la voie Wnt de manière fonctionnelle. Pour confirmer que l'activation de la voie Wnt est bien à l'origine du délai de différenciation observé dans les OPCs inactivés pour *Cic*, nous pourrions utiliser *in vitro* des inhibiteurs pharmacologiques de cette voie dans des cultures O4<sup>+</sup> de souris *Cic*<sup>CKO</sup> et mesurer la différenciation des cellules par rapport à des cultures O4<sup>+</sup> de souris *Cic*<sup>CKO</sup> non traitées et des cultures O4<sup>+</sup> de souris *Control*. Des expériences de sauvetage phénotypique peuvent aussi être envisagées

notamment par infection des OPCs de cultures *Cic*<sup>CKO</sup> par des virus codant des shRNA dirigés contre TCF7L2 et LEF1, afin de valider ces effecteurs comme responsables du phénotype d'altération de la différenciation.

### 1.3. *CIC ne régule pas la prolifération dans les OPCs*

D'autre part, nous n'observons pas d'augmentation de la prolifération induite par l'inactivation de *Cic* comme décrite dans les deux études précédentes. *Yang et al.*, décrivent dans leur modèle murin d'inactivation constitutive de *Cic*, un doublement du nombre de progéniteurs neuraux OLIG2<sup>+</sup> dans les noyaux septaux latéraux, associé à une augmentation de la densité de cellules du ventricule latéral [171]. *Ahmad et al.*, démontrent une augmentation de la prolifération et de l'auto-renouvellement des NSCs *in vitro* et *in vivo* en absence de CIC [179]. Dans ces deux études, les auteurs décrivent un phénotype prolifératif dans des progéniteurs neuraux. Ces différences observées peuvent être le reflet de rôles de CIC dépendants du contexte cellulaire. En effet, *Ahmad et al.*, n'observent pas d'augmentation de la proportion d'OPCs prolifératifs (OLIG2<sup>+</sup>EdU<sup>+</sup>/OLIG2<sup>+</sup>) inactivés pour *Cic* par rapport aux OPCs contrôles, des données cohérentes avec nos résultats [179]. Ainsi, CIC ne régulerait pas la prolifération cellulaire des OPCs. Nous avons pu constater que l'expression de CIC augmentait légèrement dans le temps dans les OPCs. La capacité proliférative des OPCs diminuant avec le temps [69], [102], [103], l'augmentation dans ces cellules de l'expression d'un répresseur de la prolifération comme CIC a du sens. L'expression de CIC pourrait ainsi être corrélée à l'entrée en quiescence des OPCs.

Ces données nous suggèrent que l'état plus différencié des OPCs par rapport aux progéniteurs neuraux, ne constitue pas un contexte suffisamment permissif pour que l'inactivation seule de *Cic* induise une augmentation de la prolifération. En effet, dans des cellules différenciées, l'inactivation de *Cic* ne conduit pas forcément à la prolifération cellulaire. Le groupe d'Huda Zoghbi a notamment pu démontrer que la perte de CIC dans les cellules de Purkinje n'entraîne pas de phénotype particulier [187]. Par ailleurs, le groupe de Gerardo Jimenez montre également, *in vitro*, une absence d'augmentation de la prolifération dans des fibroblastes embryonnaires inactivés pour *Cic* en comparaison aux fibroblastes contrôles [178]. Ainsi, CIC régulerait dans les OPCs des processus de différenciation et de maturation plutôt qu'une répression de la prolifération.

Dans l'introduction, nous avons pu décrire l'hétérogénéité des OPCs et des OLs notamment en termes de prolifération et de capacité à se différencier et maturer. C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier différentes structures de la matière blanche et de la matière grise afin de mettre en évidence une hétérogénéité dans ces processus de l'inactivation de *Cic*. Cependant, nous observons les mêmes tendances concernant les phénotypes d'altérations de différenciation et de maturation

des OLs dans les structures étudiées. Toutefois, les phénotypes d'altérations de différenciation des OLs présentent des cinétiques différentes entre les structures. Pour les structures de la matière blanche, on observe une augmentation de la proportion d'OPCs au moment où les OPCs de la structure se différencient massivement, soit à P14 pour le corps calleux et P32 pour la fimbria. Pour le cortex, on observe ce phénotype alors même que la plupart des OPCs ne sont pas différenciés, démontrant des dynamiques différentes entre les structures de la matière blanche et de la matière grise. On observe également une hétérogénéité temporelle de l'inactivation de *Cic*. Lorsque *Cic* est inactivé dans les OPCs adultes, on n'observe aucun phénotype. *CIC* régulant dans les OPCs le processus hétérogène de différenciation, il est logique que sa fonction dépendante de l'hétérogénéité des structures et des stades d'études.

## 2. L'inactivation de CIC induit l'expression de marqueurs vasculaires

---

### 2.1. Rationnel des hypothèses d'un phénotype vasculaire

L'analyse transcriptomique à P8 par RNA-Seq d'OPCs recombinaés chez les souris *Cic<sup>CKO</sup>*, a permis la mise en évidence de marqueurs vasculaires. Toutefois, cette expression de marqueurs vasculaires ne pouvait pas être attribuée avec certitude aux OPCs de souris *Cic<sup>CKO</sup>* car le tri cellulaire à l'origine de l'étude a été réalisé sur des cellules PDGFR $\alpha$ +YFP<sup>+</sup>, le marqueur PDGFR $\alpha$  étant également exprimé par les péricytes, bien que dans une moindre mesure (1,5% d'après Kang *et al.*, [105]). Nous avons alors à ce stade de l'étude émis trois hypothèses : (i) l'enrichissement de marqueurs vasculaires est du fait d'une inactivation minoritaire de *Cic* dans les cellules périvasculaires, (ii) les OPCs inactivés pour *Cic* acquièrent un phénotype vasculaire ou bien (iii) les OPCs inactivés pour *Cic* préservent leur identité, mais promeuvent un programme pro-angiogénique au niveau des cellules vasculaires. Nous avons alors entrepris différentes analyses afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

### 2.2. Preuves d'une induction de marqueurs vasculaires dans les OPCs et les cellules vasculaires

Pour éviter une contamination par les péricytes dans les analyses ultérieures, nous avons utilisé le marquage O4<sup>+</sup> permettant l'enrichissement en OPCs et en oligodendrocytes. Dans l'analyse ChIP-Seq, nous n'avons pu mettre en évidence une liaison de CIC qu'à deux de ces gènes cibles : *Dusp4* et *Cdk6*. De manière surprenante, nous mettons en évidence la liaison de CIC à des gènes associés au développement vasculaire tels que *Lef1*, *Sox17*, *Msx1*, *Foxf2* ou encore *Tbx18*, dans les cellules O4<sup>+</sup> à P8. Par ailleurs, dans notre RNA-Seq sur cellules PDGFR $\alpha$ +YFP<sup>+</sup>, nous observons une augmentation des niveaux d'expression de ces gènes lorsque *Cic* est inactivé, suggérant que des gènes vasculaires pourraient être induits dans les OPCs par la perte de fonction de CIC. Ces données renforceraient l'hypothèse (ii) d'acquisition par les OPCs inactivés pour *Cic* d'un phénotype vasculaire.

Afin d'observer la présence de cellules recombinaées présentant un phénotype endothélial, nous avons réalisé un marquage des vaisseaux et des cellules recombinaées. Nous avons pu décrire la présence de cellules recombinaées GLUT1<sup>+</sup> appelées GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub>, toutes intégrées dans des vaisseaux. Ces cellules GFP<sup>+</sup><sub>endo</sub> sont les seules cellules recombinaées à exprimer LEF1, validant l'expression de ce marqueur vasculaire par des cellules endothéliales. Ces données confortent plutôt l'hypothèse (i) d'un effet d'une inactivation minoritaire de *Cic* dans les cellules vasculaires entraînant un enrichissement des marqueurs vasculaires.

Pour tenter d'identifier la population cellulaire à l'origine de l'expression de ces marqueurs vasculaires, nous avons réalisé un *Single-cell RNA-Seq* sur cellules O4<sup>+</sup> à P8. L'analyse nous indique la présence de cellules vasculaires malgré l'utilisation du marqueur O4. De plus, l'expression de *Cic* dans le cluster vasculaire (VLMC) est réduite de 65% dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>* alors qu'elle est similaire entre les cellules *Cic<sup>CKO</sup>* et *Control* dans les clusters oligodendrocytaires. Ajouté à cela, les marqueurs vasculaires décrits dans le *RNA-Seq* sont retrouvés exprimés dans le cluster vasculaire et certains d'entre eux comme *Lef1* et *Msx1* sont enrichis dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>*. Toutes ces données suggèrent que la présence des marqueurs vasculaires dans les analyses de *ChIP-Seq* et de *RNA-Seq*, est provoquée par une contamination par les cellules vasculaires allant dans le sens de la première hypothèse (i). Toutefois, l'expression de *Tbx18* et de *Foxf2*, deux autres marqueurs vasculaires retrouvés dans le cluster vasculaire, ne sont pas retrouvés enrichis dans les cellules *Cic<sup>CKO</sup>*, comme c'est le cas dans l'analyse *RNA-Seq*, voire ont une expression diminuée. Les données du *Single-cell RNA-Seq* étant préliminaires, il est difficile de conclure de manière catégorique. Mais au vu de la présence de gènes associés à la vascularisation dans des clusters oligodendrocytaires, l'hypothèse (iii) de l'induction d'un programme pro-angiogénique des OPCs inactivés pour *Cic* paraît la plus probable.

Cependant et de manière intéressante, on distingue dans les clusters COP et NFOL1-2, la surexpression de deux gènes associés au développement vasculaire : *Vegfa* et *Ets1*. En effet, le VEGFA est un facteur de croissance des cellules vasculaires permettant par liaison à son récepteur VEGFR2, l'induction de l'angiogenèse et de la perméabilité de la BHE [215], [216]. Comme nous avons pu le décrire en introduction, la mutation *IDH1<sup>R132H</sup>* est associée à une augmentation des niveaux de VEGF dans les gliomes. Nous pouvons postuler que la sécrétion de VEGF par les COPs inactivés pour *Cic* pourrait également contribuer à un développement de l'angiogenèse. Cependant, nous n'observons pas d'augmentation significative de la surface des vaisseaux sanguins dans les souris *Cic<sup>CKO</sup>*. Cela peut être dû au fait que le phénotype n'est pas encore bien établi à P8 et qu'il progressera potentiellement au cours du temps. Pour répondre à cette supposition, il serait intéressant de réaliser les marquages réalisés à P8 des cellules endothéliales et recombinaisonnées à des stades plus tardifs.

Toutefois, la seule sécrétion de VEGFA par des COPs inactivés pour *Cic* n'explique pas la présence de cellules recombinaisonnées GLUT1<sup>+</sup>. La présence de ces cellules indique soit (i) une recombinaison non spécifique dans les cellules endothéliales soit (ii) l'acquisition d'un phénotype endothélial par les OPCs. Pour la première hypothèse, à la différence des péricytes, les cellules endothéliales n'expriment pas PDGFR $\alpha$  et ne devraient pas être recombinaisonnées après injection de tamoxifène. La présence de cellules endothéliales recombinaisonnées (GFP<sup>+</sup>GLUT1<sup>+</sup>) dans

les souris *Cic<sup>ckO</sup>* pourrait être expliquée par une proximité particulièrement étroite des OPCs de ces souris à la vascularisation. Cette proximité pourrait induire un transfert de la CRE recombinase des OPCs par exocytose aux cellules endothéliales, entraînant ainsi leur recombinaison. Pour confirmer une telle hypothèse, nous pourrions évaluer les conséquences de l'inactivation de *Cic* sur la capacité sécrétoire des OPCs *in vitro*. Pour la deuxième hypothèse, la surexpression de *Ets1* dans les COPs constitue une piste intéressante, d'autant plus que ce gène n'est que très faiblement exprimé dans le lignage oligodendrocytaire [122], [148]. En effet, *Ets1* est un facteur de transcription régulant un vaste ensemble de gènes impliqués dans l'expression de gènes vasculaires, l'inflammation et le remodelage matriciel et de peptides vasoactifs [217]. L'expression de *Ets1* dans les cellules endothéliales et les péricytes est notamment induite par le VEGFA conduisant à la sécrétion de MMP2, 9 et 13 pour promouvoir l'angiogenèse [218], [219]. L'expression de ce gène dans les COP pourrait induire l'acquisition d'un phénotype vasculaire et promouvoir l'angiogenèse par sécrétion de VEGFA. Cette transition phénotypique pourrait se faire au moment de la différenciation des OPCs auquel on observe l'expression de ces marqueurs. *CIC* réprimerait ainsi l'expression d'un programme vasculaire pour permettre la différenciation oligodendrocytaire, son absence entraînerait l'expression de ce programme vasculaire au profit de la différenciation.

Pour tester cette hypothèse, nous pourrions réaliser des co-cultures d'OPCs inactivés pour *Cic* avec des vaisseaux sanguins. En effet, *in vitro* les OPCs en culture ne développent pas de phénotype vasculaire. Si l'inactivation de *Cic* induit le développement d'un phénotype vasculaire dans les OPCs, alors cet effet serait dépendant du microenvironnement et probablement dû aux vaisseaux sanguins, les cellules vasculaires et les OPCs communiquant de façon étroite via la sécrétion de facteurs angiogéniques [212]–[214]. En culture, nous serions capables de suivre le devenir cellulaire des OPCs recombinaisonnés au contact des vaisseaux sanguins, nous pourrions ainsi mesurer : (i) l'acquisition d'un phénotype vasculaire par les cellules recombinaisonnées par immunofluorescence contre des marqueurs vasculaires (PDGFR $\beta$ , GLUT1, VEGFA, ETS1) et (ii) la prolifération des cellules vasculaires pour confirmer le développement d'un programme pro-angiogénique par les OPCs inactivés pour *Cic*. Étant donné que la voie Wnt, et LEF1 en particulier, est impliquée dans le développement des cellules vasculaires [211], nous pourrions également mettre en place en culture une surexpression de LEF1 dans les OPCs afin d'observer si la voie Wnt permet l'induction d'un phénotype vasculaire. En effet, l'activation de la voie Wnt présentée dans le *RNA-Seq*, est potentiellement due à la présence de cellules vasculaires. Enfin, le *RNA-Seq* présente également un enrichissement de voies associées à la migration (points focaux d'adhésion, adhésion cellulaire, motilité cellulaire, transition épithélio-mésenchymateuse), potentiellement attribuable aux OPCs ou aux cellules vasculaires. Pour mesurer cette migration dans des conditions

proches de la physiologie, nous pourrions utiliser le système de co-culture avec des vaisseaux sanguins décrits ci-dessus et mesurer par vidéo-microscopie la migration des OPCs le long des vaisseaux. L'activation de la voie Wnt participant au développement des cellules vasculaires mais aussi des OPCs [123], [125], [211], son expression induite par l'inactivation de *Cic* est difficilement attribuable à l'un et/ou l'autre des deux types cellulaires. Pour ce faire, après inactivation de *Cic*, nous pourrions mesurer l'expression d'effecteurs de la voie Wnt comme *Lef1*,  $\beta$ -caténine et *Tcf712* sur une population de cellules vasculaires et oligodendrocytaires triées avec des marqueurs permettant leur distinction comme PDGFR $\beta$  (marqueur péricytaire) et OLIG2 (marqueur oligodendrocytaire).

### 2.3. *La régulation par CIC des gènes Etv dans le lignage oligodendrocytaire*

De nombreuses études de la littérature présentent une liaison de CIC à ces gènes, dans des cellules souches embryonnaires et NSCs murines, des cellules pulmonaires murines et des lignées humaines [159], [162], [171], [189]. Dans notre analyse *RNA-Seq*, nous n'avons pas observé d'expression des gènes cibles canoniques de CIC dans les OPCs inactivés pour *Cic*. L'augmentation de l'expression de ces gènes en et particulier des gènes *Etv* est très souvent décrite dans les modèles d'inactivation de *Cic*. Les études de *Ahmad et al.*, et de *Hwang et al.*, décrivent, en l'absence de CIC fonctionnelle, la surexpression de *Etv4* et *Etv5*, ce dernier étant notamment responsable du phénotype d'expansion des populations gliales dans l'étude de *Ahmad et al.*, [179]. L'étude de *Hwang et al.*, décrivent également l'expression de *Spred3*, *Spry4* et de *Vgf*, responsable des défauts de maturation observés des neurones NeuN<sup>+</sup> et SATB2<sup>+</sup> [180]. Cependant, *Yang et al.*, ne décrivent pas de surexpression des gènes *Etv* en particulier dans les NSCs, suite à l'inactivation constitutive de *Cic* dans leur modèle. Notre analyse transcriptomique ayant été réalisée à un stade (P8) où nous n'observons pas de phénotype d'altération de la prolifération, il n'est pas surprenant de ne pas observer une augmentation de l'expression des gènes *Etv*. De plus, l'expression de CIC étant très faible dans les OPCs, nous pouvons supposer une moindre répression de CIC et donc une faible dérégulation entraînée en condition d'inactivation de *Cic*. Il serait intéressant de réaliser une analyse transcriptomique au stade P14, après induction de l'inactivation à P5, où nous retrouvons ce phénotype d'altération de la différenciation pour observer une potentielle augmentation des gènes *Etv*. Il est aussi probable que le phénotype d'altération de la différenciation ne soit pas dépendant des gènes *Etv* et que ces derniers ne constituent pas des gènes cibles de CIC comme le suggère leur absence dans nos données *ChIP-Seq*.

Néanmoins, notre analyse en *Single-cell RNA-Seq* sur cellules O4<sup>+</sup> à P8, montre une expression importante des gènes *Etv1*, 4 et 5 ainsi que de *Spred1*, *Shc3* et *Spry4* dans les clusters COP et NFOL1-2 des cellules *Cic*<sup>CKO</sup>. Contrairement à un tri avec le marqueur PDGFR $\alpha$  permettant l'enrichissement en OPCs, un tri avec le marqueur O4 enrichit en OPCs engagés dans la différenciation et en oligodendrocytes comme nous pouvons le voir dans nos clusters obtenus. Ainsi, ces données nous indiquent que CIC régule effectivement ses gènes cibles canoniques, mais dans un contexte de différenciation que nous n'arrivons à mettre en évidence dans notre *RNA-Seq*, mais seulement dans notre *Single-cell RNA-Seq* permettant d'étudier des clusters de cellules plus définis permettant une analyse plus fine des populations cellulaires. De plus, l'expression de CIC augmentant dans le lignage oligodendrocytaire, il est attendu que les conséquences de son inactivation entraînent des altérations transcriptomiques plus importantes que dans les OPCs. En effet, un *RNA-Seq* réalisé dans notre équipe sur les cellules O4<sup>+</sup> de souris du modèle *Olig2*<sup>tvac</sup><sup>cre</sup>; *Cic*<sup>f</sup> (annexe 2), nous observons dans les cellules O4<sup>+</sup> inactivées pour *Cic* une augmentation de l'expression des gènes *Etv1*, 4, 5 et *Shc3*.

Pour potentiellement identifier les gènes *Etv* en tant que gènes cibles de CIC dans le lignage oligodendrocytaire, il serait intéressant de réaliser un *ChIP-Seq* sur cellules O4<sup>+</sup> à un stade plus tardif comme P14. A ce stade, nous aurons une proportion d'OPCs engagés dans la différenciation plus importante et donc une expression plus importante de CIC pouvant potentiellement la présence des gènes *Etv*. Il serait intéressant de réaliser également des *ChIP-PCR* sur des gènes impliqués dans la différenciation oligodendrocytaire pour détailler avec précision le mécanisme par lequel CIC induit la différenciation des OPCs. Comme expliqué dans la première partie de la discussion, *Tcf712* pourrait constituer le candidat potentiel de la voie Wnt à l'origine du mécanisme. Étudier la liaison de CIC à des gènes régulateurs de la différenciation comme *Enpp6*, *Bcas1*, *Mbp*, *Nkx2-2*, *Sox10* et *Myrf* pourrait détailler le mécanisme.

### 3. Impact des mutations *CIC* dans les oligodendrogliomes

L'impact des mutations du gène *CIC* en tant que facteur pronostic de la survie des patients atteints d'oligodendrogliomes n'est pas clairement établi. *Yip et al.*, [17] concluent en une absence d'association entre ces mutations et la survie et *Zhang et al.*, décrivent même une association de ces mutations à une survie favorable [201]. À l'inverse, d'autres études décrivent un pronostic défavorable des mutations ou de l'expression de *CIC* [220], [200] dont celle de notre laboratoire [13]. Cependant, la plupart de ces études sont réalisées en analyse univariée ne permettant pas de décrire *CIC* comme un facteur indépendant de pronostic. Cependant, ce n'est pas le cas de l'analyse de notre laboratoire et de celle de *Zhang et al.*, décrivant en analyse multivariée des résultats contradictoires. Pour apporter une réponse à cette question, nous avons réalisé une analyse multivariée dans trois cohortes indépendantes et révélé une absence d'association entre les mutations de *CIC* et la survie globale des patients. Pour la cohorte MSKCC, nous avons décrit une association des mutations *CIC* à une survie défavorable. L'ensemble de ces résultats sont révélateurs de l'hétérogénéité des oligodendrogliomes.

Dans nos analyses de signatures dans les ODGs mutés pour *CIC*, nous avons pu décrire l'enrichissement de signatures OPCs, vasculaires et de voies de signalisation récapitulant les phénotypes observés dans notre modèle murin. Les OPCs étant décrits comme une origine cellulaire de ces tumeurs, l'augmentation de la proportion de ces derniers, suite à l'inactivation de *Cic*, peut constituer un contexte permissif pour le développement des ODGs. De plus l'angiogenèse est un mécanisme commun des tumeurs permettant de détourner à leur profit les nutriments à l'origine de leur croissance. Les OPCs sont particulièrement associés aux vaisseaux sanguins sur lesquels ils migrent via l'activation de la voie Wnt [123]. L'expression par les OPCs de CXCR4 permet la liaison au ligand SDF-1 (CXCL12) exprimé par les cellules endothéliales. Une activation de la voie Wnt permet l'expression de CXCR4 favorisant la migration des OPCs [123]. L'enrichissement de cette voie dans les ODGs mutés pour *CIC* pourrait constituer le lien entre les deux phénotypes d'altération de la différenciation, de la migration et du développement de vaisseaux sanguins [125], [211]. En effet, *Griveau et al.*, décrivent dans un modèle murin de gliomes, une migration et invasion par co-option de vaisseaux sanguins de cellules OLIG2<sup>+</sup> via l'expression d'une voie-Wnt7b distincte d'une migration dépendante du VEGF des cellules tumorales OLIG2<sup>-</sup> [221]. La migration et invasion dépendantes de Wnt7b des cellules OLIG2<sup>+</sup> est résistante aux traitements anti-angiogéniques efficaces sur le VEGF [221]. Un des rôles de l'inactivation de *CIC* dans les ODGs pourrait ainsi être

de promouvoir cette migration dépendante de la voie Wnt, résistante aux traitements, de cellules *OPC-like* favorisant une angiogénèse.

Les altérations de *CIC* dans les tumeurs périphériques sont plutôt associées à une progression tumorale et à un mauvais pronostic dans les cancers du sein, du pancréas et du poumon [192], [196], [197]. L'inactivation du gène *CIC* peut également initier le développement tumoral notamment pour les lymphomes lymphoblastiques T [178], [193]. Dans les carcinomes (foie et poumon), les cancers du sein, du pancréas et du colon, l'inactivation génétique ou fonctionnelle de *CIC* induit la prolifération et l'invasion des cellules notamment par dérégulation des gènes *ETV4* et *ETV5* (**Figure 17**) [194]–[196], [222]. Dans les ODGs, les mutations du gène *CIC* ont été décrites comme sous-clonales, rendant peu probable le fait que ces altérations conduisent à l'initiation tumorale [223]. Les mutations du gène *CIC* se retrouvent également distribuées dans les ODGs de grade 2 et 3, ne permettant pas de les associer à une progression en grade [13], [223]. Toutefois, ces mutations du gène *CIC* sont associées à une récurrence plus précoce des ODGs [14] qui pourrait être provoquée par ces phénotypes d'immaturation oligodendrocytaire et d'expression de marqueurs vasculaires dans les ODGs mutés pour *CIC*. En effet, l'étude *princeps* de notre laboratoire révèle un caractère plus agressif des ODGs mutés pour *CIC*, présentant une croissance tumorale plus importante [13]. Ainsi, de manière homologue à son rôle dans les autres tumeurs et aux phénotypes observés dans notre étude de son inactivation dans les OPCs, les mutations du gène *CIC* induiraient une accumulation d'OPCs altérés pour leur différenciation et présentant un profil migratoire plus important. Les autres mutations présentes dans ces tumeurs permettraient potentiellement à cette population enrichie de proliférer également. Les mutations du gène *CIC* induiraient également l'expression de marqueurs vasculaires favorisant l'angiogénèse. Pour tester ces hypothèses, nous pourrions réaliser des cultures de cellules issues d'ODGs de patients mutés pour *CIC* et comparer leur prolifération par marquage Ki67<sup>+</sup>/EdU ainsi que leur migration en chambre de Boyden ou en co-culture avec des cellules endothéliales. Nous avons également accès au laboratoire à des coupes d'ODGs de patients mutés ou non pour *CIC* pour lesquelles nous pourrions également comparer la prolifération (Ki67<sup>+</sup>) et l'expression de marqueurs vasculaires (GLUT1 et PDGFR $\beta$ ), oligodendrocytaires (OLIG2, PDGFR $\alpha$ , CC1 et MBP), ainsi que de la voie Wnt (LEF1, TCF7L2 et  $\beta$ -caténine) afin de valider au niveau phénotypique une augmentation de la proportion d'OPCs, de marqueurs vasculaires et de l'expression de la voie Wnt dans les ODGs mutés pour *CIC*. Nous pouvons également évaluer la proximité des cellules tumorales aux vaisseaux sanguins (GLUT1<sup>+</sup>) dans les deux groupes, en identifiant les cellules tumorales grâce à un marquage à l'anticorps anti-IDH1<sup>R132H</sup> reconnaissant spécifiquement la forme mutée de l'enzyme IDH1.

Les oligodendrogliomes étant des tumeurs présentant de nombreuses altérations, la combinaison de celles-ci avec l'inactivation de *Cic* pourrait induire le développement de tumeurs. C'est notamment la piste développée au laboratoire visant à étudier la synergie des mutations *IDH1* et *CIC* dans les OPCs chez la souris. Une étude de l'évolution clonale de gliomes *IDH1*-mutés a permis de révéler que les mutations de *Cic* sont sous-clonales et non initiatrices comme les mutations *IDH1* et la co-délétion 1p/19, ce qui est cohérent avec nos résultats. L'inactivation de *Cic* consécutive à l'induction de la mutation *IDH1<sup>R132H</sup>* dans les OPCs, constituerait ainsi une perspective intéressante au développement des oligodendrogliomes. *Bardella et al.*, décrivent une augmentation de la prolifération, de l'auto-renouvellement de NSCs dans un modèle murin présentant la mutation *IDH1<sup>R132H</sup>* dans les progéniteurs neuraux (*Nes-Cre*) [89]. Ces cellules envahissent le parenchyme cérébral depuis la SVZ formant des nodules prolifératifs. Dans ce contexte, les phénotypes induits par l'inactivation de *Cic* pourraient amplifier la migration et l'invasion de ces cellules.

# Conclusion

---

CIC est un répresseur transcriptionnel modulant le développement de divers organes en réprimant la prolifération pour favoriser la différenciation des cellules. C'est pourquoi cette protéine est retrouvée inactivée par dégradation ou mutation du gène dans de nombreux cancers dont les oligodendrogliomes. Ces tumeurs cérébrales sont très proches des progéniteurs d'oligodendrocytes, population décrite comme une origine cellulaire de ces tumeurs dans différents modèles murins. Cependant, le rôle spécifique de CIC dans ces cellules d'origine était encore méconnu. Le but de ma thèse a été de caractériser les conséquences de l'inactivation de ce répresseur dans les OPCs. J'ai pu décrire l'expression croissante de CIC associée à la différenciation et la maturation du lignage oligodendrocytaire. Nous avons ensuite validé l'efficacité de l'inactivation de *Cic* dans les OPCs dans un modèle murin transgénique. En caractérisant ce modèle, j'ai pu mettre en évidence une augmentation transitoire de la proportion d'OPCs associée à une diminution de la proportion de mOLs révélant un rôle de CIC dans la différenciation des OPCs. Associée à ce défaut, nous avons observé une augmentation de la proportion d'OLs, illustrant également un rôle de CIC dans la maturation des OLs. Des analyses transcriptomiques et des gènes cibles de CIC nous ont notamment permis de mettre en évidence la surexpression de la voie Wnt, une voie inhibitrice de la différenciation des OPCs, ainsi que la surexpression de marqueurs vasculaires. Nous avons pu confirmer *in vivo* la présence de cellules recombinaisons de phénotype endothélial chez les souris mutantes. Une analyse transcriptomique à l'échelle de la cellule unique a confirmé la surexpression des marqueurs vasculaires dans une population de cellules vasculaires, mais a également révélé l'expression de ces marqueurs dans des populations oligodendrocytaires, révélant une étroite relation entre les OPCs et les cellules vasculaires, induite par l'inactivation de *Cic*. Nous avons également décrit dans les OPCs en différenciation et les iOLs la surexpression des gènes cibles de CIC et notamment les gènes *Etv* ainsi que des gènes impliqués dans la différenciation oligodendrocytaire. Pour décrire la pertinence de ces altérations dans le développement des oligodendrogliomes, nous avons réalisé une étude de l'enrichissement de signatures dans les oligodendrogliomes mutés pour *CIC* du TCGA. Nous avons pu mettre en évidence un enrichissement de signatures OPCs, endothéliales, péricytaires et de la voie Wnt validant les observations de notre modèle murin. Nous proposons ainsi que l'inactivation de *Cic* dans les oligodendrogliomes induise via l'activation de la voie Wnt, une migration plus importante d'OPCs altérés pour la différenciation le long des vaisseaux sanguins ainsi que le développement de la vascularisation permettant la progression et l'invasion tumorale. L'inactivation de *Cic* n'entraînant pas de lésions tumorales, son rôle serait plutôt associé à la progression

tumorale voire à la récurrence dans les ODGs. Des combinaisons avec d'autres altérations retrouvées dans les oligodendrogliomes pourront apporter en perspective une compréhension plus fine du développement des oligodendrogliomes.



# Annexes

---

## ANNEXE 1 : LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES

Anticorps primaires	Dilution	Références
Anti-PDGFR $\alpha$ (rat, monoclonal IgG2a)	1/300 (glycérol)	BD Pharmingen, 558774
Anti-GFP (poulet, polyclonal)	1/2000	Aves, 1020
Anti-KI67 (lapin, polyclonal)	1/500	Vector Labs, VP-RM04
Anti-OLIG1 (souris, monoclonal IgG1)	1/500 (glycérol)	NeuroMab, 75-180
Anti-CC1 (clone APC, souris, monoclonal IgG2b)	1/500 (glycérol)	Millipore, MABC200
Anti-CIC (lapin, polyclonal)	1/1000	ThermoFisher, PA1-46018
Anti-OPALIN (souris, monoclonal IgG1)	1/500 (glycérol)	SantaCruz, sc-374490
Anti-MAG (lapin, polyclonal)	1/300 (glycérol)	Cell Signaling Technology, 9043
Anti-GLUT1 (lapin, polyclonal)	1/500 (glycérol)	Millipore, 07-1401
Anti-PDGFR $\beta$ (lapin, polyclonal)	1/1000	R&D System, AF1042
Anti-LEF1 (lapin, polyclonal)	1/500 (glycérol)	Cell Signaling Technology, C12A5
Anti-OLIG2 (mouse, polyclonal)	1/250 (glycérol)	Millipore, MABN50

## ANNEXE 2 : MODELE MURIN D'INACTIVATION CONSTITUTIVE DE CIC DANS LE LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE (*OLIG2<sup>CRE</sup>* ; *Cic<sup>FL</sup>* ; *ROSA26<sup>LSL-TOMATO</sup>*)

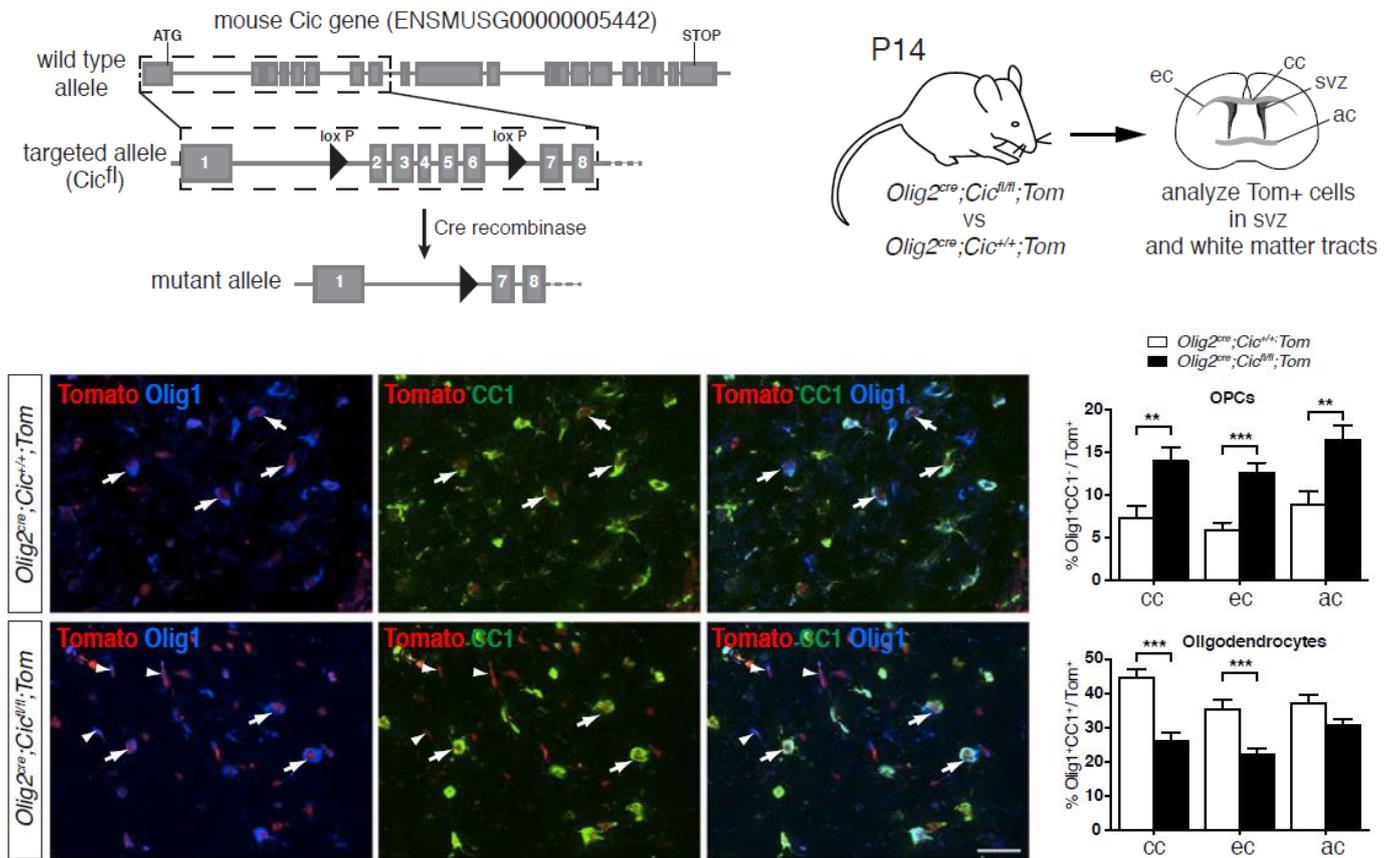


Figure S1 – L'inactivation constitutive de CIC dans le lignage oligodendrocytaire induit les mêmes défauts de différenciation que le modèle *Cic<sup>cKO</sup>*

**A.** Schéma de la stratégie utilisée pour générer les souris *Cic<sup>fl</sup>* et les allèles mutants. Le gène *CIC* possède 20 exons (rectangles), les exons 2 à 6 code le domaine HMG. **B.** Schéma de l'analyse des souris *Olig2<sup>cre</sup>;Cic<sup>fl</sup>;Tom*. **C.** Immunomarquage OLIG1 et CC1 dans le corps calleux de cerveaux de souris mutantes (*Olig2<sup>cre</sup>;Cic<sup>fl</sup>;Tom*) et contrôles (*Olig2<sup>cre</sup>;Cic<sup>+/+</sup>;Tom*) à P14. Les flèches montrent les OPCs recombines (Olig1+CC1+Tom+), les têtes de flèches montrent les mOLs recombines (Olig1+CC1+Tom+). **D.** Quantification de la proportion d'OPCs recombines et de mOLs recombines dans les structures de la matière blanche (cc=corpus calleux ; ec=capsule externe ; ac=commissure antérieure) de cerveaux de souris mutantes (n=6) et contrôles (n=6). \*\*p<0,001 ; \*\*\*p<0,0001.



# Bibliographie

---

- [1] E. J. Odes *et al.*, “Earliest hominin cancer: 1.7-million-yearold osteosarcoma from Swartkrans cave, South Africa,” *S. Afr. J. Sci.*, vol. 112, no. 7–8, pp. 7–11, 2016, doi: 10.17159/sajs.2016/20150471.
- [2] S. I. Hajdu, “A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1,” *Cancer*, vol. 117, no. 5, pp. 1097–1102, 2011, doi: 10.1002/cncr.25553.
- [3] International Agency for Research on Cancer, “Biennial report,” 2021.
- [4] D. N. Louis *et al.*, “The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary,” *Neuro. Oncol.*, vol. 23, no. 8, pp. 1231–1251, Aug. 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- [5] Q. T. Ostrom, G. Cioffi, K. Waite, C. Kruchko, and J. S. Barnholtz-Sloan, “CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018,” *Neuro. Oncol.*, vol. 23, pp. III1–III105, 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab200.
- [6] H. Yan *et al.*, “IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas,” 2009.
- [7] L. Dang *et al.*, “Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate,” *Nature*, vol. 462, no. 7274, pp. 739–744, Dec. 2009, doi: 10.1038/nature08617.
- [8] S. Han *et al.*, “IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets,” *Br. J. Cancer*, vol. 122, no. 11, pp. 1580–1589, 2020, doi: 10.1038/s41416-020-0814-x.
- [9] J. Reifenberger, G. Reifenberger, L. Liu, C. D. James, W. Wechsler, and V. P. Collins, “Molecular Genetic Analysis of Oligodendroglial Tumors Shows Preferential Allelic Deletions on 19q and 1p,” *Am. J. Pathol.*, vol. 145, no. 5, pp. 1175–1190, 1994.
- [10] J. S. Smith *et al.*, “Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 3, pp. 636–645, 2000, doi: 10.1200/jco.2000.18.3.636.
- [11] H. Arita *et al.*, “Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss,” *Acta Neuropathol.*, vol. 126, no. 2, pp. 267–276, Aug. 2013, doi: 10.1007/s00401-013-1141-6.
- [12] C. Bettegowda *et al.*, “Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma,” *Science (80-. )*, vol. 333, no. 6048, pp. 1453–1455, Sep. 2011, doi: 10.1126/science.1210557.
- [13] V. Gleize *et al.*, “CIC inactivating mutations identify aggressive subset of 1p19q codeleted gliomas,” *Ann. Neurol.*, vol. 78, no. 3, pp. 355–374, Sep. 2015, doi: 10.1002/ana.24443.
- [14] A. K. Y. Chan *et al.*, “Loss of CIC and FUBP1 expressions are potential markers of shorter time to recurrence in oligodendroglial tumors,” *Mod. Pathol.*, vol. 27, no. 3, pp. 332–342, Mar. 2014, doi: 10.1038/modpathol.2013.165.
- [15] F. Sahm *et al.*, “CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas,” *Acta Neuropathol.*, vol. 123, no. 6, pp. 853–860, 2012, doi: 10.1007/s00401-012-0993-5.

- [16] P. Baumgarten *et al.*, “Loss of FUBP1 expression in gliomas predicts FUBP1 mutation and is associated with oligodendroglial differentiation, IDH1 mutation and 1p/19q loss of heterozygosity,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 40, no. 2, pp. 205–216, Feb. 2014, doi: 10.1111/nan.12088.
- [17] S. Yip *et al.*, “Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers,” *J. Pathol.*, vol. 226, no. 1, pp. 7–16, Jan. 2012, doi: 10.1002/path.2995.
- [18] U. Rabenhorst *et al.*, “Overexpression of the far upstream element binding protein 1 in hepatocellular carcinoma is required for tumor growth,” *Hepatology*, vol. 50, no. 4, pp. 1121–1129, 2009, doi: 10.1002/hep.23098.
- [19] F. Zhang, Q. Tian, and Y. Wang, “Far upstream element-binding protein 1 (FUBP1) is overexpressed in human gastric cancer tissue compared to non-cancerous tissue,” *Onkol. Republic*, vol. 36, no. 11, pp. 650–655, 2013, doi: 10.1159/000355659.
- [20] I. Hwang *et al.*, “Far Upstream Element-Binding Protein 1 Regulates LSD1 Alternative Splicing to Promote Terminal Differentiation of Neural Progenitors,” *Stem Cell Reports*, vol. 10, no. 4, pp. 1208–1221, 2018, doi: 10.1016/j.stemcr.2018.02.013.
- [21] T. C. G. A. R. Network, “Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower- Grade Gliomas,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 26, pp. 2481–2498, 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1402121.Comprehensive.
- [22] N. Wijewardhane, L. Dressler, and F. D. Ciccarelli, “Normal Somatic Mutations in Cancer Transformation,” *Cancer Cell*, vol. 39, no. 2, pp. 125–129, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.ccell.2020.11.002.
- [23] J. H. Lee *et al.*, “Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations,” *Nature*, vol. 560, no. 7717, pp. 243–247, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0389-3.
- [24] P. Dalerba, R. W. Cho, and M. F. Clarke, “Cancer stem cells: Models and concepts,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 58, pp. 267–284, 2007, doi: 10.1146/annurev.med.58.062105.204854.
- [25] S. Bao *et al.*, “Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response,” *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 756–760, 2006, doi: 10.1038/nature05236.
- [26] R. G. W. Verhaak *et al.*, “Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized,” *Cancer Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 98–110, 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- [27] Q. Wang *et al.*, “Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment,” *Cancer Cell*, vol. 32, no. 1, pp. 42–56.e6, 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2017.06.003.
- [28] J. Wang *et al.*, “Clonal evolution of glioblastoma under therapy,” *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 7, pp. 768–776, 2016, doi: 10.1038/ng.3590.
- [29] J. Park, J. K. Shim, S. J. Yoon, S. H. Kim, J. H. Chang, and S. G. Kang, “Transcriptome profiling-based identification of prognostic subtypes and multi-omics signatures of glioblastoma,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47066-y.
- [30] N. Ahmed *et al.*, “HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified Virus- Specific T Cells for Progressive Glioblastoma,” *JAMA Oncol.*, vol. 3, no. 8, pp. 1094–1101, 2017, doi:

## Bibliographie

- 10.1001/jamaoncol.2017.0184.HER2-Specific.
- [31] P. Zhang, Q. Xia, L. Liu, S. Li, and L. Dong, "Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, no. September, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.562798.
- [32] A. Kamoun *et al.*, "Integrated multi-omics analysis of oligodendroglial tumours identifies three subgroups of 1p/19q co-deleted gliomas," *Nat. Commun.*, 2016, doi: 10.1038/pj.2016.37.
- [33] A. Bianconi *et al.*, "Systematic Review on Tumor Microenvironment in Glial Neoplasm : From Understanding Pathogenesis to Future Therapeutic Perspectives," *Int. J. Mol. Sci.*, 2022.
- [34] S. Tamai, T. Ichinose, and T. Tsutsui, "Tumor Microenvironment in Glioma Invasion," *Brain Sci.*, 2022.
- [35] D. Hambardzumyan and G. Bergers, "Glioblastoma : Defining Tumor Niches," *Trends in Cancer*, vol. 1, no. 4, pp. 252–265, 2015, doi: 10.1016/j.trecan.2015.10.009.
- [36] D. Schiffer, L. Annovazzi, C. Casalone, C. Corona, and M. Mellai, "Glioblastoma : Microenvironment and Niche Concept," *Cancers (Basel)*, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3390/cancers11010005.
- [37] D. Schiffer, M. Mellai, E. Bovio, I. Bisogno, C. Casalone, and L. Annovazzi, "Glioblastoma niches : from the concept to the phenotypical reality," *Neurol. Sci.*, 2018.
- [38] J. B. Swann and M. J. Smyth, "Immune surveillance of tumors," *J. Clin. Invest.*, no. 5, pp. 1206–1211, 2007, doi: 10.1172/JCI31405.antigens.
- [39] B. T. Himes, P. A. Geiger, K. Ayasou, A. G. Bhargav, D. A. Brown, and I. F. Parney, "Immunosuppression in Glioblastoma : Current Understanding and Therapeutic Implications," *Front. Oncol.*, vol. 11, no. October, pp. 1–11, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.770561.
- [40] A. Wesolowska *et al.*, "Microglia-derived TGF- $\beta$  as an important regulator of glioblastoma invasion - An inhibition of TGF- $\beta$ -dependent effects by shRNA against human TGF- $\beta$  type II receptor," *Oncogene*, vol. 27, no. 7, pp. 918–930, 2008, doi: 10.1038/sj.onc.1210683.
- [41] D. Hambardzumyan, D. H. Gutmann, and H. Kettenmann, "The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression," *Nat. Neurosci.*, vol. 176, no. 12, pp. 139–148, 2016, doi: 10.1038/nn.4185.The.
- [42] E. K. Nduom *et al.*, "PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma," *Neuro. Oncol.*, no. July, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1093/neuonc/nov172.
- [43] C. Hao, G. Chen, H. Zhao, Y. Li, and J. Chen, "PD-L1 Expression in Glioblastoma , the Clinical and Prognostic Significance : A Systematic Literature Review and Meta-Analysis Characteristics of Included Studies," *Front. Oncol.*, vol. 10, no. June, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.01015.
- [44] B. Mehani *et al.*, "Immune cell gene expression signatures in diffuse glioma are associated with IDH mutation status, patient outcome and malignant cell state, and highlight the importance of specific cell subsets in glioma biology," *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–18, 2022, doi: 10.1186/s40478-022-01323-w.
- [45] S. Brandenburg *et al.*, "Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors," *Acta Neuropathol.*, vol. 131, no. 3, pp. 365–378, 2016, doi: 10.1007/s00401-015-1529-6.

- [46] L. Cheng *et al.*, “Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth,” *Cell*, vol. 153, no. 1, pp. 139–152, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.021.
- [47] W. Wick, M. Platten, and M. Weller, “Glioma cell invasion : regulation of metalloproteinase activity by TGF-  $\beta$ ,” *J. Neurooncol.*, pp. 177–185, 2001.
- [48] F. Hu, M. Ku, D. Markovic, O. Dildar, S. Lehnardt, and M. Synowitz, “Glioma-associated microglial MMP9 expression is upregulated by TLR2 signaling and sensitive to minocycline,” *Int. J. Cancer*, 2014, doi: 10.1002/ijc.28908.
- [49] D. Zagzag, H. Zhong, J. M. Scalzitti, E. Laughner, J. W. Simons, and G. L. Semenza, “Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1a in brain tumors,” *Am. Cancer Soc.*, 2000.
- [50] C. Yalaza, H. Ak, M. S. Cagli, E. Ozgiray, S. Atay, and H. H. Aydin, “R132H Mutation in IDH1 Gene is Associated with Increased Tumor HIF1-Alpha and Serum VEGF Levels in Primary Glioblastoma Multiforme,” *Ann. Clin. Lab. Sci.*, vol. 47, no. 3, pp. 362–364, 2017.
- [51] S. Fujiwara, K. O. U. Nakagawa, H. Harada, S. Nagato, S. Iwata, and T. Ohnishi, “Silencing hypoxia-inducible factor-1a inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas,” *Int. J. Oncol.*, pp. 793–802, 2007.
- [52] H. S. Venkatesh *et al.*, “Neuronal activity promotes glioma growth through neuroligin-3 secretion,” *Cell*, vol. 161, no. 4, pp. 803–816, May 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.04.012.
- [53] H. S. Venkatesh *et al.*, “Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma,” *Nature*, vol. 549, no. 7673, pp. 533–537, Sep. 2017, doi: 10.1038/nature24014.
- [54] H. S. Venkatesh *et al.*, “Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits,” *Nature*, vol. 573, no. 7775, pp. 539–545, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1563-y.
- [55] V. Venkataramani *et al.*, “Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression,” *Nature*, vol. 573, no. 7775, pp. 532–538, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1564-x.
- [56] Z. C. Ye and H. Sontheimer, “Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 17, pp. 4383–4391, 1999.
- [57] H. Venkatesh and M. Monje, “Neuronal Activity in Ontogeny and Oncology,” *Trends in Cancer*, vol. 3, no. 2. Cell Press, pp. 89–112, Feb. 01, 2017, doi: 10.1016/j.trecan.2016.12.008.
- [58] R. Stupp *et al.*, “Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma,” pp. 987–996, 2005.
- [59] M. Weller *et al.*, “EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. July 2020, 2021, doi: 10.1038/s41571-020-00447-z.
- [60] M. E. Hegi *et al.*, “MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 10, pp. 997–1003, 2005, doi: 10.1056/nejmoa043331.
- [61] J. G. Cairncross, M. Wang, B. R. Jenkins, G. E. Shaw, and C. Giannini, “Benefit From Procarbazine, Lomustine, and Vincristine in Oligodendroglial Tumors Is Associated With Mutation of IDH,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 8, 2014, doi: 10.1200/JCO.2013.49.3726.
- [62] Y. Deng *et al.*, “A reciprocal regulatory loop between TAZ/YAP and G-protein Gas regulates Schwann cell proliferation and myelination,” *Nat. Commun.*, vol. 8, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1038/ncomms15161.

## Bibliographie

- [63] R. C. Sterner and R. M. Sterner, "CAR-T cell therapy : current limitations and potential strategies," *Blood Cancer J.*, 2021, doi: 10.1038/s41408-021-00459-7.
- [64] M. Han and C. H. Kim, "Current Immunotherapeutic Approaches for Malignant Gliomas," *Brain Tumor Res Treat*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2022.
- [65] A. Carpentier *et al.*, "Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound," *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 343, 2016.
- [66] A. Dréan *et al.*, "Temporary blood – brain barrier disruption by low intensity pulsed ultrasound increases carboplatin delivery and efficacy in preclinical models of glioblastoma," *J. Neurooncol.*, no. 0123456789, 2019, doi: 10.1007/s11060-019-03204-0.
- [67] M. Götz and W. B. Huttner, "The cell biology of neurogenesis," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 10, pp. 777–788, 2005, doi: 10.1038/nrm1739.
- [68] S. Alcantara Llaguno *et al.*, "Cell-of-origin susceptibility to glioblastoma formation declines with neural lineage restriction," *Nat. Neurosci.*, vol. 22, no. 4, pp. 545–555, 2019, doi: 10.1038/s41593-018-0333-8.
- [69] K. Psachoulia, F. Jamen, K. M. Young, and W. D. Richardson, "Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain," *Neuron Glia Biol.*, vol. 5, no. 3–4, pp. 57–67, Nov. 2009, doi: 10.1017/S1740925X09990354.
- [70] S. Archontidi, S. Joppé, Y. Khenniche, C. Bardella, and E. Huillard, *Mouse Models of Diffuse Lower-Grade Gliomas of the Adult*, Neurometho. Springer Protocols, 2021.
- [71] Y. Shoshan *et al.*, "Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: Implications for the histogenesis of brain tumors," 1999. [Online]. Available: [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- [72] A. Briançon-Marjollet *et al.*, "NG2-expressing glial precursor cells are a new potential oligodendroglioma cell initiating population in N-ethyl-N-nitrosourea-induced gliomagenesis," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 10, pp. 1718–1725, Jul. 2010, doi: 10.1093/carcin/bgq154.
- [73] I. Tirosch *et al.*, "Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma," *Nature*, vol. 539, no. 7628, pp. 309–313, Nov. 2016, doi: 10.1038/nature20123.
- [74] A. S. Venteicher *et al.*, "Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq," *Science (80-. )*, vol. 355, no. 6332, Mar. 2017, doi: 10.1126/science.aai8478.
- [75] C. Neftel *et al.*, "An Integrative Model of Cellular States , Plasticity , and Genetics for Glioblastoma Article An Integrative Model of Cellular States , Plasticity , and Genetics for Glioblastoma," *Cell*, pp. 835–849, 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.06.024.
- [76] H. Zong, L. F. Parada, and S. J. Baker, "Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a020610.
- [77] W. P. Ge, A. Miyawaki, F. H. Gage, Y. N. Jan, and L. Y. Jan, "Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex," *Nature*, vol. 484, no. 7394, pp. 376–380, Apr. 2012, doi: 10.1038/nature10959.
- [78] M. Guizzetti, T. J. Kavanagh, and L. G. Costa, "Measurements of Astrocyte Proliferation," *Methods Mol. Biol.*, vol. 758, pp. 349–359, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-170-3.

- [79] Y. Zhu *et al.*, “Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma,” *Cancer Cell*, vol. 8, no. August, pp. 119–130, 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.07.004.
- [80] C. Kwon *et al.*, “Pten Haploinsufficiency Accelerates Formation of High-Grade Astrocytomas,” *Cancer Res.*, no. 9, pp. 3286–3295, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6867.
- [81] C. Dai, J. C. Celestino, Y. Okada, D. N. Louis, G. N. Fuller, and E. C. Holland, “PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas from and oligoastrocytomas neural progenitors and astrocytes in vivo,” *Genes Dev.*, vol. 15, no. 15, pp. 1913–1925, 2001, doi: 10.1101/gad.903001.
- [82] E. C. Holland, J. Celestino, C. Dai, L. Schaefer, R. E. Sawaya, and G. N. Fuller, “Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice,” *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 1, pp. 55–57, 2000, doi: 10.1038/75596.
- [83] S. Alcantara Llaguno *et al.*, “Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model,” *Cancer Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 45–56, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.006.
- [84] M. Assanah, R. Lochhead, A. Ogden, J. Bruce, J. Goldman, and P. Canoll, “Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses,” *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 25, pp. 6781–6790, 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0514-06.2006.
- [85] S. R. Alcantara Llaguno *et al.*, “Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Article Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes,” *Cancer Cell*, vol. 28, no. 4, pp. 429–440, 2015, doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.007.
- [86] N. Lindberg, M. Kastemar, T. Olofsson, A. Smits, and L. Uhrbom, “Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma,” *Oncogene*, vol. 28, no. 23, pp. 2266–2275, Jun. 2009, doi: 10.1038/onc.2009.76.
- [87] A. I. Persson *et al.*, “Non-Stem Cell Origin for Oligodendroglioma,” *Cancer Cell*, vol. 18, no. 6, pp. 669–682, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.033.
- [88] C. Liu *et al.*, “Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma,” *Cell*, vol. 146, no. 2, pp. 209–221, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.06.014.
- [89] C. Bardella *et al.*, “Expression of Idh1R132H in the Murine Subventricular Zone Stem Cell Niche Recapitulates Features of Early Gliomagenesis,” *Cancer Cell*, vol. 30, no. 4, pp. 578–594, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.ccell.2016.08.017.
- [90] F. Pérez-Cerdá, M. V. Sánchez-Gómez, and C. Matute, “Pío del Río hortega and the discovery of the oligodendrocytes,” *Front. Neuroanat.*, vol. 9, no. July, pp. 7–12, 2015, doi: 10.3389/fnana.2015.00092.
- [91] N. Snaidero and M. Simons, “Myelination at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. 14, pp. 2999–3004, 2014, doi: 10.1242/jcs.151043.
- [92] X. Zhu, R. A. Hill, D. Dietrich, M. Komitova, R. Suzuki, and A. Nishiyama, “Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells,” *Development*, vol. 138, no. 4, pp. 745–753, Feb. 2011, doi: 10.1242/dev.047951.
- [93] R. A. Hill, K. D. Patel, C. M. Goncalves, J. Grutzendler, and A. Nishiyama, “Modulation of oligodendrocyte generation during a critical temporal window after NG2 cell division,” *Nat.*

## Bibliographie

- Neurosci.*, vol. 17, no. 11, pp. 1518–1527, 2014, doi: 10.1038/nn.3815.
- [94] I. Jakovcevski and N. Zecevic, “Sequence of oligodendrocyte development in the human fetal telencephalon,” *Glia*, vol. 49, no. 4, pp. 480–491, Mar. 2005, doi: 10.1002/glia.20134.
- [95] I. Jakovcevski, R. Filipovic, Z. Mo, S. Rakic, and N. Zecevic, “Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain,” *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 3, no. JUN. Jun. 01, 2009, doi: 10.3389/neuro.05.005.2009.
- [96] J. A. Murray and W. F. Blakemore, “The relationship between internodal length and fibre diameter in the spinal cord of the cat,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 45, no. 1, pp. 29–41, 1980, doi: 10.1016/S0022-510X(80)80004-9.
- [97] S. G. Waxman and H. A. Swadlow, “The conduction properties of axons in central white matter,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 8, no. PART 4, pp. 297–324, 1977, doi: 10.1016/0301-0082(77)90009-0.
- [98] Y. Lee *et al.*, “Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration,” *Nature*, vol. 487, no. 7408, pp. 443–448, 2012, doi: 10.1038/nature11314.
- [99] T. Philips and J. D. Rothstein, “Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons,” *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 9, pp. 3271–3280, 2017, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1172/JCI90610>.
- [100] M. R. L. Dawson, J. M. Levine, and R. Reynolds, “NG2-expressing cells in the central nervous system: Are they oligodendroglial progenitors?,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 61, no. 5, pp. 471–479, 2000, doi: 10.1002/1097-4547(20000901)61:5<471::AID-JNR1>3.0.CO;2-N.
- [101] A. Nishiyama, X. H. Lin, N. Giese, C. H. Heldin, and W. B. Stallcup, “Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF  $\alpha$ -receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 315–330, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960201)43:3<315::AID-JNR6>3.0.CO;2-M.
- [102] M. R. L. Dawson, A. Polito, J. M. Levine, and R. Reynolds, “NG2-expressing glial progenitor cells: An abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 24, no. 2, pp. 476–488, 2003, doi: 10.1016/S1044-7431(03)00210-0.
- [103] K. M. Young *et al.*, “Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: Evidence for myelin remodeling,” *Neuron*, vol. 77, no. 5, pp. 873–885, 2013, doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.006.
- [104] B. Nait-Oumesmar, L. Decker, F. Lachapelle, V. Avellana-Adalid, C. Bachelin, and A. Baron-Van Evercooren, “Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 11, no. 12, pp. 4357–4366, 1999, doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00873.x.
- [105] S. H. Kang, M. Fukaya, J. K. Yang, J. D. Rothstein, and D. E. Bergles, “NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration,” *Neuron*, vol. 68, no. 4, pp. 668–681, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.009.
- [106] E. G. Hughes, S. H. Kang, M. Fukaya, and D. E. Bergles, “Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain,” *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 6, pp. 668–676, Jun. 2013, doi: 10.1038/nn.3390.
- [107] A. Nishiyama, M. Komitova, R. Suzuki, and X. Zhu, “Polydendrocytes (NG2 cells): Multifunctional cells with lineage plasticity,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 10, no. 1, pp. 9–22, 2009, doi: 10.1038/nrn2495.

- [108] L. E. Rivers *et al.*, “PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice,” *Nat. Neurosci.*, vol. 11, no. 12, pp. 1392–1401, Dec. 2008, doi: 10.1038/nn.2220.
- [109] M. C. Raff, R. H. Miller, and M. Noble, “A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium,” *Nature*, vol. 303, no. 5916, pp. 390–396, 1983, doi: 10.1038/303390a0.
- [110] R. J. M. Franklin, S. A. Bayley, R. Milner, C. Ffrench-Constant, and W. F. Blakemore, “Differentiation of the O-2A progenitor cell line CG-4 into oligodendrocytes and astrocytes following transplantation into glia-deficient areas of CNS white matter,” *Glia*, vol. 13, no. 1, pp. 39–44, 1995, doi: 10.1002/glia.440130105.
- [111] A. Kriegstein and A. Alvarez-Buylla, “The glial nature of embryonic and adult neural stem cells,” *Annual Review of Neuroscience*, vol. 32, pp. 149–184, Jun. 2009, doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- [112] B. Martynoga, D. Drechsel, and F. Guillemot, “Molecular control of neurogenesis: A view from the mammalian cerebral cortex,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 10, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a008359.
- [113] H. Li, J. Paes de Faria, P. Andrew, J. Nitarska, and W. D. Richardson, “Phosphorylation Regulates OLIG2 Cofactor Choice and the Motor Neuron-Oligodendrocyte Fate Switch,” *Neuron*, vol. 69, no. 5, pp. 918–929, 2011, doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.030.
- [114] B. Emery and Q. R. Lu, “Transcriptional and epigenetic regulation of oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 9, Sep. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a020461.
- [115] H. Nakatani *et al.*, “Ascl1/Mash1 promotes brain oligodendrogenesis during myelination and remyelination,” *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 23, pp. 9752–9768, 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0805-13.2013.
- [116] C. M. Parras *et al.*, “Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain,” *EMBO J.*, vol. 23, no. 22, pp. 4495–4505, Nov. 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600447.
- [117] E. van Tilborg *et al.*, “Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury,” *GLIA*, vol. 66, no. 2. John Wiley and Sons Inc, pp. 221–238, Feb. 01, 2018, doi: 10.1002/glia.23256.
- [118] J. Cai *et al.*, “Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling,” *Neuron*, vol. 45, no. 1, pp. 41–53, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.028.
- [119] A. M. Ravanelli and B. Appel, “Motor neurons and oligodendrocytes arise from distinct cell lineages by progenitor recruitment,” *Genes Dev.*, vol. 29, no. 23, pp. 2504–2515, Dec. 2015, doi: 10.1101/gad.271312.115.
- [120] N. Kessar, M. Fogarty, P. Iannarelli, M. Grist, M. Wegner, and W. D. Richardson, “Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage,” *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 2, pp. 173–179, Feb. 2006, doi: 10.1038/nn1620.
- [121] R. B. Tripathi *et al.*, “Dorsally and ventrally derived oligodendrocytes have similar electrical properties but myelinate preferred tracts,” *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 18, pp. 6809–6819, 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6474-10.2011.

## Bibliographie

- [122] S. Marques *et al.*, “Transcriptional Convergence of Oligodendrocyte Lineage Progenitors during Development,” *Dev. Cell*, vol. 46, no. 4, pp. 504–517.e7, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.devcel.2018.07.005.
- [123] H. H. Tsai *et al.*, “Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system,” *Science (80-. )*, vol. 351, no. 6271, pp. 379–384, 2016, doi: 10.1126/science.aad3839.
- [124] B. Jablonska *et al.*, “Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination,” *Nat. Neurosci.*, vol. 13, no. 5, pp. 541–550, 2010, doi: 10.1038/nn.2536.
- [125] S. P. J. Fancy *et al.*, “Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS,” *Genes Dev.*, vol. 23, no. 13, pp. 1571–1585, 2009, doi: 10.1101/gad.1806309.
- [126] S. P. J. Fancy *et al.*, “Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination,” *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 8, pp. 1009–1016, 2011, doi: 10.1038/nn.2855.
- [127] N. Li, J. Han, J. Tang, and Y. Ying, “IGFBP-7 inhibits the differentiation of oligodendrocyte precursor cells via regulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 6, pp. 4742–4750, 2018, doi: 10.1002/jcb.26654.
- [128] R. V. Bhat *et al.*, “Expression of the APC tumor suppressor protein in oligodendroglia,” *Glia*, vol. 17, no. 2, pp. 169–174, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199606)17:2<169::AID-GLIA8>3.0.CO;2-Y.
- [129] B. Emery, “Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination,” *Science (80-. )*, vol. 330, no. 6005, pp. 779–782, 2010, doi: 10.1126/science.1190927.
- [130] J. Dai, K. K. Bercury, J. T. Ahrends, and W. B. Macklin, “Olig1 function is required for oligodendrocyte differentiation in the mouse brain,” *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 10, pp. 4386–4402, 2015, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4962-14.2015.
- [131] H. Li, Y. Lu, H. K. Smith, and W. D. Richardson, “Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes,” *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 52, pp. 14375–14382, 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4456-07.2007.
- [132] V. Balasubramaniyan, N. Timmer, B. Kust, E. Boddeke, and S. Copray, “Transient Expression of Olig1 Initiates the Differentiation of Neural Stem Cells into Oligodendrocyte Progenitor Cells,” *Stem Cells*, vol. 22, no. 7, pp. 1127–1127, 2004, doi: 10.1634/stemcells.2004-ed12.
- [133] X. Gong, T. Lin, Z. Sun, M. Fu, H. Zuo, and Z. Xie, “Olig1 is downregulated in oligodendrocyte progenitor cell differentiation,” *Neuroreport*, vol. 19, no. 12, pp. 1203–1207, 2008, doi: 10.1097/WNR.0b013e328308b322.
- [134] S. Kucenas, H. Snell, and B. Appel, “Nkx2.2a promotes specification and differentiation of a myelinating subset of oligodendrocyte lineage cells in zebrafish,” *Neuron Glia Biol.*, vol. 4, no. 2, pp. 71–81, 2008, doi: 10.1017/S1740925X09990123.
- [135] C. Marie *et al.*, “Oligodendrocyte precursor survival and differentiation requires chromatin remodeling by Chd7 and Chd8,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 35, pp. E8246–E8255, 2018, doi: 10.1073/pnas.1802620115.
- [136] B. Emery *et al.*, “Myelin Gene Regulatory Factor Is a Critical Transcriptional Regulator Required for CNS Myelination,” *Cell*, vol. 138, no. 1, pp. 172–185, 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.04.031.
- [137] D. E. Bergles, J. D. B. Roberts, P. Somogyi, and C. E. Jahr, “Glutamatergic synapses on OPCs

- in the hippocampus," *Nature*, vol. 405, no. 1996, pp. 187–191, 2000.
- [138] S. C. Lin and D. E. Bergles, "Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus," *Nat. Neurosci.*, vol. 7, no. 1, pp. 24–32, 2004, doi: 10.1038/nn1162.
- [139] R. Káradóttir, P. Cavelier, L. H. Bergersen, and D. Attwell, "NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia," *Nature*, vol. 438, no. 7071, pp. 1162–1166, 2005, doi: 10.1038/nature04302.
- [140] E. M. Gibson *et al.*, "Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain," *Science (80-. )*, vol. 344, no. 6183, pp. 1–27, 2014, doi: 10.1126/science.1252304.
- [141] L. Dimou, C. Simon, F. Kirchhoff, H. Takebayashi, and M. Götz, "Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 41, pp. 10434–10442, Oct. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2831-08.2008.
- [142] C. Simon, M. Götz, and L. Dimou, "Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury," *Glia*, vol. 59, no. 6, pp. 869–881, Jun. 2011, doi: 10.1002/glia.21156.
- [143] F. Viganò, W. Möbius, M. Götz, and L. Dimou, "Transplantation reveals regional differences in oligodendrocyte differentiation in the adult brain," *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 10, pp. 1370–1372, 2013, doi: 10.1038/nn.3503.
- [144] D. H. Lentferink, J. M. Jongsma, I. Werkman, and W. Baron, "Grey matter OPCs are less mature and less sensitive to IFN $\gamma$  than white matter OPCs: Consequences for remyelination," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-19934-6.
- [145] T. B. Martins *et al.*, "Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 136, no. 5, pp. 696–704, 2011, doi: 10.1309/AJCP7UBK8IBVMVNR.
- [146] S. Moyon *et al.*, "Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration," *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 1, pp. 4–20, 2015, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0849-14.2015.
- [147] E. M. M. Strijbis, E. J. Kooi, P. van der Valk, and J. J. G. Geurts, "Cortical remyelination is heterogeneous in multiple sclerosis," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 76, no. 5, pp. 390–401, 2017, doi: 10.1093/jnen/nlx023.
- [148] S. Marques *et al.*, "Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system," *Science (80-. )*, vol. 352, no. 6291, pp. 1323–1326, Jun. 2016, doi: 10.1126/science.aaf0784.
- [149] S. O. Spitzer *et al.*, "Oligodendrocyte Progenitor Cells Become Regionally Diverse and Heterogeneous with Age," *Neuron*, vol. 101, no. 3, pp. 459–471.e5, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.020.
- [150] G. Jiménez, A. Guichet, A. Ephrussi, and J. Casanova, "Relief of gene repression by Torso RTK signaling: Role of capicua in Drosophila terminal and dorsoventral patterning," *Genes Dev.*, vol. 14, no. 2, pp. 224–231, 2000, doi: 10.1101/gad.14.2.224.
- [151] M. Štros, D. Launholt, and K. D. Grasser, "The HMG-box: A versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 64, no. 19–20, pp. 2590–2606,

## Bibliographie

- 2007, doi: 10.1007/s00018-007-7162-3.
- [152] Y. C. Lam *et al.*, "ATAXIN-1 Interacts with the Repressor Capicua in Its Native Complex to Cause SCA1 Neuropathology," *Cell*, vol. 127, no. 7, pp. 1335–1347, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.11.038.
- [153] M. Forés *et al.*, "Origins of Context-Dependent Gene Repression by Capicua," *PLoS Genet.*, vol. 11, no. 1, 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1004902.
- [154] C.-J. Lee *et al.*, "CIC, a member of a novel subfamily of the HMG-box superfamily, is transiently expressed in developing granule neurons," *Mol. Brain Res.*, vol. 106, 2002.
- [155] S. Astigarraga, R. Grossman, J. Díaz-Delfín, C. Caelles, Z. Paroush, and G. Jiménez, "A MAPK docking site is critical for downregulation of Capicua by Torso and EGFR RTK signaling," *EMBO J.*, vol. 26, no. 3, pp. 668–677, Feb. 2007, doi: 10.1038/sj.emboj.7601532.
- [156] M. Forés *et al.*, "A new mode of DNA binding distinguishes Capicua from other HMG-box factors and explains its mutation patterns in cancer," *PLoS Genet.*, vol. 13, no. 3, Mar. 2017, doi: 10.1371/journal.pgen.1006622.
- [157] K. Dissanayake *et al.*, "ERK/p90RSK/14-3-3 signalling has an impact on expression of PEA3 Ets transcription factors via the transcriptional repressor capicúa," *Biochem. J.*, vol. 433, no. 3, pp. 515–525, Feb. 2011, doi: 10.1042/BJ20101562.
- [158] L. Ajuria *et al.*, "Capicua DNA-binding sites are general response elements for RTK signaling in *Drosophila*," *Development*, vol. 138, no. 5, pp. 915–924, Mar. 2011, doi: 10.1242/dev.057729.
- [159] Y. Lee *et al.*, "ATXN1 Protein Family and CIC Regulate Extracellular Matrix Remodeling and Lung Alveolarization," *Dev. Cell*, vol. 21, no. 4, pp. 746–757, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.017.
- [160] B. Wang *et al.*, "ATXN1L, CIC, and ETS Transcription Factors Modulate Sensitivity to MAPK Pathway Inhibition," *Cell Rep.*, vol. 18, no. 6, pp. 1543–1557, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.031.
- [161] M. Kawamura-Saito *et al.*, "Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, no. 13, pp. 2125–2137, Jul. 2006, doi: 10.1093/hmg/ddl136.
- [162] S. Weissmann, P. A. Cloos, S. Sidoli, O. N. Jensen, S. Pollard, and K. Helin, "The tumor suppressor CIC directly regulates MAPK pathway genes via histone deacetylation," *Cancer Res.*, vol. 78, no. 15, pp. 4114–4125, Aug. 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0342.
- [163] F. Roch, G. Jiménez, and J. Casanova, "EGFR signalling inhibits Capicua-dependent repression during specification of *Drosophila* wing veins," *Development*, vol. 129, no. 4, pp. 993–1002, 2002, doi: 10.1242/dev.129.4.993.
- [164] M. R. Atkey, J. F. B. Lachance, M. Walczak, T. Rebello, and L. A. Nilson, "Capicua regulates follicle cell fate in the *Drosophila* ovary through repression of mirror," *Development*, vol. 133, no. 23, p. 4794, 2006, doi: 10.1242/dev.02714.
- [165] D. J. Goff, L. A. Nilson, and D. Morisato, "Establishment of dorsal-ventral polarity of the *Drosophila* egg requires capicua action in ovarian follicle cells," *Development*, pp. 1–10, 2001.
- [166] Y. De Launoit *et al.*, "Structure-Function Relationships of the PEA3 Group of Ets-Related Transcription Factors The ets genes encode a growing family of tran," 1997.

- [167] H. Kamada, S. Yasuhira, M. Shibazaki, H. Amano, and C. Maesawa, "DUSP4 inactivation leads to reduced ERK activity via the upregulation of DUSP6 in melanoma cells," *J. Invest. Dermatol.*, 2022, doi: 10.1016/j.jid.2022.02.007.
- [168] S. Kim, Y. Park, J. S. Park, J. Park, H. Hong, and Y. Lee, "Regulation of positive and negative selection and TCR signaling during thymic T cell development by capicua," *Elife*, pp. 1–25, 2021.
- [169] D. Wong *et al.*, "Transcriptomic analysis of CIC and ATXN1L reveal a functional relationship exploited by cancer," *Oncogene*, vol. 38, no. 2, pp. 273–290, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41388-018-0427-5.
- [170] Y. Ren *et al.*, "CIC Is a Mediator of the ERK1/2-DUSP6 Negative Feedback Loop," *iScience*, vol. 23, no. 11, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101635.
- [171] R. Yang *et al.*, "Cic loss promotes gliomagenesis via aberrant neural stem cell proliferation and differentiation," *Cancer Res.*, vol. 77, no. 22, pp. 6097–6108, Nov. 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1018.
- [172] S. Barolo and J. W. Posakony, "Three habits of highly effective signaling pathways: Principles of transcriptional control by developmental cell signaling," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 10, pp. 1167–1181, 2002, doi: 10.1101/gad.976502.
- [173] A. Suisse, D. Q. He, K. Legent, and J. E. Treisman, "COP9 signalosome subunits protect capicua from MAPK-dependent and -independent mechanisms of degradation," *Dev.*, vol. 144, no. 14, pp. 2673–2682, Jul. 2017, doi: 10.1242/dev.148767.
- [174] S. Bunda, P. Heir, A. S. C. Li, Y. Mamatjan, G. Zadeh, and K. Aldape, "c-Src Phosphorylates and Inhibits the Function of the CIC Tumor Suppressor Protein," *Mol. Cancer Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 774–786, May 2020, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1370.
- [175] S. Bunda *et al.*, "CIC protein instability contributes to tumorigenesis in glioblastoma," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-018-08087-9.
- [176] J. Pascual *et al.*, "Hippo Reprograms the Transcriptional Response to Ras Signaling," *Dev. Cell*, vol. 42, no. 6, pp. 667–680.e4, 2017, doi: 10.1016/j.devcel.2017.08.013.
- [177] E. Kim *et al.*, "Deficiency of Capicua disrupts bile acid homeostasis," *Sci. Rep.*, vol. 5, 2015, doi: 10.1038/srep08272.
- [178] L. Simón-Carrasco *et al.*, "Inactivation of Capicua in adult mice causes T-cell lymphoblastic lymphoma," *Genes Dev.*, vol. 31, no. 14, pp. 1456–1468, 2017, doi: 10.1101/gad.300244.117.
- [179] S. T. Ahmad *et al.*, "Capicua regulates neural stem cell proliferation and lineage specification through control of Ets factors," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09949-6.
- [180] I. Hwang, H. Pan, J. Yao, O. Elemento, H. Zheng, and J. Paik, "CIC is a critical regulator of neuronal differentiation," *JCI Insight*, vol. 5, no. 9, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1172/jci.insight.135826.
- [181] Y. Jin *et al.*, "EGFR/Ras Signaling Controls Drosophila Intestinal Stem Cell Proliferation via Capicua-Regulated Genes," *PLoS Genet.*, vol. 11, no. 12, pp. 1–27, 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1005634.
- [182] I. K. Hariharan *et al.*, "Capicua Regulates Cell Proliferation Downstream of the Receptor Tyrosine Kinase/Ras Signaling Pathway," *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 8, pp. 728–733, 2007, doi: 10.1016/j.cub.2007.03.023.

## Bibliographie

- [183] S. Chittaranjan *et al.*, "Mutations in CIC and IDH1 cooperatively regulate 2-hydroxyglutarate levels and cell clonogenicity," 2014. [Online]. Available: [www.impactjournals.com/oncotarget/Keywords:CIC/IDH1/ACLY/citrate/2HG/Oligodendroglioma](http://www.impactjournals.com/oncotarget/Keywords:CIC/IDH1/ACLY/citrate/2HG/Oligodendroglioma).
- [184] S. Park, J. Park, E. Kim, and Y. Lee, "The Capicua-ETV5 axis regulates liver-resident memory CD8+ T cell development and the pathogenesis of liver injury," *Hepatology*, 2019, doi: 10.1002/hep.30594.
- [185] G. Y. Park *et al.*, "Deletion timing of cic alleles during hematopoiesis determines the degree of peripheral CD4+ T cell activation and proliferation," *Immune Netw.*, vol. 20, no. 5, pp. 1–11, Oct. 2020, doi: 10.4110/in.2020.20.e43.
- [186] J. D. Fryer *et al.*, "Exercise and Genetic Rescue of SCA1 via the Transcriptional Repressor Capicua," *Sci. reports*, vol. 1, 2011.
- [187] M. W. C. Rousseaux *et al.*, "ATXN1-CIC Complex Is the Primary Driver of Cerebellar Pathology in Spinocerebellar Ataxia Type 1 through a Gain-of-Function Mechanism," *Neuron*, vol. 97, no. 6, pp. 1235–1243.e5, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.013.
- [188] H. C. Lu *et al.*, "Disruption of the ATXN1-CIC complex causes a spectrum of neurobehavioral phenotypes in mice and humans," *Nat. Genet.*, vol. 49, no. 4, pp. 527–536, Mar. 2017, doi: 10.1038/ng.3808.
- [189] I. Hwang, H. Pan, J. Yao, O. Elemento, H. Zheng, and J. Paik, "CIC is a critical regulator of neuronal differentiation," *JCI Insight*, vol. 5, no. 9, May 2020, doi: 10.1172/jci.insight.135826.
- [190] D. Wong and S. Yip, "Making heads or tails – the emergence of capicua (CIC) as an important multifunctional tumour suppressor," *Journal of Pathology*, vol. 250, no. 5. John Wiley and Sons Ltd, pp. 532–540, Apr. 01, 2020, doi: 10.1002/path.5400.
- [191] F. W. Huang *et al.*, "Exome Sequencing of African-American Prostate Cancer Reveals Loss-of-Function ERF Mutations," *Am. Assoc. Cancer Res.*, no. September, 2017, doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0960.
- [192] R. A. Okimoto *et al.*, "Inactivation of Capicua drives cancer metastasis," *Nat. Genet.*, vol. 49, no. 1, pp. 87–96, 2017, doi: 10.1038/ng.3728.
- [193] Q. Tan *et al.*, "Loss of Capicua alters early T cell development and predisposes mice to T cell lymphoblastic leukemia/lymphoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 7, pp. E1511–E1519, Feb. 2018, doi: 10.1073/pnas.1716452115.
- [194] E. Kim, D. Kim, J. Lee, J. Yoe, J. Park, and C. Kim, "Capicua suppresses hepatocellular carcinoma progression by controlling ETV4-MMP1 axis," *Hepatology*, 2018, doi: 10.1002/hep.
- [195] J. S. Lee *et al.*, "Capicua suppresses colorectal cancer progression via repression of ETV4 expression," *Cancer Cell Int.*, vol. 20, no. 1, Feb. 2020, doi: 10.1186/s12935-020-1111-8.
- [196] J. Yoe, D. Kim, S. Kim, and Y. Lee, "Capicua restricts cancer stem cell-like properties in breast cancer cells," *Oncogene*, vol. 39, no. 17, pp. 3489–3506, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41388-020-1230-7.
- [197] S. Yoshiya *et al.*, "Impact of Capicua on Pancreatic Cancer Progression," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 28, no. 6, pp. 3198–3207, Jun. 2021, doi: 10.1245/s10434-020-09339-z.
- [198] C. J. Lee, W. I. Chan, and P. J. Scotting, "CIC, a gene involved in cerebellar development and ErbB signaling, is significantly expressed in medulloblastomas," *J. Neurooncol.*, vol. 73, no. 2, pp. 101–108, Jun. 2005, doi: 10.1007/s11060-004-4598-2.

- [199] S. Yip *et al.*, “Concurrent CIC mutations, IDH mutations and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers,” *J. Pathol.*, vol. 226, no. 1, pp. 7–16, 2013, doi: 10.1002/path.2995.Concurrent.
- [200] F. Han *et al.*, “Altered capicua transcriptional repressor gene expression exhibits distinct prognostic value for isocitrate dehydrogenase-mutant oligodendroglial tumors,” *Oncol. Lett.*, pp. 1459–1468, 2018, doi: 10.3892/ol.2017.7460.
- [201] L. Zhang, F. Giuste, J. C. Vizcarra, X. Li, and D. Gutman, “Radiomics Features Predict CIC Mutation Status in Lower Grade Glioma,” *Front. Oncol.*, vol. 10, Jun. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00937.
- [202] S. Srinivas *et al.*, “Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus,” 2001. [Online]. Available: <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/1/4>.
- [203] L. Dimou and M. Simons, “Diversity of oligodendrocytes and their progenitors,” *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 47. Elsevier Ltd, pp. 73–79, Dec. 01, 2017, doi: 10.1016/j.conb.2017.09.015.
- [204] A. Othman, D. M. Frim, P. Polak, S. Vujcic, B. G. W. Arnason, and A. I. Boullerne, “Olig1 is expressed in human oligodendrocytes during maturation and regeneration,” *Glia*, vol. 59, no. 6, pp. 914–926, Jun. 2011, doi: 10.1002/glia.21163.
- [205] L. Simón-Carrasco, G. Jiménez, M. Barbacid, and M. Drosten, “The Capicua tumor suppressor: a gatekeeper of Ras signaling in development and cancer,” *Cell Cycle*, vol. 17, no. 6. Taylor and Francis Inc., pp. 702–711, Mar. 19, 2018, doi: 10.1080/15384101.2018.1450029.
- [206] B. Zhao, L. Li, and K. L. Guan, “Hippo signaling at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. 23, pp. 4001–4006, 2010, doi: 10.1242/jcs.069070.
- [207] P. O. Guichet *et al.*, “Fatal correlation between YAP1 expression and glioma aggressiveness: clinical and molecular evidence,” *J. Pathol.*, vol. 246, no. 2, pp. 205–216, 2018, doi: 10.1002/path.5133.
- [208] J. Niu *et al.*, “Oligodendroglial ring finger protein Rnf43 is an essential injury-specific regulator of oligodendrocyte maturation,” *Neuron*, vol. 109, no. 19, pp. 3104–3118.e6, 2021, doi: 10.1016/j.neuron.2021.07.018.
- [209] F. Ye *et al.*, “HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the B-catenin-TCF interaction,” *Nat. Neurosci.*, vol. 12, no. 7, pp. 829–838, 2009, doi: 10.1038/nn.2333.
- [210] C. S. Gonçalves *et al.*, “WNT6 is a novel oncogenic prognostic biomarker in human glioblastoma,” *Theranostics*, vol. 8, no. 17, pp. 4805–4823, 2018, doi: 10.7150/thno.25025.
- [211] M. Hupe *et al.*, “Gene expression profiles of brain endothelial cells during embryonic development at bulk and single-cell levels,” *Sci. Signal.*, vol. 10, no. 487, 2017, doi: 10.1126/scisignal.aag2476.
- [212] J. H. Seo *et al.*, “Oligodendrocyte precursor cells support blood-brain barrier integrity via TGF- $\beta$  signaling,” *PLoS One*, vol. 9, no. 7, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0103174.
- [213] J. H. Seo *et al.*, “Oligodendrocyte precursors induce early blood-brain barrier opening after white matter injury,” *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 2, pp. 782–786, 2013, doi: 10.1172/JCI65863.
- [214] L. D. D. Pham *et al.*, “Crosstalk between oligodendrocytes and cerebral endothelium contributes to vascular remodeling after white matter injury,” *Glia*, vol. 60, no. 6, pp. 875–881, 2012, doi:

## Bibliographie

- 10.1002/glia.22320.
- [215] J. Gavard and J. S. Gutkind, "VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the  $\beta$  - arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 11, 2006, doi: 10.1038/ncb1486.
- [216] L. Claesson-Welsh and M. Welsh, "VEGFA and tumour angiogenesis," *J. Intern. Med.*, vol. 273, no. 2, pp. 114–127, 2013, doi: 10.1111/joim.12019.
- [217] P. Oettgen, "Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors," *Circ. Res.*, vol. 99, no. 11, pp. 1159–1166, 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000251056.85990.db.
- [218] S. Ghosh, M. Basu, and S. S. Roy, "ETS-1 protein regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 18, pp. 15001–15015, 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.284034.
- [219] J. Chen *et al.*, "VEGF amplifies transcription through ETS1 acetylation to enable angiogenesis /631/136/16 /631/337/572 article," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00405-x.
- [220] A. K. Chan *et al.*, "Loss of CIC and FUBP1 expressions are potential markers of shorter time to recurrence in oligodendroglial tumors," *Mod. Pathol.*, pp. 332–342, 2014, doi: 10.1038/modpathol.2013.165.
- [221] A. Griveau, G. Seano, S. J. Shelton, S. Mehta, R. K. Jain, and D. H. Rowitch, "A Glial Signature and Wnt7 Signaling Regulate Glioma-Vascular Interactions and Tumor Article A Glial Signature and Wnt7 Signaling Regulate Glioma-Vascular Interactions and Tumor Microenvironment," *Cancer Cell*, pp. 874–889, 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.020.
- [222] V. G. Leblanc *et al.*, "Comparative transcriptome analysis of isogenic cell line models and primary cancers links capicua ( CIC ) loss to activation of the MAPK signalling cascade," *J. Pathol.*, no. April, pp. 206–220, 2017, doi: 10.1002/path.4894.
- [223] H. Suzuki *et al.*, "Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 5, pp. 458–468, May 2015, doi: 10.1038/ng.3273.