

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**FACULTÉS DE MÉDECINE**

---

ANNÉE 2017

2017 TOU3 1597

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**  
**MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Aurore SIEGFRIED-VERGNON**

le 04 Octobre 2017

**RAD18 ET GLIOBLASTOME, VERS UN NOUVEL OUTIL**  
**DE RADIOSENSIBILISATION**

Directeur de thèse : Pr Emmanuelle URO-COSTE

**JURY**

Madame le Professeur Marie Bernadette DELISLE	Président
Madame le Professeur Elizabeth COHEN-JONATHAN MOYAL	Assesseur
Madame le Professeur Janick SELVES	Assesseur
Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE	Assesseur
Monsieur le Professeur Franck Emmanuel ROUX	Suppléant

**TABLEAU du PERSONNEL HU**  
**des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier**  
**au 1<sup>er</sup> septembre 2016**

**Professeurs Honoraires**

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHORE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. CABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. ESCAT Jean		
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel		
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques		
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard		

**Professeurs Émérites**

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur SALVAYRE Bernard
Professeur MURAT	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur LOUVET P.	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur Jacques LAGARRIGUE
Professeur CARATERO Claude	
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	
Professeur COSTAGLIOLA Michel	
Professeur ADER Jean-Louis	
Professeur LAZORTHES Yves	
Professeur LARENG Louis	
Professeur JOFFRE Francis	
Professeur BONEU Bernard	
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	
Professeur MAZIERES Bernard	
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth	
Professeur SIMON Jacques	
Professeur FRAYSSE Bernard	
Professeur ARBUS Louis	

## FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépatogastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BONNEVILLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BRASSAT David	Neurologie	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie	M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. GAME Xavier	Urologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. LOPEZ Raphael	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale	M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. LANGIN Dominique	Nutrition	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne	M. PERON Jean-Marie	Hépatogastro-Entérologie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. MALAVAUD Bernard	Urologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique	Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses	Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. MAZIERES Julien	Pneumologie	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie		
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépatogastro-Entérologie		
<b>P.U. Médecine générale</b>		<b>P.U. Médecine générale</b>	
M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale	M. MESTHÉ Pierre	Médecine Générale
		<b>P.A Médecine générale</b>	
		POUTRAIN Jean-Christophe	Médecine Générale

# FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

## P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARLET Philippe (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis	Hépto-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Héliène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LAURENT Guy (C.E)	Hématologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophthalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MARTY Nicole	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP Patrice (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

## P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STÓWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. LAFFOSSE Jean-Michel	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LEGUEVAQUE Pierre	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

**M.C.U. - P.H.**

M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétique
Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
M. MONTOYA Richard	Physiologie
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophthalmologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIÈRES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie

**M.C.U. Médecine générale**

M. BRILLAC Thierry

**M.C.U. - P.H.**

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

**M.C.U. Médecine générale**

M. BISMUTH Michel	Médecine Générale
M. BISMUTH Serge	Médecine Générale
Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves  
Dr CHICOULLAA Bruno  
Dr IRI-DELAHAYE Motoko  
Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre  
Dr ANE Serge  
Dr BIREBENT Jordan

A notre Maître et Présidente du jury,

**Madame Le Professeur Marie-Bernadette DELISLE**

Vous nous faites l'honneur et le plaisir de présider ce jury de thèse.

Nous avons eu la chance de bénéficier de votre enseignement et de votre expérience tout au long de notre internat. Nous admirons l'étendue de vos connaissances, votre rigueur scientifique, votre pédagogie, votre disponibilité et votre gentillesse. Les différents travaux que nous avons partagés ont été des plus formateurs.

Nous vous en remercions et vous prions de trouver ici l'expression de notre gratitude et notre profond respect. Nous espérons honorer la confiance que vous nous accordez.

A notre jury de thèse,

**Madame Le Professeur Elizabeth COHEN-JONATHAN MOYAL**

Nous sommes heureuse et honorée de vous compter parmi les membres du jury.

Votre expertise scientifique et diagnostique ainsi que vos qualités d'enseignant sont un modèle pour nous. Vous nous avez fait l'honneur de nous accueillir dans votre équipe de recherche durant notre Master 2 de recherche et dans le cadre de ce projet de recherche. Nous espérons nous montrer digne de la confiance que vous nous accordez.

Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

A notre jury de thèse,

**Madame Le Professeur Janick SELVES**

Nous sommes heureuse et honorée de te compter parmi les membres du jury.

Nous admirons ta rigueur, ton expertise diagnostique et scientifique ainsi que tes qualités d'enseignante. Nous te remercions pour ta disponibilité, ta gentillesse, tes conseils, et les réponses toujours éclairées à nos nombreuses questions.

Apprendre à tes côtés a toujours été un plaisir.

A notre directrice de thèse,

**Madame Le Professeur Emmanuelle URO-COSTE**

Tu nous as fait l'honneur de nous proposer ce travail de thèse et de le diriger.

Nous te sommes reconnaissante de nous avoir accompagnée tout au long de notre internat, depuis les premiers mois jusqu'à aujourd'hui. Ton enthousiasme et ton soutien ont été d'une grande aide tout au long de notre formation. Nous admirons tes qualités professionnelles et pédagogiques, ta capacité à mener de front autant de projets, et avant tout tes qualités humaines. Nous te remercions pour ta gentillesse, ta bienveillance, ta disponibilité, ta confiance et tes précieux conseils même à l'autre bout du monde.

Nous espérons nous montrer digne de ta confiance.

A notre jury de thèse,

**Monsieur le Professeur Franck-Emmanuel ROUX**

Vous nous faites l'honneur et le plaisir de siéger à ce jury de thèse et nous vous en remercions. Nous n'avons pas eu l'honneur de travailler dans votre service, mais nous connaissons et nous admirons vos qualités professionnelles.

Soyez assuré de notre plus grand respect.

**Je souhaite remercier tout particulièrement les personnes qui m'ont aidée au cours de ce travail :**

Domenico, je vous remercie de m'avoir confié cette partie du projet RAD18 et Glioblastome. Votre disponibilité, vos conseils et votre enthousiasme ont été des moteurs tout au long de ce travail.

Chames et Lenka, je vous remercie pour ces échanges de nouvelles idées et de protocoles qui permettent d'avancer un peu plus à chaque rencontre. Chames, bonne chance dans ta nouvelle vie de Post Doc.

Toute l'équipe 11 du CRCT, je vous remercie tous pour vos conseils et votre aide.

- Christine, je vous remercie de m'avoir accueilli dans cette équipe où je me sens si bien.

-Aline, je te remercie pour tous tes conseils et tes astuces à chaque difficulté ou bizarrerie de western blot et de culture cellulaire.

- Cathy, je te remercie pour ta gentillesse et tes conseils tout au long de ce projet.

- Laurent, je te remercie pour toutes ces questions auxquelles j'ai tenté de répondre en allant toujours plus loin dans mes manips.

-Valou, je te remercie pour tous tes conseils à chacune de mes questions « métaphysiques ».

- Anthony, merci pour tes conseils et de m'avoir plus d'une fois tenu compagnie les vendredis après-midi de manips.

- Caro, mon experte en cellules souches et en injection intracrânienne de souris. Merci pour ton aide tout au long de ce projet. La culture de cellules souches m'a fait beaucoup moins peur après en avoir discuté longuement avec toi.

- Julie, tu es partie vers d'autres horizons américains. Un immense merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton aide tout au long de ce projet. Tes talents de danseuse et nos chorées partagées me manquent.

- Laurette, je te remercie pour tout : ton écoute, tes conseils dans les périodes un peu compliquées de ce master et après. Je me suis un peu éloignée cette dernière année mais je pense fort à toi.

- Pauline, petit chat, merci pour ton aide à mes débuts. Tu es la seule à savoir faire d'aussi belles boucles dans mes cheveux !

- Sabrina, tes récits de LA m'ont fait voyager et rêver.

- Perrine, merci pour ton aide et tes conseils. Vive l'année 1986 !

- Florent, nous avons découvert les méandres du Western Blot ensemble. Merci pour ton humour décapant qui casse même les bouteilles les plus solides.

- Marie Julie, merci pour ton aide et ton humour tout au long de mon stage. J'espère que tes chinoiserries se passent bien...

- Annie, tu es arrivé un peu plus tard. Merci de poursuivre le projet et de le développer.

Audray, ton aide pour la mise au point de l'immunohistochimie de RAD18 a été très précieuse. Je remercie Jessica, Laurence, Julien, Armelle, Arielle et Mireille pour leur aide dans la réalisation du marquage de tous ces cas.

François Xavier, Gabrielle, Stéphanie et Evelyne d'avoir scanné toutes ces lames.

Nadine, je te remercie pour ton aide et ta bonne humeur dans l'exploration des stocks de blocs et de lames jusqu'à Logidos. Promis, je note mon nom et la date partout....

## **Merci à tous ceux qui m'entourent et ont toujours été là..**

### **A l'ensemble du service d'Anapath**

A tous les médecins pour votre enseignement, votre disponibilité, et votre patience depuis mon arrivée en Anapath.

Jacqueline, merci pour ta disponibilité et ta bienveillance. Apprendre la pathologie placentaire et la fœtopathologie à tes côtés est un vrai moment de plaisir. Je te remercie pour tout le temps que tu m'accordes, de répondre à l'ensemble de mes questions et de m'avoir permis de publier mon premier article. J'espère être digne de ta confiance.

Mr Brousset, Laurence, Monique, Anne, Isabelle D, Philippe, Véronique, Eliane, Isabelle R, Béatrice, Marie Laure, Marie D, Sophie L, Magali C, Raphaëlle, Camille L, Emilie, Florence, Dominique, Céline B, Solène, Chantal, Martine, Nada. Je vous remercie pour tout.

Merci à ceux qui ont quitté le service et qui m'ont beaucoup appris : Mme Escourrou, Magali L, Céline G, Laëtitia, Virginie, Caroline et Fabrice.

Une pensée pour Cathy dont le souvenir nous pousse chaque jour plus loin.

#### *Aux anciens assistants devenus PH:*

- Emilie, mes débuts en dermatopathologie à tes côtés, ont été un vrai plaisir.
- Florence, j'ai toujours adoré travailler à tes côtés. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble et aux nombreux autres à venir!

#### *A mes anciens co-internes devenus assistants :*

-Gwendoline, première co-interne. Nous venions toutes deux du « Nord ». Notre duo infernal fut une épopée sympathique et un massacre pour ces pauvres thyroïdes. Heureusement ceci n'était qu'un début. Merci pour ces semestres passés à tes côtés.

-Claire I, Merci pour tous tes conseils, ton soutien, tu as été un pilier dans ces débuts de séniorisation. Grâce à toi j'ai pris un peu plus confiance en moi. Tu as été un véritable ange gardien. Une dernière chose, tes meringues sont fantastiques !

-Romain, premier formateur de macro. Comme tu peux le voir pas encore de bébé. Et comme je te le répète depuis 6 ans maintenant, ça va être toi le premier !!!!

- Maxime, un grand merci pour le mot de dédicace sur ta thèse. A chaque moment difficile, je le relisais et ça me redonnait un peu de confiance.

- Camille F, un grand merci pour ton écoute et tes conseils. Tes connaissances m'ont toujours poussé à aller plus loin !

-Audrey, ma voisine de bureau. Toujours à l'écoute des autres, tu m'as soutenu énormément ces derniers mois et permis de prendre un peu confiance en moi. Un grand merci !!! Comme tu le dis si bien « c'est ça les amis ».

*A mes co-internes :*

- Julie, toute douce et gentille. Très contente de te retrouver et de découvrir ensemble ces nouveaux horizons.

-Anne Cha, ta bonne humeur et tes éclats de rires ont marqué ces années. Je suis triste que tu partes mais heureuse que tu te rapproches de ta famille.

-Laure, ton franc parlé et ta bonne humeur ont illuminé toutes ces années. Reste comme tu es !!! C'est toi la prochaine thésarde !!

-Sarah, allez dernière ligne droite pour toi. Plein de courage pour la suite!

-Quentin, quelques sacrés fous rires, quelques chamailleries... C'est dur de devenir grand ! Mais tu vas voir c'est pas si mal et on peut toujours porter un boa rose de temps en temps.

-Sébastien, j'espère que tu es prêt à reprendre les rênes du « référent d'Anapath ». Je suis sûre que tu te débrouilleras comme un chef !!!

-Charlotte, le M2R ce n'est qu'une année ! On ne comprend pas toujours tout au début mais ça vient vite, Courage miss !!

-Alix, très discrète, toute douce et toujours hyper efficace. Une super Anapath !!

-Cécile, une machine de guerre de la macro, une table pleine sur deux étages même pas peur !

-Claire R, très heureuse pour ton inter-CHU. Fait un coucou à la Réunion pour moi !!

-Gabrielle, mon écolo préférée. Je pense à toi à chaque café.

-Justine, ta bonne humeur et ton sourire nous illumine chaque jour! Tu es sur la bonne voie pour devenir la reine des plannings !

-Lisa, tu m'as énormément touchée. Je suis sûre que si tu prends confiance en toi, tout ira bien.

-Margot, ta bonne humeur, ton humour, ton sourire et ton sérieux dans le travail font de toi une super co-interne. Ça été un véritable plaisir de partager cette dernière année d'internat avec toi.

-Anna, ma pro de l'informatique ! Au moindre souci d'ordinateur tu es toujours là ! Merci !

-Guillaume, J'espère que tu es prêt. Encore un an avec des garçons comme co-internes et après tu risques d'être une espèce en voie de disparition...

Et à tous ceux que j'ai croisés lors d'une escapade en Anapath : Michaël, Romulus, Laureline, Gauthier, Pierre, Florent, Claire U, Anne, Juliette, Noëlle, Oubada, David, Baptiste et Sarah.

A tous les techniciens du service, Virginie, Anaïs, Marie, Marylène, Gisèle, Chantal S, Chantal C, Aurélia, Brigitte, Nicolas, Benjamin, Marion, Marjorie, Thomas, Julien, Charley, Audray, Sophie D, Mireille, Arielle, Evelyne, Gabrielle, Isabelle, Armelle, Mélanie, Justine, Jessica, Dévy, Laura, Sylvie, Laurence, Flavien, Céline, Cécile, Emma, Stéphanie, Lucie, Marie-Claude, Maryse, Nadine, Angélique, Séverine, Véronique, Danièle, Maryse, Nadine, Justine L, Ann, Aurore, Charlène et ceux qui sont partis : Alan, Sandy, Guylaine, Audrey,

Michelle, Emilie, Marie-Christine. Un grand merci pour tous ces moments partagés à vos côtés.

Aux ARC, Nadia, Samira, Estelle et Marion que ferions-nous sans vous !

A Katia, pour ta patience à chaque fois que nous faisons des erreurs sur Kalilab.

A Doriane pour son aide informatique précieuse.

A toutes les secrétaires, Marie-Jo, Sandrine, Delphine, Dounia, Hélène, Marie-France, Ludivine, et celles qui sont parties Sylvie, Virginie et Yolande.

Merci aux cadres du service, Béatrice et Myriam, et à leur bonne volonté pour que tout fonctionne bien !

A David et Frédéric pour leur aide dans chaque nouveau projet de recherche et découverte.

A l'équipe de recherche de Raugeil, Yvan, Mélanie, Sandrine, Najat et Serge. Une pensée particulière à Yvan qui m'a aidé dans tous mes projets de biologie moléculaire et à Najat (Ta bonne humeur, ton sourire et ton expertise en immunohistochimie m'ont sauvé bien des fois).

### **Aux différents services qui m'ont accueillie**

L'équipe du service de Gynéco-obstétrique d'Auch : Mr Hoppeler, Véronique, Clémentine, Céline et toutes les sages-femmes de l'équipe. Merci de m'avoir fait découvrir cette merveilleuse spécialité. J'ai passé un de mes meilleurs semestres à vos côtés. Céline tu as été une formatrice et une amie magique, comme tu le dis si bien « un petit bijou ».

L'équipe de Génétique de Purpan, l'équipe médicale : Pr Calvas, Dr Bieth, Nicolas, Adeline Sophie, Delphine, Dominique, Christelle et Laetitia (merci pour ces discussions à l'orée de la porte de ton bureau, que de bons moments partagés !!! Ca me manque !!! ) l'équipe technique : Béatrice, Elisabeth, Grégory, Joëlle, Sandy, Véronique, Geneviève, Gérard, Didier, Sandra, Claire V, Claire, Véra, Elise, Martine, Michelle, Ludivine, Cathy et mes co-internes Valentine, Julie, Charlotte (on se retrouve l'année prochaine mais de mon côté de la barrière cette fois), Olivier (ton humour décalé et tes connaissances m'ont toujours impressionnés), Hélène (nous nous sommes retrouvées dans les détours de ce semestre de génétique mais quelle expérience hors du commun!!!). Cette année a été riche en émotion et en rencontre. Je vous remercie de votre confiance tout au long de ce stage.

## **A mes amis**

*De toujours ou presque,*

Kelly, je t'ai rencontrée dans un avion pour la Nouvelle Calédonie, il y a bientôt 30 ans. Un grand merci à toi et merci Benji de nous avoir accueilli dans cette jolie ville rose et d'avoir suivi au fur et à mesure mes aventures d'interne.

Coralie, merci d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments. Tu ne pourras pas être présente en ce grand jour mais je sais que tu penseras à moi. C'est pour mieux se retrouver sur Paris autour d'une pizza aux quatre temps.

Kévin, que de chemin parcouru depuis la piscine des Bords de Loire, je suis très heureuse de t'avoir retrouvé en cette année décisive pour moi. Merci pour tous tes coups de fils auxquels je ne répons pas tout le temps, tu n'as pas idée du soutien que c'est chaque jour.

Marinou, on ne se voit pas beaucoup ces dernières années mais à chaque message et coup de fil c'est comme si on ne s'était jamais quittées. Hâte de pouvoir te revoir toi et ta petite famille!

*Aux copines de fac,*

Pauline alias « Popsinette », quel plaisir de partager tous ces moments avec toi et tellement heureuse que tu sois toi aussi à Toulouse. Merci pour ton soutien toutes ces années et d'avoir relu ma thèse. Que ce soit les séances « shopping » ou « zumba », je ne vois plus ma vie Toulousaine sans toi et Momo bien sûr !! A quand la prochaine escapade à quatre pour affronter le « shambala » de nuit et au premier rang ?

Chloé, très heureuse de t'avoir retrouvée au cours de cet internat. J'admire ton indépendance et ta volonté à toute épreuve. Un grand merci maman Chloé.

Gaëlle, tu as été un soutien et une amie durant toutes ces années. Tu as vu mes joies, mes peines et tu es toujours là !

*Aux copains toulousains,*

Jérem, un grand merci pour tes messages d'encouragement tout au long de cette épreuve compliquée : l'internat (que tu découvres chaque jour avec Flo). Ça été un moteur dans ces moments difficiles. Un grand merci !!

Anne So et Vincent, les copains de Bad devenus au fil des balades et des barbecues des copains tout court. Merci pour votre aide et vos corrections de tous les manuscrits que j'ai pu rendre ces dernières années.

Gillou, Marion, et Elias, Voisins de paliers, devenus amis. Merci pour ce weekend d'évasion autour de votre union.

Emilie, sans oublié Philo, découverte du foot féminin et de ta bonne humeur autour de soirées crêpes mémorables et de randonnées !!

Marie, tu m'as fait découvrir la zumba, sortir de temps en temps des sentiers battus, et surtout tu es toujours partante pour de nouvelles aventures ! Merci d'être là, de m'écouter et de m'offrir ton amitié chaque jour.

Anaïs et Laure merci pour ces sorties jusqu'au bout de la nuit !!! Ça m'a fait tellement de bien cette année !! Il faudra remettre ça dès que possible.

Aurélia, je n'ai que quelques mots à dire : « Vive le vent, Vive le vent d'hiver » en plein mois d'Août c'est normal ! Merci pour ton écoute chaque jour.

Thomas, c'est promis je resterai éternellement ton bébé médecin. A quand le prochain mach de tennis ?

Lucie, merci d'illuminer à coup de « lumos » les moments plus difficiles. (Aurore Sparrow au bandeau rouge).

*Aux copains Ardéchois*

Nos pérégrinations en terres Arméniennes et nos retrouvailles à chaque mariage (et bientôt naissances) font de chaque instant partagé un souvenir indélébile !!! Merci à tous et toutes d'être là !!! Flo (le roi de la batterie qui m'impressionne à chaque morceau), Mathilde (toute douce, tu seras une merveilleuse maman), Maël (tu vois finalement la thèse ce sera la même année que moi ! Courage !), Julie (Nos discussions me font voyager à chaque fois), Steph (Ton caractère de feu dans lequel je me retrouve souvent et ton amitié sont essentiels !!!!), Jean (tu vois maintenant tu dis « nous » plus souvent), Marina (Ta joie de vivre et ta douceur sont un vrai bonheur) et Alex (mon chien fou préféré qui va devenir papa, Waouh).

## **A ma famille, sans qui je ne serai pas là...**

Ma Mamounette, tu es toujours là. A n'importe quelle heure du jour et de la nuit, tu m'écoutes, me conseilles et m'aides dans la vie de tous les jours. Tu es ma maman mais aussi ma meilleure amie, il n'y a personne au monde qui me connaisse aussi bien que toi. Merci pour tout Mamoun, ce travail c'est aussi le tien tu sais. Je t'aime fort fort fort.

Mon Papou, tu es un exemple pour moi. Tu m'as appris à ne jamais baisser les bras quelle que soit la situation, ta volonté devient la mienne au fil du temps. Tu es la fondation de mon travail, je ne serai pas là sans toi, ne l'oublie jamais. Je resterai toujours ton bébé chat.

Ma grande sœur Patricia, mes poussinettes d'amours Estrelia et Maelline et mon beau-frère Stéphane, un énorme merci pour vos messages et votre soutien durant toutes ces années de médecine. Ça n'a pas toujours été facile mais voilà c'est la fin ! Je vais enfin pouvoir profiter de vous autant que je le souhaite ! Je vous aime.

Mon grand frère Ralph, ma belle-sœur pleine de tendresse Clémentine, et mes deux petits chatons Zoé et. Luce. Tellement heureuse de vous retrouver et de vous voir si bien. Nos rencontres sont ma force pour affronter les moments plus difficiles. Merci pour votre amour...

Mon neveu déjà grand Adrien et sa chérie Alex, Toulouse devient un lieu de retrouvaille familiale grâce à vous deux. La découverte de nouveaux lieux gastronomiques est toujours un bon moment à vos côtés et ceux de François et Frédérique. Merci pour votre aide dans l'élaboration de cette thèse.

Ma deuxième maman et mon deuxième papa, votre amour, votre soutien, vos petits mots sont chaque jour un moteur qui me permet d'avancer. La Nouvelle Calédonie c'est loin mais avec Skype vous restez à mes côtés. Je vous aime de tout mon cœur.

Tatie Lili, tu ne peux pas être près de moi en cet instant mais tu restes dans mon cœur à chaque instant que Dieu fait. Comme tu me l'as dit si bien « tout est dans mes mains », tu vois j'ai atteint une nouvelle étape. Tatie Lène, ton courage est pour moi un exemple chaque jour. Marraine, je vois un peu de toi dans chacun de mes gestes. Vous me manquez tellement toutes les trois.

Michael, mon grand cousin, ton petit docteur devient grand. Vivement ce voyage à la Réunion pour te revoir et rencontrer la femme qui partage ta vie.

Et le reste de la famille Réunionnaise : Ma Mamie, Mes Oncles et Mes Tantes, Tonton Jacky, Tatïe Myrose, Tonton Jean, Tatïe Marie-Jeanne, Tonton Pierre, Tatïe Liliane, Tonton Christophe, Tatïe Suzie, Tonton Paul, Tonton Serge, Mairaine, Tonton Harry, Tatïe Jacqueline, Mes Cousins et Cousines, vous êtes tous dans mon cœur. Mi aime a ou !

Tatie Bernadette et Tonton Michel, vous veillez sur moi depuis notre retour en métropole. Vous m'avez vue grandir, merci pour votre amour.

Jade merci pour ton amour toutes ces années. Heureuse de vous voir à Toulouse avec Patrick.  
Pascale et Angelo merci pour votre amour et votre soutien toutes ces années.

Ma belle Famille, Elie et Babette, comme je suis heureuse de faire partie de votre famille. Vous m'avez tant apporté au cours de ces dernières années. Votre amour a été une force de plus dans cette aventure qu'est la médecine. Un énorme bisou et un grand merci à vous deux.

Je ne peux pas tous vous citer la famille Vergnon-Crouzet est trop nombreuse ! Merci de m'avoir accueillie dans votre si belle famille.

Une pensée particulière pour Sonia et Pierre, merci pour ces week-ends d'évasion en terre inconnue et vos appels tout au long de l'internat. Karine, Fabrice et vos petits loups, vous rayonnez de bonheur et ça illumine nos week-ends ardéchois. Nathalie, vivement le prochain concert d'Indochine, nouvel album déjà sorti !!

**A mon mari, Chaton,**

Je ne suis pas sûre que ces quelques mots suffisent à exprimer ce que je ressens. Tu as su me comprendre, m'apprivoiser et surtout prendre soin de moi au cours de ces neuf dernières années. Et surtout cette dernière qui ne fut pas des plus faciles pour toi.... Merci pour ton amour, ta tendresse qui a su tempérer les flammes de mon caractère bien trempé. Tu es mon meilleur ami, la personne en qui j'ai le plus confiance. Ce travail n'aurait pas été le même sans toi. Je t'aime tout simplement.

**RAD18 ET GLIOBLASTOME, VERS UN  
NOUVEL OUTIL  
DE RADIOSENSIBILISATION**

# TABLES DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	5
1 INTRODUCTION .....	7
2 GENERALITES .....	8
2.1 LES MODIFICATIONS APPORTEES PAR L'OMS 2016 .....	8
2.2 GLIOBLASTOME IDH SAUVAGE .....	8
2.2.1 <i>Épidémiologie</i> .....	8
2.2.2 <i>Localisation</i> .....	8
2.2.3 <i>Caractéristiques cliniques</i> .....	9
2.2.4 <i>Caractéristiques radiologiques</i> .....	9
2.2.5 <i>Genèse des glioblastomes primaires</i> .....	10
2.2.6 <i>Génétique</i> .....	11
2.2.6.1 Mutations du gène IDH.....	11
2.2.6.2 Cytogénétique et anomalie chromosomique.....	11
2.2.6.3 Epidermal Growth Factor (EGFR) .....	11
2.2.6.4 Voie du Récepteur à la tyrosine kinase/PI3K/PTEN/AKT/mTOR .....	12
2.2.6.5 La voie p53/MDM2/p14RF.....	12
2.2.6.6 La voie CDKN2A/CDK4/Rb .....	13
2.2.6.7 Mutation du promoteur TERT.....	13
2.2.6.8 Anomalies épigénétiques.....	13
2.2.7 <i>Syndrome de prédispositions</i> .....	14
2.2.7.1 Le Syndrome de Lynch et ses variantes .....	14
2.2.7.2 Le syndrome de Li-Fraumeni .....	14
2.2.7.3 La Neurofibromatose de type 1 (NF1) .....	15
2.2.8 <i>Processus d'invasion du Glioblastome</i> .....	16
2.2.8.1 Mécanisme d'invasion .....	16
2.2.8.2 Gliomatose cérébrale.....	16
2.2.8.3 Métastases.....	16
2.2.9 <i>Anatomopathologie des glioblastomes</i> .....	17
2.2.9.1 Macroscopie.....	17
2.2.9.2 Microscopie .....	17
2.2.9.3 Immunohistochimie .....	18
2.2.9.4 Aspects particuliers des GB .....	19
2.2.9.5 Les différents variants.....	21
2.2.10 <i>Traitement</i> .....	24
2.2.10.1 Protocole Stupp.....	24
2.2.10.2 Thérapie ciblée.....	26
2.2.10.3 Immunothérapie .....	28
2.2.10.4 Optune ®.....	30
2.2.11 <i>Principales lésions de l'ADN et les différents systèmes de réparation</i> .....	30
2.2.11.1 TMZ.....	30
2.2.11.2 Radiothérapie .....	33
2.2.12 <i>Résistance au traitement</i> .....	35
2.2.13 <i>Facteurs pronostiques</i> .....	36
2.2.13.1 Age.....	36
2.2.13.2 Etat clinique et cognitif.....	36
2.2.13.3 Localisation et taille du GB.....	36

2.2.13.4	Résection chirurgicale.....	36
2.2.13.5	Histopathologie.....	36
2.2.13.6	Facteurs pronostiques en imagerie.....	37
2.2.13.7	Facteur pronostiques biologiques.....	37
2.3	RAD18.....	40
2.3.1	<i>RAD18 et la synthèse Translésionnelle (TLS)</i> .....	41
2.3.2	<i>RAD18 et Recombinaison Homologue (RH)</i> .....	42
2.3.3	<i>RAD18 et Ligature des extrémités non homologues(NHEJ)</i> .....	43
2.4	RAD18 ET GLIOBLASTOME.....	43
3	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	44
4	MATERIELS ET METHODES.....	45
4.1	IN VITRO.....	45
4.1.1	<i>Lignées cellulaires</i> .....	45
4.1.1.1	Cellules différenciées.....	45
4.1.1.2	Cellules initiateurs de glioblastome (GIC).....	45
4.1.2	<i>Transfection par Small Interferions ARN (siARN)</i> .....	45
4.1.3	<i>Transfection par Small Harpin ARN (shARN)</i> .....	45
4.1.3.1	Sous forme de plasmide.....	45
4.1.4	<i>Irradiation</i> .....	46
4.1.5	<i>Test de survie</i> .....	46
4.1.6	<i>Activité Caspase 3/7</i> .....	46
4.1.7	<i>Cytométrie en flux</i> .....	46
4.1.7.1	Analyse de la mort cellulaire par double marquage Annexine V / Iodure de Propidium (IP).....	46
4.1.7.2	Cycle cellulaire par marquage IP.....	47
4.1.8	<i>RT PCRq</i> .....	47
4.1.8.1	Extraction des ARNs et réaction de Reverse Transcription (RT).....	47
4.1.8.2	PCRq.....	47
4.1.9	<i>Western Blot</i> .....	48
4.1.9.1	Lyse des cellules et dosages protéiques.....	48
4.1.9.2	Migration et transfert des protéines.....	48
4.1.9.3	Immunoblots.....	48
4.2	SELECTION DE PATIENT.....	49
4.2.1	<i>Recueil de données</i> .....	49
4.2.2	<i>Immunohistochimie</i> .....	49
4.2.2.1	Protocole technique.....	49
4.2.2.2	Interprétation.....	50
4.3	ANALYSES STATISTIQUES.....	50
5	RESULTATS.....	51
5.1	CONTROLE DE L'EFFICACITE DES SIARN ET DES SHARN DANS LES GIC ET LES LIGNEES ATCC DE GB.....	51
5.1.1	<i>Efficacité de la transfection transitoire avec siARN spécifiques de RAD18</i> .....	51
5.1.2	<i>Transfection stable des shARN ciblant RAD18 dans la lignée U87</i> .....	52
5.2	ÉTUDE DE L'EFFET RADIO SENSIBILISANT DE L'INHIBITION DE RAD18 DANS LES CELLULES ATCC DE GB ET LES GIC.....	53
5.2.1	<i>Effet sur le nombre de cellules</i> .....	53
5.2.2	<i>Effet sur la formation des neurosphères</i> .....	54
5.2.3	<i>Effet sur la survie</i> .....	55
5.2.4	<i>Effet sur l'apoptose</i> .....	56
5.2.5	<i>Effet sur le cycle cellulaire</i> .....	58
5.3	ETUDE DES MECANISMES DE LA RADIO SENSIBILISATION DES CELLULES.....	60

5.3.1	<i>Effet sur les cassures double brins</i> .....	61
5.3.2	<i>Expression des effecteurs de la réparation par RH</i> .....	61
5.3.3	<i>Expression des effecteurs de la réparation par NHEJ</i> .....	61
5.4	ETUDE DE L'EXPRESSION DE RAD18 SUR DES GB DE PATIENT .....	62
5.4.1	<i>Caractéristiques générales de la population</i> .....	62
5.4.2	<i>Données immunophénotypiques</i> .....	64
5.4.2.1	Score IRS .....	65
5.4.2.2	Score H .....	65
5.4.2.3	Comparaison des scores H et scores IRS.....	65
5.4.2.4	Comparaison des GB au diagnostic et à la récurrence.....	66
5.4.3	<i>Corrélation entre l'expression de RAD18 et d'autres marqueurs</i> .....	66
5.4.3.1	Sexe-ratio .....	66
5.4.3.2	Âge.....	66
5.4.3.3	p53 .....	67
5.4.3.4	MIB1 .....	68
5.4.3.5	MGMT .....	68
5.4.3.6	EGFR .....	69
5.4.3.7	ATRX .....	69
5.4.4	<i>Corrélation entre l'expression de RAD18 et la survie</i> .....	69
6	DISCUSSION .....	70
7	PERSPECTIVES .....	74
8	CONCLUSION.....	75
9	BIBLIOGRAPHIE .....	76

## Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique  
ARN : Acide ribonucléique  
ATCC : *American Type Culture Collection*  
BER : *Base Excision Repair*  
Cho : Choline  
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
EGF : *Endothelial Growth Factor*  
FDA : *Food and Drug Administration*  
FGF : *Fibroblast Growth Factor*  
GB : Glioblastome  
GIC : *Glioblastoma initiating cell*  
Gy : Gray  
IDH : *Isocitrate Déshydrogénase*  
IP : Iodure de Propidium  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
IRS : *ImmunoReactive Score*  
Ku: Hélicase II de l'ADN, ATP dépendante  
OMS : Organisation Mondiale de Santé  
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*  
MDM2 : Murine Double Minute 2  
MGMT : *O6-Methyl Guanine-DNA Methyl Transférase*  
MMR : *MisMatch Repair*  
mTOR : *Mammalian Target Of Rapamycin*  
NAA : N-Acétyl Aspartate  
Néo : *Néomycine*  
NHEJ : Ligature des extrémités non homologues  
NS : Neurosphères  
PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*  
PCRq : *Polymerase Chain Reaction quantitative*  
PI3K : *Phosphatidylinositol-3 Kinase*  
RAD18 : *DNA repair 18*  
RAD51 : *DNA repair 51*  
RAD54 : *DNA repair 54*  
RI : Radiations Ionisantes  
RGB1 : Première récurrence de glioblastome  
RH : Recombinaison Homologue  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
RPA : *Replication Protein A*  
RT : Radiothérapie  
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase  
ShClt : *Small Harping* ARN contrôle  
shRAD18 : *Small Harping* ARN dirigé contre RAD18  
siClt : *Small Interfering* ARN contrôle  
siRAD18 : *Small Interfering* ARN dirigé contre RAD18  
SVF : Sérum Veau fœtal  
TCGA : *The Cancer Genome Atlas*  
TLS : Translésionnelle  
TMZ : Témzolomide

# Liste des figures et tableaux

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) d'un GB envahissant le lobe frontal droit.....	10
Figure 2 : Les principales caractéristiques des GIC .....	11
Figure 3 : Critères diagnostiques des GB .....	18
Figure 4 : GB avec composante neuronale primitive .....	20
Figure 5 : GB épithélioïde.....	21
Figure 6 : GB à cellules géantes.....	22
Figure 7 : Gliosarcome.....	23
Figure 8 : Schéma du protocole Stupp <sup>2</sup> .....	24
Figure 9 : Réparation de la O6-methylguanine par l'enzyme MGMT.....	31
Figure 10 : Les différents mécanismes de réparation mis en place par les cellules de GB face au témozolomide.....	32
Figure 11: Les différents systèmes de réparation des cassures double brin de l'ADN : la NHEJ et la RH.....	34
Figure 12 : Schéma de structure de la protéine RAD18 .....	40
Figure 13 : Rôle de RAD18 dans la réplication translésionnelle .....	41
Figure 14 : Rôle de RAD18 dans la RH et la NHEJ.....	42
Figure 15 : Courbe de survie de Kaplan Meyer de l'étude REMBRANDT de 178 GB extraites du site <i>Betastatic</i> .....	44
Figure 18 : Effet de l'inhibition de RAD18 sur la formation de neurosphères. ....	54
Figure 19 : Effet de l'inhibition de RAD18 sur la survie. ....	55
Figure 20 : Effet de l'apoptose dans les cellules de GB et les GIC. ....	56
Figure 21 : Effet de l'inhibition de RAD18 sur le cycle cellulaire. ....	58
Figure 23 : Exemple d'immunomarquage avec l'anticorps anti-RAD18 par immunohistochimie sur 4 cas de GB .....	64
Figure 24 : Comparaison du pourcentage de cellules exprimant p53 en fonction de l'expression de RAD18.....	67
Figure 25 : Comparaison de l'indice de prolifération et de l'expression de P53 dans les GB de patients exprimant ou non RAD18.....	68
Figure 26 : Courbes de survie des patients ayant des GB exprimant ou pas RAD18, sous forme de courbes de Kaplan Meier .....	69

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées au cours de la qPCR .....	47
Tableau 2 : Référence des anticorps utilisés au COURS de la technique de Western Blot .....	49
Tableau 3 : Caractéristiques cliniques et immunophénotypiques des 40 cas de GB de patients.....	63
Tableau 4 : Tableau représentatif des résultats obtenus avec le marquage de RAD18 sur les 40 GB de patient.....	65
Tableau 5 : Comparaison des scores IRS et scores H entre les GB et les récidives.....	66

## 1 Introduction

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales primitives de l'adulte les plus fréquentes. Leur incidence est de 3-4/100000 par an en France. Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2016<sup>1</sup>, elles sont classées au sein des tumeurs de grade IV correspondant au plus haut grade de malignité. Malgré des schémas de traitement de plus en plus précis, leur pronostic reste sombre : la médiane de survie est de 14,6 mois<sup>2</sup>. Ces tumeurs invasives et chimio-radiorésistantes récidivent de façon quasi-systématique<sup>3</sup>. L'exérèse chirurgicale constitue la première ligne de traitement. Elle est suivie d'une radiothérapie fractionnée associée au témozolomide, un agent méthylant oral. Ces traitements créent des lésions de l'ADN dans les cellules cancéreuses<sup>4</sup>. Le but est de saturer les capacités de réparation de ces cellules et ainsi d'induire un arrêt du cycle cellulaire, puis une apoptose ou une mort post-mitotique.

RAD18, une ubiquitine ligase de type E3<sup>5</sup> est impliquée dans de nombreux mécanismes de réparation de l'ADN. Elle a un rôle dans la réparation des cassures double brins. Cette protéine est notamment surexprimée dans les glioblastomes et pourrait être un médiateur important de la résistance aux rayons ionisants. La mécanistique régissant cette résistance n'est pas encore totalement élucidée. Son décryptage pourrait conduire à proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet radio sensibilisant de l'inhibition de RAD18 dans différentes lignées cellulaires humaines de glioblastome (ATCC) et de cellules initiatrices de glioblastomes issues de patients et à connaître son niveau d'expression dans des échantillons tissulaires de glioblastomes. Ce projet pourrait à terme mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique, RAD18, pour restaurer la radiosensibilité des cellules de glioblastome.

## 2 Généralités

### 2.1 Les modifications apportées par l'OMS 2016

La classification proposée par l'OMS des tumeurs du système nerveux central publiée en 2016<sup>1</sup>, intègre pour la première fois des données moléculaires dans le diagnostic de ces tumeurs, en plus des aspects morphologiques et des expressions phénotypiques détectées par immunohistochimie. Ceci entraîne une révolution dans la classification histopathologique et moléculaire de ces tumeurs cérébrales.

Les GB sont définis au sein des tumeurs astrocytaires et oligodendrogiales diffuses. La classification sur les caractéristiques moléculaires est définie par l'existence ou non d'une mutation sur le gène de l'Isocitrate Déshydrogénase (IDH). Ainsi les GB sont séparés en deux groupes distincts : les GB IDH sauvages et les GB IDH mutés. 90 % des GB de novo sont IDH sauvages, les 10 % restant sont des GB IDH mutés. Nous nous intéresserons tout au long de cette thèse au GB IDH sauvage.

### 2.2 Glioblastome IDH sauvage

#### 2.2.1 Épidémiologie

Le GB est la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente chez les adultes : 15 % de toutes les tumeurs cérébrales intracrâniennes et de 45-50 % des tumeurs malignes cérébrales<sup>6,7</sup>. En Europe, son incidence est de 3-4 cas pour 100 000 personnes<sup>6,7</sup>. Cette incidence est très hétérogène en fonction des régions du monde, en Asie son incidence est seulement de 0,59 cas pour 100 000 personnes<sup>7</sup>. Il existe une augmentation de l'incidence de cette tumeur au cours des 30 dernières années ; ceci est notamment dû au vieillissement de la population.

Les GB peuvent se manifester chez des patients de tout âge, mais affectent préférentiellement les adultes. Il existe un pic d'incidence chez les patients qui ont entre 55 et 85 ans. C'est d'ailleurs la seconde tumeur intra crâniale la plus fréquente chez les adultes de plus de 55 ans, après le méningiome<sup>7</sup>. L'âge médian de survenue est de 64 ans. La population masculine est plus touchée par cette pathologie avec un sexe-ratio 1,4 à 1,6 homme pour une 1 femme<sup>7,8</sup>.

#### 2.2.2 Localisation

Les GB se développent préférentiellement en localisation sus tentorielle, au sein de la substance blanche sous-corticale et dans des noyaux gris profonds des hémisphères cérébraux. Les sites les plus affectés sont par ordre croissant : le lobe temporal (31%), le lobe pariétal (24

%), le lobe frontal (23 %) et le lobe occipital (16 %) selon une étude de 987 GB à Zurich<sup>9</sup>. Ces données correspondent à celles trouvées aux États-Unis<sup>7</sup>. En général, l'infiltration tumorale s'étend du cortex au corps calleux et parfois jusqu'au lobe controlatéral.

### 2.2.3 Caractéristiques cliniques

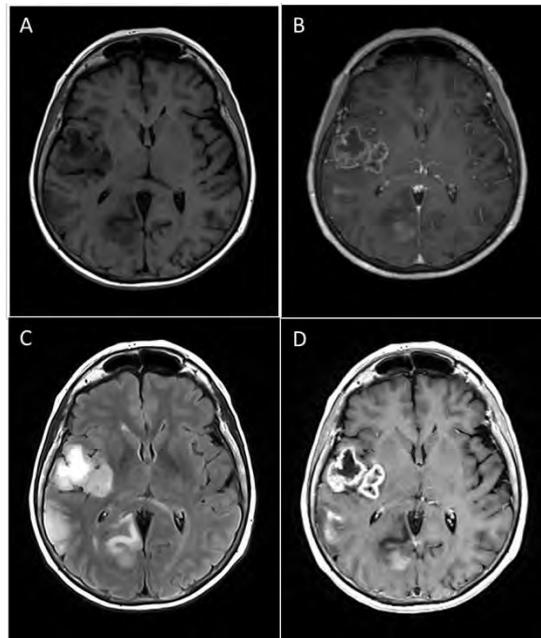
Les GB se développent rapidement, le volume tumoral est souvent important entraînant une hypertension intracrânienne. Les symptômes dépendent de la localisation. Ils se manifestent généralement par un déficit neurologique (hémiparésie et aphasie) et un trouble neurocognitif, il peut s'y associer des troubles du comportement, des nausées et des vomissements ainsi que d'importantes céphalées pulsatiles. Plus de la moitié des cas sont diagnostiqués suite à une crise comitiale inaugurale. Une étude de 677 patients a mis en évidence que le temps entre les premiers symptômes et le diagnostic est inférieur à 3 mois dans 68 % des cas et inférieur à 6 mois dans 84 % des cas<sup>10</sup>.

### 2.2.4 Caractéristiques radiologiques

Le GB apparaît généralement comme une masse au signal hétérogène (Figure 1), liée à la présence de foyers nécrotiques et/ou de formations kystiques aux contours irréguliers, en hypo signal T1, hyper signal T2 et Flair. Après injection de gadolinium, un rehaussement hétérogène nodulaire et/ou plus rarement annulaire est retrouvé dans plus de 98 % des cas<sup>11</sup>. En périphérie de la lésion, il existe une plage en hypo signal T1, hyper signal T2, correspondant à un œdème vasogénique réactionnel associé à un infiltrat tumoral le long des fibres de la substance blanche<sup>12</sup>. Le volume tumoral sera déterminé par les plus grands diamètres de la prise de contraste dans les trois plans de l'espace. La séquence de diffusion qui permet d'évaluer le mouvement aléatoire des molécules d'eau dans les tissus, apprécie la cellularité lésionnelle. La séquence de perfusion permet d'apprécier la microvascularisation tumorale. L'augmentation du volume sanguin cérébral est un marqueur de la néoangiogenèse, permettant d'identifier les zones les plus actives de la tumeur. Elle a principalement un intérêt dans le diagnostic différentiel des abcès ou des tumeurs hyper-cellulaires comme les lymphomes ou les tumeurs neuroectodermiques primitives.

Les séquences de spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permettent une exploration non invasive du métabolisme tumoral. Les signes de prolifération tumorale sont essentiellement une augmentation de la choline (Cho), liée à la synthèse membranaire, et une diminution du N-Acétyl-Aspartate (NAA). Le métabolisme tumoral étant le plus souvent altéré, la créatine est en général diminuée. Dans les GB, on aura également la présence d'un

doublet de lactate et d'un pic de lipides libres, reflète, respectivement, de l'augmentation du métabolisme anaérobie et de la nécrose cellulaire<sup>13</sup>.

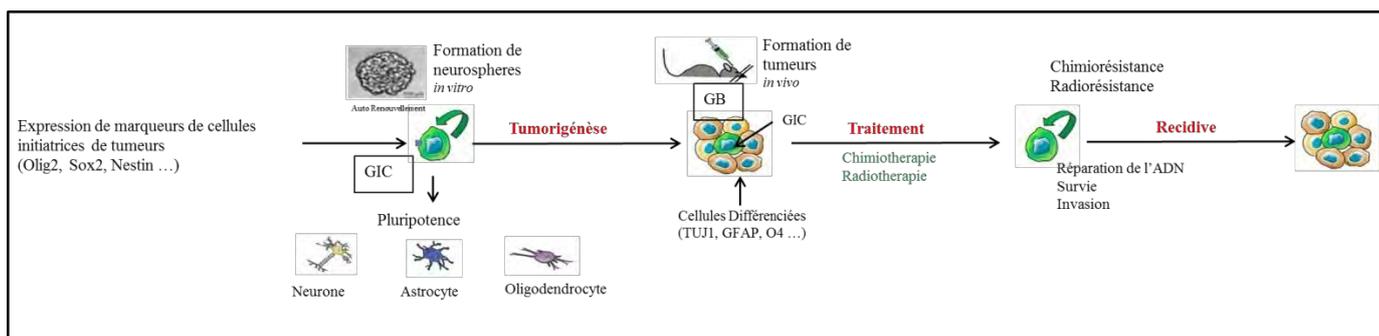


**Figure 1 : Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) d'un GB envahissant le lobe frontal droit.**

*A. Séquence T1 : lésion infiltrante cortico, sous-corticale hétérogène. B. Séquence T1 3D neuronavigation. C. Séquence T2 : la nécrose centrale est hyperintense. D. Séquence T1 avec gadolinium : prise de contraste hétérogène de la lésion soulignant un pourtour charnu périphérique.*

### 2.2.5 Genèse des glioblastomes primaires

L'étiologie et la cellule d'origine de ces GB sont inconnues. L'expression de marqueurs de différenciation astrocytaire par les cellules de GB a longtemps été considérée comme une preuve de la dédifférenciation de ces cellules après transformation. Devant l'hétérogénéité biochimique et génétique importante des cellules de GB, différentes hypothèses ont été exposées : celle d'une cellule précurseur bi potentielle<sup>14</sup> ou d'une cellule primordiale : la cellule souche neuronale<sup>15</sup>, située dans la zone sub-ventriculaire. Certaines cellules aux propriétés similaires aux cellules souches ont été isolées dans les GB : renouvellement cellulaire autonome, expression de marqueurs de régulation du développement et tumorigènes<sup>16</sup> (Figure 2). Ce sont les cellules initiatrices de GB (GIC). Elles ne correspondent qu'à une proportion mineure des cellules tumorales. Ces GIC dériveraient de cellules souches neuronales ayant accumulé des lésions de leur ADN entraînant des mutations sur des gènes « driver » de l'oncogénèse. Ces cellules pourraient conférer des propriétés de croissances illimitées aux cellules tumorales.



**Figure 2 : Les principales caractéristiques des GIC**

## 2.2.6 Génétique

Les GB présentent de nombreuses anomalies génétiques. La cancérogenèse se déroule selon un processus multi-étapes. Les anomalies accumulées sont différentes entre les GB IDH sauvages et les GB IDH mutés.

### 2.2.6.1 Mutations du gène IDH

Les mutations d'IDH sont une signature moléculaire permettant de séparer les GB secondaires des GB primaires.

### 2.2.6.2 Cytogénétique et anomalie chromosomique

Les déséquilibres du nombre de chromosomes dans les GB touchent généralement les chromosomes 7, 9, 10, 13, 19 et 20. Un gain du petit bras du chromosome 7 associé à une perte du bras long du chromosome 10 est l'anomalie la plus fréquemment rencontrée dans les GB<sup>17</sup>. Ceci est souvent associé à une amplification du gène de l'*EGFR*. L'autre déséquilibre fréquemment rencontré est un gain combiné des chromosomes 19 et 20.

### 2.2.6.3 Epidermal Growth Factor (*EGFR*)

Le gène de l'*EGFR* est le gène le plus souvent amplifié au sein des GB, ce qui entraîne une surexpression de la protéine EGFR. Cette amplification touche 40 % des GB primaires et est associée dans 50 % des cas à des réarrangements chromosomiques à l'origine de formes mutées. Le gène *EGFR* amplifié est tronqué dans 20 à 50 % des GB. La forme tronquée la plus fréquente est le variant EGFRvIII<sup>18</sup>. Cette protéine tronquée est activée constitutionnellement et donc indépendante d'un ligand. Cette surexpression est très fortement corrélée à l'existence d'une délétion du chromosome 10<sup>19</sup>, alors que son association avec l'inactivation de p53 n'est que très rarement retrouvée<sup>20,21</sup>.

#### 2.2.6.4 Voie du Récepteur à la tyrosine kinase/PI3K/PTEN/AKT/mTOR

Une anomalie des Récepteurs à la Tyrosine Kinase (RTK) et de la voie de signalisation en aval de ce récepteur est retrouvée dans près de 90 % des GB<sup>18</sup>. En dehors d'*EGFR*, d'autres gènes codant pour des RTK peuvent être amplifiés notamment *PDGFRA* et *MET*. L'amplification de *PDGFRA* est là encore associée à un gène tronqué avec une délétion des exons 8 et 9. Ces amplifications d'*EGFR*, *PDGFRA* et *MET* ne sont pas mutuellement exclusives. Elles peuvent s'observer dans différentes cellules d'une même tumeur, ce qui ne facilite pas la mise en place de traitement ciblé. D'autres gènes deviennent constitutionnellement actifs suite à une translocation comme *FGFR1* avec le gène partenaire *TACCI* ou *FGFR3* avec *TACC3*.

Les mutations et les amplifications du gène PhosphatidyInositol-3 Kinase (PI3K) sont rares au sein des GB, moins de 10 % des cas.

Le gène *PTEN* est situé dans la région 10q23 et code pour une protéine qui joue un rôle dans la prolifération et l'apoptose<sup>22</sup>. Il peut être perdu ou muté dans 15 à 40 % des GB. Cette anomalie est retrouvée exclusivement au sein des GB IDH sauvages.

Une mutation du gène *NFI* est présente dans environ 20 % des GB.

#### 2.2.6.5 La voie p53/MDM2/p14RF

p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 53 kD, codée par le gène *TP53* situé sur le chromosome 17. p53 joue un rôle dans de nombreux processus mais est surtout impliquée dans les mécanismes de réponse aux lésions de l'ADN<sup>23</sup>. Quel que soit le mécanisme d'inactivation de p53 (notamment par mutations inactivatrices ou interaction avec la protéine Murine Double Minute 2 [MDM2]), sa perte de fonction aura pour conséquence la poursuite du cycle cellulaire et l'absence d'apoptose après lésion de l'ADN. La cellule est alors incapable d'assurer l'intégrité du génome<sup>23</sup>, ce qui entraîne une instabilité génétique permettant l'émergence de clones de malignité accrue. Une altération de la voie p53 est observée dans 90 % des GB secondaires mais seulement dans 25 % des GB IDH sauvages.

Une surexpression de MDM2 est un autre mode d'inactivation de p53 qui est observée dans plus de 50 % des GB primaires. La protéine p14RF inhibe la dégradation de p53 par MDM2. Une perte de l'expression p14RF est observée dans 76 % des GB. Cette perte est souvent corrélée avec une délétion ou une méthylation du promoteur de *CDKN2A*.

### 2.2.6.6 La voie *CDKN2A/CDK4/Rb*

Une altération de la voie du rétinoblastome est observée dans 80 % des cas de GB du *The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network*, 2008<sup>18</sup>. La délétion de *CDKN2A* est mutuellement exclusive d'une altération du *RB* dans les GB.

Le locus de *CDKN2A* code également un inhibiteur de *CDKN2A* et de *p14RF*: *CDK4*. L'inactivation de ce gène est retrouvée fréquemment dans les GB. Le gène *CDK4* est amplifié dans 15 % des GB, particulièrement en cas de délétion homozygote de *CDKN2A*<sup>24</sup>.

Les mutations du gène *RB1* sont rares. Il existe plus souvent des pertes d'expression de *RB1* liées à une méthylation de son promoteur dans 43 % des GB.

### 2.2.6.7 Mutation du promoteur *TERT*

La région promotrice de *TERT* contient deux hot spots mutationnels, 80 % des GB sont porteurs de ces mutations<sup>25</sup>. Les mutations du promoteur de *TERT* sont inversement corrélées aux mutations de *p53*. La mutation du promoteur de *TERT* entraîne le recrutement de facteur de transcription spécifique menant à une expression aberrante de *TERT*<sup>26</sup>.

### 2.2.6.8 Anomalies épigénétiques

#### 2.2.6.8.1 Remodelage de la chromatine

Une des fonctions de la chromatine est de maintenir inactives certaines portions du génome à l'aide d'une structure compactée de la chromatine empêchant l'accès aux facteurs de transcription. Un des marqueurs de cet état de compression ou hétérochromatine est la protéine H3.3 triméthylée en position K27 (H3K27me3). La protéine PRC2 catalyse cette triméthylation à l'aide de son unité catalytique EZH2. Il existe une surexpression d'EZH2 au sein des GB qui contribue à la mise sous silence de gènes suppresseurs de tumeur<sup>27</sup>. L'activité de PRC2 est régulée finement dans les GB. *ATRX* est une protéine qui permet de remodeler la chromatine notamment sur l'histone H3.3. Des mutations d'*ATRX* ont été décrites au sein de 13 GB sur une série de 291 cas<sup>28</sup>.

#### 2.2.6.8.2 Méthylation de l'ADN

En plus du remodelage de la chromatine, d'autres mécanismes épigénétiques peuvent entrer en jeu, notamment la méthylation de l'ADN et des promoteurs de gène. Cette méthylation des promoteurs entraîne une diminution voire une extinction d'expression du gène.

Le gène *O6-methyl guanine-DNA methyl transferase (MGMT)*, localisé en 10q26, code pour une enzyme clé dans les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN<sup>29</sup>. Son rôle est d'enlever les ajouts méthyles sur la position O6 de la guanine empêchant l'action des chimiothérapies à base d'agents méthylants. Une méthylation du promoteur de *MGMT* est retrouvée dans 40 à 50 % des GB<sup>28</sup>. Ceci est à l'origine d'une meilleure réponse thérapeutique pour ces patients.

### 2.2.7 Syndrome de prédispositions

Une très petite proportion des gliomes (1 %) <sup>30</sup> est liée à une pathologie génétique héréditaire et transmissible. Les syndromes génétiques de prédisposition au GB sont principalement le syndrome de Lynch, le syndrome de Li-Fraumeni, la sclérose tubéreuse de Bourneville et la Neurofibromatose de type 1.

#### 2.2.7.1 Le Syndrome de Lynch et ses variantes

Il s'agit d'un syndrome caractérisé par l'association d'une tumeur cérébrale primitive et de polypes ou cancers colorectaux.

Selon certains auteurs, il existe deux entités :

- Le syndrome de Turcot associant une polypose adénomateuse familiale à une tumeur du SNC (GB, médulloblastome, épendymome). Il résulte d'une mutation du gène *APC* porté par le chromosome 5q21<sup>31</sup>.
- Le syndrome de Lynch avec un spectre large qui associe un syndrome *hereditary non polyposis colonic cancer* (HNPCC) et un GB, où sont retrouvées des mutations des gènes du système de réparation de l'ADN *mismatch repair* (MMR) comme *hMSH2* (2p16), *hMSH6* (2p16), *hMLH1* (3p21.3) et *hPMS2* (7p22)<sup>32</sup>.

Les patients atteints d'un GB s'intégrant dans le syndrome de Lynch auraient une survie plus longue que ceux avec des GB apparaissant de façon sporadique<sup>33,34</sup>.

#### 2.2.7.2 Le syndrome de Li-Fraumeni

Il s'agit d'une maladie rare, autosomique dominante, en général liée à une mutation germinale du gène suppresseur de tumeur *TP53* localisé au niveau du locus 17p13. La prévalence est estimée à 1 à 9/100 000 (source Orphanet). Il prédispose à une grande variété de cancers comme des sarcomes, des cancers du sein chez la femme jeune, des leucémies aiguës, des tumeurs cérébrales et des corticosurrénales.

Deux formes de LFS sont identifiées :

- le classique LFS défini par un sarcome diagnostiqué avant 45 ans chez le probant, avec un apparenté du premier degré atteint de n'importe quel cancer avant 45 ans, et un apparenté du premier ou second degré atteint de n'importe quel cancer avant 45 ans ou d'un sarcome quel que soit l'âge. Dans cette forme, la mutation du gène *TP53* est retrouvée dans environ 70 % des cas<sup>35</sup>;
- le Li-Fraumeni-like syndrome (LFL) qui est une variante proche de la forme classique, dont la mutation du gène *TP53* n'est retrouvée que dans 22 à 40 % des cas<sup>35</sup>. L'inactivation de la protéine p53, quel qu'en soit le mécanisme (mutation du gène *TP53*, délétion en 17p, inactivation post-traductionnelle), est retrouvée dans de nombreux cancers, notamment dans environ 60 % des astrocytomes et GB secondaires<sup>6</sup>. L'histologie des tumeurs cérébrales associées au LFS est variée, comprenant les lésions gliales de bas et de haut grades, médulloblastomes, *Primitive Neuroectodermal Tumor* (PNET), tumeurs des plexus choroïdes et épendymome.

### **2.2.7.3 La Neurofibromatose de type 1 (NF1)**

La NF1 ou maladie de Von Recklinghausen est une des maladies génétiques les plus fréquentes qui affecte un individu sur 3500<sup>36</sup>. Il s'agit d'une maladie autosomique dominante, à pénétrance complète, dont la moitié des cas est représentée par une néomutation. Elle est causée par une mutation germinale du gène *NF1*, localisé sur le bras long du chromosome 17 (17q11.2), gène dit « suppresseur de tumeur » codant pour une protéine appelée neurofibromine qui régule les voies de transduction du signal RAS ou *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) et AKT ou *Mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR).

Le diagnostic est supposé devant des macules « café au lait », des neurofibromes des nerfs périphériques, d'un ou de plusieurs neurofibromes plexiformes, d'un astrocytome pilocytique des voies optiques dans 15 à 20 % des cas, des nodules de Lisch, hamartomes de l'iris ou un apparenté du premier degré atteint de cette pathologie. En plus des tumeurs bénignes, les patients NF1 ont un risque accru de développer des lésions malignes du système nerveux<sup>37</sup> notamment, un neurofibrosarcome qui est l'une des complications caractéristiques de cette maladie. Les gliomes de haut grade dont les GB semblent être associés à un pronostic moins péjoratif que dans la population générale, avec une survie globale supérieure constatée chez l'enfant et l'adulte<sup>37</sup>.

## **2.2.8 Processus d'invasion du Glioblastome**

Les GB sont particulièrement connus pour leur capacité rapide de propagation dans le cerveau<sup>38</sup>, au niveau de la substance blanche mais aussi du cortex et des noyaux gris centraux. Si le corps calleux est infiltré, alors il peut exister un envahissement de l'hémisphère controlatéral. Les cellules infiltrantes peuvent également être à plusieurs centimètres de la tumeur principale. Ces cellules infiltrantes sont souvent la cause de récurrences après une première ligne de traitement.

### ***2.2.8.1 Mécanisme d'invasion***

Les mécanismes qui vont promouvoir les propriétés infiltrantes des cellules de GB sont essentiellement la mobilité cellulaire, l'adhésion cellule-matrice et cellule-cellule, le remodelage de la matrice extracellulaire ainsi que les interactions avec le microenvironnement<sup>39</sup>. Les cellules tumorales sécrètent des enzymes protéolytiques qui permettent l'invasion, facilitant la migration à travers la matrice extracellulaire : MMP2 et MMP9 et des cathepsines. Ces cellules produisent également des intégrines qui favorisent la déformation cellulaire permettant la mobilité. Les cellules expriment de nombreux facteurs de croissance tels que le VEGF, EGF qui vont activer des voies de RTK qui régissent la migration. Ces facteurs sont d'autant plus exprimés par la cellule tumorale qu'elle se trouve au sein d'un milieu hypoxique.

### ***2.2.8.2 Gliomatose cérébrale***

Certains GB peuvent se manifester initialement sous la forme d'un envahissement massif du système nerveux central que l'on décrivait sous le terme gliomatose cérébrale. Les zones affectées sont généralement un hémisphère cérébral (trois lobes ou plus touchés) jusqu'aux deux hémisphères associés parfois à un envahissement des noyaux gris centraux, du tronc cérébral, du cervelet et de la moelle épinière.

### ***2.2.8.3 Métastases***

Bien que les GB aient des capacités d'infiltration rapide, il est rare qu'ils s'étendent jusqu'à l'espace sub-arachnoïdien ou essaient dans le liquide cérébro-spinal. L'envahissement des os et du sinus de la dure mère est exceptionnel. Les métastases extracrâniennes sont peu fréquentes. Certaines études ont montré que des cellules de GB circulaient dans le sang. Ceci suggère la présence de mécanismes immunitaires ou d'un environnement inhospitalier dans les organes à distance empêchant l'implantation et la croissance de métastase<sup>40</sup>.

## 2.2.9 Anatomopathologie des glioblastomes

### 2.2.9.1 Macroscopie

Les GB sont mal limités. Ils présentent des couleurs variables à la coupe : plutôt gris, en périphérie constituant un anneau tumoral de cellules viables et une zone le plus souvent centrale nécrotique, de couleur jaune. Cette nécrose peut occuper jusqu'à 80 % du prélèvement. Les GB sont généralement le siège d'importants remaniements hémorragiques qui se traduiront par des foci bruns ou rouge au sein de la tumeur. Cette tumeur peut être kystique. Ce kyste correspond généralement à un tissu nécrosé liquéfié.

### 2.2.9.2 Microscopie

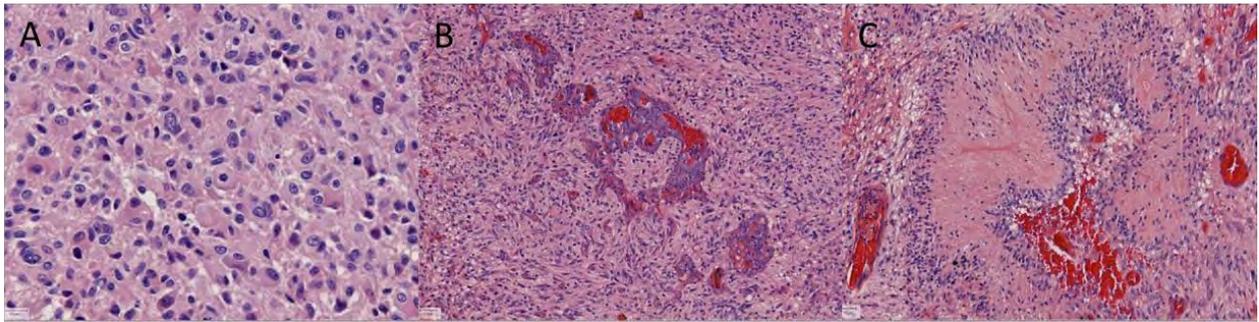
Il existe deux composantes dans ces tumeurs : une composante solide sur laquelle repose le diagnostic et une composante infiltrante faite de cellules isolées.

Cette composante solide est généralement densément cellulaire. Ces cellules tumorales généralement peu différenciées se disposent sur un fond fibrillaire qui est peu visible dans cette composante. Les GB étaient appelés « GB multiformes » du fait d'une hétérogénéité histopathologique importante : certains peuvent montrer un très grand pléomorphisme cellulaire. Ces aspects peuvent aller du monomorphisme cellulaire à un nombre important de cellules géantes. Nous reviendrons sur ces différents aspects tout au long de ce chapitre.

La composante infiltrante située en périphérie de la composante solide est parfois difficile à distinguer d'un gliome de bas grade car elle est souvent constituée par des noyaux nus ovoïdes ou très peu atypiques. Il peut s'y associer une infiltration sous piele, une satellitose péri-neurale ou une infiltration des espaces de Virchow-Robin. Il existe des difficultés diagnostiques notamment sur les biopsies stéréotaxiques faites en périphérie de la composante solide.

#### 2.2.9.2.1 Critères diagnostiques principaux

Le diagnostic de GB est souvent basé sur l'identification de certaines caractéristiques histopathologiques plutôt que sur la reconnaissance de types cellulaires spécifiques. Certains critères sont essentiels au diagnostic de GB : la présence de cellules gliales très anaplasiques, une activité mitotique élevée, une prolifération micro vasculaire et des foyers de nécroses. En fonction du prélèvement, la variabilité de la distribution de ces critères et de leur proportion est très importante.



**Figure 3 : Critères diagnostiques des GB**

*A. Prolifération densément cellulaire présentant des figures de mitose. B. Prolifération cellulaire avec des formations gloméruloïdes correspondant à une prolifération micro-vasculaire. C. Les cellules tumorales s'agencent sous forme de palissade délimitant un foyer de nécrose.*

#### *2.2.9.2.1.1 Prolifération micro-vasculaire*

La prolifération micro-vasculaire (Figure 3B) se présente généralement sous la forme de vaisseaux gloméruloïdes constitués des cellules endothéliales multistratifiées mitotiquement actives associées à des péricytes ou des cellules musculaires lisses. Une autre forme est caractérisée par une prolifération hypertrophique des cellules endothéliales au sein des vaisseaux de taille moyenne.

#### *2.2.9.2.1.2 Nécrose*

Cette nécrose (Figure 3C) est constituée de cellules gliales à différents stades de dégénération avec des débris cellulaires. Elle prend le plus souvent la forme d'une nécrose palissadique : une bande faite de petites cellules irrégulières orientée de façon radiale autour de la nécrose. Elle peut se manifester sous forme de plage extensive de nécrose comportant des couronnes de cellules tumorales viables autour des vaisseaux.

#### *2.2.9.2.1.3 Prolifération (Figure 3A)*

L'activité mitotique (Figure 3A) est très intense avec des mitoses détectables dans tous les cas de GB. Des mitoses atypiques sont très souvent présentes. Il existe cependant une grande différence intra et inter-tumorale.

### **2.2.9.3 Immunohistochimie**

#### **2.2.9.3.1 Protéines du cytosquelette**

Les GB se caractérisent par une expression constante des marqueurs astrocytaires GFAP et PS100. L'expression de la GFAP est variable en intensité d'une cellule tumorale. Il existe également une expression constante d'Olig2 mais le pourcentage de cellules marquées varie

d'un GB à l'autre. Il ne doit pas toujours être interprété comme une différenciation oligodendrogliale<sup>41</sup>.

#### 2.2.9.3.2 Protéines du cycle cellulaire et récepteurs de facteurs de croissance

L'index de prolifération (MIB1) est compris entre 15 et 20 % généralement. Cependant, cette fraction de prolifération peut varier considérablement d'un territoire à l'autre (jusqu'à plus de 50% focalement). Une fraction de prolifération basse n'élimine toutefois pas le diagnostic.

Les GB peuvent exprimer p53 ou encore EGFR. Une forte expression d'EGFR conforte le diagnostic de GB. Dans les GB, il existe une excellente corrélation entre le score d'expression de l'EGFR, défini par l'intensité du marquage de 1 à 4 multiplié par le pourcentage des cellules marquées<sup>42</sup>, et l'amplification du gène.

Certains GB expriment fortement p53 mais la valeur pronostique est controversée<sup>10</sup>.

Il n'y a pas d'intérêt diagnostique à détecter en routine les autres altérations des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, comme *p16(CDKN2A)*, *CDK4*, *cycline D1*, *MDM2*. De même, l'intérêt pronostique de la détection de l'expression de MGMT en immunohistochimie reste controversé.

#### 2.2.9.3.3 IDH1/IDH2

Dans le groupe des GB, des mutations d'IDH1/IDH2 sont l'apanage des GB secondaires. Les premières études immunohistochimiques avec un anticorps dirigé contre la forme mutée de IDH1 R132H montrent dans les tumeurs présentant une mutation de IDH1 une expression homogène cytoplasmique de l'immunomarquage<sup>43</sup>. L'utilisation en routine de ce marqueur permet d'identifier aisément les différents sous-groupes de GB selon leur statut d'IDH1. De plus, en cas de doute diagnostique, une expression de IDH1 au sein d'une tumeur permettra d'exclure une tumeur non gliale.

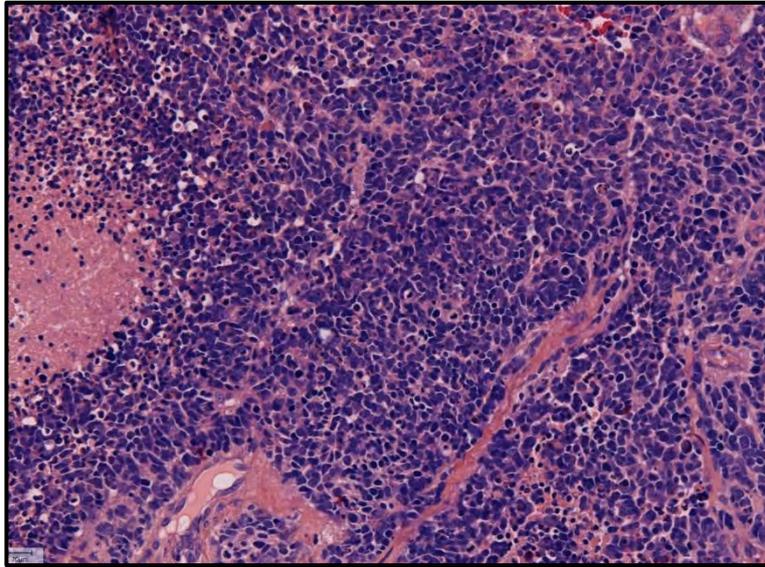
### 2.2.9.4 Aspects particuliers des GB

#### 2.2.9.4.1 Petites cellules

Ces cellules tumorales sont de petite taille, monomorphiques, peu atypiques, rondes ou ovoïdes, hyperchromatiques à haut rapport nucléocytoplasmique. Les mitoses sont nombreuses. Ces cellules expriment généralement la protéine GFAP et présentent dans 70 %

des cas une surexpression de l'EGFR. L'index de prolifération est souvent haut. Si cette composante est prédominante, elle constitue un sous-type appelé GB à petites cellules. Ces GB ont une évolution clinique similaire au GB classique avec une médiane de survie de 11 mois.

#### 2.2.9.4.2 Cellules neuronales primitives



**Figure 4 : GB avec composante neuronale primitive**

*Coloration à l' Hématoxyline–Eosine : Prolifération tumorale densément cellulaire constituée essentiellement de petites cellules rondes aux noyaux hyperchromatiques. Il existe un foyer de nécrose tumorale et de prolifération micro-vasculaire.*

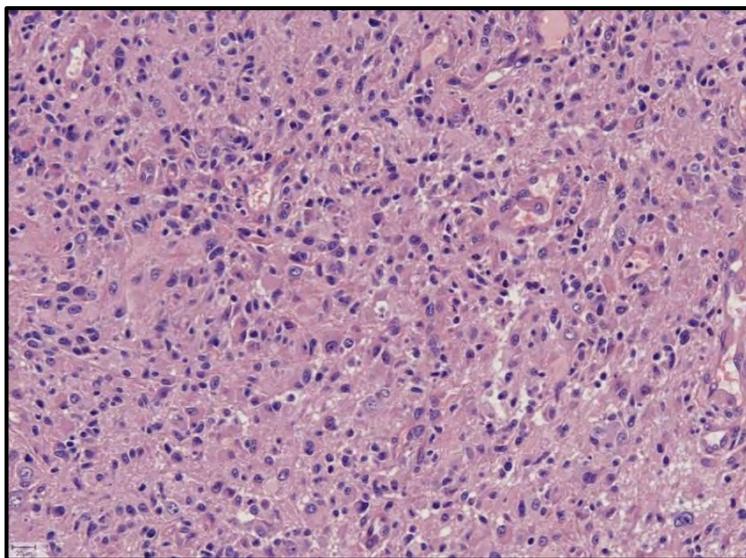
La présence de cette composante quelque soit le pourcentage dans la tumeur définit un sous type de GB : les GB avec une composante neuronale primitive (Figure 4). Ce GB est constitué de deux types cellulaires : cellules de GB classique et cellules avec différenciation neuronale formant souvent des nodules. Ces nodules se détachent bien du GB classique adjacent. Ils sont souvent plus densément cellulaires. Ces cellules ont un rapport nucléocytoplasmique élevé avec souvent des aspects anaplasiques similaires aux cellules de médulloblastome. Il s'y associe de nombreux corps apoptotiques. Elles vont souvent former des rosettes Homer Wright et s'imbriquer les unes aux autres. Cette composante va exprimer des marqueurs neuronaux tels que la synaptophysine et souvent perdre l'expression de la protéine GFAP. L'index de prolifération est particulièrement élevé. Une expression intense et diffuse de la protéine p53 est souvent observée. Dans 15 à 20 % des cas, elles ont une mutation d'IDH1 R132H.

#### 2.2.9.4.3 Cellules granuleuses

Ces cellules sont de grandes tailles, avec un cytoplasme granulaire PAS positif. Elles peuvent parfois avoir des aspects de tumeur à cellules granuleuses et ressembler à des macrophages. Ces cellules peuvent exprimer CD68 mais pas CD163 qui est plus spécifique. La plupart des cellules ne sont pas marquées par l'anticorps anti-GFAP. Si cette composante est prédominante, elle définit le sous type de GB à cellules granuleuses. Ils ont un pronostic similaire à ceux des GB classiques.

#### 2.2.9.5 Les différents variants

##### 2.2.9.5.1 Glioblastome épithélioïde



**Figure 5 : GB épithélioïde**

*Coloration à l'Hématoxyline–Eosine : Prolifération tumorale densément cellulaire faite de grandes cellules au noyau rond ou ovoïde parfois nucléolé entouré d'un cytoplasme éosinophile abondant.*

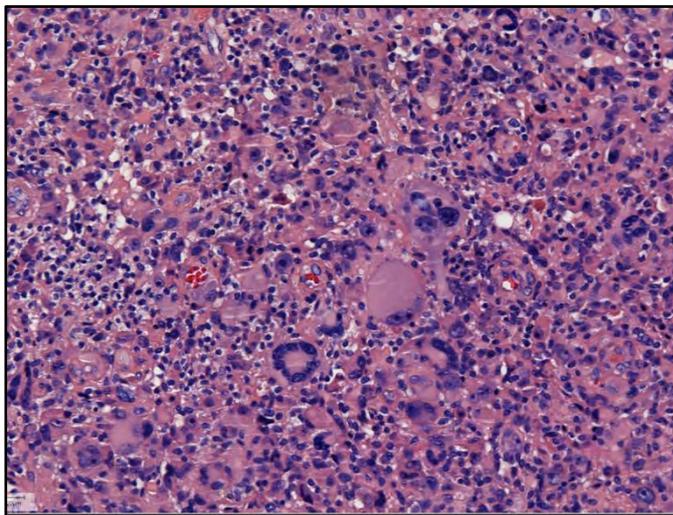
Le GB épithélioïde se développe généralement chez les adultes jeunes ou les enfants. Il est localisé le plus souvent au niveau du diencephale ou du cortex cérébral notamment au niveau du lobe frontal ou temporal. C'est une tumeur très agressive avec une médiane de survie de 6,3 mois chez les adultes et 5,6 mois chez les enfants.

Microscopiquement, cette tumeur est constituée de cellules tumorales uniformes épithélioïdes (Figure 5). Elles sont caractérisées par une membrane cytoplasmique bien visible, délimitant un cytoplasme éosinophile abondant qui entoure un noyau souvent positionné latéralement. Il y a peu de remaniements xanthomateux dans ces cellules contrairement au xanthoastrocytome pléomorphe, son diagnostic différentiel. Il peut s'y associer une vascularisation gloméruloïde peu abondante et des foyers de nécrose.

Ces cellules sont marquées avec les anticorps anti-PS100, anti-Vimentine. L'expression de la protéine GFAP est très souvent focale. Certains GB épithélioïdes peuvent exprimer des cytokératines, la synaptophysine. Ces cellules n'expriment pas la protéine MelanA. Il existe une persistance de l'expression de SMARCB1.

50% de ces GB présentent une mutation  $BRAF^{V600E}$  détectable par immunohistochimie. Ce variant ne présente jamais de mutation des gènes des histones ou d'*IDH*, mais peut s'associer à une amplification de l'*EGFR*, une délétion homozygote de *CDKN2A* et/ou une perte de *PTEN*. Les anomalies touchant les loci des gènes *MET* ou *PDGFRA* sont très rares.

#### 2.2.9.5.2 Glioblastome à cellules géantes



#### **Figure 6 : GB à cellules géantes**

*Coloration à l'Hématoxyline-Eosine : Prolifération tumorale densément cellulaire constituée par place de cellules géantes multi-nuclées.*

Il s'agit d'un variant rare (<1 %) de GB IDH sauvage. Il touche particulièrement la population pédiatrique. Il se développe au sein des mêmes territoires anatomiques que les GB classiques IDH sauvages avec souvent un aspect très circonscrit à l'imagerie.

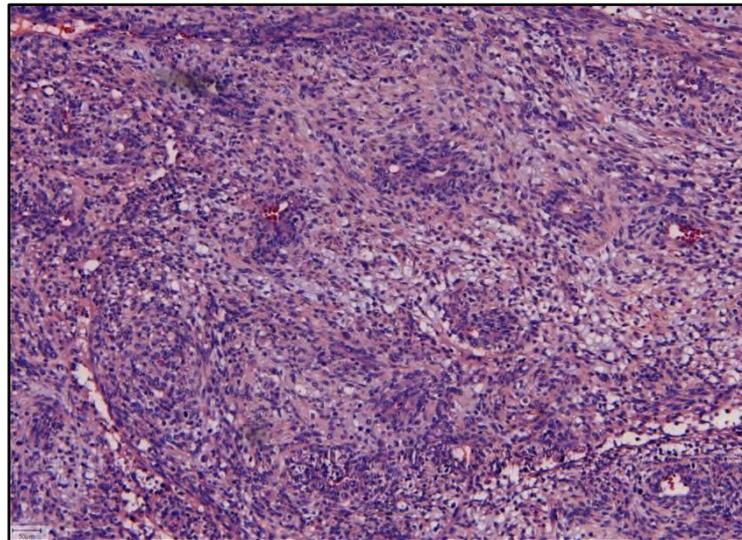
Microscopiquement, le GB à cellules géantes (Figure 6) est caractérisé par la présence de nombreuses cellules géantes multi-nuclées, de petites cellules syncytiales et un réseau réticulinique riche. Ces cellules géantes peuvent faire jusqu'à 0,5mm de diamètre et contenir jusqu'à 20 noyaux. Des foyers de nécrose parfois bordés par des noyaux agencés sous forme de palissades peuvent être observés. Il existe une accumulation péri-vasculaire de cellules tumorales semblant dessiner des aspects de pseudo-rosette. Parfois, il peut s'y associer un infiltrat inflammatoire lymphocytaire péri-vasculaire.

Ces cellules expriment fortement la protéine GFAP et surexpriment fréquemment la protéine p53. Cette surexpression est généralement le témoin d'une mutation du gène *TP53*. Les marqueurs neuronaux sont négatifs.

Ces tumeurs sont caractérisées au niveau génétique par de fréquentes mutations de *TP53* (75-90 % des cas) et de *PTEN* (33 %). Les mutations *IDH*, l'amplification du gène *EGFR* ou la délétion de *CDKN2A* sont absentes.

Les GB à cellules géantes présentent une survie à 5 ans d'environ 10 % plus longue que les GB classiques,

#### 2.2.9.5.3 Gliosarcome



**Figure 7 : Gliosarcome**

*Coloration à l'Hématoxyline–Eosine : prolifération tumorale densément cellulaire faite de deux contingents : un contingent gliale (cellules ovoïdes hyperchromatique) et contingent sarcomateux (cellules fusiforme forment des faisceaux)*

C'est un variant rare des GB *IDH* sauvage (2% des GB). Elle touche la même population que les GB classiques *IDH* sauvage. Il se développe généralement dans les hémisphères cérébraux le plus souvent temporal puis frontal et pariétal par ordre de fréquence. À l'imagerie cette tumeur est bien limitée en périphérie.

Microscopiquement, le gliosarcome (Figure 7) présente des aspects biphasiques : des territoires astrocytaires de type GB classiques associés à des territoires en différenciation sarcomateuse/mésenchymateuse. Cette composante peut prendre des aspects de cellules fusiformes sarcomateuses entourées de fibres conjonctives colorées par la réticuline. Cette

différentiation peut prendre d'autres formes comme du tissu osseux, du cartilage, du muscle strié ou même un tissu adipeux.

L'immunohistochimie facilite la différenciation entre ces deux composantes. Les cellules de la composante gliale expriment la GFAP, la protéine Olig2 alors que le contingent pseudo sarcomateux entouré par la réticuline exprime la Vimentine et est négatif avec GFAP et Olig2.

Les gliosarcomes ont un profil génétique particulier, caractérisé par des mutations de *PTEN* et *TP53*, des délétions de *CDKN2A* sans amplification du gène *EGFR*. Au sein de la composante mésenchymateuse, ces cellules vont exprimer les protéines SNAI2, TWIST, MMP2 et MMP9 typiques des tumeurs mésenchymateuses. Ceci suggère une transformation épithélio-mésenchymateuse au sein de ces tumeurs.

Leur pronostic ne diffère pas des GB classiques *IDH* sauvages.

## 2.2.10 Traitement

### 2.2.10.1 Protocole Stupp

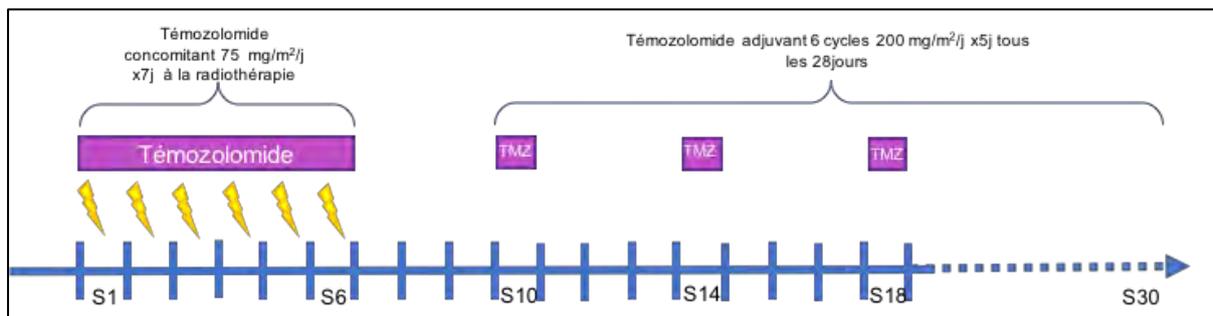


Figure 8 : Schéma du protocole Stupp<sup>2</sup>

Le traitement des GB requiert une approche multidisciplinaire. La thérapie standard inclut une résection chirurgicale maximale, suivie d'une radiothérapie fractionnée et d'une chimiothérapie par témozolomide (TMZ) concomitante, puis un traitement adjuvant par TMZ seul en consolidation<sup>44</sup>. Ce protocole (Figure 8) a été établi suite à l'analyse stratifiée des résultats de l'étude de phase III sur la radio-chimiothérapie concomitante avec TMZ<sup>2</sup>.

#### 2.2.10.1.1 Chirurgie

Le diagnostic histologique est indispensable pour proposer une radiothérapie ou une chimiothérapie. La biopsie a aussi l'intérêt de pouvoir redresser le diagnostic, soit vers une pathologie gliale de plus bas grade soit vers une pathologie non tumorale (abcès à pyogène, mycosique, parasitose...etc).

Si une exérèse chirurgicale d'emblée est décidée, elle se doit d'être extensive et complète. Ceci est difficile à obtenir. Cette exérèse complète doit être en balance avec une bonne qualité de vie post-opératoire. Les GB sont très infiltrants et peuvent envahir des zones essentielles du cerveau contrôlant la parole, les fonctions motrices et sensitives. De plus, au pourtour de la tumeur, les cellules tumorales infiltrantes qui seront responsables d'une récurrence ou de la progression de la maladie, peuvent ne pas être accessibles à une thérapeutique locale<sup>45</sup>. L'utilisation de l'IRM fonctionnelle et des séquences de diffusion en préopératoire, l'IRM avec stimulation directe pendant la chirurgie avec des systèmes de neuronavigation ont permis de mieux intégrer les spécificités anatomiques et tumorales de chaque patient. Malgré ces nouvelles technologies, faire la différence entre du cerveau normal et du tissu tumoral résiduel reste un challenge. L'utilisation du marqueur fluorescent, l'acide 5-aminolevulinique permettrait de faire plus facilement cette différence<sup>46</sup>. Cependant, une revue Cochrane montre une très faible augmentation de la qualité d'exérèse avec ces nouvelles technologies<sup>47</sup>.

La résection complète doit donc être définie sur une imagerie post-opératoire TDM ou maintenant plus volontiers IRM en séquence T1 avec injection de gadolinium, par la disparition de toutes les prises de contraste. L'imagerie post-opératoire immédiate (dans les 48 heures) est idéale, bien que parfois difficile à obtenir en pratique.

Au total, la résection complète doit donc être tentée dans tous les cas où elle est raisonnablement possible, en utilisant au mieux les progrès technologiques.

#### 2.2.10.1.2 Radio-chimiothérapie

Après une résection chirurgicale maximale, le patient doit attendre environ 4 semaines que la craniotomie se cicatrise avant de pouvoir bénéficier des thérapeutiques adjuvantes. La radiothérapie post-opératoire seule a été un des traitements standards du GB après chirurgie ceci avant 2005. En effet Stupp et al ont montré que l'association TMZ associée à la radiothérapie (RT) externe était plus bénéfique que la radiothérapie seule. Les patients qui recevaient l'association TMZ + RT avaient une médiane de survie de 14,6 mois au lieu de 12,1 mois pour la RT seule. De plus, la proportion de longs survivants avec le protocole RT + TMZ est plus importante 27 % vs 11 %<sup>46</sup>.

La RT est actuellement un traitement standard. La dose totale typique délivrée est de 60 Gy, par fraction de 1.8–2 Gy administrés 5 jours par semaine sur six semaines (Figure 8) Il existe un avantage certain en matière de survie à une dose de 60 Gy. L'escalade des doses supérieures à 60 Gy entraîne une augmentation de la toxicité sans bénéfice additionnel sur la

survie. D'autres techniques tels que la curiethérapie avec de l'iode 125, la radio-immunothérapie, la radio-chirurgie stéréotaxique et l'hyperfractionnement ont été testés pour augmenter le contrôle local, tout en limitant la toxicité mais aucune n'apporte d'amélioration de la survie des patients.

Le TMZ est donné à une dose 75 mg/m<sup>2</sup> par jour pendant 6 semaines suivies d'une période de repos de 1 mois après la fin de la RT. Quand le protocole recommence, la dose de TMZ est de 150 mg/m<sup>2</sup> par jour pendant 5 jours le premier mois. Si ce traitement est bien toléré, la dose est augmentée à 200 mg/m<sup>2</sup>, 5 jours d'affilée par mois jusqu'à la fin de la thérapeutique. Dans le protocole Stupp, le TMZ est administré pendant 6 mois après la RT. En pratique courante, plusieurs institutions continuent de donner du TMZ en cycle pendant 12 à 18 mois. Un protocole proposant du TMZ sur une période plus longue conférerait une survie supérieure.

### ***2.2.10.2 Thérapie ciblée***

#### **2.2.10.2.1 Bevacizumab**

Bevacizumab est un anticorps monoclonal humain qui inhibe le VEGF. C'est la première thérapie antiangiogénique ciblée qui a été approuvée dans le traitement du cancer. Le GB est une tumeur très vascularisée avec une néoangiogenèse tumorale abondante, due à une fréquente surexpression de VEGF. Il a été montré que celle-ci est corrélée à l'évolution tumorale, en particulier à la précocité de la rechute et à la survie. Deux essais de phase III (Avaglio et RTOG 0825) comparant après randomisation RT avec TMZ versus RT avec TMZ et Bevacizumab n'ont pas montré de bénéfice significatif sur la survie globale malgré une amélioration significative de la survie sans rechute, et ont globalement retrouvé une majoration des toxicités. Le Bevacizumab n'a pas de place dans la prise en charge du GB à la première rechute avec ou sans association avec la lomustine, l'étude EORTC 26101 ne confère pas de bénéfice thérapeutique à cette association. À noter que l'Agence européenne du médicament n'a pas validé l'utilisation du Bevacizumab dans les GB en première ligne ni à la récurrence, mais est souvent utilisée en pratique clinique à la récurrence (indication reconnue par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis). D'autres anti-angiogéniques, tels que des inhibiteurs de tyrosine kinase (enzastaurin, cediranib, sunitinib, vandetanib...), des molécules piégeant le VEGF (aflibercept) ou encore des polypeptides cycliques (cilengitide visant le récepteur de l'intégrine) n'ont à ce jour pas démontré de bénéfice significatif en survie globale.

#### 2.2.10.2.2 Inhibiteur de facteurs de croissance

L'amplification d'EGFR est l'altération génétique la plus fréquente des GB, retrouvée dans environ 60 % des cas, dont 31% des GB présente une mutation du récepteur de type EGFRvIII<sup>45</sup>. Elle s'associe à un phénotype tumoral plus agressif, favorisant l'angiogenèse, la progression et l'invasion tumorale, ainsi que des propriétés de radiorésistance qui pourraient être levées par l'utilisation concomitante d'anti-EGFR. Le gefitinib et l'erlotinib sont deux anti-EGFR qui n'ont montré aucune efficacité clinique de restauration de la radiosensibilité des GB surexprimant EGFR (RTOG 0211 : association RT et gefitinib dans un essai de phase I-II). Le cetuximab est un anticorps chimérique murin humanisé bloquant l'activation d'EGFR par son ligand, favorise l'internalisation d'EGFR et conduit à diminuer sa surexpression. Il n'a pas non plus montré de bénéfice clinique<sup>45</sup>. D'autres traitements ont ciblé la surexpression de PDGFR, événement moléculaire fréquent favorisant la transformation et la croissance tumorale via une signalisation autocrine, mais également pro-angiogénique par une sécrétion paracrine sur les cellules endothéliales. L'imatinib, traitement de la leucémie myéloïde chronique, est un inhibiteur de tyrosine kinase possédant une action anti-PDGFR. Il montre une efficacité en association à l'hydroxyurée dans le GB récidivant lors d'une étude de phase II. Cependant, cette molécule se heurte à une mauvaise diffusion à travers la BHE et les essais ultérieurs n'ont pas pu obtenir de résultats comparables (ni essai de phase II coordonné par l'EORTC, ni un essai de phase III sur 240 patients conduits par la même équipe que la précédente étude positive).

#### 2.2.10.2.3 Nouvelles thérapies ciblées et leurs voies d'action : mTOR/PI3K, MEK. . . etc

L'activation des récepteurs à activité Tyrosine Kinase (TK), y compris EGFR et PDGFR, conduit à une activation des voies PI3K/AKT/mTOR et RAD/RAF/MAPK. Ces voies sont souvent dérégulées au sein d'un GB. Dans ce domaine, aucun traitement n'a à ce jour démontré de bénéfice en monothérapie ni en association<sup>45</sup>. La voie de la PI3K semble également prometteuse, à travers son action avec AKT et mTOR, en raison de son implication dans la croissance, la prolifération et la survie tumorale. Une association thérapeutique associant inhibiteur de PI3K et de mTOR semble potentiellement prometteuse<sup>45</sup>. Concernant les inhibiteurs de la voie mTOR, les résultats d'un essai de phase II (NCT01019434) évaluant l'association de la RT au temsirolimus sont attendus. D'autres études sont en cours, notamment avec l'everolimus, la rapamycine et le temsirolimus ; ils n'ont cependant pas encore démontré de bénéfice en survie globale<sup>45</sup>. Des inhibiteurs de farnesyl transférase

(tipifarnib, lonafarnib), limitant la cinétique de RAS, n'ont pas démontré de bénéfice clinique. Le sorafenib (cible RAF, VEGF, PDGFR et autres kinases) semble bien toléré mais d'efficacité limitée<sup>45</sup>. Des études de phase I/II sont également en cours (veliparib NCT02152982, iniparib NCT00589576) évaluant l'intérêt de l'association d'un inhibiteur de PARP au TMZ dans le traitement adjuvant. Ils visent à inhiber un mécanisme de réparation de l'ADN, actifs sur les tumeurs mutées *BRCA 1* ou *2*<sup>48</sup>. D'autres voies d'action sont étudiées, moins avancées dans le domaine de la recherche clinique. Il s'agit notamment de celles visant la voie de l'hypoxie, médiée par *hypoxia inductible factor 1* (HIF-1a), TGF- $\beta$ , présent dans le microenvironnement tumoral, qui semble favoriser la migration et l'agressivité du GB ou encore *chemokine [C-X-C Motif] receptor 4* (CXCR4) ainsi que des métalloprotéases actives dans l'invasion tumorale. Les inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDAC, ayant un rôle dans l'expression génique) semblent avoir une action synergique avec la CT par stimulation de PTEN et AKT.

### 2.2.10.3 Immunothérapie

#### 2.2.10.3.1 Immunothérapie active : vaccination anti tumorale

Elle consiste en une activation du système immunitaire (LT CD4+ et CD8+) par exposition antigénique, selon le principe de la vaccination. Elle présente de nombreux avantages : spécificité d'action importante vis-à-vis de la tumeur (donc épargne du tissu cérébral sain), action contre toutes les cellules, en cours de division et quiescentes (donc action sur les GIC également), et création d'une « mémoire immunitaire », d'où une action potentielle à long terme<sup>49</sup>. Elle utilise des cellules tumorales, des lysats de cellules tumorales, des peptides antigéniques tumoraux ou synthétiques, ou encore des micro-ARN. Le rindopepimut, vaccin peptidique d'administration sous-cutanée ciblant EGFRvIII, est actuellement le plus prometteur. Des études préliminaires et de phase I prometteuses ont conduit à la mise en œuvre de 3 essais de phase II (qui ont retrouvé une survie médiane particulièrement « favorable » de respectivement 21,8 mois, 20,5 mois et 20,4 mois<sup>50</sup>). Constatation notable, 82 % des tumeurs récidivantes ne présentaient plus d'expression EGFRvIII. Le bon profil de tolérance a conduit au développement d'une phase III, actuellement close, en association avec un facteur de croissance de macrophages et granulocytes (GM-CSF) après chirurgie et RCT classique selon le protocole Stupp (NCT01480479).

### 2.2.10.3.2 Immunothérapie passive : transfert cellulaire adoptif

Ces traitements consistent en un transfert (intratumoral ou systémique) de cellules immunitaires autologues activées ex vivo, responsables d'une réaction immunitaire anti tumorale. Les lymphocytes tueurs activés (LAK) et les lymphocytes T cytotoxiques activés sont principalement utilisés<sup>51</sup>. Les LAK sont obtenus par mise en culture de monocytes du sang périphérique en présence d'interleukine 2 (IL-2), aboutissant à une population polyclonale de lymphocytes T et NK. Certains résultats positifs ont été retrouvés dans des essais anciens, mais leur usage en monothérapie a un effet tumoricide limité en raison d'une spécificité d'action modérée, en plus d'un mauvais profil de tolérance en raison de l'utilisation d'IL-2 responsable de méningites aseptiques, d'un œdème cérébral, et de fièvre suivant l'injection.

### 2.2.10.3.3 Inhibiteurs de checkpoints

Cette classe thérapeutique peut être classée parmi les immunothérapies passives. Elle vise à lutter contre l'immunosuppression du microenvironnement tumoral en agissant contre les médiateurs du système immunitaire impliqués dans les mécanismes de «tolérance immunitaire».

La démonstration de la fréquente perte d'expression de PTEN (associée à la délétion du chromosome 10), aboutissant à une surexpression de B7-H1 (PD-L1) à la surface des cellules tumorales, offre de plus un rationnel solide à leur utilisation dans le GB. PD-L1 en se fixant directement aux récepteurs PD-1 lymphocytaires est ainsi responsable d'une inactivation via la phosphatase SHP2 des LTD cytotoxiques (Tc), et d'une stimulation de l'action immunosuppressive des LTD auxiliaires (LTa)<sup>49</sup>. De plus, le GB sécrète des molécules immunosuppressives dans son microenvironnement tumoral, telles que TGFb et l'interleukine 1, favorisant la multiplication des LTa. Une étude de phase III en cours compare le nivolumab avec et sans ipilimumab au Bevacizumab (traitement de référence) dans le GB récidivant (NCT02017717). De nombreuses autres molécules visant ces inhibiteurs de checkpoints sont en développement, ciblant par exemple le gène-3 activateur des lymphocytes, l'immunoglobuline mucine-3 des lymphocytes T ou encore des ligands inhibiteurs (B7-H3 et B7-H4). Des études précliniques ont démontré une efficacité de ces traitements chez la souris. Une nouvelle approche proposée ces dernières années consiste en l'administration de ces traitements sur une courte durée avant même la chirurgie initiale, afin d'étudier in vivo leur action sur la pièce opératoire. Compte tenu des circonstances de découverte (déficit

neurologique, HTIC) et du risque potentiel de majoration de l'œdème cérébral secondaire à la réaction immunitaire, ceci semble cependant difficilement transposable au GB.

#### **2.2.10.4 Optune®**

En octobre 2015, Optune®, un dispositif fournissant des champs électriques au sein de la tumeur, a reçu l'approbation de la FDA comme traitement associé au TMZ chez les adultes porteurs d'un GB supratentorial nouvellement diagnostiqué. Optune® est un dispositif délivrant des ondes de courant électrique alternatif de petite et moyenne fréquence. Ces ondes électriques vont interrompre la division cellulaire, entraîner une mort cellulaire vraisemblablement par apoptose. 315 patients ont été randomisés entre la branche Optune® associé au TMZ contre TMZ seul en traitement adjuvant. Optune® associé au TMZ a montré une survie sans récurrence de 7,1 mois contre 4 mois avec le TMZ seul. La survie globale est respectivement de 20,5 mois (Optune® associé au TMZ) contre 15,6 mois (TMZ seul)<sup>52</sup>.

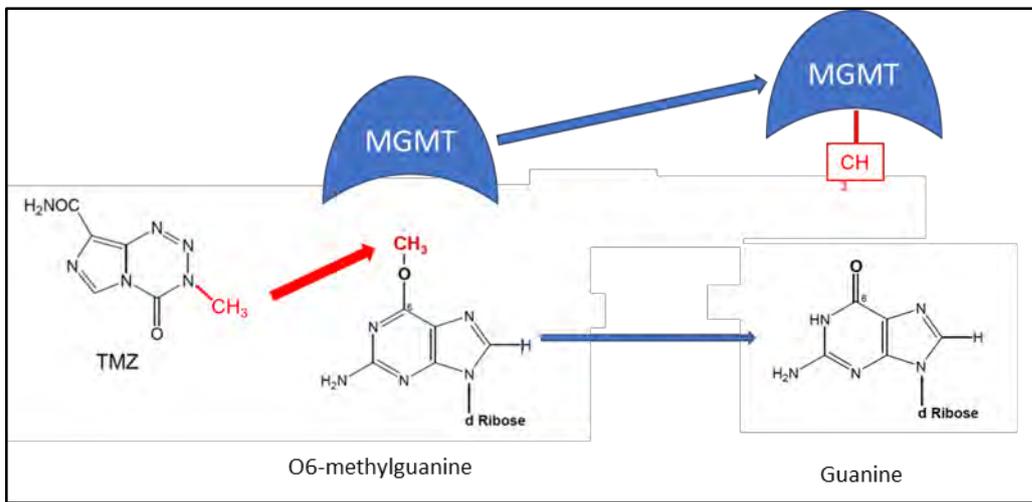
### **2.2.11 Principales lésions de l'ADN et les différents systèmes de réparation**

#### **2.2.11.1 Témzolomide**

Le TMZ est une chimiothérapie orale. Il s'agit d'un agent méthylant de l'ADN. Cette molécule a pour cible la guanine en position O6 et N7. L'ajout d'un groupement CH<sub>3</sub> (groupement méthyle) sur la guanine, entraîne un arrêt de la réplication de l'ADN et peut aller jusqu'à la mort des cellules cancéreuses. La cellule tumorale va alors mettre en place différents systèmes de réparation<sup>4</sup>.

En premier lieu, en réaction à l'adduit O6-méthyle sur la guanine la cellule va activer une enzyme, la MGMT (Figure 9). Il s'agit d'une enzyme suicide qui est capable de transférer le groupe O6-méthyle à la cystéine de son site actif (Cys 145). La MGMT avec l'agent méthyle va changer de conformation et sera ensuite détruit par le système ubiquitine/protéasome<sup>53</sup>. Cette réaction se fait sans cofacteur ou protéine intermédiaire. La MGMT protège les cellules des adduits accidentels de méthyl qui sont cancérogènes, mais entraîne une résistance des cellules cancéreuses aux agents méthylants des chimiothérapies.

Dans les GB, l'activité du MGMT peut varier de 300 fois. Il existe une corrélation importante entre cette activité et la réponse à la chimiothérapie méthylante des GB.



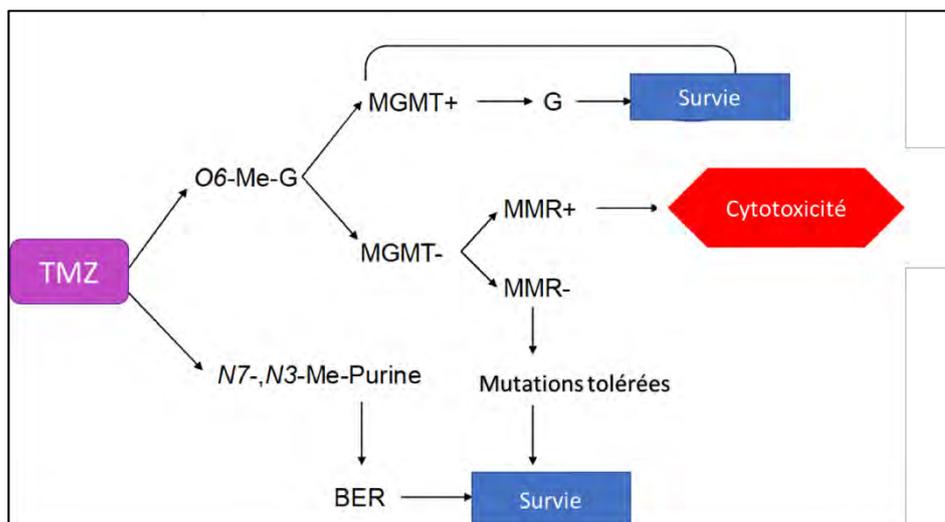
**Figure 9 : Réparation de la O6-méthylguanine par l'enzyme MGMT**

L'autre système mis en place en réaction aux adduits méthyles sur les bases de l'ADN est le système de *MisMatch Repair* (MMR). C'est un système de reconnaissance et de correction des bases mal appariées et des conformations anormales de l'ADN qui peuvent survenir pendant la synthèse de l'ADN. Deux hétérodimères de protéines MSH2 associé à MSH6 et MSH2 associé à MSH3 forment les systèmes de reconnaissance des bases mal appariées. Ces systèmes vont se fixer sur ces bases. L'hétérodimère MSH2/MSH6 va changer de conformation et recruter le complexe MLH1/PMS2 qui permet l'interphasage avec différentes protéines additionnelles telles que l'exonucléase 1, les hélicases, les ADN polymérase qui sont nécessaires à la réparation et au remplacement de ces bases mal appariées. Le système MMR joue un rôle essentiel dans la vérification des erreurs liées aux polymérase. L'absence de ce système entraîne une augmentation dramatique du nombre de mutations particulièrement au niveau des séquences micro satellitaires de l'ADN. D'ailleurs, l'analyse mutationnelle de ces séquences microsatellites est devenue l'outil de détection des défaillances de ce système. Ces dernières ont diverses origines : des mutations de la protéine MLH1 ou MSH2, une méthylation du promoteur de MLH1...etc. L'efficacité du système MMR influence la réponse des cellules aux génotoxiques notamment les chimiothérapies telles que le TMZ. Ainsi les cellules déficientes pour le système MMR sont jusqu'à 100 fois moins sensibles au TMZ que les cellules avec un système MMR actif<sup>54</sup>. Dans ces cellules, les mésappariements liés à l'O6-méthyle guanine ne sont pas reconnus, et sont tolérés par la cellule cancéreuse qui poursuit son cycle cellulaire.

Un dernier système peut être déclenché en réaction aux adduits méthyles sur le N7 et le N3 des purines provoqués par le TMZ (Figure 10) : c'est le système de Base Excision Repair (BER)<sup>55</sup>. Ces lésions sont reconnues par des glycosylases spécifiques qui vont couper les ponts N-glycosylés et générer des sites abasiques. Ces sites abasiques vont être la cible

d'endonucléases spécifiques qui couperont le pont phosphodiester en 5' du site abasique et créeront une cassure simple brin de l'ADN. Ces cassures font appel aux deux modes de réparations du BER : si cette cassure est courte, le remplacement de ce site abasique se fait par un nouveau nucléotide, en utilisant une ADN polymérase et un hétérodimère ADN ligase III/ *X-ray Repair Cross Complementing 1* (XRCC1). Si cette cassure est plus longue entre 2 et 10 nucléotides, la cellule doit créer un rabat et faire appel à une Flap Endonuclease-1 (FEN-1) qui va couper le rabat et entraîner une cassure simple brin de l'ADN qui sera reconnue par une *DNA ligase I*. Une des protéines clés du système BER est la PolyADP-Ribose Polymerase-1 (PARP-1) qui est exprimée, puis activée en cas de dommage à l'ADN. Elle se fixe aux extrémités de la cassure et recrute le système de réparation BER : XRCC1, ADN polymérase, ADN ligase III et FEN-1 pour réparer cette cassure. Ainsi les cellules déficientes en PARP auront une diminution de recrutement du système de réparation BER. Les adduits méthyles sur le N7 de la guanine et sur le N3 de l'adénine générés par le TMZ, sont rapidement pris en charge par le système BER et deviennent cytotoxiques en cas d'inactivation du BER. Ainsi une inhibition de PARP augmente la cytotoxicité des lésions créées par le TMZ<sup>56</sup>.

La cytotoxicité du TMZ est principalement provoquée par l'adduit méthyle sur l'O6 de la guanine. Cependant quand ces lésions sont réparées à la fois par le système MGMT ou tolérées par un arrêt de fonction du MMR, les adduits sur N7 deviennent significatifs et l'inhibition du système BER augmente la cytotoxicité du TMZ.



**Figure 10 : Les différents mécanismes de réparation mis en place par les cellules de GB face au témozolomide**

### *2.2.11.2 Radiothérapie*

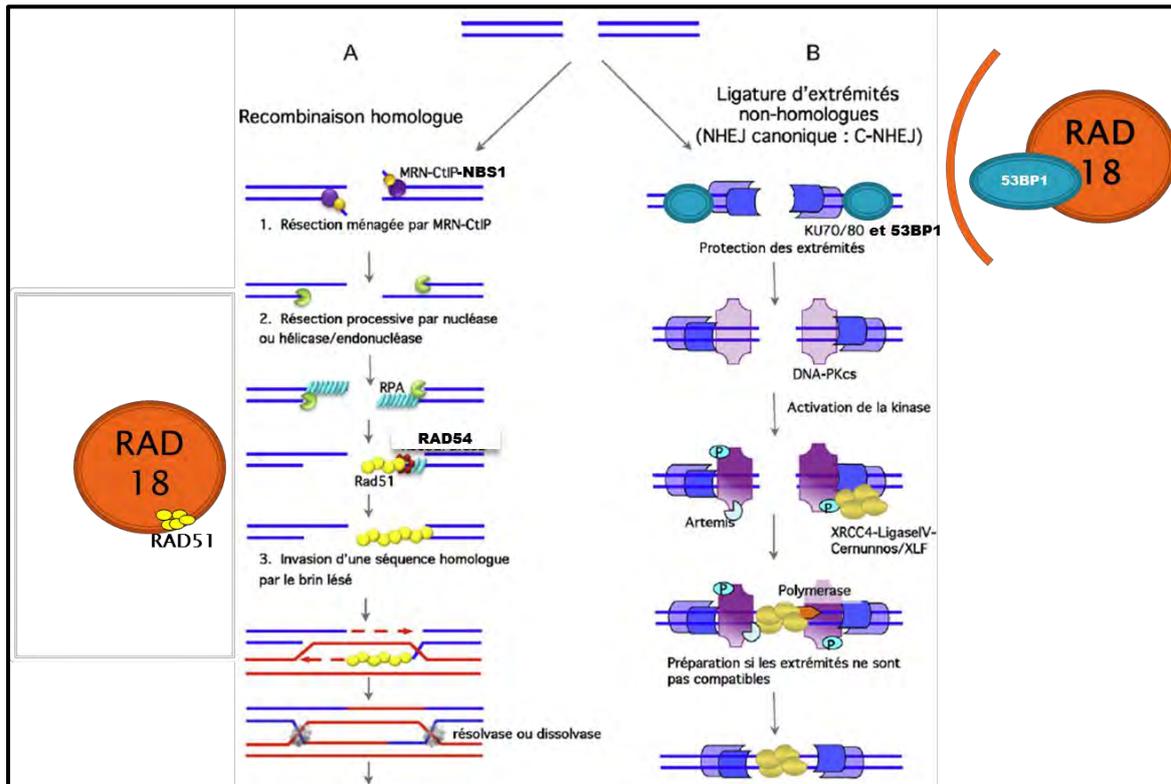
L'ADN a toujours été considéré comme la cible élective des radiations ionisantes (RI). Lorsque cytoplasme et noyau sont irradiés de façon sélective, la mort cellulaire survient pour des doses plus faibles d'irradiation et à une fréquence plus grande quand l'irradiation a lieu dans le noyau : les lésions cellulaires responsables de la létalité sont donc surtout celles qui touchent l'ADN. Différentes lésions sont observées :

- Des cassures simple-brin sans gap, par rupture des ponts diester, considérées comme non létales car réparables par une ligase ; la demi-vie de cette réparation varie de 2 à 10 minutes ;
- Des cassures simple-brin avec gap par perte d'un sucre et d'une base, nécessitant un temps de réparation plus long du fait de l'action d'une polymérase et d'une ligase ;
- Des altérations des bases, non létales mais pouvant être à l'origine d'une mutation en cas de non-réparation ou de réparation fautive. Ces lésions sont réparées à 80 % dans les 15 minutes suivant l'irradiation par des mécanismes d'excision-resynthèse faisant intervenir endonucléases, glycosylases, polymérases et ligases ;
- Des cassures double-brin, qui peuvent résulter d'un événement touchant les deux brins simultanément ou de deux cassures simple-brin indépendantes. Chaque cassure double-brin est létale en cas de non-réparation, et le nombre de cassures double-brin conditionne la radiosensibilité cellulaire.

L'aptitude à la réparation des cassures double-brin dépend de leur type : elles seront plus difficilement réparables s'il existe une perte associée de matériel chromosomique, en cas de pontage avec des protéines, ou encore si elles sont multiples et rapprochées. On considère qu'une cassure double-brin survient pour 20 cassures simple-brin. La cellule va mettre en place différents systèmes de réparation sur ces cassures doubles brins.

Il existe deux voies différentes dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN : la recombinaison homologue (RH) et la ligature des extrémités non homologues (NHEJ). La recombinaison homologue nécessite la présence de la chromatine sœur pour servir de guide à la réparation et donc permettre une réparation fidèle. Du fait de la nécessité d'une chromatine sœur la recombinaison homologue ne peut être réalisée que pendant les phases S-G2. La NHEJ permet une réparation moins fidèle car elle permet uniquement de lier les deux

extrémités cassées de la molécule d'ADN en perdant l'intégrité génomique. Elle peut être faite à n'importe quel moment du cycle.



**Figure 11: Les différents systèmes de réparation des cassures double brin de l'ADN : la NHEJ et la RH**

### 2.2.11.2.1 NHEJ

La NHEJ (Figure 11) permet les ligations directes des molécules d'ADN cassées. La première étape de la NHEJ est la reconnaissance et la fixation de l'hétérodimère Ku sur l'extrémité de la cassure double brin<sup>57</sup>. Cette fixation vise à initier la NHEJ et à protéger les extrémités de l'ADN de processus non spécifiques qui pourraient aboutir à des aberrations chromosomiques ou une instabilité génétique. Cet hétérodimère est composé des protéines Ku70 et Ku80. Il va permettre le recrutement d'autres facteurs de la NHEJ : *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PKc), *X-Ray Cross Complementing protein 4* (XRCC4), *DNA Ligase IV*, *XRCC4-like factor* (XLF), et *Aprataxin-and-PNK-like factor* (APLF). Les DNA-PKc sont des membres de la famille des PI3K, qui incluent deux autres protéines essentielles dans la réponse au dommage à l'ADN, *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) et *ATM and Rad3- related* (ATR). L'étape suivante requiert plusieurs acteurs qui sont différents en fonction de la configuration de la cassure et de la nature de l'ADN. En effet différentes étapes comme celles décrites au cours du BER sont nécessaires : création d'un rabat, exonucléation, création de

liaison phosphodiester. Les protéines impliquées sont : Artémis, PNKP, APLF, Pol $\mu$ , Pol $\lambda$ , Werner, Aprataxine, et Ku. La dernière étape correspond à la ligation des deux brins cassés d'ADN grâce à la *DNA Ligase IV*.

#### 2.2.11.2.2 Recombinaison homologue

Le système de RH (Figure 11) utilise comme trame le plus souvent la chromatine sœur de l'ADN endommagé ce qui assure une réparation conservatrice et non mutagène. Ceci n'est donc possible que durant la fin de la phase S et au cours de la phase G2 après réplication de l'ADN<sup>58</sup>. C'est donc un processus très régulé en trois phases distinctes.

La première phase consiste à générer sur l'extrémité 3' de la cassure un seul brin d'ADN. Des endonucléases sont donc nécessaires pour supprimer les nucléotides du brin 5' : il s'agit du complexe MRN (MRE11, RAD50, and NBS1). La seconde étape correspond à la protection de ce brin d'ADN isolé en le recouvrant de multiples filaments de *Replication Protein A* (RPA). Au cours de la troisième étape, le RPA est remplacé par RAD51 au cours d'un processus BRCA1 et BRCA2 dépendant qui va permettre la recombinaison en utilisant le modèle de l'ADN homologue<sup>59</sup>.

#### 2.2.12 Résistance au traitement

Les GB restent des tumeurs très résistantes aux traitements. Seules quelques modestes augmentations de durée de survie sont observées malgré des résections chirurgicales importantes et une association radio-chimiothérapies adaptée. Ces résistances thérapeutiques peuvent être liées à différents facteurs :

- La pénétrance incertaine des procédés pharmaceutiques du fait de la barrière hématoencéphalique et de la haute pression interstitielle au sein même de la tumeur.
- La synthèse de système de rejet des substances pharmacologiquement actives (Pompes)
- Les propriétés invasives des cellules de GB qui sont capables de s'étendre dans tout le système nerveux central et de passer la barrière hématoencéphalique.
- La maintenance du système de réparation des lésions de l'ADN empêchant l'action efficace des chimiothérapies et radiothérapies.
- Une hétérogénéité intra-tumorale et une instabilité génomique dans les populations clonales résistantes au traitement. Notamment une sous population : les GIC qui contribuent à l'hétérogénéité tumorale

- Les changements oncogéniques et épigénétiques survenus au fur et à mesure de l'évolution de la tumeur.
- L'immuno-modulation des cellules de GB

### **2.2.13 Facteurs pronostiques**

#### **2.2.13.1 Age**

Plusieurs séries prospectives ont montré que les patients plus jeunes avaient un meilleur pronostic que les patients plus âgés. L'âge est donc un facteur pronostique. Les patients plus âgés, vont avoir des stratégies de traitement différentes pour préserver au maximum leur qualité de vie. Bien que l'âge soit un critère pronostic aucun *cut-off* n'est défini pour les décisions cliniques.

#### **2.2.13.2 Etat clinique et cognitif**

Les différentes études s'accordent pour considérer que l'existence d'un déficit neurologique est un facteur péjoratif. Les déficits neurologiques correspondent cependant à des atteintes variées. Un score fonctionnel de Karnofsky supérieur à 70-80, est corrélé à une survie plus longue.

#### **2.2.13.3 Localisation et taille du GB**

Les tumeurs de plus de 5-6 cm de grand axe et qui sont sur la ligne médiane ont été associées à un mauvais pronostic<sup>60</sup>. Les tumeurs supratentorielles et du cervelet qui ne sont pas accessibles à la chirurgie présentent un meilleur pronostic que les tumeurs situées au niveau du tronc cérébral et du diencephale<sup>61</sup>.

#### **2.2.13.4 Résection chirurgicale**

De nombreuses études ont démontré l'importance d'une résection maximale par rapport à une résection partielle ou une biopsie : il existe une augmentation statistiquement significative de la survie sans progression et de la survie totale<sup>62</sup>.

#### **2.2.13.5 Histopathologie**

Seul les GB à cellules géantes semblent avoir un meilleur pronostic par rapport aux autres types et sous types de GB. Il n'y a actuellement pas de véritable explication à cette particularité de GB à cellules géantes et ces données restent très limitées.

La nécrose extensive est associée à une survie plus faible.

### **2.2.13.6 Facteurs pronostiques en imagerie**

Le rôle pronostique de la vitesse de croissance tumorale, majeur dans les gliomes de grade II<sup>63</sup>, n'a pas encore été étudié dans les gliomes malins. L'intérêt pronostique de l'œdème péritumoral est controversé. De récentes études suggèrent que les patients qui ont un œdème péritumoral majeur avant tout traitement ont un pronostic plus sévère<sup>64</sup>. Les patients avec des lésions multifocales ou de petites lésions satellites d'un GB ont une survie médiane 4,3 fois plus courte que ceux avec une lésion uni-focale<sup>64</sup>.

La localisation tumorale influe sur de nombreux paramètres cliniques : l'état neurologique et fonctionnel, la taille tumorale et l'extension, la possibilité et la qualité de la résection chirurgicale. Les patients qui ont un GB frontal survivent plus longtemps que ceux qui ont une tumeur temporale ou pariétale (médiane de survie respectivement de 11,4 mois, 9,1 mois et 9,6 mois)<sup>65</sup>. Certains paramètres de spectroscopie par RMN, comme la valeur relative maximale intra tumorale de la choline (rapport Cho/Créatine et Cho/NAA) et du groupe lactates lipides pourraient être corrélés négativement à la survie. Ces résultats demandent, cependant, à être confirmés à plus grande échelle.

Le volume sanguin cérébral tumoral relatif (rCBV) maximum mesuré sur les séquences l'IRM de perfusion avant tout traitement pourrait constituer un facteur pronostic dans les GB<sup>66</sup>. Ce rCBV maximum est en moyenne plus élevé dans les GB que dans les astrocytomes de grade III. La présence à l'intérieur de la tumeur d'une zone avec rCBV maximum élevée (> 2,3) semble corrélée à un plus mauvais pronostic (taux de survie à deux ans égal à 5 % versus 25 %).

### **2.2.13.7 Facteur pronostiques biologiques**

De nombreux marqueurs biologiques ont été proposés comme ayant une valeur prédictive de la survie globale ou de la réponse aux traitements complémentaires. Ces marqueurs correspondent à certaines mutations (IDH1, PTEN, EGFRvIII), à des modifications chromosomiques (délétion 10q, 1p, 19q) ou à la dysrégulation épigénétique de certains gènes (méthylation du promoteur de *MGMT*). Certains de ces marqueurs (comme p53, EGFR, IDH1...etc) permettent d'identifier des sous-groupes de GB appartenant à des voies oncogéniques différentes ayant des pronostics différents ; d'autres, comme *MGMT*, sont prédictifs de l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante.

#### 2.2.13.7.1 Gène *TP53* et protéine p53

La grande majorité des études portant sur la survie des GB en fonction du statut de p53 n'a pas montré de corrélation significative<sup>67</sup>.

L'altération de *MDM2*, étudiée à travers l'amplification du gène ou sa surexpression, n'est pas un facteur pronostique statistiquement indépendant pour certains auteurs<sup>21</sup>.

La chimiothérapie et la radiothérapie induisent la mort des cellules tumorales par l'intermédiaire des lésions de l'ADN qu'elles provoquent. La perte de fonction de p53 devrait diminuer ainsi l'efficacité de ces traitements. Les données concernant les patients traités sont contradictoires.

Quoiqu'il en soit, le statut de p53 ne semble pas être un facteur pronostique majeur.

#### 2.2.13.7.2 EGFR

La forme mutée EGFRvIII ne semble pas avoir de valeur pronostique dans les GB<sup>68</sup>. Plusieurs travaux ont montré que la valeur pronostique de l'amplification d'EGFR était différente en fonction de l'âge<sup>69</sup> : L'amplification d'EGFR serait un facteur de mauvais pronostic chez les patients jeunes (médiane de survie de 63 semaines si EGFR amplifié et 75 semaines si EGFR non amplifié). Inversement, l'amplification d'EGFR serait de bon pronostic chez les patients de plus de 60 ans, avec un risque relatif de 0,74. L'influence de la surexpression d'EGFR sur la radiorésistance a été suggérée par la diminution du délai sans progression après radiothérapie des GB surexprimant EGFR par rapport aux autres. Dans une série de 170 GB irradiés, il existait une nette corrélation entre l'intensité de marquage EGFR et l'absence de réponse à la radiothérapie<sup>20</sup>. Cependant, ces données n'ont pas été confirmées par d'autres études<sup>70</sup> qui diffèrent sur les critères de réponses, la technique d'IHC et l'évaluation du seuil de positivité.

#### 2.2.13.7.3 Délétions en 10q, mutations de *PTEN*

Au sein des GB, la délétion 10q pourrait être corrélée à une survie plus courte (médiane de survie de 8,8 mois versus 18 mois) mais cette corrélation était à la limite de la significativité<sup>5</sup> ou absente<sup>21</sup> dans deux études en analyse multivariée. Une surexpression de PTEN en RT-PCR est corrélée à un meilleur pronostic en analyse multivariée dans une série de GB, ce qui pourrait suggérer que d'autres types de régulation de PTEN pourraient être impliqués dans les GB<sup>71</sup>.

#### 2.2.13.7.4 MGMT

La relation entre le statut de MGMT et la chimiosensibilité aux méthylants a été clairement montrée dans la littérature. La réponse à la chimiothérapie (BCNU, procarbazine, TMZ), évaluée radiologiquement, était significativement différente en fonction du statut méthylé ou non méthylé de la région promotrice de *MGMT* : 63 % versus 4 %<sup>29</sup>.

L'inactivation de MGMT, le plus souvent par méthylation de son promoteur, est donc un facteur prédictif de la chimio sensibilité des GB, mais cette prédiction n'est pas sans faille. Le statut de MGMT reste, cependant, une aide précieuse lors de la discussion de l'indication d'une chimiothérapie adjuvante chez un patient, en particulier âgé.

#### 2.2.13.7.5 Profil d'expression génique

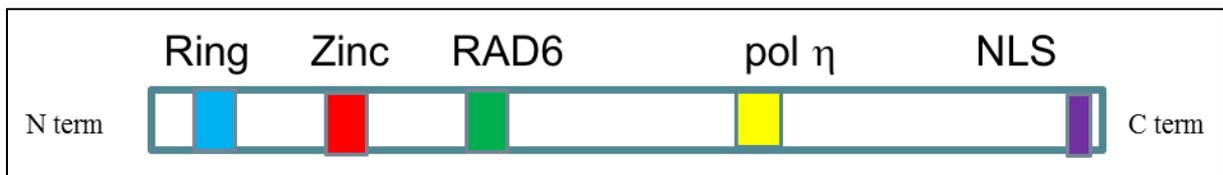
La technique des microarrays ou « puces à ADN » permet de mesurer quantitativement et simultanément l'expression de plusieurs dizaines de milliers de gènes (transcriptome). Différentes méthodes d'analyse informatique peuvent être utilisées pour définir des groupes (*clusters*) de gènes dont l'expression différentielle permet de distinguer des groupes de tumeurs. Le regroupement hiérarchique est utilisé pour identifier des groupes de tumeurs aux profils d'expression génique globalement similaires, qui peuvent ensuite être confrontés avec d'autres critères comme le grade, le type histologique, des caractéristiques biologiques ou cliniques ou la survie. De manière alternative, il est possible d'identifier des groupes de gènes dont l'expression est corrélée avec un paramètre biologique ou clinique défini, ou avec la survie. L'étude du profil d'expression génique permet de différencier les gliomes de bas grade et ceux de haut grade. Cependant, peu d'études ont cherché à différencier des gliomes malins morphologiquement très semblables mais aux pronostics différents et à établir des corrélations entre profil transcriptionnel et survie.

Une étude en regroupement hiérarchique a classé 200 GB en quatre groupes, en fonction de leur profil l'expression génique<sup>67</sup>. Bien que cette classification soit indépendante du statut MGMT, la chimiothérapie semblait moins efficace dans certains groupes. Cependant, la survie ne différait pas significativement selon les groupes.

Ces résultats suggèrent que le profil d'expression génique pourrait être un facteur pronostique indépendant, mais les groupes de gènes les plus pertinents pour établir une corrélation avec le pronostic restent à préciser.

## 2.3 RAD18

RAD18 est une ubiquitine ligase de type E3<sup>4</sup> de 487 acides aminés chez le *Saccharomyces Cerevisiae* et de 495 acides aminés chez l'homme<sup>72</sup>. La protéine RAD18 chez *S. Cerevisiae* interagit avec la protéine RAD6. Elle a été isolée pour la première fois sur la base d'une augmentation de sensibilité aux agents ultraviolets, les rayons ionisants et d'autres agents entraînant des dommages à l'ADN. RAD18 (Figure 12) est une protéine très bien conservée qui contient un domaine RING-finger du côté N-terminal, un domaine doigt de zinc suivi d'un domaine SAP au milieu de la protéine sur lequel se fixe RAD6.



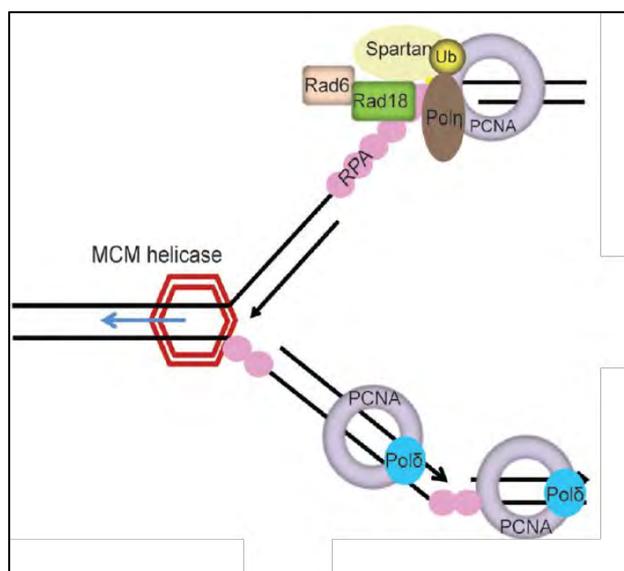
**Figure 12 : Schéma de structure de la protéine RAD18**

C'est un acteur clé de la voie de réparation post-réplication (PRR) et particulièrement la voie de la réplication translésionnelle. RAD18 va former un complexe E2-E3 avec RAD6 chez la levure ou HHR6A/HHR6B chez l'homme pour promouvoir la mono ubiquitinylation de *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA). Ceci est une étape cruciale dans cette voie très conservée chez l'homme et la levure<sup>73</sup>.

En complément de cette fonction traditionnelle dans la réplication translésionnelle, RAD18 a un rôle dans le système de réparation des cassures doubles brins de l'ADN aussi bien dans la recombinaison homologue que dans le mécanisme de ligation des extrémités non homologues<sup>74</sup>.

Il a également un rôle dans le signal de dommage à l'ADN qui implique ATM, MDC1 and RNF8 lié également au système de réparation RH via leur interaction avec RAD51c.

### 2.3.1 RAD18 et la synthèse Translésionnelle (TLS)

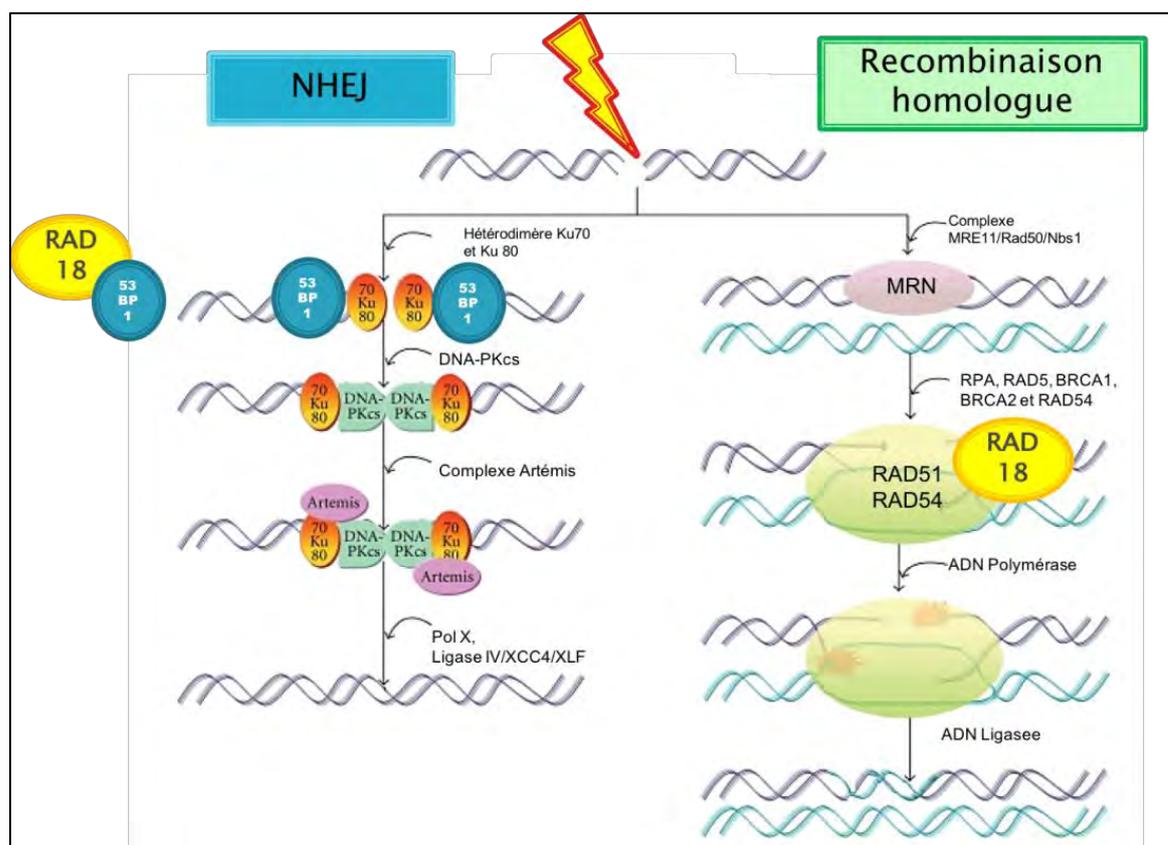


**Figure 13 : Rôle de RAD18 dans la réplication translésionnelle**

Les différentes agressions de la molécule d'ADN vont entraîner des erreurs qui ne pourront pas être réparées avant la phase de réplication. Certains mécanismes vont permettre ces réparations au sein même de la fourche de réplication (Figure 13). Les lésions de l'ADN vont généralement former des brins isolés d'ADN qui seront recouverts de filaments de RPA pour les protéger et va permettre au mécanisme de la TLS d'entrer en jeu directement au niveau de la fourche de réplication<sup>75</sup> (Figure 13). Les filaments de RPA à travers une interaction directe avec RAD18 et un recrutement du complexe RAD6–RAD18, vont catalyser la réaction de monoubiquitinylation de PCNA<sup>76</sup>. La mono-ubiquitinylation de PCNA sur le résidu lysine164 est considérée comme une étape cruciale dans la régulation de la réparation des lésions pendant la réplication<sup>77</sup>. Cette mono-ubiquitinylation of PCNA active la voie de la TLS en facilitant le recrutement des polymérase tolérant les erreurs qui vont s'accrocher à cette PCNA mono-ubiquitinyllée au sein de la fourche de réplication<sup>77</sup>. Ces polymérase appartiennent à la famille Y des Polymérase de l'ADN : Polη and Polξ Polk et Polη<sup>78</sup>.

L'ubiquitinylation de PCNA peut être reversée par USP1, ce qui permet de continuer la synthèse avec une polymérase comportant un haut niveau de fidélité : Polδ<sup>79</sup>. Si PCNA est polyubiquitinyllé cela va entraîner un autre choix de réparation : la voie de synthèse translésionnelle autorisant les erreurs<sup>77</sup>.

## 2.3.2 RAD18 et Recombinaison Homologue (RH)



**Figure 14 : Rôle de RAD18 dans la RH et la NHEJ**

Au-delà de son rôle pivot dans la réplication TLS, plusieurs études rapportent un rôle de RAD18 dans le système de réparation de type RH (Figure 14). Les cellules DT40 (Lymphome de poulet) RAD18-déficientes montrent une diminution des réarrangements des immunoglobulines qui est un des rôles essentiels de la RH<sup>80,81,82</sup>.

RAD18 peut être recruté au niveau des sites de cassures double brins de l'ADN via son domaine doigt de zinc de façon RNF8/UBC13-dépendante<sup>83</sup>. Une délétion du domaine doigt de zinc de RAD18 entraîne une abolition de la localisation de RAD18 au niveau de ces points de cassure. Elle élimine son rôle dans le RH<sup>83</sup>. Mécanistiquement, Huang et al.<sup>83</sup> ont montré que l'action de RAD18 dans la RH ne requiert pas son activité E3 ligase et donc une absence de lien avec RAD6 dans cette fonction. RAD18 aurait une fonction d'adaptateur car il peut interagir directement avec RAD51C, permettre son accumulation et ainsi faciliter la formation de foci de RAD51 dans la RH.

Pour une réponse optimale aux dommages à l'ADN, la cellule a besoin de synchroniser les signaux de dommages avec les systèmes de réparation. RAD18 est un bon exemple de molécules faisant le lien entre ces deux systèmes.

### 2.3.3 RAD18 et Ligature des extrémités non homologues(NHEJ)

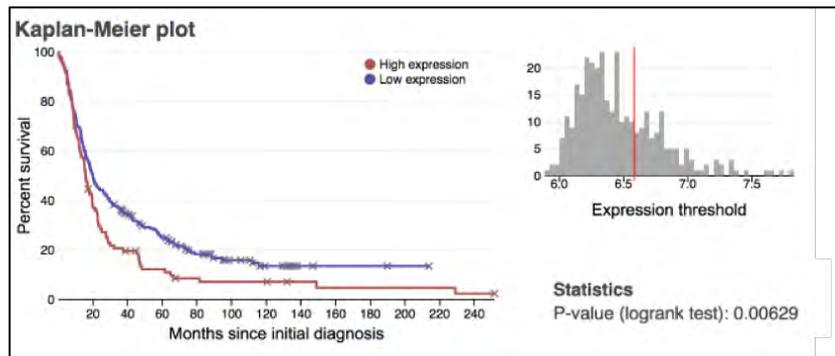
Kobayashi et al.<sup>84</sup> ont montré que RAD18 est recruté au niveau des sites de cassures double brins post-irradiation (Figure 14). Il est colocalisé avec 53BP1, NBS1, ATM phosphorylé, BRCA1 et  $\gamma$ -H2AX. RAD18 est recruté au niveau des cassures doubles brins de façon dépendante de 53BP1 durant la phase G1<sup>84</sup>. De plus RAD18 permet le mono-ubiquitylation de 53BP1 sur la lysine 1268 in vitro. Cette modification de 53BP1 facilite son interaction avec la chromatine et permettrait un meilleur signal des sites endommagés. 53BP1 est également connu pour ses rôles dans les systèmes de réparation de l'ADN<sup>85</sup>. Dans les cellules KO pour RAD18, il existe une diminution des foci de 53BP1, une diminution de l'efficacité des réparations des cassures et de la viabilité post irradiation comparée aux cellules sauvages.

## 2.4 RAD18 et glioblastome

Kermi et al.<sup>86</sup> ont montré que RAD18 est surexprimé dans des GIC isolées à partir de biopsie de GB humain sans augmentation de l'expression de RAD6, des autres acteurs de la TLS et des checkpoints. Ces résultats sont en miroir de ceux trouvés au sein des profils *Gene Expression Omnibus* (GEO) qui montrent une expression d'ARNm de RAD18 augmentée dans les GB. De plus Kermi et al.<sup>86</sup> ont également montré que l'inhibition de l'expression de RAD18 des cellules différenciées de GB, les U87, induit une augmentation de la sensibilité au cisplatine et que la réexpression de RAD18 entraîne une augmentation de leur viabilité. De plus l'augmentation d'expression de RAD18 pourrait conférer aux GB, un avantage prolifératif et une tolérance aux dommages à l'ADN.

Xie et al.<sup>87</sup> ont montré qu'il existait une relation entre l'expression augmentée de RAD18 et des propriétés de radiorésistance de certaines cellules de GB différenciées. Une déplétion endogène de RAD18 via un ShARN induit une augmentation de la létalité cellulaire face aux irradiations via des mécanismes d'apoptose. Ils ont également montré qu'il persistait des lésions à l'ADN suite aux irradiations et ont suggéré mais sans le prouver un rôle de RAD18 dans le mécanisme de RH. Ils ont également montré que l'expression de RAD18 est fortement augmentée dans les GB humains primaires et que cette expression est encore augmentée dans les récurrences de GB ayant été traitées par RT.

En parallèle, les analyses in silico disponibles sur la base de données Rembrandt montrent que les patients ayant un GB surexprimant RAD18 ont une survie significativement diminuée (Figure 15).



**Figure 15 : Courbe de survie de Kaplan Meyer de l'étude REMBRANDT de 178 GB extraites du site *Betastatic***

Ainsi ces différents résultats suggèrent sans connaître la mécanistique exacte de RAD18 que cette protéine est potentiellement une nouvelle cible thérapeutique dans les GB qui sont des tumeurs très agressives, radio et chimiorésistantes.

### 3 Objectifs de l'étude

L'objectif de cette thèse vise à étudier l'effet radiosensibilisant de l'inhibition de RAD18 dans différentes lignées cellulaires humaines de GB (ATCC) et de GIC issues de patients, et d'étudier son niveau d'expression dans des GB de patients. Ce projet pourrait à terme, mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique, RAD18, dans la sensibilisation des cellules de GB aux traitements.

## 4 Matériels et Méthodes

### 4.1 In Vitro

#### 4.1.1 Lignées cellulaires

##### 4.1.1.1 Cellules différenciées

3 lignées humaines de GB disponibles au laboratoire sont utilisées (U87, U251, LN18) provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide (90 %) en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>, *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM, Gibco Invitrogen à 5 % de glucose, 1 % de glutamine et supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (DMEM 10 % SVF). Les lignées sont passées 1 à 2 fois par semaine pour les maintenir dans une phase de croissance exponentielle.

##### 4.1.1.2 Cellules initiatrices de glioblastome (GIC)

Ces cellules sont issues de tumeurs de 2 patients, 2 lignées de neurosphères (C1 et SC1) enrichies en GICet caractérisées au laboratoire comme précédemment décrit<sup>88</sup>. Elles sont maintenues en suspension dans des conditions similaires aux cellules différenciées, cultivées dans un milieu approprié (milieu souche ou *Stem Cell Medium*), composé de *Dulbecco's modified eagle medium* F12 (DMEM-F12, Invitrogen), supplémenté en B27 (2 %, Invitrogen), N2 (1 %, Invitrogen), EGF (50ng/mL, Peprotech) et FGF (20ng/mL, Peprotech)

#### 4.1.2 Transfection par *Small Interferions* ARN (siARN)

350 000 cellules sont ensemencées en plaque 6 puits et maintenues en culture jusqu'à une confluence de 60 à 80 %. Elles sont transfectées avec 30pmol d'un siARN contrôle (siClt, Qiagen AllStars Neg.) ou 30 pmol d'un siARN spécifique de RAD18 (siRAD18, MWG, 5'-GAGGAUUCUUCUAGCUGUA-3') en utilisant l'agent de transfection Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) et en respectant les instructions du fournisseur.

#### 4.1.3 Transfection par *Small Harpin* ARN (shARN)

##### 4.1.3.1 Sous forme de plasmide

350 000 cellules sont ensemencées en plaque 6 puits et maintenues en culture jusqu'à une confluence de 60 à 80%. Elles sont transfectées avec 1,2µg de plasmide contenant la séquence d'un shARN dirigé contre RAD18 (ShRAD18-1, 5'-AGAGGATTCTTCTAGCTGTAT-3' ou ShRAD18-3, 5'-TGGTTCTACATCAGAGTTGTT-3', (Qiagen) ou une séquence contrôle (shClt, 5'-GGATCTCATTCGATGCATAC-3') couplées au gène de résistance à la

néomycine, en utilisant un agent de transfection Attracten (Qiagen) conformément aux instructions du fournisseur. Elles sont maintenues en culture pendant 4 jours avec 2mL de DMEM 10%SVF puis, ajout de la néomycine (1000µg/mL, Merck) pour sélectionner les clones et obtenir des lignées stables. Les cellules sont maintenues dans un milieu avec 1000µg/mL de néomycine à long terme. 4 séquences de shARN ont été testées et les shRAD18-1 et shRAD18-3 ont été sélectionnés au vu de l'inhibition de RAD18 obtenue par Western Blot après sélection avec la néomycine.

#### **4.1.4 Irradiation**

Les cellules transfectées sont irradiées à la dose de 4 Gy en fractionné (irradiateur GammaCell Nordion Exactor 40). Une première dose de 2 Gy 24h après transfection pour les siRNA ou 24h après ensemencement pour les shRNA, puis une deuxième dose de 2Gy, 24h plus tard. Les cellules sont maintenues en culture jusqu'à analyse.

#### **4.1.5 Test de survie**

24h après transfection par siClt ou siRAD18, les cellules sont ensemencées à faible densité dans des plaques 6 puits (U87, LN18, U251 : 1500 cellules par puits, 1000 cellules par puits et 750 cellules par puits) puis plus ou moins irradiées de façon fractionnée. Lorsque les clones atteignent 50 cellules, les cellules sont fixées avec de l'AFA puis colorées au Crystal violet. Au sein de chaque puit, les colonies sont comptées et permettent de déterminer la fraction de survie (Rafehi et al., 2011).

#### **4.1.6 Activité Caspase 3/7**

Le caspase buffer est mélangé avec le substrat des caspases (Caspase-Glo 3/7 assay, Promega) selon le protocole du fournisseur. Dans une plaque 96 puits, 20000 cellules sont maintenues dans 100 µL de milieu avec 65µL du mix précédent. Cette plaque est incubée à 37°C pendant 1h à l'obscurité avant de lire les résultats au spectrofluoromètre.

#### **4.1.7 Cytométrie en flux**

Ces études sont réalisées 72h après transfection par siClt ou siRAD18.

##### ***4.1.7.1 Analyse de la mort cellulaire par double marquage Annexine V / Iodure de Propidium (IP)***

Ces études sont réalisées 72h après transfection avec un si contrôle (siClt) ou un siRAD18. Les cellules sont trypsinisées puis centrifugées (1800rpm, 4min, 4°C). Les culots sont repris dans 100µL de tampon de liaison à l'Annexine V (Invitrogen) et incubés avec 5µL

d'Annexine V (pour identifier les cellules apoptotiques) pendant 15 min à température ambiante à l'obscurité. 100µL de tampon de liaison à l'Annexine V et 5µL d'une solution de Iodure de Propidium (IP) (pour distinguer les cellules nécrotiques) sont ajoutés. Les cellules sont conservées dans la glace jusqu'au passage en cytométrie en flux (AccuriC6, BD).

#### 4.1.7.2 Cycle cellulaire par marquage IP

Les cellules sont fixées dans de l'éthanol froid 70 %. Elles sont lavées et perméabilisées après centrifugation (1800rpm, 4min x 3,4 °C) avec une solution PBS 0,1 % Tween. Elles sont incubées pendant 15min à 37°C dans l'obscurité avec une solution de PBS 0,1 % Tween supplémentée de 5mg/mL de RNase et de 5µL/mL d'IP. Les cellules sont conservées dans la glace jusqu'au passage en cytométrie en flux (AccuriC6, BD).

### 4.1.8 RT PCR quantitative

#### 4.1.8.1 Extraction des ARNs et réaction de transcription

##### Inverse

Les ARNm sont extraits en utilisant le kit RNeasy mini kit (Qiagen). La réaction de Transcription inverse est effectuée avec le kit iScript cDNA synthesis (Biorad) en suivant les instructions du fournisseur.

#### 4.1.8.2 PCRq

Les ADNc obtenus sont analysés par PCRq (Step one Plus, Applied Biosystems), grâce à des amorces sélectionnées et validées (Tableau 1).

Gène	Amorce sens (5'- 3')	Amorce anti-sens (5'- 3')
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>RAD18</i>	GAGCCGGATCTGAAAAATAACCG	GCTGGTGACTCTAAAGCAAACCTG
<i>RAD51</i>	CGAGCGTTCAACACAGACCA	GTGGCACTGTCTACAATAAGCA
<i>53BP1</i>	TGAGCAGTTACCTCAGCCAAA	AAGGGAATGTGTAGTATTGCCTG

**Tableau 1 : Liste des amorces utilisées au cours de la qPCR**

Les résultats sont obtenus pour chaque gène en nombre de cycles d'amplification pour atteindre une concentration donnée (Ct) (logiciel StepOne). Ils sont ensuite normalisés par rapport au gène de référence (GAPDH) ( $\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ GAPDH}$ ). A partir de ces valeurs, le  $\Delta Ct$  d'un gène pour une condition donnée est rapporté à la valeur du  $\Delta Ct$  dans la condition contrôle afin d'établir le  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ contrôle}$ ). Le calcul de l'amplification du niveau d'ARNm par rapport au contrôle se fait par la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 4.1.9 Western Blot

### 4.1.9.1 Lyse des cellules et dosages protéiques

Les culots cellulaires sont resuspendus dans 50 à 200µL de tampon de lyse (Tris 50mM pH7.6, NaCl 150mM, NP40 1%, Sodium desoxycholate 0,1 %, SDS 0,1 %) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (1/100<sup>ème</sup> *Protease inhibitor cocktail*, Sigma), d'inhibiteurs de phosphatases (1/100<sup>ème</sup> *Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Sigma) puis incubés 30 min à 4°C. Les lysats sont ensuite centrifugés 10 min à 12000 rpm. Les surnageants sont prélevés et les protéines sont dosées par la méthode colorimétrique de Bradford (Biorad). 30µg de protéines sont prélevées et supplémentées par du tampon Laemmli 5X (Biorad) au 1/10<sup>ème</sup> de Dichlorodiphényltrichloroéthane (DTT). Les protéines sont dénaturées et réduites 10 min par chauffage à 95°C.

### 4.1.9.2 Migration et transfert des protéines

Chaque échantillon (30µg) est déposé et soumis à l'électrophorèse sur gel PAGE-SDS à 10 %. La migration s'effectue pendant 2h30 (60V pour le gel de concentration puis 110V pour le gel de séparation) dans le tampon de migration (Tris 0,025mM pH8.3, glycine 19mM, SDS0.1 %). Les protéines séparées sur le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (2h00, 250mA) dans le tampon de transfert (Tris 0,025mM, pH 8.3, glycine 19mM, CH<sub>2</sub>OH 20 %)

### 4.1.9.3 Immunoblots

Les membranes sont saturées avec 10mL de TBS-0.1 %Tween 20 (TBS-T) avec 10 % de lait pendant 1h. Elles sont alors hybridées avec l'anticorps primaire (Tableau 2) dans 10mL de tampon TBS-T/1 % lait pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, après 3 lavages au TBS-T (3 x 5 min), l'anticorps secondaire approprié conjugué à la peroxydase est ajouté au TBS-T/1 % lait pendant 1h. Après les lavages (3x5 min), les membranes sont mises en contact avec la solution de révélation contenant le substrat de la peroxydase (Pierce ELC Western Blotting substrate, Thermo Scientific), permettant ainsi la révélation des membranes par chimioluminescence.

<b>Protéine</b>	<b>Anticorps Primaire</b>	<b>Anticorps Secondaire</b>
GAPDH	Anticorps anti-GAPDH (1/10000 <sup>ème</sup> , Chemicon)	Anticorps anti-souris (1/10000 <sup>ème</sup> , Biorad)
RAD18	Anticorps anti-RAD18 (1/1000 <sup>ème</sup> , Abcam)	Anticorps anti-lapin (1/10000 <sup>ème</sup> , Biorad)
RAD51	Anticorps anti-RAD51(1/1000 <sup>ème</sup> , Abcam)	Anticorps anti-lapin (1/10000 <sup>ème</sup> , Biorad)
53BP1	Anticorps anti-53BP1(1/1000 <sup>ème</sup> , Abcam)	Anticorps anti-lapin (1/10000 <sup>ème</sup> , Biorad)
PCNA	Anticorps anti-PCNA (1/2000 <sup>ème</sup> , Cell Signaling)	Anticorps anti-lapin (1/10000 <sup>ème</sup> , Biorad)
Ku80	Anticorps anti-(1/1000 <sup>ème</sup> , Abcam)	Anticorps anti-lapin (1/10000 <sup>ème</sup> , Biorad)
Nbs1	Anticorps anti-(1/1000 <sup>ème</sup> , Abcam)	Anticorps anti-lapin (1/10000 <sup>ème</sup> , Biorad)
RAD54	Anticorps anti-(1/1000 <sup>ème</sup> , Abcam)	Anticorps anti-lapin (1/10000 <sup>ème</sup> , Biorad)

**Tableau 2 : Référence des anticorps utilisés au cours de la technique de Western Blot**

## 4.2 Sélection de patient

Il s'agit d'une étude réalisée sur 40 patients ayant subi une résection chirurgicale d'un glioblastome dans le service de neurochirurgie de l'Hôpital Pierre Paul Riquet à Toulouse en 2016 et dont les blocs de paraffine étaient disponibles au sein du laboratoire d'Anatomie Pathologique. Pour 10 d'entre eux, une étude immunohistochimique a été réalisée sur la résection initiale et la récurrence de la tumeur.

L'ensemble des patients a donné son consentement éclairé en accord avec la déclaration d'Helsinki auprès du Centre de Recherche Biologique (CRB) Cancer des Hôpitaux de Toulouse (BB-0033-0014).

### 4.2.1 Recueil de données

Les données cliniques et le suivi des patients, ont été recueillis à l'aide des logiciels de traitement du dossier médical Orbis, Dossier Patient Informatisé (DPI). Les données histopathologiques ont été recueillies à l'aide du logiciel Diamic.

### 4.2.2 Immunohistochimie

#### 4.2.2.1 Protocole technique

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes de 4 µm d'épaisseur à partir des blocs de paraffine de différents échantillons à l'aide du kit En Vision™ Flex (Dako). Les lames ont été déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de xylène et d'alcool à des concentrations décroissantes. Un démasquage des épitopes a été réalisé par chauffage dans un bain marie à 95°C, dans une solution de citrate (pH 6) pendant 30 minutes. Un blocage des peroxydases endogènes a été effectué pendant 20 minutes, puis une incubation avec l'anticorps primaire RAD18 (ab188235, Abcam,). Les lames ont été ensuite incubées pendant

30 minutes avec une solution contenant des polymères de dextrane couplés à des molécules d'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin et des molécules de peroxydases. La contre-coloration a été effectuée avec de l'hématoxyline pendant 20 minutes.

#### **4.2.2.2 Interprétation**

Seul le marquage nucléaire de l'anticorps anti-RAD18 a été analysé. Car il correspond à la forme active de la protéine RAD18.

##### **4.2.2.2.1 Score IRS**

L'analyse des marquages a été effectuée selon le score d'immunomarquage IRS (ImmunoReactive Score), prenant en compte l'intensité du marquage (0 ; 1=intensité faible ; 2= intensité modérée ; 3= intensité forte) et le pourcentage de cellules marquées (0% ; 1= moins de 10% ; 2= 10-50% ; 3= 50-80% ; 4= plus de 80%). Le score IRS correspond au produit de l'intensité du marquage et du pourcentage de cellules marquées.

##### **4.2.2.2.2 Score H**

L'analyse des marquages a été effectuée selon le score H. Il s'obtient en additionnant les produits des intensités par le pourcentage de cellules marquées selon la formule suivante :

H-Score : 3 x le pourcentage de cellules fortement marquées + 2 x le pourcentage de cellules modérément marquées + 1 x le pourcentage de cellules faiblement marquées. Ce score sera compris entre 0 et 300.

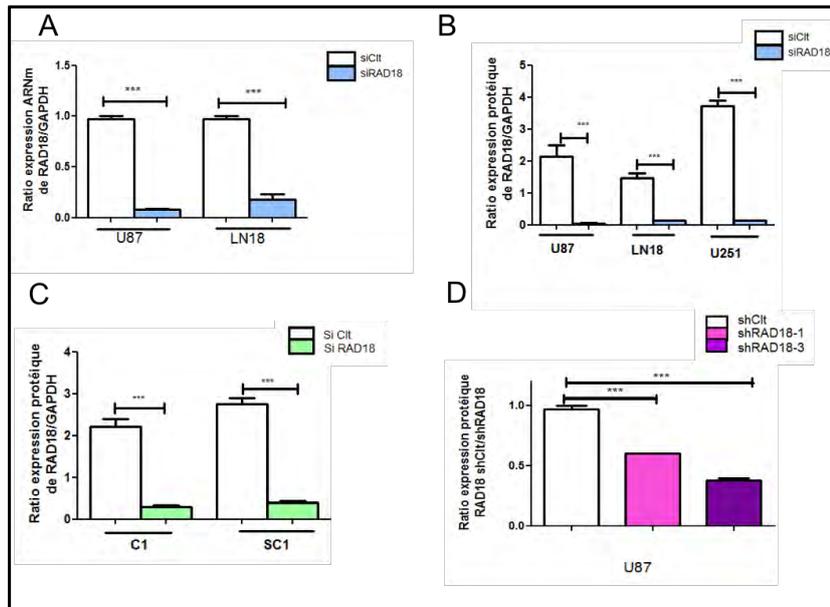
### **4.3 Analyses statistiques**

Les résultats in-vitro sont présentés comme les moyennes d'au moins 3 expériences indépendantes  $\pm$  Erreur Standard sur la moyenne (ESM). Les comparaisons des valeurs de chaque condition par rapport à sa condition contrôle sont effectuées par Test-t de Student. L'analyse de corrélation entre les différents marqueurs a été effectuée avec le test de corrélation de Spearman. La comparaison entre les groupes a été faite avec le test du  $\chi^2$  pour les variables qualitatives. Pour les variables quantitatives, la comparaison entre les deux groupes a été réalisée avec le test de Mann-Whitney. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque  $p \leq 0.05$ . La survie globale a été estimée par la méthode de Kaplan Meier.

## 5 Résultats

### 5.1 Contrôle de l'efficacité des siARN et des shARN dans les GIC et les lignées ATCC de GB

#### 5.1.1 Efficacité de la transfection transitoire avec siARN spécifiques de RAD18



**Figure 16 : Inhibition de RAD18 par transfection transitoire dans les lignées de GB et GIC.**

L'expression transcriptionnelle et protéique est testée 72h après une transfection transitoire par siARN spécifique de RAD18 (siRAD18) par rapport au contrôle (siClt). **A.** Histogramme représentant l'expression en ARNm de RAD18 normalisée à 1 par rapport au contrôle. **B.** et **C.** Histogrammes représentant l'expression protéique de RAD18 en ratio par rapport à celle de la GAPDH, dans les cellules de GB ATCC (**B.**), dans les GIC (**C.**). **D.** Histogrammes représentant l'expression protéique de RAD18 en ratio par rapport à la GAPDH, dans la lignée U87 après transfection stable avec shARN spécifique de RAD18 (shRAD18) et sélection avec la néomycine. Les résultats sont présentés comme les moyennes de 3 expériences indépendantes  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05 = (*)$ ,  $p \leq 0.01 = (**)$ ,  $p \leq 0.001 = (***)$   $n = 3$ .

Dans un premier temps, nous avons modulé négativement l'expression de RAD18 afin de déterminer si son inhibition pouvait avoir un effet fonctionnel sur les cellules de GB et les GIC (Figure 16). Pour cela, nous avons utilisé la technique de transfection d'un siARN. Nous avons étudié et déterminé le niveau d'expression de l'ARNm et de protéine de RAD18.

Les profils d'expressions transcriptionnels et protéiques sont similaires pour les lignées U87 et LN18 (Figure 16A). La transfection transitoire d'un siARN spécifique de RAD18 provoque une inhibition de 80 à 90 % de l'expression totale de la protéine dans chaque lignée testée : lignées ATCC et GIC (Figure 16B, C). Ces résultats démontrent la très bonne efficacité de notre système d'inhibition par siARN anti-RAD18. Il est à noter que nous avons utilisé différentes séquences de siARN spécifiques pour RAD18 afin d'éliminer les effets hors cibles.

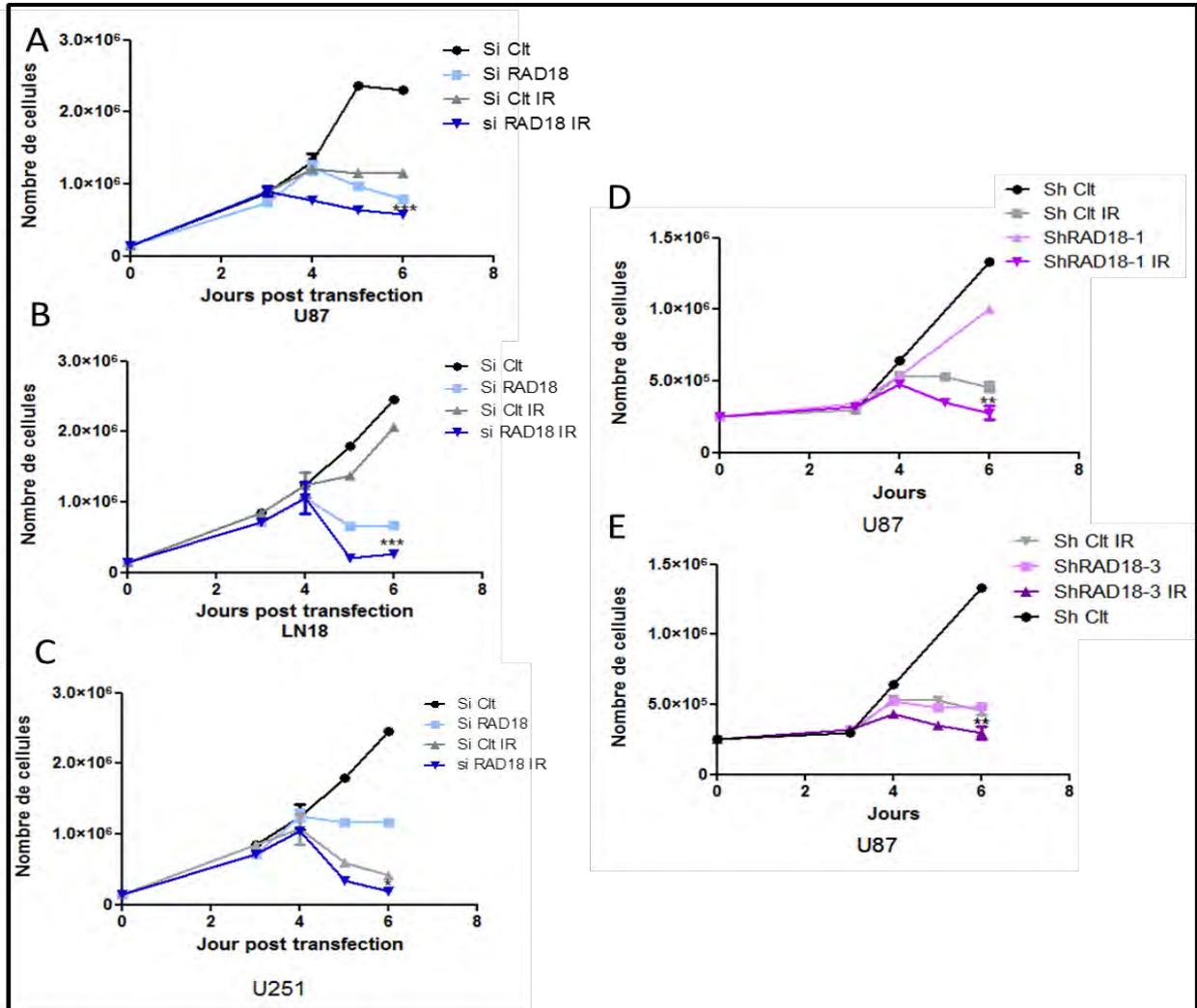
### **5.1.2 Transfection stable des shARN ciblant RAD18 dans la lignée U87**

Nous avons modulé négativement l'expression de RAD18 par une transfection stable afin de déterminer si son inhibition pouvait avoir des effets fonctionnels différents de ceux obtenus avec une transfection transitoire. Pour cela, nous avons utilisé la technique de transfection d'un shARN au sein d'un plasmide avec une sélection par antibiotique (Néomycine). Nous avons étudié et déterminé le niveau d'expression de l'ARNm et de protéine de RAD18.

La transfection de shARN spécifique de RAD18 provoque une inhibition, de 40 % à 60 % en moyenne, de la protéine dans chaque lignée testée (Figure 16 D). Ces résultats démontrent l'efficacité de notre système d'inhibition par shARN pour RAD18. Il est à noter que nous avons utilisé différentes séquences de shARN spécifiques pour RAD18 afin d'éliminer les effets hors cibles.

## 5.2 Étude de l'effet radio sensibilisant de l'inhibition de RAD18 dans les cellules ATCC de GB et les GIC

### 5.2.1 Effet sur le nombre de cellules



**Figure 17** : Effet de l'inhibition de RAD18 sur le nombre de cellules RAD18 dans les cellules de GB et les GIC.

A. B. C. Courbes représentant le nombre de cellules comptées quotidiennement pendant 6 jours après transfection avec siClt (courbe noire) ou siRAD18(courbe bleu clair), +/- irradiées (siClt : courbe grise /siRAD18 : courbe bleu foncé) dans la lignée U87 (A), LN18(B), U251(C). D. E. Courbes représentant le nombre de cellules comptées quotidiennement pendant 6 jours après transfection stable avec shClt (courbe noire), shRAD18-1 (D) et shRAD18-3 (E) (courbe rose) et sélection à la néomycine dans la lignée U87+/- irradiées (shClt : courbe grise/ shRAD18-1 et shRAD18-3 (courbe violette). Les résultats sont présentés comme les moyennes de 3 expériences indépendantes  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)  $n=3$ .

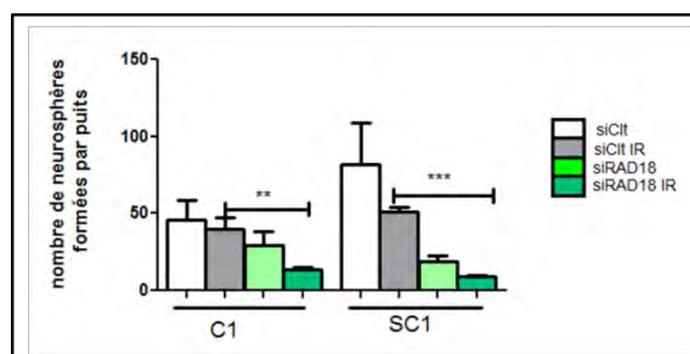
Après avoir validé l'inhibition de RAD18 dans les différentes lignées de GB et les GIC, nous avons cherché à déterminer si cette inhibition pouvait moduler le nombre de cellules. Pour cela, nous avons compté quotidiennement, sur une période de 7 jours, les cellules transfectées, dans des conditions irradiées ou non.

Dans toutes lignées non irradiées, nous avons observé que le nombre de cellules à partir de 2 jours post-transfection avec un siRAD18 diminue de façon statistiquement significative par rapport au contrôle traité par siClt. Pour les cellules irradiées et transfectées transitoirement avec RAD18 par rapport aux contrôles irradiés, le nombre de cellules diminue de façon statistiquement significative (Figure 17A, B, C).

Dans la lignée U87 transfectée de façon stable avec un shARN spécifique de RAD18, nous avons observé une diminution du nombre de cellules avec le shARN spécifique de RAD18. Les cellules irradiées et transfectées de façon stable présentent une diminution statistiquement significative du nombre de cellules par rapport aux contrôles. Nous avons observé une diminution plus importante de ce nombre de cellules en fonction du degré d'inhibition de RAD18 (350000 cellules pour 40 % d'inhibition et 280 000 cellules pour 60 % d'inhibition). (Figure17 D, E)

L'efficacité de l'inhibition a été évaluée tout au long de cette période et se révèle très concluante (Données non montrées).

## 5.2.2 Effet sur la formation des neurosphères



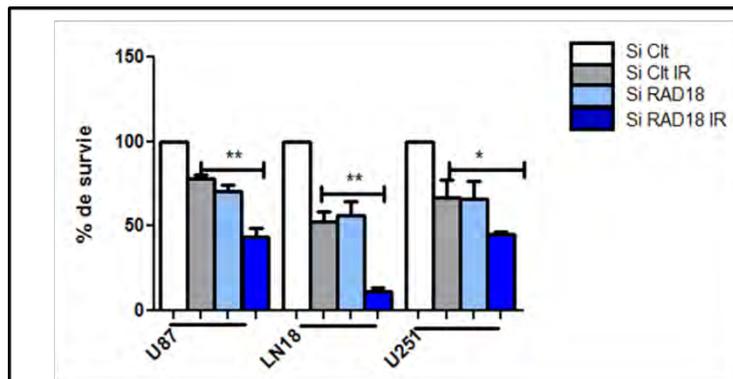
**Figure 18** : Effet de l'inhibition de RAD18 sur la formation de neurosphères.

*Histogramme représentant le nombre de neurosphères formées après transfection transitoire avec un siClt (barre blanche) ou siRAD18 (barre vert clair) +/- irradiées (siClt : barre grise, siRAD18 : barre vert foncé) et cultivées pendant 10 jours dans les GIC (C1, SC1) Les résultats sont présentés comme les moyennes de 3 expériences indépendantes  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05 = (*)$ ,  $p \leq 0.01 = (**)$ ,*

Pour évaluer au mieux l'effet de l'inhibition de RAD18 associée ou non aux irradiations sur les GIC, nous avons étudié le nombre de neurosphères par puits dans ces différentes conditions.

Les GIC transfectées avec RAD18 et irradiées forment moins de neurosphères de façon statistiquement significative que les cellules contrôles irradiées (Figure18).

### 5.2.3 Effet sur la survie



**Figure 19 : Effet de l'inhibition de RAD18 sur la survie.**

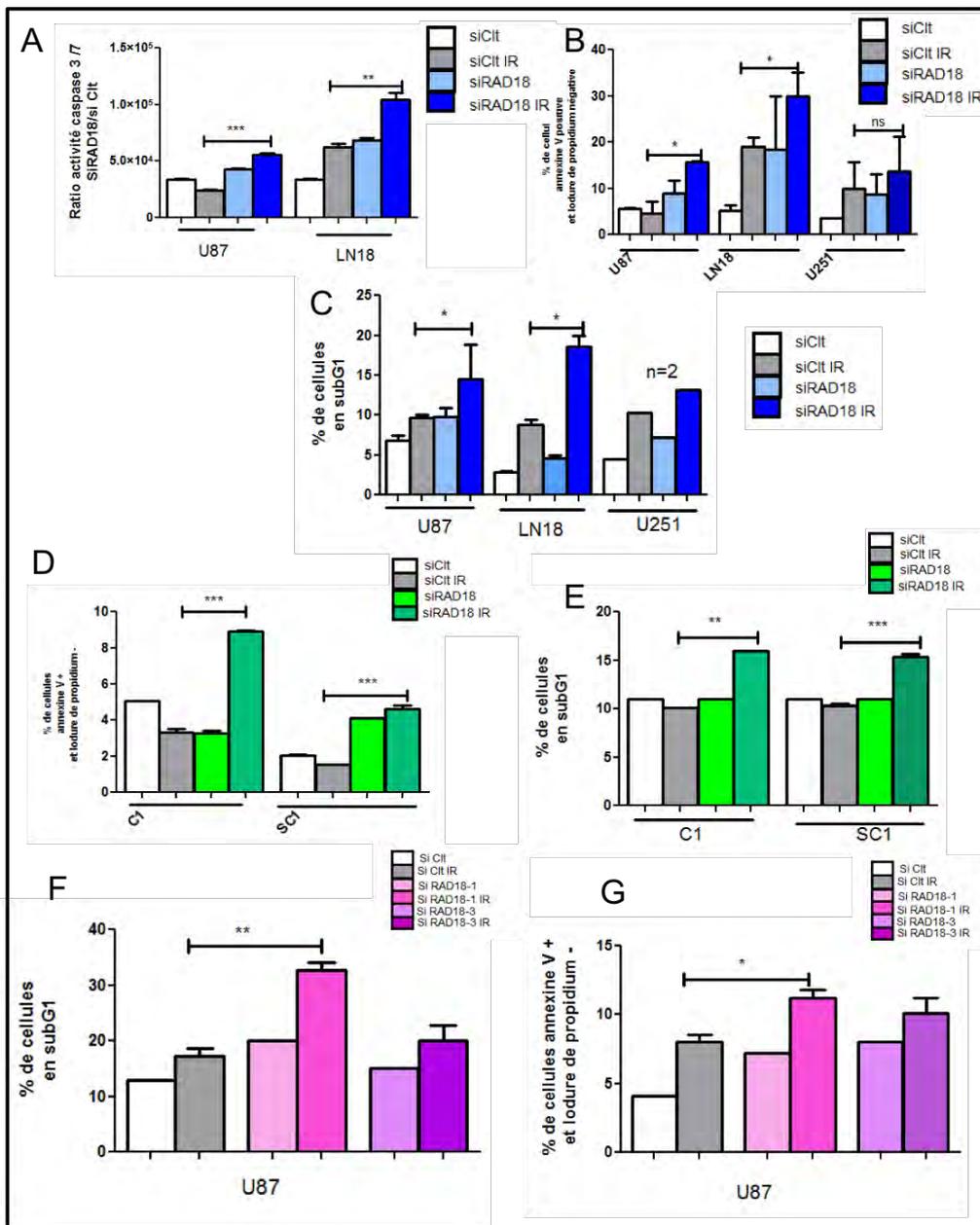
*Histogramme représentant le pourcentage de survie après ensemencement de 750 à 1500 cellules par puits après transfection transitoire avec siClt (barre blanche) ou siRAD18 (barre bleu clair) +/- irradiées (siClt : barre bleu clair, siRAD18 barre bleu foncé) et cultivé pendant 10 jours, comptage du nombre de clone obtenus après fixation et coloration au Crystal violet dans les lignées U87, LN18 et U251. Les résultats sont présentés comme les moyennes de 3 expériences indépendantes  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05 = (*)$ ,  $p \leq 0.01 = (**)$ ,  $p \leq 0.001 = (***)$   $n=3$ .*

Devant la diminution du nombre de cellules, nous avons vérifié l'effet de l'inhibition de RAD18 et des irradiations sur la survie (Figure 19). Pour cela, nous avons ensemencé les différentes lignées de GB transfectées de façon transitoire à des concentrations limites (1500, 1000, 750 cellules/puits) et continué à les cultiver pendant une dizaine de jours jusqu'à ce que les clones atteignent environ 50 cellules.

La figure 19 illustre que l'inhibition de RAD18 associée aux irradiations diminue fortement la survie de toutes les lignées de GB ATCC.

Nous avons cherché à savoir si ces diminutions du nombre de cellules, de la survie et de la formation de neurosphères pouvaient être dues à une augmentation de la mort cellulaire et/ou à un arrêt du cycle cellulaire.

## 5.2.4 Effet sur l'apoptose



**Figure 20 : Effet de l'apoptose dans les cellules de GB et les GIC.**

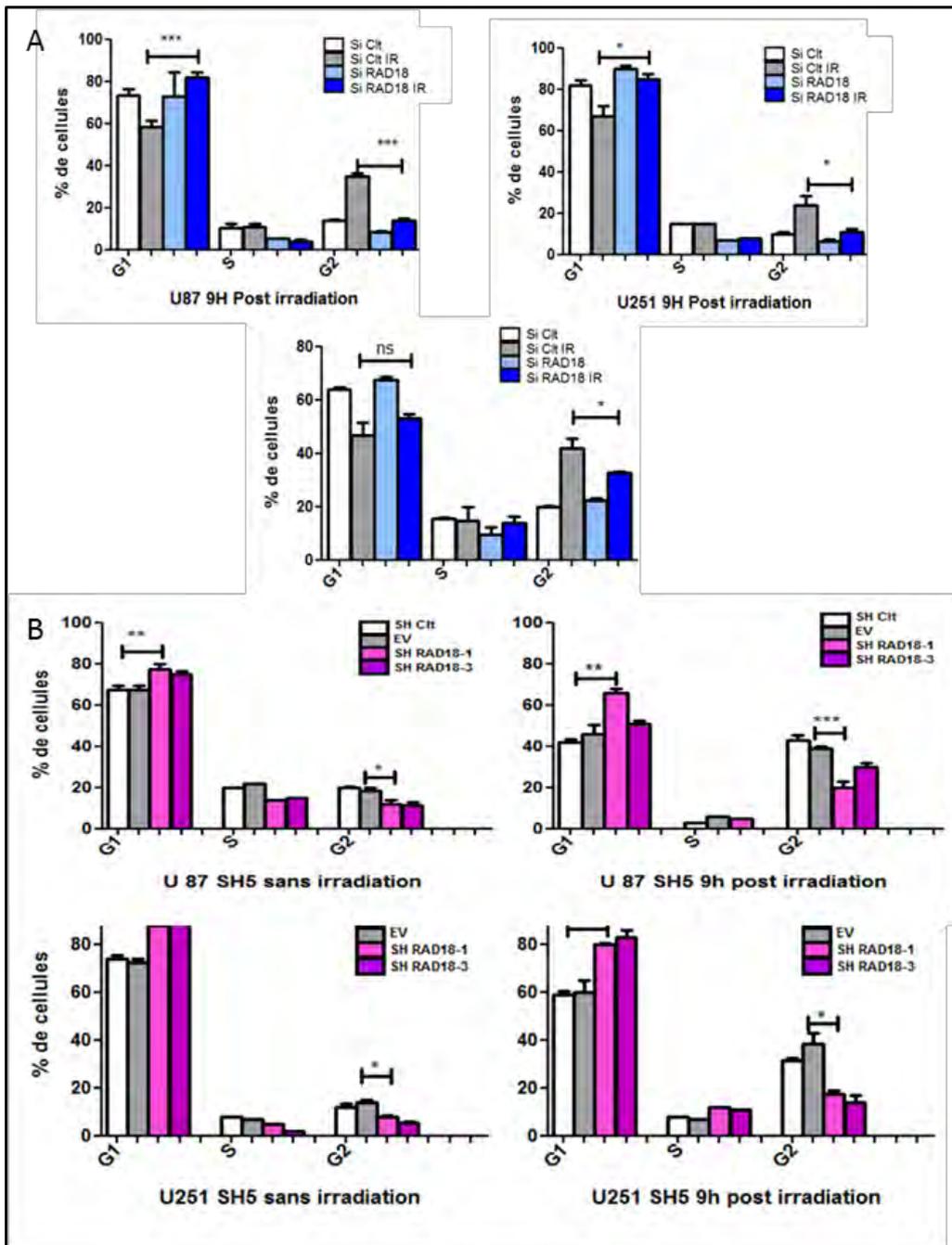
Les cellules sont transfectées avec un siClt ou un siRAD18 +/- irradiées et cultivées pendant 2 jours après irradiation jusqu'à analyse. **A.** Histogramme représentant l'activité caspase 3/7 dans les lignées U87 et LN18. **B. D.** Le pourcentage de cellules Annexine V+ et IP- dans les lignées ATCC (**B**) et les GIC (**D**). **C. E.** Le pourcentage de cellules en phase subG1 dans le cycle cellulaire dans les lignées ATCC (**C**) et dans les GIC (**E**). **F. G.** Les cellules de la lignée U87 sont transfectées de façon stable avec shClt ou shRAD18-1 ou 3 +/- irradiées et cultivées pendant 2 jours après irradiation jusqu'à analyse. Le pourcentage de cellules U87 Annexine V+ et IP- (**F**). Le pourcentage de cellules U87 en phase subG1 dans le cycle cellulaire (**G**). Les résultats sont présentés comme les moyennes de 3 expériences indépendantes  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05 = (*)$ ,  $p \leq 0.01 = (**)$ ,  $p \leq 0.001 = (***)$   $n=3$ .

Nous avons étudié l'effet de l'inhibition de RAD18 sur l'apoptose des cellules de GB et les GIC par trois méthodes différentes : par cytométrie en flux en mesurant les cellules positives pour le marquage à l'AnnexineV et négatives pour l'Iodure de Propidium (IP), par la population correspondant au subG1 dans l'étude du cycle cellulaire et par luminescence pour quantifier l'activité des caspases 3/7.

La figure 20 illustre que l'inhibition de RAD18 par transfection transitoire associée aux irradiations dans les lignées U87 et LN18 augmente le nombre de cellules AnnexineV V+/PI- par rapport aux cellules contrôles irradiées (Figure 20B). Ces données sont confirmées par l'augmentation de la population cellulaire en SubG1 et par l'augmentation de l'activité des caspases 3/7 dans ces deux lignées (Figure 20A, C). Pour la lignée U251 radiosensible, il existe une augmentation du marquage AnnexineV V+/IP- et du pourcentage des cellules en SubG1. Il en est de même pour les GIC et les cellules U87 avec une transfection stable (Figure 20D, E, F, G).

Ces résultats permettent d'expliquer en partie la diminution du nombre de cellules en réponse à l'inhibition de RAD18 et aux irradiations par une induction de la mort cellulaire par apoptose.

## 5.2.5 Effet sur le cycle cellulaire



**Figure 21 : Effet de l'inhibition de RAD18 sur le cycle cellulaire.**

Les cellules sont transfectées avec un siClf ou un siRAD18, +/- irradiées et cultivées pendant 9h après irradiation jusqu'à analyse. **A.** Histogrammes représentant le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire G1/S/G2/M dans les lignées ATCC, U87, LN18, U251.

Les cellules de la lignée U87 sont transfectées de façon stable avec shClf ou shRAD18-1 ou shRAD18-3. **B.** Histogrammes représentant le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire G1, S, G2/M. Les résultats sont présentés comme les moyennes de 3 expériences indépendantes  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05 = (*)$ ,  $p \leq 0.01 = (**)$ ,  $p \leq 0.001 = (***)$   $n=3$ .

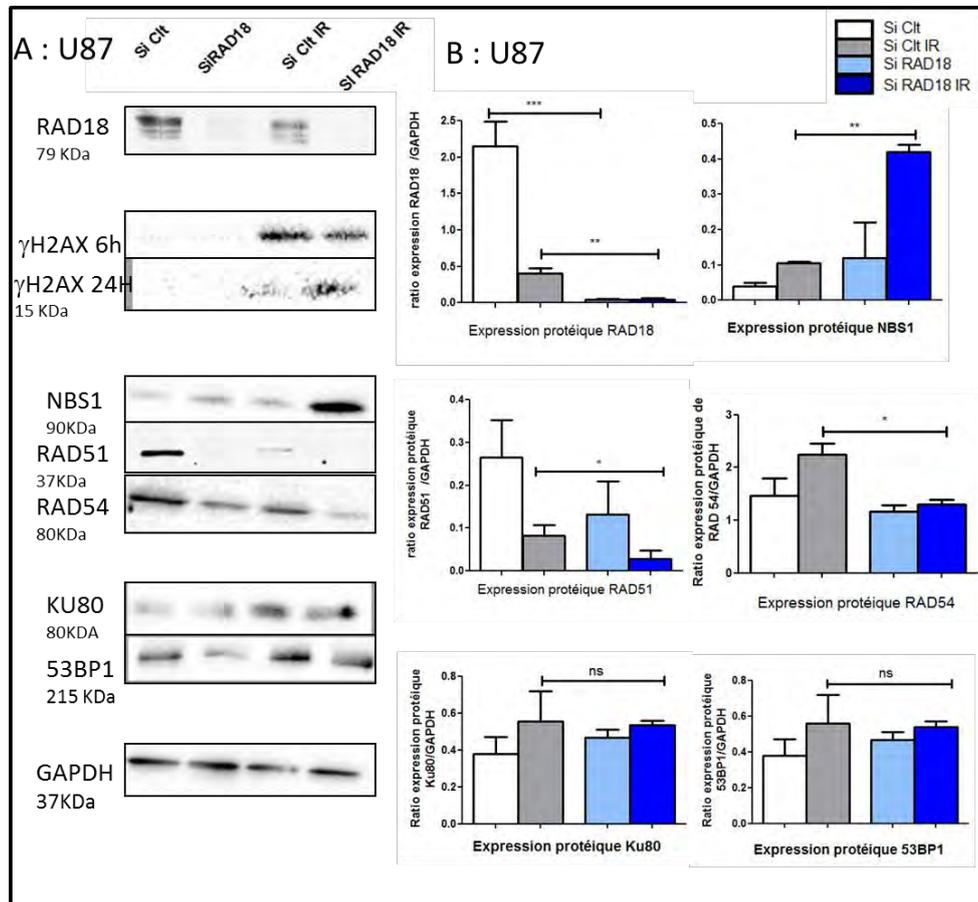
Suite aux résultats de diminution du nombre de cellules au sein des cellules présentant une inhibition de RAD18 associées aux irradiations, nous avons voulu savoir si cela entraînait des modifications du cycle cellulaire. Nous avons étudié ces paramètres par cytométrie en flux et marquage avec du IP après fixation et perméabilisation des cellules. Nous avons visualisé les cellules dans les 3 phases du cycle (G1, S, G2/M) grâce à la quantité d'ADN marqué par l'agent intercalant.

La figure 21A illustre le fait que dans les lignées U87, LN18 et U251, l'inhibition de RAD18 associée aux irradiations entraîne une augmentation statistiquement significative des cellules en phase G1. Ceci est corrélé à une diminution du nombre de cellules en phase S et G2/M. Ceci est également le cas pour les cellules U87 transfectées avec un ShARN RAD18 (Figure 21B).

Ainsi, la diminution du nombre de cellules peut aussi être expliquée par une modification du cycle cellulaire.

## 5.3 Etude des mécanismes de la radio sensibilisation des cellules

Ces résultats sont les mêmes sur l'ensemble des lignées de GB ATCC étudiées et pour les GIC.



**Figure 22: L'effet de l'inhibition de RAD18**

Les cellules sont transfectées avec un siCIt ou un siRAD18 +/- irradiées et cultivées pendant 2 jours après irradiation jusqu'à analyse dans les cellules U87. **A.** Immunoblots de RAD18,  $\gamma$ H2AX 6h post irradiation,  $\gamma$ H2AX 24h post irradiation, NBS1, RAD51, RAD54, Ku80 et 53BP1. La GAPDH correspond au contrôle de charge. **B.** Histogramme représentant l'expression protéique de RAD18, RAD51, NBS1, RAD54, Ku80 et 53BP1 en ratio par rapport à le GAPDH. Les résultats sont présentés comme les moyennes de 3 expériences indépendantes  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05 = (*)$ ,  $p \leq 0.01 = (**)$ ,  $p \leq 0.001 = (***)$   $n=3$ .

### **5.3.1 Effet sur les cassures double brins**

Nous avons étudié l'expression protéique par western blot d'un marqueur des cassures double brins de l'ADN :  $\gamma$ H2AX (Figure 22). Cette expression protéique est la même entre les cellules contrôles irradiées et les cellules présentant une inhibition de RAD18 de façon transitoire et irradiées. Cette expression protéique de  $\gamma$ H2AX est augmentée jusqu'à 24h post irradiation.

L'augmentation de l'expression totale de  $\gamma$ H2AX est témoin d'une persistance de cassures double brins dans les cellules où RAD18 est inhibée par rapport aux cellules contrôles. Ceci peut être dû à un dysfonctionnement des systèmes de réparation des cassures de l'ADN.

### **5.3.2 Expression des effecteurs de la réparation par RH**

Nous nous sommes intéressés à différents acteurs de la recombinaison homologe : RAD51, RAD54 et NBS1 (Figure 22). Nous avons étudié leur expression au niveau ARNm par RT-PCRq (RAD51) et protéique par Western Blot (RAD51, RAD54 et NBS1).

L'expression protéique de NBS1 est augmentée dans les cellules présentant une inhibition de RAD18 et irradiées par rapport aux cellules contrôles irradiées. C'est un second témoin de la persistance de cassures double brin d'ADN.

Les profils transcriptionnels (données non montrées) et protéiques de RAD51 sont identiques. L'inhibition de RAD18 associée aux irradiations est corrélée à une diminution de l'expression protéique de RAD51 par rapport à celle des cellules contrôles irradiées. La modification de l'expression protéique de RAD 54 est parallèle à celle de RAD51.

### **5.3.3 Expression des effecteurs de la réparation par NHEJ**

Nous nous sommes intéressés à différents acteurs de la recombinaison non homologue : Ku80 et 53BP1 (Figure 22). Nous avons étudié leur expression au niveau ARNm par RT-PCRq (53BP1) et/ou protéique (Ku80) par Western Blot.

Les profils transcriptionnels (données non montrées) et protéiques de 53BP1 sont identiques : augmentés dans les conditions irradiées que les cellules soient transfectées par un siRAD18 ou un siClf. La protéine Ku80 est plus exprimée dans les conditions irradiées.

## 5.4 Etude de l'expression de RAD18 sur des GB de patient

### 5.4.1 Caractéristiques générales de la population

Nous avons étudié 40 patients ayant eu une résection chirurgicale de GB (Tableau 3). 10 d'entre eux avaient deux résections disponibles : la résection initiale et la résection de la récursive.

Il existe une légère prédominance masculine avec un sexe-ratio de 1,3 : 17 femmes pour 23 hommes. Aucun cas ne présente de mutation IDH1 R132H.

L'âge moyen au moment du diagnostic est de 53,6 et l'âge médian est de 66 ans. Le statut de méthylation du promoteur de *MGMT* était disponible pour 23 patients : 16 d'entre eux présentent un promoteur *MGMT* méthylé. 16 patients présentent une surexpression de p53. Leur index de prolifération MIB1 est de 20 % en moyenne avec une médiane de 23 %. Il existe une surexpression d'EGFR dans 84 % des cas (32/38). L'expression d'ATRX n'est pas perdue dans l'ensemble des cas testés (25 cas).

Les localisations les plus fréquentes sont temporales (50 %, 20/40) puis frontales (33 %, 12/40) puis pariétales (7 %, 3/40) et occipitales (5 %, 2/40). 7,5 % (3/40) des patients présentent une tumeur multifocale dès le diagnostic.

Tous les patients ont bénéficié d'une exérèse chirurgicale. 34 patients ont été traités par radio-chimiothérapie concomitante par le protocole Stupp. 13 patients ont récidivé et 10 ont bénéficié d'une deuxième chirurgie. 9 patients ont été traités par Avastin et un par immunothérapie. 10 patients ont été perdus de vue. Le délai de surveillance moyen est de 262 jours. 15 patients sont décédés. Le délai moyen de survenue du décès est de 144 jours.

Numéro de cas	IRS score	H score	Sexe	Âge au diagnostic	Temps entre diagnostic et décès (Jours)	Temps de suivi (Jours)	EGFR	Méthylation de MGMT	IDH1 R132H	MIB	p53	Olig2	ATRX
1	2	10	M	71	212	212	+	Non	-	15	5	80	
2	2	10	M	52	436	436	+	Non	-	30	30	80	
3	2	10	M	68			+		-	25	5	70	+
4	4	20	M	63		382	+		-	25	30	60	+
5	4	20	M	73	369	369	+		-	40	5	80	+
6	4	20	M	78		272	-	Oui	-	15	30	50	+
7	4	20	M	54	251	251	+		-		5	80	+
8	4	20	F	64	44	44	+		-	15	5	70	+
9	2	20	M	63			+	Non	-	15	15	70	+
10	4	21	F	73	53			Oui	-	15	10	15	
11	3	21	M	76	196		+		-	20	20	60	
12	3	30	F	60			+	Non	-		1	50	+
13	6	30	F	68		280	+		-	30	5	30	+
14	4	30	F	64			+	Oui	-	20	5	50	
15	6	35	F	61		506	+	Non	-	20	15	80	+
16	4	40	M	71	113	113	+	Oui	-	25	5	60	
17	4	40	M	50	136	136	+	Oui	-	20	5	60	+
18	3	45	M	81			+		-	30	5	80	+
19	5	50	F	75		234	+	Oui	-	15	5	60	+
20	6	80	M	71				Oui	-	30	5	80	+
21	9	80	F	55		722	-		-	20	20	70	
22	9	80	F	82	240	240	-	Non	-	50	25	1	+
23	9	110	M	72	88	88	+		-	25	70	70	
24	6	110	M	60			+	Oui	-	15		70	
25	9	120	F	62		382	+		-	15	80	80	+
26	6	120	M	66	204	204	+	Oui	-	40	95	65	+
27	9	130	F	71		270	-		-	15	5	50	
28	9	130	M	73	128	128	+	Oui	-	30	5	60	
29	9	130	F	64	196	196	+	Oui	-	40	5	80	+
30	9	130	F	78	119	119	+	Non	-	20	50	60	+
31	6	140	F	78		355	+	Non	-	30	15	95	+
32	6	160	M	80			+	Oui	-	25	80	15	
33	9	170	M	68	463	463	+	Non	-	40	10	80	
34	9	170	M	64		262	+	Oui	-	25	60	50	
35	8	170	F	72			+	Non	-	25	90	30	+
36	9	170	M	56	51		+		-	40	20	70	
37	9	180	M	69			-	Oui	-	25	40	70	+
38	9	210	F	66		359	+	Oui	-	50	90	85	+
39	9	210	M	47		524	+	Non	-	60	80	90	+
40	9	230	F	71	82	82	-	Oui	-	35	90	90	+

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques et immunophénotypiques des 40 cas de GB de patient

#### 5.4.2 Données immunophénotypiques

Nous avons obtenu un marquage cytoplasmique et nucléaire avec l'anticorps anti-RAD18 (Figure 23). Le rôle de RAD18 est essentiellement nucléaire. Il semblerait que la forme cytoplasmique soit une forme de réserve, inactive. Seul le marquage nucléaire a été interprété à l'aide des scores H et du score IRS. Ce marquage est très hétérogène en fonction des échantillons et au sein d'un même échantillon.

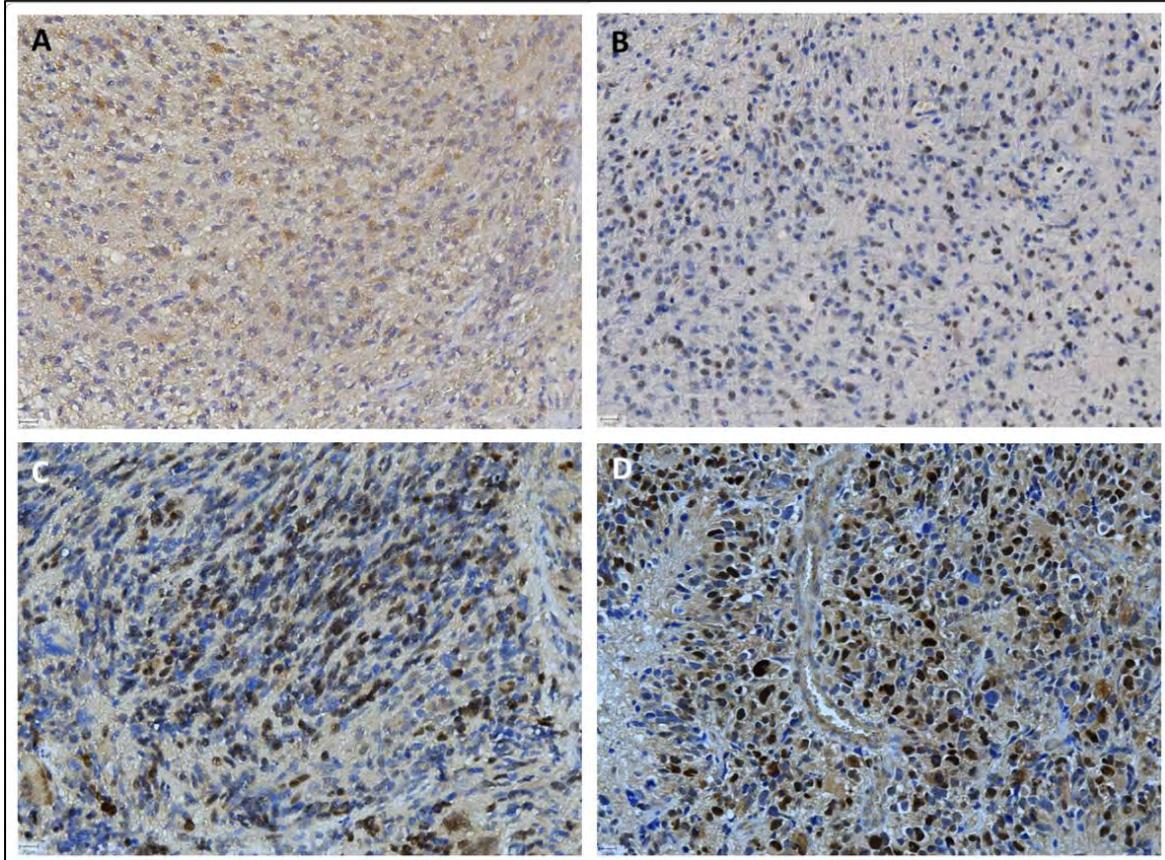


Figure 23 : Exemple d'immunomarquage avec l'anticorps anti-RAD18 par immunohistochimie sur 4 cas de GB

### 5.4.2.1 Score IRS

Score IRS		Score H	
RAD18+(>6)	16	RAD18+(>80)	18
RAD18-(>6)	24	RAD18-(>80)	22
Comparatif			
IRS RAD18+(>6) / Score H RAD18+(>80)		14	
IRS RAD18-(<6) / Score H RAD18-(<80)		20	
IRS RAD18+(>6) / Score H RAD18-(<80)		2	
IRS RAD18-(<6) / Score H RAD18+(>80)		4	

**Tableau 4 : Tableau représentatif des résultats obtenus avec le marquage de RAD18 sur les 40 GB de patient**

La répartition des scores d'immunomarquage IRS évaluant l'expression de RAD18 en immunohistochimie est résumée dans le tableau 4. La médiane du score IRS est de 6. La moyenne est de 6,63.

### 5.4.2.2 Score H

La répartition des scores H d'immunomarquage évaluant l'expression de RAD18 en immunohistochimie est résumée dans le tableau. La médiane du score H est de 55. La moyenne est de 80.

### 5.4.2.3 Comparaison des scores H et scores IRS

Le tableau 4 résume les résultats des deux scores. L'analyse de la répartition de ces deux scores montre deux populations distinctes de GB : ceux qui expriment fortement RAD18+ et ceux qui l'expriment faiblement RAD18-. Devant cette ségrégation de deux groupes, nous avons établi un seuil de positivité de 6 pour le score IRS et de 80 pour le score H. On note que 6 valeurs sont discordantes. Mais sans différence statistiquement significative entre ces deux méthodes.

#### 5.4.2.4 Comparaison des GB au diagnostic et à la récurrence

Numéro de cas	IRS score	H score	Diagnostic
3	2	10	GB
	2	10	RGB1
5	4	20	Gb
	4	20	RGB1
13	6	30	GB
	6	60	RGB1
20	6	80	Gb
	6	80	RGB1
21	9	80	GB
	1	1	RGB1
22	9	80	Gb
	1	5	RGB1
28	9	130	Gb
	1	1	RGB1
29	9	130	GB
	4	20	RGB1
36	9	170	Gb
	1	15	RGB1
37	9	180	Gb
	9	180	RGB1
38	9	210	GB
	3	60	RGB1

**Tableau 5 : Comparaison des scores IRS et scores H entre les GB et les récurrences.**

L'expression de RAD18 est très variable entre un GB au diagnostic et lors de sa récurrence. Il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre ces deux groupes (Tableau 5).

#### 5.4.3 Corrélation entre l'expression de RAD18 et d'autres marqueurs

Seuls les résultats obtenus avec le score H sont représentés.

##### 5.4.3.1 Sexe-ratio

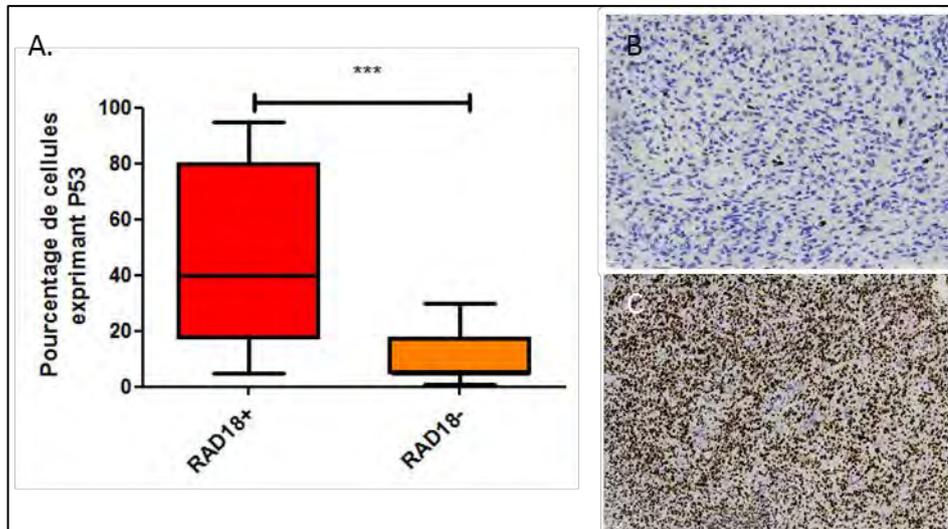
Sur les 17 femmes, 9 expriment faiblement RAD18 et 8 expriment fortement RAD18. Sur les 23 hommes, 13 expriment faiblement RAD18 et 10 expriment fortement RAD18. Il n'existe pas de lien statistiquement significatif entre l'expression de RAD18 et le sexe des patients.

##### 5.4.3.2 Âge

Les 18 cas qui expriment faiblement RAD18, ont une moyenne d'âge de 66,98 ans et une médiane d'âge de 68 ans. Les 22 cas qui expriment fortement RAD18, ont une moyenne d'âge

de 67,61 ans et 68,5 ans. Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre ces deux populations.

### 5.4.3.3 p53



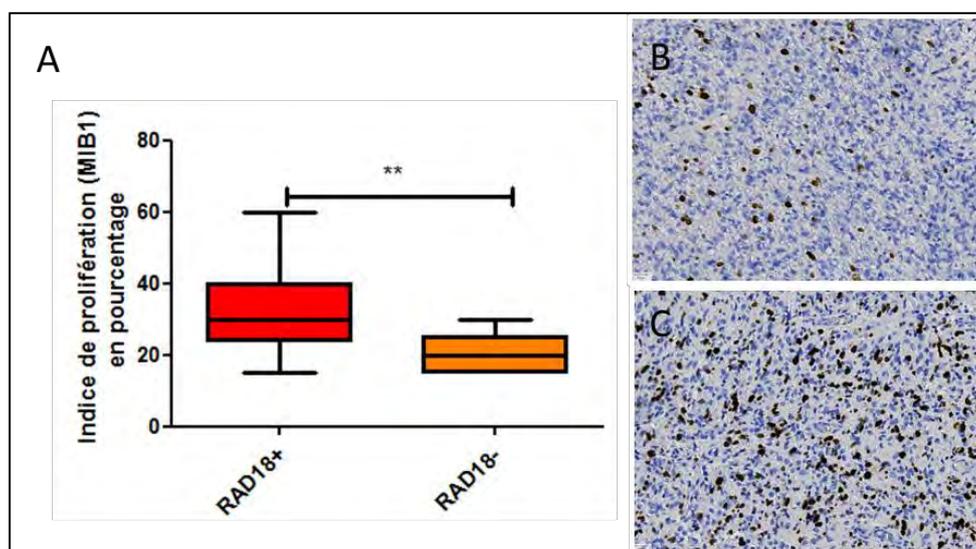
**Figure 24 : Comparaison du pourcentage de cellules exprimant p53 en fonction de l'expression de RAD18.**

**A.** Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme indiquant la moyenne et l'intervalle de confiance entre ces deux populations.  $p \leq 0.001 = (***)$ . **B.** Immunohistochimie avec l'anticorps anti-p53 : moins de 5 % de cellules sont positives (Cas RAD18 -). **C.** Immunohistochimie avec l'anticorps anti-p53 : plus de 90 % des cellules sont positives (Cas RAD18 +).

Nous avons étudié et mis en corrélation le pourcentage de cellules exprimant p53 et RAD18 (Figure 24). Les cellules de GB des cas RAD18- expriment p53 en moyenne dans 10,94 % des cellules avec un intervalle de confiance compris entre 5,734 et 16,15. Les cellules de GB des cas RAD18+ expriment en moyenne dans 47,38 % des cellules p53 avec un intervalle de confiance compris entre 32,27 et 62,49. Cette différence d'expression est statistiquement significative ( $p < 0.001$ )

Le coefficient de corrélation de Spearman est de 0,5868 définissant une corrélation forte entre l'expression de p53 et celle de RAD18. ( $p = 0,0001$ )

#### 5.4.3.4 MIB1



**Figure 25 : Comparaison de l'indice de prolifération et de l'expression de P53 dans les GB de patients exprimant ou non RAD18.**

**A.** Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme indiquant la moyenne et l'intervalle de confiance entre ces deux populations.  $p \leq 0.01 (= **)$ , **B.** Immunohistochimie avec l'anticorps anti-ki67/MIB1 : l'index de prolifération est estimé à 10-12 % (cas RAD18 -) **C.** Immunohistochimie avec l'anticorps anti-ki67/MIB1 : l'index de prolifération est estimé à 35 % (cas RAD18 +).

Nous avons étudié et mis en corrélation l'index de prolifération MIB1 et l'expression de RAD18 (Figure 25). Les cellules de GB des cas RAD18- ont un index de prolifération en moyenne de 21,25 % avec un intervalle de confiance compris entre 18,10 et 24,40 %. Les cellules de GB des cas RAD18+ ont un index de prolifération en moyenne 32,50 % avec un intervalle de confiance compris entre 26,70 et 38,30. Cette différence d'expression est statistiquement significative ( $p < 0.05$ ).

Le coefficient de corrélation de Spearman est de 0,1831, ne définissant pas de corrélation entre index de prolifération et l'expression de RAD18 ( $p = 0,2712$ ).

#### 5.4.3.5 MGMT

Nous avons étudié le statut de méthylation du promoteur de MGMT et l'expression de RAD18. Ce statut MGMT est disponible pour 23 patients. Pour les 10 cas RAD18-, 5 d'entre eux ne présentent pas de méthylation du promoteur de MGMT et 5 autres ont cette méthylation. Pour les 13 cas RAD18+, 8 d'entre eux présentent une méthylation du promoteur de MGMT et les 5 restants non. L'effectif est trop réduit pour les tests statistiques.

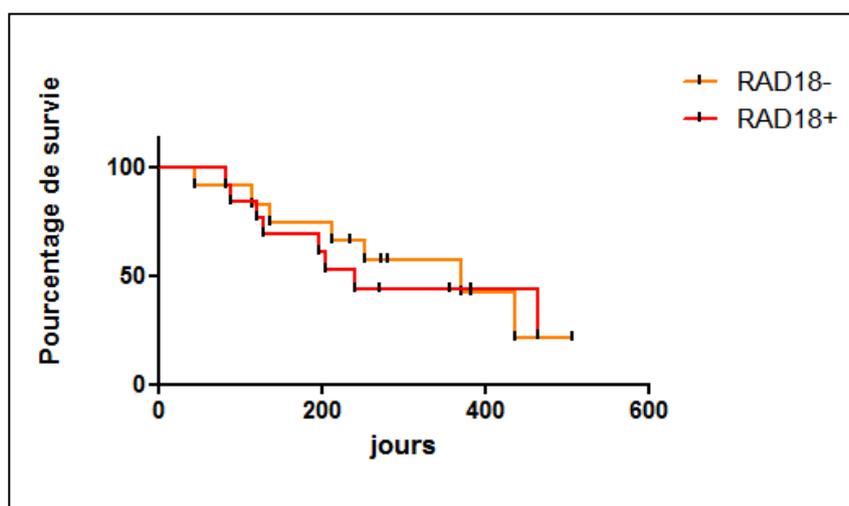
#### 5.4.3.6 EGFR

Nous avons étudié l'expression d'EGFR et l'expression de RAD18. Il existe une positivité de 84 % des cas avec l'anticorps anti-EGFR. Sur les 32 cas qui surexpriment la protéine EGFR, 15 présentent une expression forte de RAD18 et 17 l'expriment faiblement. Sur les 6 cas qui n'expriment pas EGFR, 3 expriment fortement RAD18 et les 3 autres l'expriment faiblement. Il n'existe pas de lien entre l'expression d'EGFR et celle de RAD18.

#### 5.4.3.7 ATRX

Nous avons étudié l'expression d'ATRAX et d'EGFR et l'expression de RAD18. Il existe une positivité de 100% des cas avec l'anticorps anti-ATRAX. Ainsi il n'existe pas de lien entre l'expression ATRAX et celle de RAD18.

#### 5.4.4 Corrélation entre l'expression de RAD18 et la survie



**Figure 26 : Courbes de survie des patients ayant des GB exprimant ou pas RAD18, sous forme de courbes de Kaplan Meier**

La médiane de survie pour les cas RAD18 - est de 369 jours et celle des cas RAD18+ est de 240 jours (Figure 26). Il n'y a pas de différence significative entre ces deux populations.

## 6 Discussion

Les GB sont des tumeurs invasives, radio-chimiorésistantes, qui récidivent rapidement. Ce caractère agressif reposerait sur la présence au sein de ces tumeurs hétérogènes, de GIC décrites comme tumorigènes et radiorésistantes. Les stratégies de recherche actuelles visent donc à cibler cette population. Kermi et al.<sup>86</sup> ont démontré que les GIC surexprimaient RAD18 et que l'inhibition de RAD18 potentialisait l'action du cisplatine avec une diminution de la viabilité cellulaire. En parallèle, les analyses *in silico* disponibles sur la base de données Rembrandt et TCGA montrent que les patients ayant un GB surexprimant RAD18 ont une survie significativement diminuée. RAD18 possède plusieurs rôles, notamment dans la signalisation et la réparation des cassures double brins. Par ces données de la littérature, nous avons donc émis l'hypothèse que RAD18 pouvait jouer un rôle dans les mécanismes de radiorésistance des GIC.

Pour mener à bien ce projet, nous avons inhibé l'expression de RAD18 par transfection transitoire afin d'étudier les effets de cette modulation sur les lignées différenciées de GB et les GIC irradiées. Nous avons choisi d'irradier ces cellules en deux fois (2Gy à 24h d'intervalle) pour être au plus près des traitements reçus par les patients<sup>89</sup>. Nous avons observé une diminution significative du nombre de cellules, de la survie dans l'ensemble des lignées de GB ATCC et une diminution de la formation des neurosphères pour les cellules GIC. Ceci montre un effet radiosensibilisant aux rayons gamma d'une inhibition de RAD18 dans les GIC. Nous avons étudié deux mécanismes pouvant être à l'origine de cette diminution du nombre de cellules : une altération du cycle cellulaire et une induction de la mort cellulaire.

Les cellules des lignées LN18, U87 et U251 transfectées avec le siRAD18 et irradiées présentent une population cellulaire augmentée en phase G1 associée à une diminution des cellules en phase G2/M ou S. Ceci peut être la preuve d'un ralentissement ou d'un arrêt du cycle cellulaire. Il faudrait compléter ces résultats par un double marquage RAD18 et BrdU pour savoir si les cellules inhibées pour RAD18 sont en cycle (BrdU+) ou non.

Les cellules irradiées avec une inhibition de RAD18 présentent une augmentation du pourcentage de cellules marquées par l'Annexine V+/IP- de 5 à 40 % de la population étudiée, témoin d'une mort cellulaire induite par apoptose. Ces résultats correspondent à ceux décrits dans la littérature notamment dans l'article de Xie et al.<sup>87</sup>. Ces données ont été

vérifiées par deux autres méthodes : le pourcentage de cellules en SubG1 et l'activité des caspases 3 et 7. L'accumulation de lésions de l'ADN dans les cellules irradiées peut entraîner une induction de l'apoptose dans ces cellules. Mais, l'induction de la mort par apoptose n'est qu'une des voies de mort induite par les rayons gamma. Certains auteurs ont montré que la déplétion de RAD18 dans les cellules colorectales entraînait une augmentation de formation de micronoyaux<sup>90</sup>. Il serait intéressant de compléter ces premières observations par l'étude de la mort post mitotique ceci par le biais de l'utilisation de l'immunofluorescence et le marquage par DAPI pour compter les micronoyaux témoins de cette mort ainsi que la multiplication des centrosomes. Nos premiers résultats permettent d'expliquer la diminution du nombre de cellules de GB via l'augmentation de l'induction d'apoptose et un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire.

Les irradiations vont créer de multiples cassures sur les brins d'ADN qui doivent être réparées ou tolérées par la cellule pour poursuivre le cycle cellulaire. La cellule mettra en place un blocage à certains *check-points* pour permettre la réparation des différentes lésions de l'ADN. RAD18 est un partenaire de la réparation et de la signalisation des cassures de l'ADN et sa surexpression permet d'ignorer certains de ces *check-points*<sup>86</sup>. L'expression protéique de  $\gamma$ H2AX persistant 24h post irradiation est le témoin d'un nombre de cassures d'ADN plus important dans les cellules où RAD18 est inhibé par rapport aux contrôles. Ceci a été observé par western blot pour l'ensemble des lignées (U87, LN18, U251) et GIC (C1 et SC1) étudiées. Devant cette augmentation, plusieurs hypothèses sont possibles : un dysfonctionnement des systèmes de réparation ou une tolérance face à ces lésions. Nous avons donc étudié l'expression protéique des principaux acteurs de la réparation (RAD51 et 53BP1)<sup>84,91</sup> présentant une interaction avec RAD18, ainsi que RAD54, NBS1 et Ku 80. La signalisation des cassures double brins ne semble pas être altérée car l'expression protéique de NBS1 (composant du complexe « senseur » MRN) est augmentée après irradiation dans les cellules où RAD18 est inhibé<sup>92</sup>. Ceci permet théoriquement l'orientation de la cellule vers une réparation par la RH. Dans les cellules irradiées et inhibées pour RAD18, l'expression protéique totale de RAD51 et RAD54 est diminuée. Ces deux acteurs sont en aval de la cascade de la RH. La diminution du niveau de RAD51 en parallèle d'une inhibition de RAD18 a été précédemment décrite dans la littérature<sup>93</sup>. RAD18 interagit directement avec RAD51c un des composants essentiels de RAD51<sup>83</sup>. Nous pouvons supposer que l'absence de RAD18 peut entraîner une diminution ou même l'absence de RAD51c dans le complexe RAD51, ce qui compromettrait sa stabilité. Ceci aurait pour conséquence un arrêt de la RH. Si

la RH est arrêtée, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'action de RAD54 sera diminuée à son tour puisque celle-ci n'est possible qu'en association avec RAD51. Pour vérifier l'interaction pouvant exister entre RAD18 et RAD51, il serait intéressant d'utiliser un siARN dirigé contre RAD51 au sein des cellules de GB et de regarder l'expression de RAD18.

L'absence de modification des niveaux d'expression des protéines impliquées dans la NHEJ démontre un rôle moindre de RAD18 dans cette voie de réparation. Ainsi, l'hypothèse principale de l'action de l'inhibition de RAD18 dans le GB serait son action sur la RH. Nous comparons ici des différences d'expression protéique totale sans connaître la localisation de chacune d'entre elles. Ainsi un complément d'information serait nécessaire en utilisant l'immunofluorescence pour compter et observer la localisation des foci de ces protéines telles que RAD18, RAD51 et 53BP1.

Nous avons mis en place des cellules U87 inhibant RAD18 via deux shARN différents dirigés contre RAD18. Les séquences de ces shARN étaient toutes différentes de celle du siARN utilisé. L'efficacité de ces 3 constructions pour inhiber l'expression de RAD18 limite les possibles effets hors cibles de ces shARN et siARN. Les cellules dont l'expression de RAD18 est diminuée à long terme, présentent une diminution du nombre de cellules lors de l'irradiation via des modifications du cycle et l'induction de la mort par apoptose. Cette inhibition par transfection stable devrait permettre l'étude de l'inhibition de RAD18 sur la croissance tumorale et la radiosensibilisation dans des modèles animaux par xélogreffes orthotopiques ou sous-cutanées. Il serait intéressant de pouvoir étendre cette technique à d'autres lignées et aux GIC.

Devant ces résultats, *in vitro* prometteurs, nous avons voulu nous concentrer sur des cas de GB de patients. Les études immunohistochimiques nous montrent une expression variable de RAD18 au sein des GB. Cette série reste assez petite (40 cas de GB et 10 récurrences) mais est représentative de la population générale touchée par cette tumeur en termes d'âge, de sexe-ratio et de profil immunohistochimique.

Le marquage obtenu avec l'anticorps anti-RAD18 est à la fois cytoplasmique et nucléaire. Seul le marquage nucléaire a été évalué par les scores IRS et les scores H. En effet, l'expression de RAD18 au niveau cytoplasmique correspond à une protéine non active<sup>94</sup>. Il existe une hétérogénéité d'expression importante de cette protéine, sur des cas différents ou au sein d'un même cas. Ceci peut être expliqué par l'hétérogénéité majeure des cellules de GB. Cette expression variable a été démontrée à l'aide de deux scores d'évaluation le score H

et le score IRS. Il existe quelques différences de score mais non significatives entre ces deux marquages. Il semble tout de même que le Score H s'adapte plus aux différences de marquage dans une tumeur hétérogène<sup>95</sup>.

L'expression de RAD18 ne semble pas liée à l'âge ni au sexe de la population étudiée. Il semble ne pas exister de lien entre le statut méthylé ou non du promoteur de *MGMT* et l'expression de RAD18. Il en est de même pour la surexpression d'EGFR et la conservation de l'expression d'ATRAX. La comparaison de l'expression de RAD18 et des différents marqueurs immunohistochimiques employés en routine a souligné deux relations statistiquement significatives. Une expression intense de RAD18 est associée à une augmentation de l'index de prolifération. Ceci fait écho aux données montrées in vitro sur le ralentissement du cycle cellulaire en cas d'inhibition d'expression de RAD18.

Il existe également une corrélation entre l'expression de RAD18 et l'expression de p53. Cette relation est intéressante car il a été récemment publié que p53 peut réguler l'expression de RAD18 dans les cellules de cancer du côlon en tant que facteur de transcription<sup>96</sup>. p53 entre également en jeu au sein d'un supra-moléculaire avec RAD6, un des partenaires connus de RAD18<sup>97</sup> via une stabilisation par mono-ubiquitinylation dans le cancer du sein. Cette étude suggère que RAD18 entre en jeu dans ce complexe avec p53 et montre un nouveau lien entre ces deux protéines. Via deux processus différents, p53 et RAD18 semblent liés et avoir un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, notamment l'arrêt en phase G2/M. Cette piste découverte dans les échantillons tissulaires des patients doit être explorée au sein des cellules différenciées et initiatrices de GB.

En terme de survie, il n'y a pas de différence dans notre série entre les tumeurs RAD18+ et RAD18-, alors que les études transcriptomiques de la TCGA et de la base Rembrandt montraient une différence de survie. Notre série est probablement trop restreinte. Notre étude de l'expression de RAD18 entre les GB au diagnostic et leurs récurrences reste trop succincte et non exploitable en l'état. Il est toutefois à noter que Xie et al.<sup>87</sup> ont démontré une augmentation de RAD18 dans les récurrences. Ceci est probablement dû au fait que notre série est toutefois assez petite et que le suivi des patients est assez court. Il conviendrait donc de l'élargir et de suivre à plus long terme ces patients.

## 7 Perspectives

La découverte d'inhibiteurs de la RH est une voie à privilégier dans le traitement des GB, en effet les GIC utilisent préférentiellement la voie de la RH face aux lésions de l'ADN provoquées par le traitement. Il en est de même pour les cellules de GB pour corriger les lésions de l'ADN liées à la radiothérapie<sup>98</sup>. Il a été démontré que cibler cette voie augmente la radiosensibilité de ces cellules ce qui est en accord avec nos résultats<sup>99</sup>. Les GIC présentent une activité basale augmentée de la réparation via la voie des Single Stand Break Repair<sup>100</sup>. Ainsi l'inhibition de RAD18 associée à un inhibiteur de PARP<sup>101</sup> (en essai clinique phase I actuellement : « *Olaparib and Temozolomide in Treating Patients With Relapsed Glioblastoma* ») pourrait potentialiser l'effet radiosensibilisant attendu notamment dans les GIC.

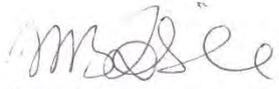
## 8 Conclusion

Nous avons démontré que l'inhibition de RAD18 a une action radiosensibilisante sur l'ensemble des lignées étudiées et notamment sur les cellules initiatrices de glioblastome. Cette étude apporte de nouveaux éléments sur le mode d'action de RAD18 dans la recombinaison homologe, en particulier via RAD51. Nous avons démontré une action directe jusqu'alors inconnue de RAD18 sur le cycle cellulaire. L'étude d'une série de patients permet d'enrichir cette démonstration, en confirmant la relation entre indice de prolifération MIB1 et niveau d'expression de RAD18 sur des échantillons tissulaires de glioblastomes. Dans cette série, nous décrivons pour la première fois, une corrélation entre le niveau d'expression de p53 et celui de RAD18 ; ceci ouvre un champ d'investigation avec des perspectives sur de nouvelles cibles thérapeutiques exploitant cette possible interdépendance. Inhiber simultanément plusieurs voies de réparation et de tolérance des dommages à l'ADN devrait être un moyen efficace de sensibiliser les glioblastomes à leur thérapie. L'implication de RAD18 dans plusieurs mécanismes de réparation des lésions de l'ADN en fait une cible thérapeutique de choix.

Vu permis d'imprimer  
Le Doyen de la Faculté  
De Médecine Rangueil

E. SERRANO

08.09.2017

  
Anatomie et Cytologie Pathologiques  
Pr. M.B. DELISLE  
Hôpital de RANGUEIL  
1, Avenue J. Poulhès - TSA 50032  
31059 TOULOUSE Cedex 9  
Téléphone 05 61 32 28 48  
Télécopie 05 61 32 21 27

## 9 Bibliographie

1. Louis, D. N. *et al.* *WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System*. (International Agency for Research Cancer, 2016).
2. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
3. Park, J. K. *et al.* Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3838–3843 (2010).
4. Zhang, J., Stevens, M. F. G. & Bradshaw, T. D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 102–114 (2012).
5. Berndsen, C. E. & Wolberger, C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 301–307 (2014).
6. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **109**, 93–108 (2005).
7. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncol.* **16**, iv1-iv63 (2014).
8. Bauchet, L. *et al.* Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004. *Neuro-Oncol.* **12**, 725–735 (2010).
9. Gramatzki, D. *et al.* Glioblastoma in the Canton of Zurich, Switzerland revisited: 2005 to 2009. *Cancer* **122**, 2206–2215 (2016).
10. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **170**, 1445–1453 (2007).
11. Laws, E. R. *et al.* Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J. Neurosurg.* **99**, 467–473 (2003).
12. Cha, S. Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **27**, 475–487 (2006).
13. Negendank, W. G. *et al.* Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. *J. Neurosurg.* **84**, 449–458 (1996).
14. Noble, M., Wren, D. & Wolswijk, G. The O-2A(adult) progenitor cell: a glial stem cell of the adult central nervous system. *Semin. Cell Biol.* **3**, 413–422 (1992).
15. Mayer-Proschel, M., Kalyani, A. J., Mujtaba, T. & Rao, M. S. Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* **19**, 773–785 (1997).
16. Suvà, M. L. *et al.* Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* **157**, 580–594 (2014).
17. Ichimura, K., Schmidt, E. E., Miyakawa, A., Goike, H. M. & Collins, V. P. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes. Chromosomes Cancer* **22**, 9–15 (1998).
18. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068 (2008).
19. von Deimling, A. *et al.* Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* **77**, 295–301 (1992).

20. Barker, F. G. *et al.* EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **51**, 410–418 (2001).
21. Weller, M. *et al.* Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5743–5750 (2009).
22. Huang, S. C. *et al.* Genetic heterogeneity in familial juvenile polyposis. *Cancer Res.* **60**, 6882–6885 (2000).
23. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323–331 (1997).
24. Nakamura, M. *et al.* p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **11**, 159–168 (2001).
25. Killela, P. J. *et al.* TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6021–6026 (2013).
26. Bell, R. J. A. *et al.* Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* **348**, 1036–1039 (2015).
27. de Vries, N. A. *et al.* Prolonged Ezh2 Depletion in Glioblastoma Causes a Robust Switch in Cell Fate Resulting in Tumor Progression. *Cell Rep.* (2015). doi:10.1016/j.celrep.2014.12.028
28. Brennan, C. W. *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477 (2013).
29. Esteller, M. & Herman, J. G. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* **23**, 1–8 (2004).
30. Wrensch, M. *et al.* Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *Am. J. Epidemiol.* **145**, 581–593 (1997).
31. Yong, W. H., Raffel, C., von Deimling, A. & Louis, D. N. The APC gene in Turcot's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **333**, 524 (1995).
32. Lucci-Cordisco, E., Zito, I., Gensini, F. & Genuardi, M. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *Am. J. Med. Genet. A.* **122A**, 325–334 (2003).
33. Jeannin, S. *et al.* [Turcot's syndrome confirmed by molecular biological tests]. *Rev. Neurol. (Paris)* **162**, 741–746 (2006).
34. Hamilton, S. R. *et al.* The molecular basis of Turcot's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **332**, 839–847 (1995).
35. Varley, J. M. *et al.* Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res.* **57**, 3245–3252 (1997).
36. Ward, B. A. & Gutmann, D. H. Neurofibromatosis 1: from lab bench to clinic. *Pediatr. Neurol.* **32**, 221–228 (2005).
37. Huttner, A. J. *et al.* Clinicopathologic study of glioblastoma in children with neurofibromatosis type 1. *Pediatr. Blood Cancer* **54**, 890–896 (2010).
38. Burger, P. C., Heinz, E. R., Shibata, T. & Kleihues, P. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* **68**, 698–704 (1988).
39. Demuth, T. & Berens, M. E. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Migration and Invasion.

*J. Neurooncol.* **70**, 217–228 (2004).

40. Sullivan, J. P. *et al.* Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov.* **4**, 1299–1309 (2014).
41. Colin, C. *et al.* Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **33**, 431–439 (2007).
42. Hirsch, F. R. *et al.* Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3798–3807 (2003).
43. Capper, D. *et al.* Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **20**, 245–254 (2010).
44. Singapore Cancer Network (SCAN) Neuro-Oncology Workgroup. Singapore Cancer Network (SCAN) Guidelines for Systemic Therapy of High-Grade Glioma. *Ann. Acad. Med. Singapore* **44**, 463–473 (2015).
45. Wilson, T. A., Karajannis, M. A. & Harter, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* **5**, 64 (2014).
46. Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **10**, 459–466 (2009).
47. Barone, D. G., Lawrie, T. A. & Hart, M. G. Image guided surgery for the resection of brain tumours. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD009685 (2014). doi:10.1002/14651858.CD009685.pub2
48. Bai, R.-Y., Staedtke, V. & Riggins, G. J. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol. Med.* **17**, 301–312 (2011).
49. Patel, M. A. *et al.* Agonist anti-GITR monoclonal antibody and stereotactic radiation induce immune-mediated survival advantage in murine intracranial glioma. *J. Immunother. Cancer* **4**, 28 (2016).
50. Patel, M. A., Kim, J. E., Ruzevick, J., Li, G. & Lim, M. The Future of Glioblastoma Therapy: Synergism of Standard of Care and Immunotherapy. *Cancers* **6**, 1953–1985 (2014).
51. Yamanaka, R. Cell- and peptide-based immunotherapeutic approaches for glioma. *Trends Mol. Med.* **14**, 228–235 (2008).
52. Stupp, R. *et al.* Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **314**, 2535–2543 (2015).
53. Srivenugopal, K. S., Yuan, X. H., Friedman, H. S. & Ali-Osman, F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 1328–1334 (1996).
54. Fang, J. Y. *et al.* Regulation of hMSH2 and hMLH1 expression in the human colon cancer cell line SW1116 by DNA methyltransferase 1. *Cancer Lett.* **233**, 124–130 (2006).
55. Wood, R. D., Mitchell, M. & Lindahl, T. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat. Res.* **577**, 275–283 (2005).
56. Curtin, N. J. *et al.* Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc.*

*Cancer Res.* **10**, 881–889 (2004).

57. Deriano, L. & Roth, D. B. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 433–455 (2013).
58. Johnson, R. D. & Jasin, M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.* **19**, 3398–3407 (2000).
59. San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229–257 (2008).
60. Ellor, S. V., Pagano-Young, T. A. & Avgeropoulos, N. G. Glioblastoma: background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. *J. Law Med. Ethics J. Am. Soc. Law Med. Ethics* **42**, 171–182 (2014).
61. Walid, M. S. Prognostic factors for long-term survival after glioblastoma. *Perm. J.* **12**, 45–48 (2008).
62. Roder, C. *et al.* Maximizing the extent of resection and survival benefit of patients in glioblastoma surgery: high-field iMRI versus conventional and 5-ALA-assisted surgery. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* **40**, 297–304 (2014).
63. Pallud, J. *et al.* Prognostic value of initial magnetic resonance imaging growth rates for World Health Organization grade II gliomas. *Ann. Neurol.* **60**, 380–383 (2006).
64. Pope, W. B. *et al.* MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **26**, 2466–2474 (2005).
65. Simpson, J. R. *et al.* Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **26**, 239–244 (1993).
66. Hirai, T. *et al.* Prognostic value of perfusion MR imaging of high-grade astrocytomas: long-term follow-up study. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **29**, 1505–1510 (2008).
67. Verhaak, R. G. W. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110 (2010).
68. Heimberger, A. B. *et al.* Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 1462–1466 (2005).
69. Korshunov, A., Sycheva, R. & Golanov, A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer* **104**, 825–832 (2005).
70. Chakravarti, A. *et al.* Immunohistochemically determined total epidermal growth factor receptor levels not of prognostic value in newly diagnosed glioblastoma multiforme: report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **62**, 318–327 (2005).
71. Sano, T. *et al.* Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res.* **59**, 1820–1824 (1999).
72. Bailly, V., Lamb, J., Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L. Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev.* **8**, 811–820 (1994).
73. Tateishi, S. *et al.* Enhanced genomic instability and defective postreplication repair in RAD18

- knockout mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 474–481 (2003).
74. Ting, L., Jun, H. & Junjie, C. RAD18 lives a double life: Its implication in DNA double-strand break repair. *DNA Repair* **9**, 1241–1248 (2010).
75. Fanning, E., Klimovich, V. & Nager, A. R. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res.* **34**, 4126–4137 (2006).
76. Davies, A. A., Huttner, D., Daigaku, Y., Chen, S. & Ulrich, H. D. Activation of Ubiquitin-Dependent DNA Damage Bypass Is Mediated by Replication Protein A. *Mol. Cell* **29**, 625–636 (2008).
77. Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–141 (2002).
78. Friedberg, E. C. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 943–953 (2005).
79. Brun, J., Chiu, R. K., Wouters, B. G. & Gray, D. A. Regulation of PCNA polyubiquitination in human cells. *BMC Res. Notes* **3**, 85 (2010).
80. Szüts, D., Simpson, L. J., Kabani, S., Yamazoe, M. & Sale, J. E. Role for RAD18 in Homologous Recombination in DT40 Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8032–8041 (2006).
81. Simpson, L. J. *et al.* RAD18-independent ubiquitination of proliferating-cell nuclear antigen in the avian cell line DT40. *EMBO Rep.* **7**, 927–932 (2006).
82. Yamashita, Y. M. *et al.* RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *EMBO J.* **21**, 5558–5566 (2002).
83. Huang, J. *et al.* RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* **11**, 592–603 (2009).
84. Kobayashi, S. *et al.* Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining. *Oncogene* **34**, 4403–4411 (2015).
85. Kolas, N. K. *et al.* Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* **318**, 1637–1640 (2007).
86. Kermi, C. *et al.* RAD18 Is a Maternal Limiting Factor Silencing the UV-Dependent DNA Damage Checkpoint in *Xenopus* Embryos. *Dev. Cell* **34**, 364–372 (2015).
87. Xie, C. *et al.* RAD18 mediates resistance to ionizing radiation in human glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**, 263–268 (2014).
88. Avril, T. *et al.* Human glioblastoma stem-like cells are more sensitive to allogeneic NK and T cell-mediated killing compared with serum-cultured glioblastoma cells. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **22**, 159–174 (2012).
89. Stupp, R. *et al.* Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 2712–2718 (2010).
90. Sasatani, M. *et al.* RAD18 activates the G2/M checkpoint through DNA damage signaling to maintain genome integrity after ionizing radiation exposure. *PLoS One* **10**, e0117845 (2015).
91. Watanabe, K. *et al.* RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1. *Nucleic Acids Res.* **37**, 2176–2193 (2009).

92. Komatsu, K. NBS1 and multiple regulations of DNA damage response. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **57 Suppl 1**, i11–i17 (2016).
93. Tripathi, K., Mani, C., Clark, D. W. & Palle, K. Rad18 is required for functional interactions between FANCD2, BRCA2, and Rad51 to repair DNA topoisomerase 1-poisons induced lesions and promote fork recovery. *Oncotarget* **7**, 12537–12553 (2016).
94. Notenboom, V. *et al.* Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5819–5830 (2007).
95. Fedchenko, N. & Reifenrath, J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn. Pathol.* **9**, (2014).
96. Fischer, M., Quaas, M., Steiner, L. & Engeland, K. The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* **44**, 164–174 (2016).
97. Lyakhovich, A. & Shekhar, M. P. V. Supramolecular complex formation between Rad6 and proteins of the p53 pathway during DNA damage-induced response. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2463–2475 (2003).
98. Fontana, A. O. *et al.* Differential DNA repair pathway choice in cancer cells after proton- and photon-irradiation. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **116**, 374–380 (2015).
99. Lim, Y. C. *et al.* Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells. *Mol. Oncol.* **8**, 1603–1615 (2014).
100. Venere, M. *et al.* Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ.* **21**, 258–269 (2014).
101. Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M. J., Kaufmann, S. H. & Poirier, G. G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 293–301 (2010).

## **RAD18 ET GLIOBLASTOME, VERS UN NOUVEL OUTIL DE RADIOSENSIBILISATION**

---

### **RESUME EN FRANÇAIS :**

Le glioblastome (GB) est la tumeur cérébrale la plus maligne, caractérisée par sa résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Cette agressivité repose en partie sur la présence de cellules initiatrices de glioblastomes (GIC). La radiorésistance implique une surexpression des systèmes de réparation de l'ADN. La protéine RAD18 est une cible de choix du fait de son action à plusieurs niveaux dans les mécanismes de réparation de l'ADN et de sa surexpression dans les glioblastomes.

Cette étude a consisté à étudier l'effet radiosensibilisant d'une inhibition de RAD18 sur différentes lignées cellulaires de glioblastomes et dans des GIC. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'expression de RAD18 et de protéines associées à son action dans une série de 50 échantillons tissulaires de GB.

Sur les cultures cellulaires, nous avons démontré que l'inhibition de RAD18 entraînait une diminution de la survie, un ralentissement du cycle cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire par apoptose. Cette dernière est induite par une accumulation de cassures double brins liée à une diminution de la recombinaison homologue. Les GB ont une expression variable de RAD18. Cette expression est corrélée à celle de p53 et à l'indice de prolifération MIB1.

Le développement d'inhibiteurs de RAD18 pourrait être une nouvelle voie thérapeutique vers la radiosensibilisation des GB.

---

**TITRE EN ANGLAIS :** RAD18 and glioblastoma, towards a new radiosensibilisation tool.

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE:** Médecine spécialisée clinique

---

**MOTS-CLÉS** RAD18, Glioblastome, Système de réparation de l'ADN, Immunohistochimie

---

**INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Université Toulouse III-Paul Sabatier  
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,  
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

---

**Directeur de thèse :** Pr Emmanuelle URO-COSTE